



HAL
open science

Encapsulation de cellules souches pluripotentes pour développer et produire à l'échelle des thérapies cellulaires biomimétiques

Philippe Cohen

► **To cite this version:**

Philippe Cohen. Encapsulation de cellules souches pluripotentes pour développer et produire à l'échelle des thérapies cellulaires biomimétiques. Biologie cellulaire. Université Paris Cité, 2022. Français. NNT : 2022UNIP7170 . tel-04347678

HAL Id: tel-04347678

<https://theses.hal.science/tel-04347678v1>

Submitted on 15 Dec 2023

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 Frontières Du Vivant (ED 474)

Institut Imagine (Paris), Plateforme iPS

TreeFrog Therapeutics (Pessac), Équipe R

ENCAPSULATION DE CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES POUR DEVELOPPER ET PRODUIRE A L'ECHELLE DES THERAPIES CELLULAIRES BIOMIMETIQUES

*PLURIPOTENT STEM CELL ENCAPSULATION
TO DEVELOP AND SCALE UP
BIOMIMETIC CELL THERAPIES*

Philippe J. R. Cohen

**Thèse de doctorat de biologie interdisciplinaire
dirigée par Nathalie Lefort et Kevin Alessandri,
présentée et soutenue le 22 mars 2022**

JURY

D ^r Nathalie Lefort	Directrice de thèse	Université de Paris
D ^r Kevin Alessandri	Co-encadrant de thèse	TreeFrog Therapeutics
P ^r Jérôme Larghero	Président du jury	Université de Paris
P ^r John De Vos	Rapporteur	Université de Montpellier
D ^r Danijela Vignjević	Rapporteuse	Université Paris Sciences et Lettres
D ^r Lucie Laplane	Examinatrice	Université Paris 1 Panthéon-Sorbonne
D ^r Pierre Nassoy	Examineur	Université de Bordeaux
D ^r Maxime Feyeux	Examineur	TreeFrog Therapeutics



À Sophie

*« Our real teacher has been and still is the embryo,
who is, incidentally, the only teacher that is always right. »*

Viktor Hamburger

RÉSUMÉ

Les thérapies cellulaires suscitent l'espoir de millions de patients souffrant de maladies chroniques ou en impasse thérapeutique. Les cellules souches pluripotentes en constituent la matière première de choix. La bioproduction des cellules souches est considérée comme la clef de voûte de l'industrialisation des procédés. Toutefois, les technologies de culture de ces cellules souches sont encore récentes – le travail fondateur de Shinya Yamanaka sur les cellules souches pluripotentes induites a été récompensé par le prix Nobel de médecine en 2012.

La problématique de cette thèse est une question industrielle fondamentale : comment passer à l'échelle la bioproduction de cellules souches pluripotentes humaines sans en altérer l'identité et l'intégrité génétique ?

Nous proposons une approche biomimétique d'encapsulation des cellules souches pluripotentes qui permet de les cultiver en suspension automatisée dans des bioréacteurs de grande taille. Grâce à un système microfluidique de coextrusion haut débit, nous pouvons produire des milliers de capsules par seconde par injecteur. Les microcapsules produites, qui ont environ 400 µm de diamètre, sont creuses et protègent les cellules durant le processus de production. L'espace interne des capsules nous permet de mimer la niche des cellules *in vivo*.

Nous avons observé que les microcompartiments biomimétiques permettent aux cellules souches pluripotentes de s'auto-organiser sous forme de colonies en 3D cystiques semblables à l'épiblaste durant l'embryogenèse. Nous appelons cette stratégie de culture « épiblastoïdes encapsulés ».

Ces épiblastoïdes encapsulés, cultivés en suspension en bioréacteur, maintiennent la pluripotence en culture de manière homogène, reproductible et prolongée. Ils aident également à atteindre des facteurs d'amplification inégalés pour de grands volumes de culture (x 282 en 6,5 jours dans un bioréacteur de 10 litres).

Lors d'une culture prolongée, nous avons aussi montré que la sélection de la 'mutation 20q11.21' (par duplication du grand bras du chromosome 20) est réduite d'un ordre de grandeur par rapport aux cultures conventionnelles. La viabilité des cellules souches pluripotentes dans notre système de culture (> 98 %), très supérieure au système classique, explique probablement l'amélioration des facteurs d'amplification et la diminution de la pression de sélection. Nous présentons des résultats préliminaires d'histologie et de biophysique des épiblastoïdes.

L'encapsulation protège les cellules des atteintes mécaniques au sein des bioréacteurs et permet de reconstituer une niche biomimétique à l'échelle microtissulaire. Nous espérons que la combinaison de cette protection et de ce biomimétisme permettra de produire des thérapies issues de cellules souches pluripotentes sûres et efficaces pour des millions de patients.

Mots clés : Cellules souches pluripotentes, Épiblaste, Encapsulation, Bioréacteur, Thérapie cellulaire et organoïde, Épiblastoïde, Épithélium pseudostratifié, Capsule, Microfluidique, Niche, Microenvironnement, Culture 3D, Biomimétisme, Embryologie, Intégrité génétique, Bioproduction

ABSTRACT

Cell therapies represent hope for millions of patients with chronic diseases or unmet medical needs. Pluripotent stem cells have emerged as the most promising cellular source to produce them. The bioproduction of stem cells is considered as the keystone of the industrialization processes. However, the technologies for culturing these stem cells are quite recent – Shinya Yamanaka's seminal work on induced pluripotent stem cells was awarded the Nobel Prize for Medicine in 2012.

The focus of this thesis is a fundamental industrial question: how to scale up human pluripotent stem cell bioproduction while preserving their identity and genetic integrity ?

We propose a biomimetic approach to encapsulate pluripotent stem cells that allows them to be grown in automated suspension culture in large-scale bioreactors. Thanks to a microfluidic high-throughput coextrusion device we are able to generate thousands of capsules per second per injector. The microcapsules produced (~400µm in diameter), are hollow and protect the cells during the production process. This inner space is partially liquid and allows us to engineer the cell micro-environment to mimic the *in vivo* cell niche.

In those biomimetic compartments, we observed self-organization of pluripotent stem cells as cystic 3D colonies reminiscent of the epiblast during embryogenesis. We call this culture strategy "encapsulated epiblastoids".

These encapsulated epiblastoids, cultured in bioreactor suspension (C-STEM), maintain pluripotency in culture in a homogeneous, reproducible and prolonged manner, while reaching unprecedented amplification factor for large culture volumes (282 fold in 6.5 days in 10 liter bioreactor).

We also have shown that selection of chromosomal mutation '20q11.21' (by duplication of the large arm of chromosome 20) in long term culture is reduced by one order of magnitude compared to conventional culture systems.

The higher pluripotent stem cell viability (>98%) in our culture system, compared to traditional system, probably explains the improvement of the amplification factors and the decrease of pressure selection. We present preliminary results describing histological and biophysical findings of epiblastoids.

The encapsulation protects the cells from mechanical damage within the bioreactors and allows the reconstruction of a biomimetic niche at the microtissue level. Combining mechanical protection and biomimicry could help to overcome the current quantitative and qualitative limits of stem cell derived therapies bioproduction.

Key words : Pluripotent stem cells, Epiblast, Encapsulation, Bioreactor, Cell and organoid therapy, Epiblastoid, Pseudostratified epithelium, Capsule, Microfluidics, Niche, Microenvironment, 3D culture, Biomimicry, Embryology, Genetic integrity, Bioproduction

GRAPHICAL ABSTRACT

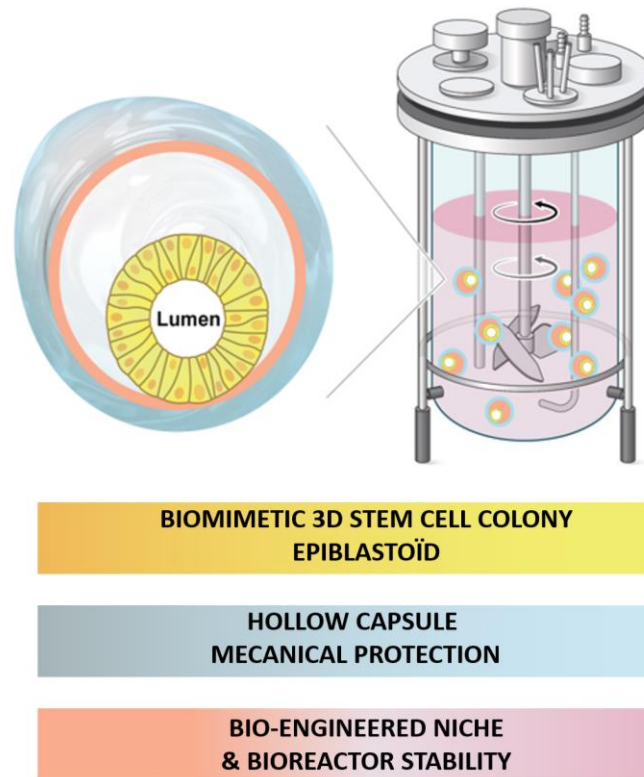


Figure 1. Des capsules pluripotentes pour des thérapies cellulaires biomimétiques

L'encapsulation de cellules souches pluripotentes humaines dans des microcompartiments biomimétiques permet la culture à grande échelle en bioréacteur de colonies 3D ressemblant à l'épiblaste.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
MOTIVATIONS	2
1. THÉRAPIES CELLULAIRES : UNE SYNERGIE DES SCIENCES.....	3
1.1 DES THÉRAPIES CELLULAIRES POUR « RÉPARER LE VIVANT »	3
1.2 INTÉGRATION IMMUNOLOGIQUE DU GREFFON	5
1.3 LES DÉBUTS DES THÉRAPIES CELLULAIRES	11
1.4 ÉTAT DE L'ART DES THÉRAPIES CELLULAIRES ET LIMITES ACTUELLES	14
2. BIOMIMÉTISME ET ORGANOÏDES.....	18
2.1 LE BIOMIMÉTISME.....	18
2.2 LA BIOCHIMIE DU DÉVELOPPEMENT	19
2.3 LA BIOPHYSIQUE DU DÉVELOPPEMENT	20
2.4 LES CELLULES SOUCHES RÉSIDENT DANS DES NICHES	21
2.5 ORGANOÏDES : L' <i>IN VITRO</i> BIOMIMÉTIQUE.....	23
2.6 LES ORGANOÏDES CONTRIBUENT À PRÉSERVER L'INTÉGRITÉ DU GÉNOME.....	30
3. EMBRYOLOGIE.....	34
3.1 EMBRYOLOGIE <i>IN VIVO/EX VIVO</i>	34
3.2 LES DÉBUTS DES MODÈLES EMBRYONNAIRES.....	39
3.3 MODÈLES ÉPIBLASTIQUES	42
3.4 L'EMBRYOLOGIE DE SYNTHÈSE.....	46
4. LES CELLULES SOUCHES.....	47
4.1 DIFFÉRENTS TYPES DE CELLULES SOUCHES	47
4.2 LES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES	48
4.3 CARACTÈRE SOUCHE : UNE CAPACITÉ INFINIE D'AUTORENOUVELLEMENT	50
4.4 LES FACTEURS INTRINSÈQUES ET EXTRINSÈQUES DE RÉGULATION DE LA PLURIPOTENCE ...	52
4.5 PLURIPOTENCE NAÏVE FORMATIVE ET AMORCÉE	53
4.6 ÉVALUER LE CARACTÈRE SOUCHE ET LA PLURIPOTENCE	55
5. SYSTÈMES DE CULTURE DE CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES	56
5.1 LES DÉBUTS DE LA CULTURE <i>IN VITRO</i>	56
5.2 LIMITES DE LA MONTÉE EN ÉCHELLE DES CULTURES EN 2D	58
5.3 BIORÉACTEUR ET CULTURES EN SUSPENSION 3D	59
5.4 CULTURES DE CELLULES SOUCHES EN BIORÉACTEUR	60
5.5 LA LIMITE MÉCANIQUE DES SYSTÈMES EN SUSPENSION NON PROTÉGÉS.....	63

PARTIE 1 : LA CAPSULE DE CELLULES SOUCHES	65
MOTIVATIONS	66
1. L'ENCAPSULATION : UN MICROENVIRONNEMENT CONTRÔLÉ ET PROTÉGÉ	67
2. ENCAPSULATION DE CELLULES SOUCHES.....	73
3. ARTICLE C-STEM : ENGINEERING NICHE-LIKE MICRO-COMPARTMENTS FOR OPTIMAL AND SCALE- INDEPENDENT EXPANSION OF HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS IN BIOREACTORS.....	77
4. DISCUSSION COMPLÉMENTAIRE DE LA PARTIE 1	110
4.1 BIOPRODUCTION DE CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES	110
4.2 CULTURE DE CELLULES SOUCHES EMBRYOMIMÉTIQUE : LES ÉPIBLASTOÏDES.....	113
4.3 LES AVANTAGES DU FORMAT ÉPIBLASTIQUE.....	115
4.4 ÉTHIQUE DES ÉPIBLASTOÏDES.....	119
5. CONCLUSION DE LA PARTIE 1.....	121
 PARTIE 2 : GÉNÉTIQUE DES ÉPIBLASTOÏDES	 123
MOTIVATIONS	124
1. INTRODUCTION : GÉNÉTIQUE DES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES	125
1.1 IMPORTANCE DE L'INTÉGRITÉ GÉNÉTIQUE POUR LES THÉRAPIES CELLULAIRES.....	125
1.2 NÉCESSITÉ D'UNE STRATÉGIE GLOBALE	126
1.3 DÉRIVE GÉNÉTIQUE DES CELLULES SOUCHES DURANT LEUR AMPLIFICATION <i>IN VITRO</i>	128
1.4 <i>IN VITRO</i> : ADAPTATION DES CELLULES AUX CONDITIONS DE CULTURE.....	130
1.5 <i>IN VIVO</i> : CONTRÔLE QUALITÉ ÉPIBLASTIQUE	132
2. RÉSULTATS.....	134
2.1 COMPARAISON DE LA SÉLECTION D'UNE MUTATION 20q11.21 LORS DE CULTURES PROLONGÉES EN AGRÉGATS, 2D ET ÉPIBLASTOÏDES ENCAPSULÉS	134
2.2 MAINTENANCE ET HOMOGÉNÉITÉ DES STRUCTURES ÉPITHÉLIALES	141
3. DISCUSSION DE LA PARTIE 2.....	146
3.1 SÉLECTION EN CULTURE DE LA MUTATION 20q11.21	146
3.2 CONTRÔLE QUALITÉ TISSULAIRE DES ÉPIBLASTOÏDES	149
3.3 MODÈLE PROPOSÉ	149
4. CONCLUSION DE LA PARTIE 2.....	151
 DISCUSSION GÉNÉRALE	 153
1. BIOPRODUCTION QUANTITATIVE ET QUALITATIVE	154
2. C-Stem™ : UN OUTIL POLYVALENT ET INTÉGRÉ	155
3. LA THÉRAPIE ORGANOÏDE : L'AVENIR DE LA THÉRAPIE CELLULAIRE ?	157
4. CONCLUSION PERSONNELLE	160

ANNEXES	162
1. LEGENDES DES ILLUSTRATIONS DE COUVERTURE	163
2. ARTICLE: THEORETICAL AND EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF THE MORPHO-DYNAMICS OF HUMAN PLURIPOTENT STEM CELL CYSTS.....	164
3. LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	181
4. BIBLIOGRAPHIE	182

INDEX DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Des capsules pluripotentes pour des thérapies cellulaires biomimétiques	8
Figure 2. Prométhée	4
Tableau 1. Pourquoi des cellules souches pour les thérapies cellulaires ?.....	7
Figure 3. Thérapies cellulaires autologues et allogéniques	8
Figure 4. Banques cellulaires haplotypées.....	10
Figure 5. Premières vagues de thérapies cellulaires.....	12
Figure 6. Essais cliniques en immuno-oncologie cellulaire en 2020.....	14
Figure 7. Principales thérapies cellulaires issues de cellules souches pluripotentes	15
Figure 8. Transcriptomes de cellules uniques et identités cellulaires	16
Figure 9. Interdisciplinarité de la médecine régénérative	18
Figure 10. Biomimétisme et embryologie.....	19
Figure 11. Différenciation dirigée	20
Figure 12. Dualité physico-chimique lors du développement	21
Figure 13. La niche cellulaire.....	22
Figure 14. Exemple de cellules souches adultes et leurs niches.....	23
Figure 15. Danse des cellules	24
Figure 16. Caractéristiques des organoïdes :	24
Figure 17. Auto-organisation des organoïdes.....	25
Figure 18. Échelle microtissulaire des organoïdes.....	25
Figure 19. L'essor récent des organoïdes	26
Figure 20. Applications multiples des organoïdes	28
Figure 21. Cocultures et organoïdes	29
Figure 22. Sophistication des cultures organoïdes	30
Figure 23. Rôle clé du microenvironnement dans la tumorigenèse.....	31
Figure 24. Rôle primordial de la niche pour le contrôle du destin cellulaire.....	32
Figure 25. Mécanismes de l'intégrité génétique des organoïdes	34
Figure 26. Chronologie de l'embryologie humaine	35
Figure 27. Stades embryologiques Carnegie et structuration de l'épiblaste.....	36
Figure 28. Développement embryonnaire humain <i>ex vivo</i> (prégastrulation)	37
Figure 29. Développement embryonnaire humain précoce.....	38
Figure 30. Développement péri-implantatoire de l'épiblaste humain	39
Figure 31. Modèles embryonnaires en 2D.....	40
Figure 32. Culture des corps embryoides	41
Figure 33. Mécanismes développementaux précoces.....	42
Tableau 2. Epiblastoïdes, des colonies de cellules souches pluripotentes 3D autour d'un lumen central	44
Tableau 3. Epiblastoïdes, rupture de symétrie et différenciation	45
Tableau 4. Vers des modèles embryonnaires complets : gastrulation, neurulation	46
Figure 34. Cellule souche	48
Figure 35. Chromatine semi-ouverte	49
Figure 36. Arbre de la différenciation	50
Figure 37. Cycle cellulaire des cellules souches.....	51

Figure 38. Syncytium pluripotent	51
Figure 39. Homéostasie télomérique des cellules souches pluripotentes	52
Figure 40. Facteurs intrinsèques : NANOG, OCT4, SOX2, les gènes clés de la pluripotence	53
Figure 41. In vivo : l'hypothèse d'un stade formatif de pluripotence	54
Figure 42. Lignées de cellules souches pluripotentes naïves, formatives, amorcées.....	55
Figure 43. Marquage immunohistochimique de colonies de cellules souches pluripotentes	56
Figure 44. Premières lignées de cellules souches pluripotentes humaines	57
Figure 45. Morphologie typique d'une colonie de cellules souches pluripotentes <i>in vitro</i>	58
Figure 46. Stratégie de parallélisation en 2D : <i>Scale-Out</i>	59
Tableau 5. Différents types de bioréacteurs.....	60
Figure 47. Stratégie de montée en échelle 3D : <i>Scale-Up</i>	62
Tableau 6. Meilleures performances quantitatives des cultures de cellules souches.....	63
Figure 48. Limites mécaniques des cultures en 3D non protégées	64
Figure 49. Proposition de cahier des charges et notation des systèmes de culture de cellules souches pluripotentes à visée clinique	67
Figure 50. Microcompartiment cellulaire protégé pour la culture en 3D	68
Tableau 7. Types d'encapsulation.....	69
Figure 51. Méthodes d'encapsulations.....	70
Figure 52. Microencapsulation en haut débit par coextrusion et électrodispersion	73
Tableau 8. Encapsulation de cellules souches en billes pleines.....	75
Tableau 9. Encapsulation de cellules souches en capsules creuses et en culture d'aggrégats.....	76
Tableau 10. Encapsulation de cellules souches en tubes	77
Figure 53. Un process de bioproduction insensible à l'échelle	111
Figure 54. Sécurisation et accélération de la montée en échelle de la production cellulaire.....	112
Figure 55. Prochains défis pour une culture encapsulée à grande échelle et de grade clinique	113
Figure 56. Encapsulation à grande échelle et culture en bioréacteur	113
Figure 57. Épiplastoïde.....	114
Figure 58. Épiblastogenèse	115
Figure 59. Modèle de croissance des colonies de cellules souches pluripotentes en 2D et 3D.....	116
Figure 60. Étirement/Compression et rôle du lumen en dehors de l'épiblastogenèse.....	117
Figure 61. « Effet bord » et hétérogénéité des colonies de cellules souches pluripotentes en 2D.....	119
Figure 62. Recommandations 2021 de l'ISSCR pour les cellules souches et modèles embryonnaires	121
Figure 63. Approche globale pour la sécurité et l'acceptabilité des thérapies cellulaires	128
Figure 64. Principaux types de mutations.....	129
Figure 65. Amplification chromosomique 20q11.21	130
Figure 66. Adaptation des cellules souches aux conditions de culture	131
Figure 67. Contrôle qualité de l'épiplaste <i>in vivo</i>	134
Figure 68. Contrôle qualité épiplastoïde <i>in vitro</i>	134
Figure 69. Plan expérimental QC-Stem.....	136
Figure 70. Résultats QC-Stem : morphologie, amplification, viabilité et cytométrie	137
Figure 71. Résultats QC-Stem : analyse SNP des génomes initiaux et finaux.....	139
Figure 72. Résultats QC-Stem : évaluation de la dérive génétique par ddPCR.....	140
Figure 73. Épithélium épiblastique	142
Figure 74. Panels qPCR comparés : 2D, agrégats, épiplastoïdes encapsulés.....	146

Figure 75. L'équilibre dynamique du génome, entre intégrité et dérive	147
Figure 76. 'Million to Trillion Time'	149
Figure 77. Comment C-Stem pourrait préserver l'intégrité génétique ?.....	151
Figure 78. Courbe qualité/quantité des systèmes de culture des cellules souches pluripotentes	155
Figure 79. Différenciation en 3D in capsulo.....	156
Figure 80. Thérapies organoïdes : des mini-greffes issues de cellules souches	159
Figure 81. Médecine organoïde et victoire de la microfluidique ?	160
Figure 82. Couverture de l'introduction générale : <i>Coupola</i>	164
Figure 83. Couverture de la partie 1 : <i>Virtual capsules</i>	164
Figure 84. Couverture de la partie 2 : <i>Éclipse</i>	164
Figure 85. Couverture de la Discussion générale : <i>Pluripotent droplets</i>	164
Figure 86. Couverture des Annexes : <i>The stem cell foam</i>	164

Les illustrations des articles ne sont pas listées.

LISTE DES PUBLICATIONS

Cette thèse, tout comme la thérapie cellulaire, se situe à la croisée de l'industrie et de la science fondamentale. Le travail a été effectué au sein de l'Institut Imagine et de la start-up TreeFrog Therapeutics.

Deux articles sont en cours de publication :

- C-Stem™: Engineering niche-like micro-compartments for optimal and scale-independent expansion of human pluripotent stem cells in bioreactors (1^{er} auteur, Partie 2)
- Theoretical and experimental investigation of the morpho-dynamics of human pluripotent stem cell cysts (2^e auteur, Annexes).

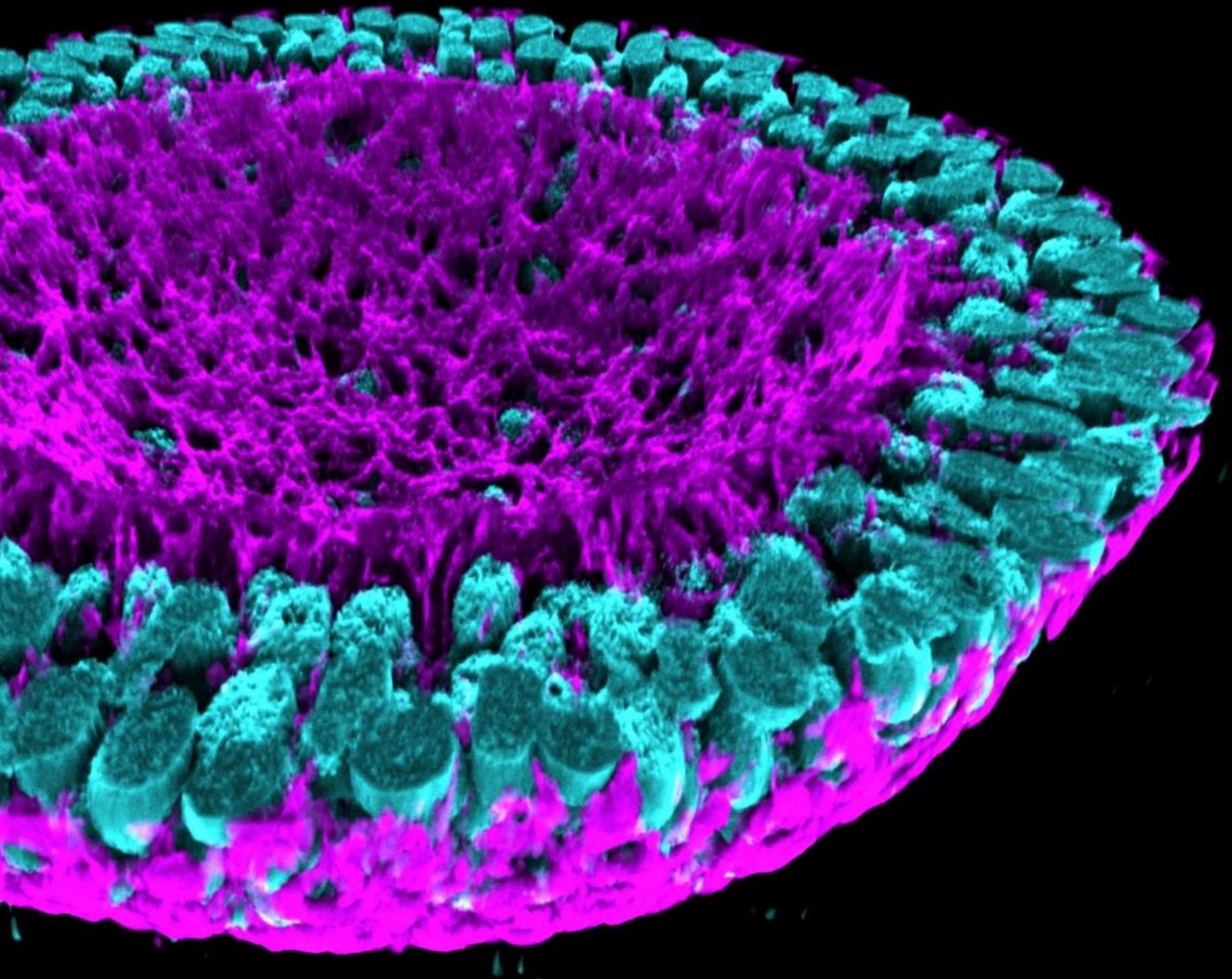
Deux brevets ont été déposés :

- FR2106403 : Microcompartiments cellulaires de grande taille comprenant plusieurs cystes ;
- FR2104988 : Microcompartiments cellulaires comprenant des cellules dont l'intégrité génomique est maintenue après amplification et procédé de préparation.

Posters, conférences, présentations

- Radio, émission « La Méthode scientifique » du 6/11/2019 (France Inter), Des organoïdes de cellules souches ([lien](#)).
- FSSCR 2020 : A 3D cell culture technology for high quality, high throughput iPSC culture and differentiation.
- ISCT 2020 : High-throughput cell encapsulation technology enables large-scale and high quality hiPSC culture and differentiation in bioreactor.
C-Stem™, a new technology to scale-up cell therapy manufacturing.
- ISSCR 2021 : Up to 151 millionfold cumulated expansion of encapsulated hiPS cells in bioreactor over 28 days: Comparison with 2D culture and standard spheroid culture et Production of a single batch of 15 billion hiPS cells within a 10L bioreactor with an exponential amplification factor of 276-fold in 6.59 days.
- ISCT & ASGCT 2021: C-Stem™ provides best hiPSC amplification over 28 days while controlling passage numbers.
- Biotech' Week Boston 2021 : From 50 million to 15 billion human iPS cells within a week.

INTRODUCTION GÉNÉRALE



MOTIVATIONS

Peut-on désormais créer, façonner et utiliser génome, cellules et tissus ? Les progrès de la biologie, de la génétique et de la biophysique atteignent une masse critique. L'application des connaissances fondamentales dans le domaine de la thérapeutique humaine s'accélère. L'édition du génome avec CRISPR, les ARN thérapeutiques ou les cellules CAR-T sont les figures de proue de cette « médecine-science » très technologique.

Les thérapies cellulaires sont utilisées pour traiter des centaines de patients dans le monde. Néanmoins, cette branche de la médecine régénérative en est encore à un stade émergent par rapport à l'étendue de son potentiel ; seuls quelques produits sont validés par les agences du médicament européenne et américaine. La complexité des thérapies cellulaires est due à leur nature si différente de la médecine classique. La culture à grande échelle de cellules vivantes n'a été abordée que très récemment ; le recul industriel et scientifique sur la bioproduction de cellules thérapeutiques est très limité.

Les cellules souches pluripotentes utilisées pour concevoir ces traitements sont très difficiles à produire en masse et se détériorent en culture. De longue date, les biologistes essayent de maintenir ces cellules *in vitro* tout en préservant les mêmes propriétés cellulaires qu'*in vivo*.

Nous proposons une stratégie biomimétique pour reconstituer un microenvironnement cellulaire semblable à celui observé *in vivo*. L'encapsulation microfluidique nous permet de produire des microcompartiments inframillimétriques dont les paramètres peuvent être ajustés finement. Ces espaces 3D protégés nous permettent d'intégrer certaines avancées fondamentales issues de la biologie du développement, de la biophysique, ou de la génétique.

Le fil rouge de cette thèse est l'interdisciplinarité. L'introduction générale présentera les rouages scientifiques des thérapies cellulaires. Une description des cultures biomimétiques et organoïdes nous permettra d'aborder ensuite l'embryologie et les modèles développementaux récents. Ces disciplines nous aideront à mieux comprendre les cellules souches pluripotentes. Enfin, nous examinerons les différents systèmes de culture, leurs avantages et leurs limites.

Ces travaux de thèse ont été réalisés sous la supervision de Nathalie Lefort (Institut Imagine) et Kevin Alessandri (TreeFrog Therapeutics). Les recherches menées s'inscrivent dans un cadre translationnel et ont été financées par TreeFrog (dispositif CIFRE, ANRT).

1. THÉRAPIES CELLULAIRES : UNE SYNERGIE DES SCIENCES

1.1 DES THÉRAPIES CELLULAIRES POUR « RÉPARER LE VIVANT »

La thérapie cellulaire consiste à injecter ou à greffer chez un patient des cellules ou groupes de cellules vivantes afin d'obtenir un effet thérapeutique. Elle fait partie intégrante de la médecine régénérative qui s'inspire des capacités intrinsèques de l'organisme à se réparer (cf. figure 2).

Les thérapies cellulaires portent l'espoir de proposer un traitement vivant qui s'intègre à l'organisme et répare la fonction déficiente. Les cellules ainsi greffées délivreraient un effet prolongé, potentiellement pendant des décennies et libéreraient le patient de prises médicamenteuses itératives. Au-delà d'un traitement symptomatique, les thérapies cellulaires offriraient une réparation, une régénération, voire une guérison (Chakradhar, 2016; Kahn, 2002).

Leur portée est vaste, concerne tous les organes et potentiellement toutes les maladies. Elles sont particulièrement adaptées au traitement des maladies chroniques (Blau & Daley, 2019). Les cellules greffées comblent alors la perte de fonction de certaines cellules par vieillissement ou maladie.

- Diabète de type 1 : élimination auto-immune des cellules β des îlots de Langerhans entraînant une perte de la sécrétion d'insuline.
- Maladie de Parkinson : dégénération des neurones dopaminergiques A9 de la substance noire *pars compacta* provoquant la perte de la sécrétion de dopamine.
- Insuffisance cardiaque : lors d'un infarctus du myocarde, par perte ischémique principalement de cardiomyocytes amenant une perte de la contractilité cardiaque.
- Cancer : système immunitaire dépassé par la progression tumorale, apport de cellules immunitaires modifiées pour éliminer les cellules cancéreuses et induire une rémission durable.

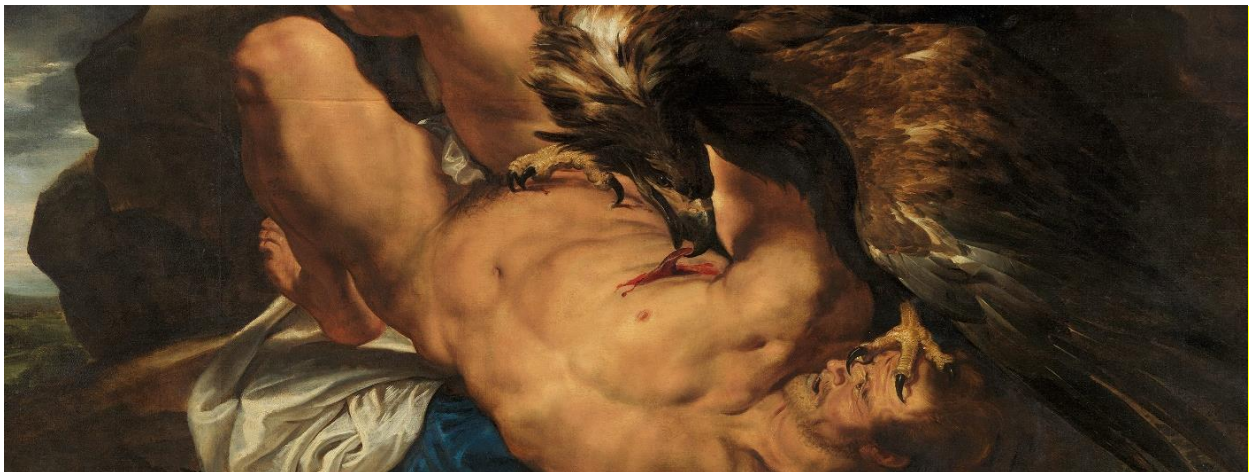


Figure 2. Prométhée

Dans la mythologie grecque, le foie de Prométhée se régénère à chaque fois qu'il est mangé par l'aigle (Power & Rasko, 2008; Tiniakos et al., 2010). Peinture : *Prométhée supplicié* (Pierre Paul Rubens, 1618).

La dénomination « thérapies par remplacement cellulaire » parfois utilisée, évoque également d'autres disciplines médicales. Les thérapies cellulaires font partie de la médecine régénérative ; elles ont hérité des avancées pionnières de la greffe d'organe et de la transfusion sanguine (thérapie cellulaire par perfusion de globules rouges). Les thérapies cellulaires peuvent prendre différents formats et les domaines ont tendance à se chevaucher. Par exemple, à mi-chemin entre la greffe d'organe et la thérapie cellulaire en suspension, la greffe d'unités fonctionnelles tissulaires pancréatiques a été pratiquée pour traiter le diabète (greffe d'îlots de Langerhans issus de donneurs (Shapiro, 2000)).

En effet, la transfusion, la greffe d'organe et la thérapie cellulaire partagent des problématiques communes :

- la stratégie de remplacement cellulaire ;
- la source de cellules ou d'organes ;
- le manque de donneurs ;
- la conservation des cellules ou des organes ;
- le mode d'administration ;
- l'intégration fonctionnelle et la vascularisation du greffon au receveur ;
- le rejet.

L'immunologie, la biologie et l'ingénierie génétique ont été les trois premières disciplines scientifiques qui tentent de répondre à ces problématiques.

1.2 INTÉGRATION IMMUNOLOGIQUE DU GREFFON

Le système immunitaire et le rejet

Les progrès de la transplantation et de la transfusion sont indissociables de ceux de l'immunologie. Les systèmes immunitaires inné et adaptatif sont capables de reconnaître le « soi » du « non-soi ». Cette défense naturelle permet par exemple d'éliminer des agents infectieux ou des cellules cancéreuses, mais est également responsable du rejet des greffes.

Les premières tentatives de greffe sans immunosuppression se sont soldées par une dysfonction précoce du greffon et un décès des patients. En 1954 et 1955, aux États-Unis et en France, des greffes rénales sans immunosuppression entre jumeaux monozygotes sont couronnées de succès. La réussite de cette thérapie pseudoautologue montre alors qu'en l'absence d'immunosuppression, il est nécessaire d'avoir une correspondance parfaite entre donneur et receveur.

Pour aller au-delà du périmètre limité des greffes autologues et permettre au patient de tolérer des cellules ou organes qui ne proviennent pas de lui-même (allothérapies, thérapies allogéniques), il a fallu comprendre le fonctionnement du système immunitaire puis développer des stratégies adaptées.

Découverte des groupes sanguins et tissulaires et premières allothérapies

Les utilisations thérapeutiques du sang documentées historiquement, telles que la transfusion ou ingestion de sang de jeunes hommes par le pape Innocent VII en 1492 sont au mieux douteuse et au pire mortelles. Plus récemment les interventions documentées de James Blundell en 1818 permirent la survie de 5 patientes sur 10. Il a fallu attendre la découverte des groupes sanguins ABO et Rhésus par l'Autrichien Karl Landsteiner, à partir de 1901, pour éclairer les compatibilités transfusionnelles. Le Français Jean Dausset décrit quant à lui dès 1958 le système majeur d'histocompatibilité humaine (système HLA, *Human leukocyte antigen*). L'identification de ces motifs antigéniques à la surface des cellules par l'organisme lui permet de reconnaître le soi du non-soi. Les thérapies allogéniques ont pu émerger lorsqu'il a été possible d'apparier donneurs et receveurs par groupes sanguins ou tissulaires.

L'immunosuppression et la greffe d'organe

Les prémices d'immunosuppression consistaient en une irradiation totale suivie d'une greffe de moelle provenant du même donneur d'organe. Cette pratique, très lourde pour le patient, a toutefois permis d'induire une « tolérance » du greffon et de montrer que la barrière de la défense immunitaire pouvait être franchie. À partir des années 1960, les progrès de l'immunologie clinique sont nombreux. Les molécules immunosuppressives ou immunomodulatrices contribuent à une tolérance et une fonctionnalité prolongée des greffons (Bruno Moulin ; Marie-Noëlle Peraldi, 2018 ; Évolution du traitement immunosuppresseur en transplantation rénale, 2004). Mais, encore aujourd'hui, ces traitements immunosuppresseurs ont de nombreux effets secondaires et limites. Ils ne peuvent pas être interrompus et doivent être pris pendant toute la durée de fonctionnement du greffon (à vie pour les organes vitaux). L'immunosuppression est non spécifique et entraîne une augmentation du risque d'infection et de cancer post-transplantation. En outre, il existe des toxicités spécifiques en fonction des traitements prescrits (hypertension artérielle, diabète, dyslipidémie, diarrhées, néphrotoxicité, neutropénie, anémie, thrombopénie, tremblements, etc.). Enfin, elle demeure imparfaite à cause de la persistance d'une réaction immunologique dirigée contre le greffon. Celle-ci peut être responsable en partie d'un dysfonctionnement chronique de la greffe, même en l'absence d'épisode de rejet aigu.

La transfusion et les greffes d'organes aujourd'hui

Les progrès conjoints de l'immunologie clinique, de la chirurgie, de la réanimation et une organisation des soins spécialisés (Établissement français du sang, Agence de la biomédecine) ont permis le déploiement à grande échelle de la transfusion sanguine et des greffes d'organes en France. Progressivement, des greffes de rein (1955), de moelle (1956), de cœur (1967), de pancréas (1967), de foie (1972), des poumons (1981) sont réalisées. En France, on dénombre désormais :

- 530 980 patients transfusés en 2019 (rapport d'hémovigilance de l'ANSM, 2019) ;
- 4 640 patients greffés par moelle osseuse/cellules souches hématopoïétiques en 2020 (Agence de la biomédecine, agence-biomedecine.fr) ;
- 5 901 greffes d'organes par an en 2019, dont 3 643 reins, 1 355 foies, 425 cœurs, 384 poumons, 9 cœur-poumons, 107 pancréas, 1 intestin (Agence de la biomédecine, <https://www.dondorganes.fr>).

La plupart des greffons sont issus de dons d'organes sur des personnes en état de mort cérébrale. La transplantation d'organes est ainsi limitée par le nombre restreint de donneurs. Plus de 20 000 personnes sont sur liste d'attente de greffe en France, et chaque année plus de 500 personnes meurent faute d'avoir été greffées.

Les cellules souches pluripotentes, une source infinie de cellules et de tissus

À partir des années 2000, grâce à l'essor de la biologie des cellules souches pluripotentes, il devient envisageable de créer à la demande des greffons *in vitro* pour tout type de pathologie (cf. tableau 1). Ces cellules ont la capacité naturelle de se renouveler infiniment et de se différencier dans toutes les cellules de l'organisme. En utilisant une partition de plus en plus précise de facteurs de transcription et de molécules de signalisation, des protocoles de différenciation cellulaire de plus en plus efficaces sont établis.

À l'origine, les cellules souches pluripotentes sont extraites à partir d'embryons humains. La maîtrise de la reprogrammation cellulaire contribue progressivement à remplacer ces cellules souches embryonnaires par des cellules souches pluripotentes induites, appelées « cellules iPS » (K. Takahashi *et al.*, 2007). Le développement de thérapies cellulaires produites entièrement à partir d'iPS permet de contourner le manque de donneurs d'organes et les limites éthiques posées par l'utilisation des embryons. Il devient alors possible de privilégier des approches autologues, allogéniques, haplotypées, génétiquement modifiées.

Tableau 1. Pourquoi des cellules souches pour les thérapies cellulaires ?

La capacité naturelle des cellules souches pluripotentes à s'autorenouveler et à se différencier en tout type cellulaire a deux avantages majeurs pour la thérapie cellulaire :

- D'une part, c'est une source robuste, reproductible, potentiellement illimitée de cellules.
- D'autre part, les protocoles et les contrôles qualité peuvent être standardisés.

Thérapies autologues

Le principe de la thérapie autologue est de prélever des cellules somatiques issues du patient, de les reprogrammer par un stade pluripotent (iPS), de les différencier dans le type cellulaire d'intérêt, puis de les lui greffer (cf. figure 3). Les iPS permettent en théorie de créer des thérapies cellulaires autologues sur mesure pour chaque patient. Cependant, le processus en découlant est à ce jour trop laborieux pour être généralisé, et ce pour plusieurs raisons.

- Le médicament cellulaire autologue doit être produit et qualifié pour chaque patient, ce qui entraîne un coût et un délai de production très importants. On estime à 1 million de dollars le prix d'une thérapie cellulaire autologue issue d'iPS, dont 500 000 dollars seraient dévolus au contrôle qualité (Chakradhar, 2016).
- Dans certains cas, lors de maladies génétiques, les thérapies produites à partir des cellules du patient peuvent dysfonctionner car elles portent les anomalies qui ont causé la maladie initiale. Dans ce cas, il faudrait non seulement générer des iPS sur mesure pour chaque patient, mais également les « corriger » par édition génique.

Toutefois, ces difficultés pourront en partie être surmontées, et « il est raisonnable de penser que les greffes issues de cellules souches autologues sont une bonne opportunité de thérapies cellulaires sans rejet, sans immunosuppresseurs » (Yamanaka, 2020).

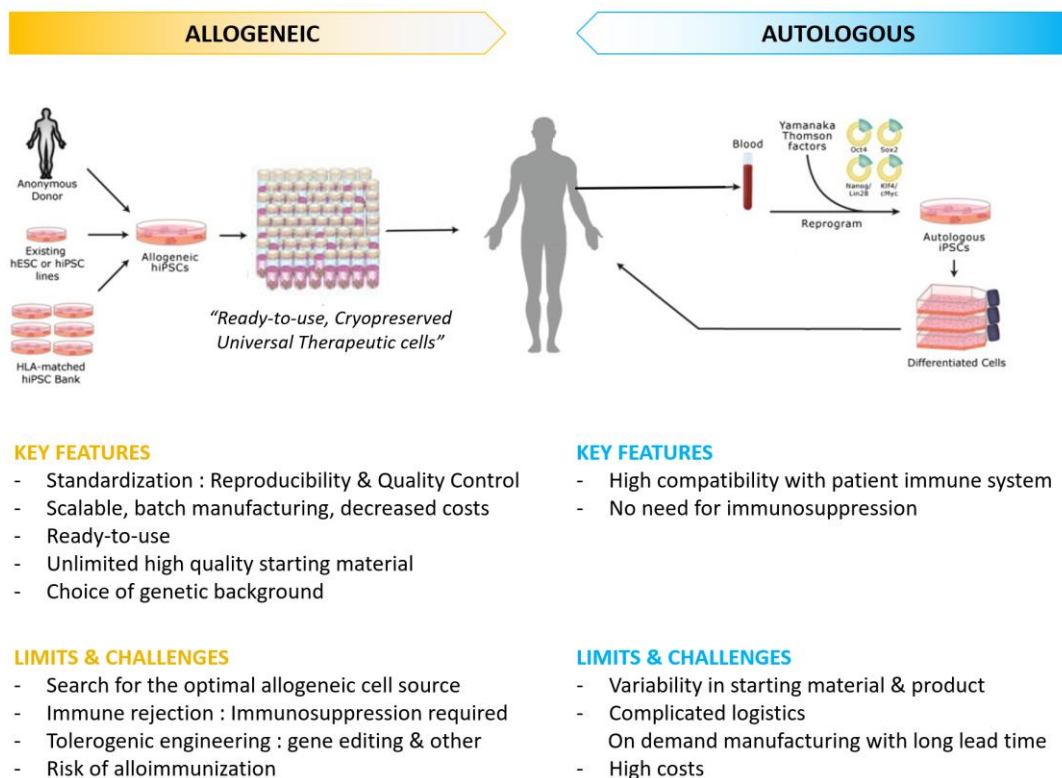


Figure 3. Thérapies cellulaires autologues et allogéniques

La visée des thérapies cellulaires allogéniques est de produire à grande échelle, à moindre coût et de manière reproductible des doses cellulaires prêtes à l'emploi. Le défi des thérapies cellulaires autologues est de dépasser la variabilité et le fardeau logistique actuel, pour permettre une médecine régénérative personnalisée.

Thérapies allogéniques

Les cellules greffées ne sont pas issues du patient, et la différence des profils antigéniques donneur/receveur nécessite dans la plupart des cas une immunosuppression complète et prolongée (cf. figure 3). Les greffes dans des organes à « privilège immun », les thérapies allogéniques haplotypées ou l'ingénierie génétique peuvent être des stratégies avantageuses pour diminuer ces traitements.

- **Les organes ou tissus à « privilège immun »** permettent aux greffes allogéniques qui y sont faites de se maintenir de manière prolongée sans nécessiter de traitement immunosuppresseur (Hong & van Kaer, 1999). Le cerveau et la rétine, par exemple, sont particulièrement isolés des cellules immunes par la barrière hémato-encéphalique et la barrière hémato-rétinienne. Si ces barrières sont intactes et fonctionnelles – ce qui n'est pas trivial en cas de pathologie ou de chirurgie –, ces tissus sont alors très avantageux et susceptibles de tolérer plus facilement des allogreffes (Spadoni *et al.*, 2017). D'autres sites bénéficient également de cette spécificité : la capsule rénale, les testicules, la cornée, le foie, le placenta/fœtus (Arck *et al.*, 2014 ; Mölzer *et al.*, 2020). Ce privilège immun à l'échelle d'un organe inspire certaines stratégies récentes qui tentent de reproduire cette tolérance localement au niveau vasculaire (Siren *et al.*, 2021) ou cellulaire (Elisseff *et al.*, 2021).

- **Thérapie allogénique haplotypée**
Grâce à la constitution de grandes banques de cellules souches, il est possible d'apparier donneurs et receveurs en fonction de leur typage HLA (cf. figure 4). Cette correspondance d'histocompatibilité, semblable à celle réalisée pour les greffes d'organes, est encore peu développée aujourd'hui, car il faut sélectionner et gérer des dizaines, voire des centaines de donneurs-iPS. Afin de réduire le nombre de lignées nécessaires pour couvrir l'ensemble de la population, ces haplobanques engendrent des cellules souches pluripotentes induites à partir de super-donneurs homozygotes HLA (cf. figure 4). En Angleterre par exemple, il a été montré qu'une dizaine de lignées HLA homozygotes offrent une excellente concordance pour 37,7 % de la population et une correspondance partielle pour 67 % de la population (Taylor *et al.*, 2005). Ces haplobanques améliorent la tolérance et l'efficacité des thérapies cellulaires, et réduisent l'intensité et la durée des traitements immunosuppresseurs (Morizane *et al.*, 2013). En mutualisant les lignées à l'échelle internationale, comme cela a été fait pour les répertoires de moelle osseuse, il est permis d'espérer une bonne couverture de la population mondiale dans les années à venir (S. Lee *et al.*, 2018 ; Liedtke *et al.*, 2021 ; Turner *et al.*, 2013 ; Wilmot *et al.*, 2015).

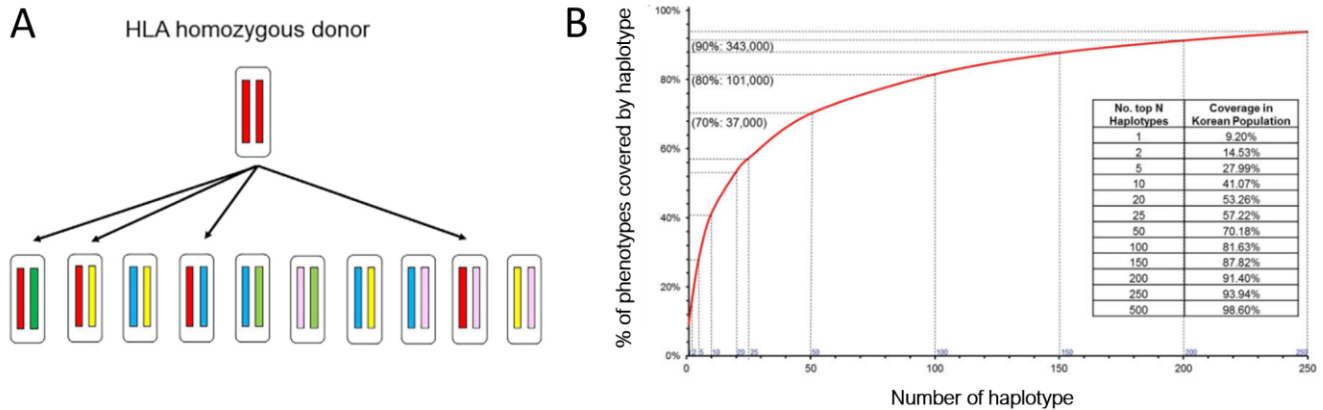


Figure 4. Banques cellulaires haplotypées

(A) Adapté de « Pluripotent stem cell-based cell therapy – Promise and challenges » par Yamanaka, 2020. Les haplotypes de 10 individus sont illustrés par différentes combinaisons de couleurs (*en haut*). Aucun d'entre eux n'a de correspondance identique ou parfaite. En revanche, une lignée iPS obtenue à partir d'un super-donneur HLA-homozygote (*en haut*) permet de faire un appariement correct pour 4 des 10 individus. (B) Adapté de « Repurposing the cord blood bank for haplobanking of HLA-homozygous iPSCs and their usefulness to multiple populations » par S. Lee et al., 2018. Ce schéma illustre le pourcentage de la population coréenne couverte par une haplobanque de cellules souches en fonction du nombre de donneurs HLA homozygotes (nombre d'haplotypes en abscisse).

➤ **Ingénierie génétique et lignées cellulaires universelles**

La tolérance immunitaire des thérapies cellulaires peut théoriquement être obtenue par édition génique. En supprimant l'expression d'antigènes HLA et en forçant l'expression de molécules immunorégulatrices à la surface des cellules (HLA E, HLA G, CD 47, etc.). Il serait possible d'obtenir un échappement immunitaire quasi complet (Yamanaka, 2020). Une lignée de cellules souches pluripotentes pourrait être modifiée pour exprimer un profil immunitaire favorable. Ainsi tous les greffons qui en seraient issus obtiendraient ce même bénéfice. En théorie, produire une ou plusieurs lignées de cellules « universelles » compatibles avec une très large portion de la population aiderait à réduire drastiquement les coûts et les freins logistiques des thérapies cellulaires. Cette approche permettrait également aux malades d'éviter la prise chronique de médicaments immunosuppresseurs et leurs effets indésirables. Il faut toutefois rappeler que ces cellules indétectables par le système immunitaire du patient présenteraient des risques nouveaux. En cas d'évolution tumorale des cellules greffées (génétiquement modifiées et cultivées *in vitro*) ou d'infection de celles-ci, elles ne pourraient pas être repérées ou éliminées par les défenses immunitaires.

Édition génique pour des cellules augmentées

Pour répondre aux exigences d'efficacité et de sécurité prolongées, mais également aux réalités logistiques et économiques des thérapies cellulaires, les modifications géniques sont de plus en plus utilisées (X. Tan *et al.*, 2021) (Elisseff *et al.*, 2021 ; Kimbrel & Lanza, 2020 ; Rafiq *et al.*, 2020). Du côté de la sécurité, elles peuvent permettre de contrôler l'activité thérapeutique après la greffe ; en cas de problème, l'incorporation de gènes suicides (« *safety switch* ») permet d'éliminer les cellules greffées.

Les progrès synergiques de la génétique, de l'immunologie et de la biologie sont à l'origine d'une nouvelle génération de thérapies cellulaires plus efficaces, sûres et accessibles (cf. figure 9). Dans cette thèse, nous ne traitons pas des thérapies géniques. Toutefois, la frontière est parfois mince entre thérapie génique et thérapie cellulaire, comme avec les stratégies de « reprogrammation *in vivo* » (Palfi *et al.*, 2014).

1.3 LES DÉBUTS DES THÉRAPIES CELLULAIRES

Une synergie médico-scientifique

Les précurseurs du domaine des thérapies cellulaires démontrent bien l'interdisciplinarité nécessaire au développement de ces nouveaux médicaments cellulaires : médecine-chirurgie, immunologie, biologie, génétique.

1^{ère} génération : des greffons cellulaires « natifs » issus de donneurs

À partir des années 1970, la greffe de moelle osseuse a permis de sauver de nombreuses personnes souffrant de cancers hématologiques. Ces thérapies cellulaires de cellules souches hématopoïétiques (HSC) sont un franc succès (Chabannon *et al.*, 2018). À ce jour, on dénombre plus de 1 million de transplantations déjà réalisées dans le monde (Josep Carreras Foundation, 2020).

À partir des années 2000, plus d'un millier d'études cliniques ont tenté de prouver le potentiel thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses (MSC) (Wong *et al.*, 2015). Ces cellules extraites principalement du tissu adipeux ou de la moelle osseuse du patient lui sont réinjectées directement (Hass *et al.*, 2011 ; Lazarus *et al.*, 1995). Ces thérapies ont suscité beaucoup d'espoir pour le traitement de pathologies extrêmement variées (GVHD, arthrose, infarctus du myocarde, infections, autisme, etc.). Toutefois, leurs mécanismes d'action ne restent à ce jour que partiellement élucidés (Caplan, 2017b) et peu de bénéfices thérapeutiques ont été prouvés (Galipeau & Sensébé, 2018 ; Rodríguez-Fuentes *et al.*, 2021).

Ces thérapies HSC et MSC constituent la première vague de thérapies cellulaires initialement issues de donneurs. Leur développement se poursuit actuellement (cf. figure 5).

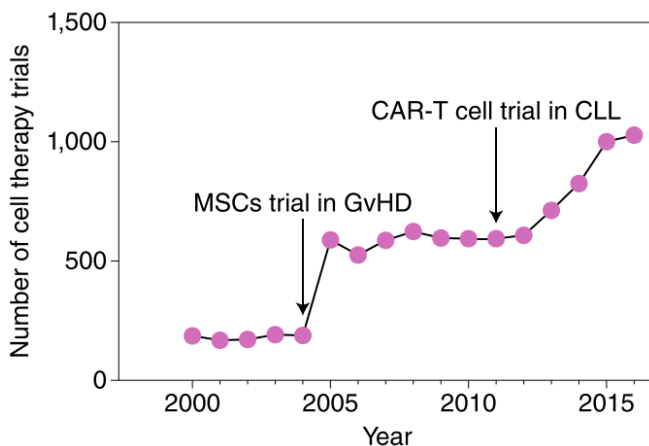


Figure 5. Premières vagues de thérapies cellulaires

Adapté de « Biomanufacturing for clinically advanced cell therapies » par Aijaz *et al.*, 2018. MSCs est mis pour *Mesenchymal stem cells* (cellules souches mésenchymateuses), GvHD pour *Graft versus host disease* (maladie du greffon contre l'hôte), CAR-T pour *Chimeric antigenic receptor-T* (lymphocyte T modifié génétiquement *ex vivo*) et LLC pour leucémie lymphoïde chronique.

2^{ème} génération : des greffons de synthèse issus de cellules souches

L'émergence de ces greffons de synthèse peut être illustrée par le domaine de la thérapie cellulaire pour la maladie de Parkinson (Obeso *et al.*, 2017). Pallier la perte chronique de neurones dopaminergiques par la greffe de nouvelles cellules directement dans le cerveau représente un front thérapeutique prometteur pour les 7 millions de patients dans le monde (Barker *et al.*, 2015 ; Pires *et al.*, 2017).

À partir des années 1980, les premières preuves de concept ont été réalisées à partir de fragments de cerveaux fœtaux (Lindvall *et al.*, 1989 ; P. Brundin, O. G. Nilsson, R. E. Strecker, O. Lindvall, B. Astedt, 1986). Éthiquement et techniquement très difficile à généraliser, cette source fœtale a tout de même contribué à démontrer le potentiel clinique de cette stratégie (Barker *et al.*, 2013 ; Kefalopoulou *et al.*, 2014 ; W. Li *et al.*, 2016). À partir des années 2000, les progrès de la biologie des cellules souches pluripotentes et l'établissement des premiers protocoles de différenciation dopaminergique (Arenas *et al.*, 2015 ; Kawasaki *et al.*, 2000 ; J. H. Kim *et al.*, 2002 ; Park *et al.*, 2005 ; Zeng, 2004) permettent d'envisager des greffes sans recours aux donneurs fœtaux. Plus récemment, des cellules souches pluripotentes induites ont également été utilisées comme matériel de départ pour la différenciation neurale des greffons (J. F. Loring, 2018 ; J. Takahashi, 2017). Grâce à l'essor de la transcriptomique, les protocoles de différenciation sont ajustés pour maximiser l'efficacité et la sécurité thérapeutique (Doi *et al.*, 2020 ; Kirkeby, Nolbrant *et al.*, 2017 ; Osborn & Hallett, 2017). Grâce à ces greffons de synthèse issus d'iPS, on peut désormais se passer de donneur pour créer *in vitro* un médicament cellulaire allogénique, sur mesure, plus facilement reproductible, efficace et sûr (Barker *et al.*, 2017 ; Kirkeby, Parmar, *et al.*, 2017 ; Natalwala & Kunath, 2017 ; Studer, 2017). Ce parcours montre que certaines stratégies thérapeutiques ne pouvaient réellement se concrétiser sans le développement synergique des sciences et des techniques (Barker, 2014).

3^{ème} génération : des greffons cellulaires génétiquement modifiés

À partir des années 2000-2010, la modification génique permet de reprogrammer les lymphocytes T pour qu'ils ciblent des cellules cancéreuses (Labanieh *et al.*, 2018). Emily Whitehead, une Américaine de 7 ans atteinte d'une leucémie aigüe lymphoblastique, fut l'une des premières à recevoir ce type d'immunothérapie cellulaire, en 2012 (Caldwell *et al.*, 2021). Le principe de ces cellules CAR-T est de reprogrammer le système immunitaire *ex vivo* et de le réimplanter dans le patient pour cibler le cancer.

Depuis, cette stratégie a permis de sauver la vie de nombreux patients en impasse thérapeutique et a suscité un engouement majeur. Profitant du développement d'outils de modifications géniques comme CRISPR et TALEN, l'ingénierie génétique est utilisée dans ce domaine à des fins multiples : tolérance immune (allothérapies), augmentation de l'efficacité, persistance, *switch on/off*, combinaison de cibles, etc. (Cortés-Selva *et al.*, 2021 ; Minutolo *et al.*, 2019 ; Mitwasi *et al.*, 2020 ; Morandi *et al.*, 2020 ; Picanco-Castro *et al.*, 2020 ; Rafiq *et al.*, 2020 ; Valton *et al.*, 2018). Ces cellules augmentées, de plus en plus souvent issues de cellules souches pluripotentes (Y. Li *et al.*, 2018), ciblent désormais un large panel d'indications (MacKay *et al.*, 2020 ; Marofi *et al.*, 2021 ; Moreno-Cortes *et al.*, 2021 ; Raffin *et al.*, 2020 ; Weber *et al.*, 2020 ; J. X. Yu *et al.*, 2020).

L'immuno-oncologie est aujourd'hui l'exemple d'une thérapie cellulaire contemporaine : un intégrateur pluridisciplinaire de la biologie, de l'immunologie, de la génétique (Depil *et al.*, 2020 ; Elisseeff *et al.*, 2021). Elle apporte aussi la preuve que malgré certains échecs, les thérapies cellulaires ne sont pas qu'un mythe et que les promesses qu'elles portent sont atteignables (cf. figure 6).

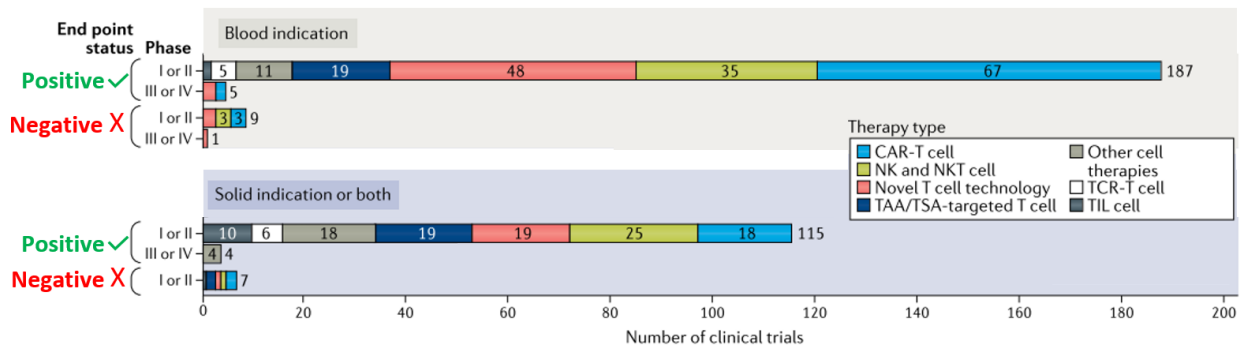


Figure 6. Essais cliniques en immuno-oncologie cellulaire en 2020

Adapté de « Cancer cell therapies: The clinical trial landscape » par Yu *et al.*, 2020.

1.4 ÉTAT DE L'ART DES THÉRAPIES CELLULAIRES ET LIMITES ACTUELLES

Les prémices de la thérapie cellulaire

À ce jour, le nombre de patients traités par des thérapies cellulaires augmente, mais le nombre de médicaments commercialisés reste faible (Quinn *et al.*, 2019 ; Upadhaya *et al.*, 2021). Les essais cliniques issus de cellules souches pluripotentes sont encore plus rares (cf. figure 7 & Yamanaka, 2020).

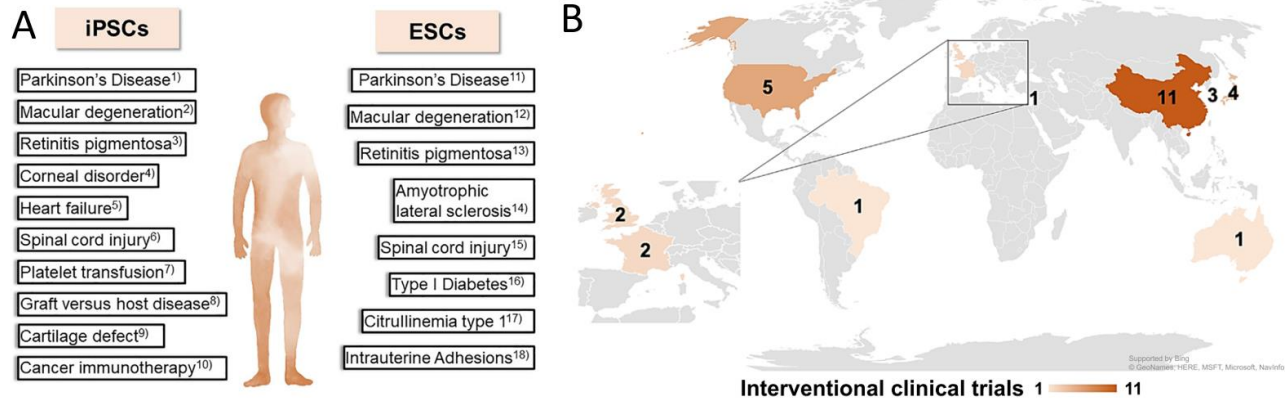


Figure 7. Principales thérapies cellulaires issues de cellules souches pluripotentes

(A) Adapté de « Pluripotent stem cell-based cell therapy – Promise and challenges » par Yamanaka, 2020. Essais cliniques en thérapies cellulaires issues de cellules souches pluripotentes induites (à gauche) et embryonnaires (à droite), menés en septembre 2020 et listées sur clinicalTrials.gov. (B) Carte des thérapies cellulaires interventionnelles en 2020. Adapté de « Global trends in clinical trials involving pluripotent stem cells: A systematic multi-database analysis » par Deinsberger *et al.*, 2020.

« Injecter une suspension de cellules pure à 100 % »

Historiquement, les transfusions sanguines ou les suspensions cellulaires injectées pour l'oncohématologie correspondent à des cellules qui sont naturellement des cellules isolées circulant dans le sang. Les standards de contrôle qualité des thérapies cellulaires héritent, au moins partiellement des normes historiques de l'industrie du médicament ; il est souvent exigé du produit cellulaire injecté qu'il soit parfaitement défini, pur à 100 %, et qu'il ne contienne qu'un seul type de cellules effectrices, qu'un seul principe actif.

Artefacts d'identités et fonctions cellulaires

La fonction d'un organe comme celles des cellules qui le composent est intimement liée à la structure tissulaire.

L'essor de la transcriptomique de cellules uniques a permis d'éclairer les protocoles de différenciation d'une lumière nouvelle. On sort progressivement du modèle classique d'arbre de différenciation avec un nombre fini de stades cellulaires pour aller vers un modèle continu plus réaliste où les cellules empruntent des chemins, des continuums de différenciation (cf. figure 8). Cette hétérogénéité cellulaire est très difficile à appréhender. Même au sein d'une population cellulaire apparemment pure, exprimant uniformément les mêmes marqueurs, il y aura toujours un certain degré d'hétérogénéité (Haas *et al.*, 2018 ; Velten *et al.*, 2017).

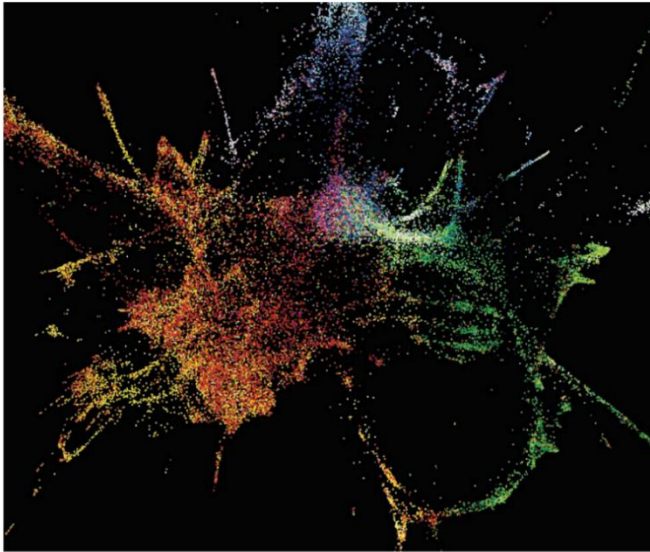


Figure 8. Transcriptomes de cellules uniques et identités cellulaires

Adapté de « A new view of embryo development and regeneration » par Harland, 2018, revue *Science*, percée scientifique de l'année en 2018. Profil transcriptionnel en cellules uniques d'un embryon de poisson-zèbre. Chaque point représente un aperçu de l'état cellulaire au premier jour du développement. Les cellules de l'embryogenèse précoces sont au centre ; les cellules en cours de différenciation se déploient en branches neurales (rouge), épidermiques (bleu), mésendodermiques (vert).

Pour la maladie de Parkinson, les essais cliniques en cours utilisent tous des progéniteurs neuraux issus de cultures 2D axés sur la pureté cellulaire ; une suspension homogène de ces cellules est injectée dans le cerveaux et il est attendu que la différenciation initiée *in vitro* se termine correctement *in vivo*. Le groupe de Malin Parmar, en pointe dans ce domaine, utilise la transcriptomique de cellules uniques pour vérifier les identités cellulaires. Dans un modèle préclinique de rats parkinsoniens, la population de cellules greffées, pourtant pures à l'origine, laisse place six mois après à plusieurs types cellulaires inattendus (Tiklová *et al.*, 2020). L'hétérogénéité des cellules se révèle dans ce cas tardivement : après le contrôle qualité, après la greffe.

De nombreux essais cliniques sont menés actuellement avec des cellules immunitaires obtenues à partir de cellules souches pluripotentes (cf. Fate, Carisma, Allogene, Century, Cytovia, Notch, Adaptimmune, Astellas, Takeda, Caribou, Shoreline, CIRA etc.). La correspondance physiologique et l'homogénéité de ces cellules immunes artificielles, sont établies typiquement par cytométrie de flux et la présence de marqueurs de surface. Malgré des caractéristiques plus ou moins proches de leurs équivalents naturels, la fonctionnalité n'est pas toujours complète. La compréhension du lien entre identité cellulaire et effet thérapeutique est ici aussi une problématique importante pour les années à venir.

Mortalité cellulaire lors de l'injection

Le taux de survie cellulaire post-greffe des thérapies cellulaires actuelles est un enjeu majeur. Traditionnellement, les cellules cultivées en 2D sont récoltées par détachement et dissociation avant d'être injectées chez le patient. Ces étapes entraînent jusqu'à 75 % de morts cellulaires.

- La dissociation peut provoquer un dommage cellulaire important. La mortalité cellulaire peut être directe, engendrée par stress mécanique, ou indirecte, par apoptose due à la perte du contact cellule/cellule ou cellule/matrice, ou par manque de facteurs de croissance/survie (anoïkis). Dans le cas de la greffe de neurones matures, la dissociation aboutit à la détérioration massive des neurites, et la mort cellulaire atteint presque 100 %. C'est pour cette raison que les greffes dopaminergiques pour la maladie de Parkinson expérimentées jusqu'à présent n'ont pu être constituées que de progéniteurs dopaminergiques et non de neurones matures pleinement différenciés et stables. Et, malgré cela, jusqu'à 90 % des progéniteurs injectés meurent dans les suites de l'injection (Sortwell *et al.*, 2000). Certains types cellulaires sont plus fragiles que d'autres ; cette sensibilité au détachement et à la dissociation limite grandement les indications impliquant des cellules adhérentes.
- La manipulation et l'injection des cellules peuvent produire un stress mécanique intense. Le stress de cisaillement lors du passage des cellules dans l'aiguille est souvent cité. La stratégie de transplantation (Amer *et al.*, 2017 ; Ng & Thakor, 2020) implique souvent la création de matériel spécifique et constitue un maillon indispensable de chaque projet thérapeutique (Mitrousis *et al.*, 2018 ; O'Ceirbhail *et al.*, 2014 ; Wahlberg *et al.*, 2018).
- Une troisième cause de mortalité cellulaire lors de la greffe est due à l'inhospitalité du site d'injection. Les cellules ayant survécu au détachement, à la dissociation et à l'injection arrivent dans un environnement inflammatoire, ischémique (effet de l'injection) et souvent pathologique (maladies chroniques, dégénératives, etc.). Dans ce contexte de microenvironnement dégradé, Par conséquent, la survie et l'intégration des cellules greffées sont difficiles.

Vers une 4^{ème} génération de thérapie cellulaire : biophysique et biomimétisme

Au-delà des défis immunologiques biologiques et génétiques évoqués précédemment, des difficultés persistantes de survie tant au niveau de la production que de la greffe questionnent la stratégie globale des thérapies cellulaires. Les techniques organoïdes et plus largement les avancées en biophysique permettent d'envisager de nouveaux formats de culture et de greffe en 3D. Cette stratégie pourrait bénéficier à l'identité, au fonctionnement, à la survie et à l'intégration des greffons (cf. figure 9). Ce travail de thèse s'inscrit dans cette approche récente des thérapies cellulaires.

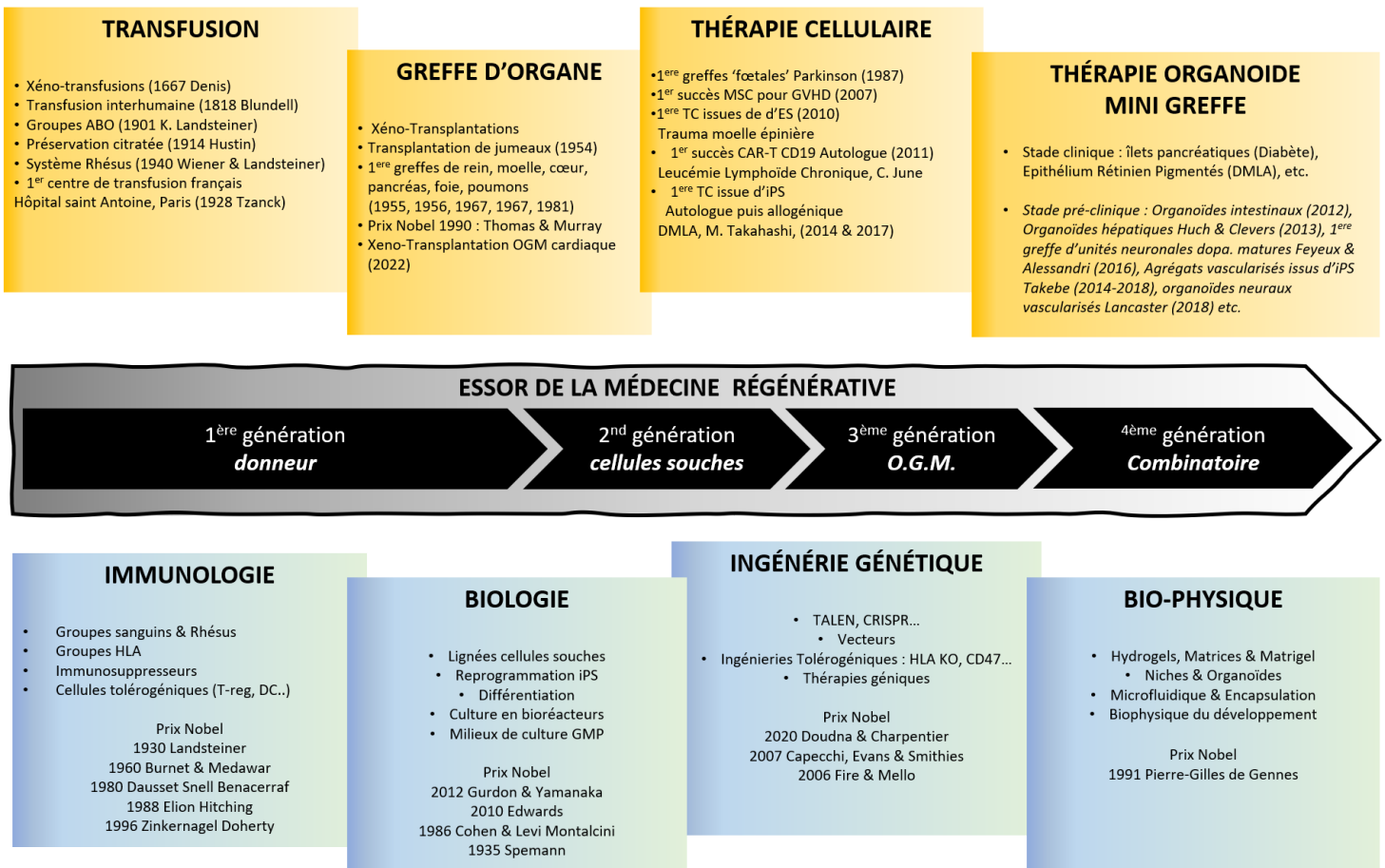


Figure 9. Interdisciplinarité de la médecine régénérative

Frise schématique illustrant les débuts cliniques de la médecine régénérative. Cette dernière est à la croisée de quatre sciences fondamentales (*voir en bas*) et recouvre quatre champs d'application médicale (*voir en haut*).

2. BIOMIMÉTISME ET ORGANOÏDES

2.1 LE BIOMIMÉTISME

Le mot « biomimétique » vient du grec *bíos* (vie) et de *mímêsis* (imitation). Le biomimétisme désigne un processus d'innovation ou d'ingénierie qui s'inspire des formes, matières, propriétés, processus et fonctions du vivant (Wikipédia, n.d.). Le Centre d'études et d'expertises dédié au déploiement du biomimétisme en France décrit le biomimétisme comme « une coopération interdisciplinaire de la biologie et de la technologie ou d'autres domaines d'innovation dans le but de résoudre des problèmes pratiques par le biais de l'analyse fonctionnelle des systèmes biologiques, de leur abstraction en modèles ainsi que le transfert et l'application de ces modèles à la solution ». Il le définit comme « une philosophie et des approches conceptuelles interdisciplinaires prenant pour modèle la nature afin de relever les défis du développement durable » (CEEBIOS, 2021).

Le biomimétisme englobe différents domaines d'application techniques, médicaux, industriels ou économiques. Il comprend des sous-domaines tels que la bionique ou l'architecture biomimétique, par exemple. Il peut concerner des échelles nanométriques et biomoléculaires ainsi que des échelles macroscopiques et écosystémiques.

Il est difficile de dater l'émergence du biomimétisme tant l'inspiration du vivant est présente de longue date. On peut citer Léonard de Vinci (1452-1519) et sa machine volante qui devait permettre aux hommes de voler grâce à des ailes inspirées de celles des oiseaux. C'est l'Américain Otto Schmitt qui aurait forgé le néologisme anglais *biomimetics* pour décrire la notion de transfert de processus de la biologie à la technologie (Schmitt, 1984). Janine Benyus l'a ensuite vulgarisé dans son livre de 1997 *Biomimicry: innovation inspired by nature*, où elle invite à considérer la nature comme « modèle, mesure et mentor » (Pathak, 2019).

Appliquée aux thérapies cellulaires, l'inspiration vient de l'étude de la biologie du développement et de l'histologie qui permettent des avancées majeures pour la biophysique, la science des matériaux, la culture cellulaire, la différenciation (Ingber *et al.*, 2006 ; Nava *et al.*, 2015 ; Vincent, 2009). Viktor Hamburger disait en 1968 : « *Our real teacher has been and still is the embryo, who is, incidentally, the only teacher who is always right.* » (The emergence of order in developing systems: The twenty-seventh symposium the society for developmental biology, 1968) (cf. figure 10).

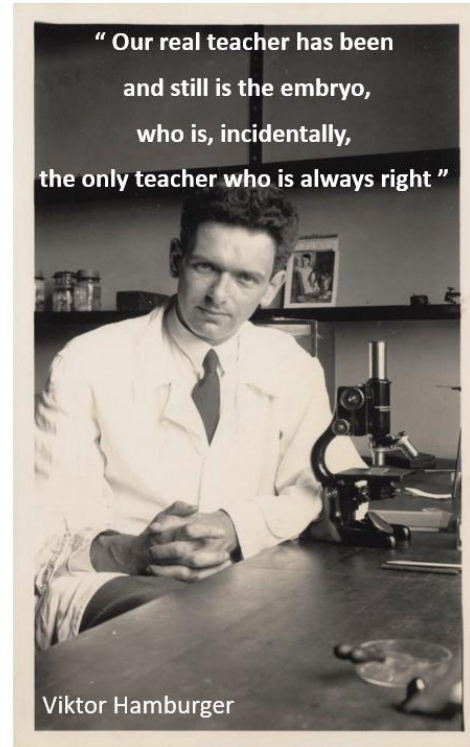


Figure 10. Biomimétisme et embryologie
Portrait et citation de Viktor Hamburger, embryologiste germano-américain (1900-2001).

2.2 LA BIOCHIMIE DU DÉVELOPPEMENT

La biologie du développement reste aujourd'hui la première ressource pour guider la création de greffons cellulaires issus de cellules souches pluripotentes. C'est une science pluridisciplinaire qui décrit les mécanismes expliquant la transformation d'une cellule unique en organisme pluricellulaire complexe. Le programme développemental entraîne les cellules à proliférer, rentrer en apoptose, se différencier, migrer pour former un organisme.

La biologie du développement et les travaux précoces sur les batraciens (cf. figure 11) ont permis d'identifier des signaux biochimiques clés. Une chorégraphie (combinaison spatio-temporelle précise) de molécules diffusives, appelées « morphogènes », guident chaque cellule dans l'expression d'un programme développemental spécifique (*French flag model*, Lewis Wolpert, 1960). La compréhension de cette communication cellulaire a permis d'élaborer des protocoles de différenciation de plus en plus proches de l'*in vivo* et de plus en plus efficaces.

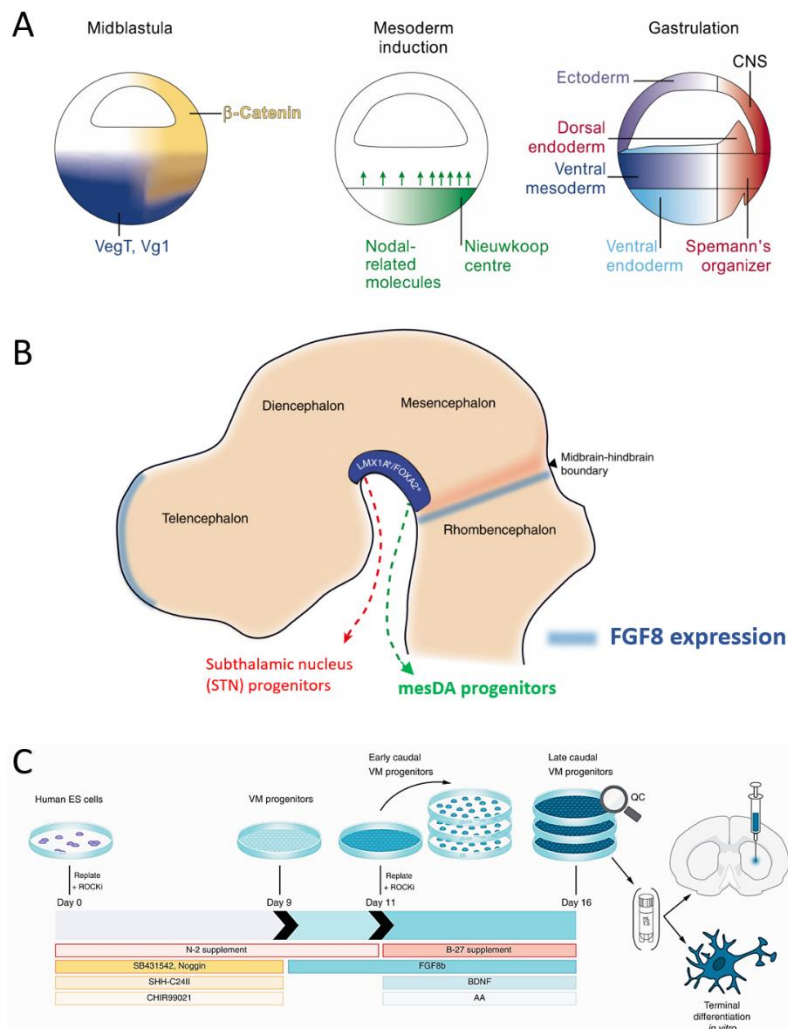


Figure 11. Différenciation dirigée

(A) Gradient de morphogènes et centres inducteurs de Nieuwkoop et Spemann lors de l'embryogenèse du xénope. Adapté de « The establishment of Spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo » par de Robertis et al., 2000. (B et C) Approche biomimétique pour l'optimisation des protocoles de différenciation de neurones dopaminergiques *in vitro*. La caudalisation des progéniteurs mésencéphaliques ventraux et leur orientation précise vers une identité dopaminergique sont obtenues comme dans des conditions *in vivo*, grâce à l'utilisation précise du facteur de croissance FGF8. Adapté de « Generation of high-purity human ventral midbrain dopaminergic progenitors for *in vitro* maturation and intracerebral transplantation » par Nolbrant et al., 2017.

2.3 LA BIOPHYSIQUE DU DÉVELOPPEMENT

L'étude du développement révèle également l'importance du rôle du microenvironnement. La dualité chimique/mécanique de l'embryon avait été pressentie par Alan Turing alors même qu'il décrivait sa théorie « biochimique » de réaction/diffusion (Saunders, 2013).

En plus des gradients de morphogènes et des mécanismes d'induction/compétence, les signaux mécaniques éclairent les trajectoires d'identité cellulaire (cf. figure 12) (Chen, 2008 ; Eyckmans *et al.*, 2011 ; Hannezo & Heisenberg, 2019 ; Muncie & Weaver, 2018 ; Shao *et al.*, 2015 ; Vining & Mooney, 2017). La biophysique et la mécanobiologie ont permis de faire des avancées significatives dans la biologie du développement, l'établissement de protocoles de différenciation, la reprogrammation cellulaire ou la biologie des cancers (Hayward *et al.*, 2021).

In vitro, la physique du microenvironnement cellulaire peut être utilisée pour guider la différenciation cellulaire (cf. figure 12). La rigidité de la matrice est un paramètre clef (Chen, 2008). Les cellules souches mésenchymateuses, par exemple, cultivées sur des substrats plus ou moins rigides, vont se différencier préférentiellement vers des destins osseux, cartilagineux, adipeux ou éventuellement nerveux (Cameron *et al.*, 2011 ; Chaudhuri *et al.*, 2016 ; Das *et al.*, 2016). Lors de la reprogrammation cellulaire, les propriétés mécanobiologiques et le microenvironnement en 3D participent également aux changements d'identités cellulaires (Caiazzo *et al.*, 2016).

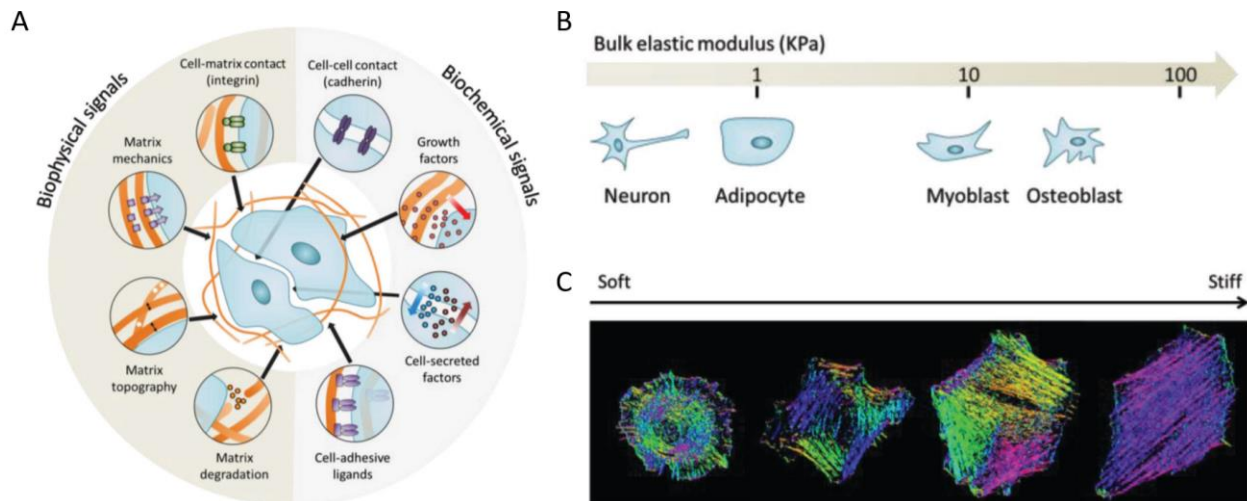


Figure 12. Dualité physico-chimique lors du développement

(A) Les cellules intègrent des signaux biochimiques et biophysiques multiples. Adapté de « Recent advances in engineering the stem cell microniche in 3D » par Bao *et al.*, 2018. Les cellules convertissent les stimulations mécaniques en signaux biochimiques, ce qui leur permet de sentir leur microenvironnement physique et d'y répondre. Cette mécanotransduction est essentielle *in vivo* et *in vitro*. **(B)** La différenciation des MSCs en types cellulaires est régulée par la rigidité de leur microenvironnement (Bao *et al.*, 2018). **(C)** Le cytosquelette d'actine s'organise en fonction de la rigidité du substrat ; les différentes couleurs indiquent l'orientation des filaments d'actine. Adapté de « Adaptive rheology and ordering of cell cytoskeleton govern matrix rigidity sensing » par Gupta *et al.*, 2015.

2.4 LES CELLULES SOUCHES RÉSIDENT DANS DES NICHES

Les identités cellulaires ne sont pas qu'une addition simple de signaux physiques et chimiques. Elles existent de manière complexe et dynamique au sein de structures supracellulaires hautement organisées, que l'on nomme « niches » (cf. figure 13).

Les niches sont définies comme : « des microenvironnements spécialisés d'un tissu où les cellules souches résident. Elles exercent une influence majeure sur les fonctions des cellules souches et peuvent être définies par la somme des interactions cellules-cellules, cellule-matrice, cellules-facteurs solubles, dans un contexte de contraintes physiques et géométriques qu'une cellule rencontre à un temps précis » (Simian & Bissell, 2017). Il n'est pas certain que le caractère « souche » soit intrinsèque ou extrinsèque et qu'il puisse être défini en dehors de la niche (Mesa *et al.*, 2015 ; Schofield, 1978). Une cellule souche sortant de sa niche peut perdre son caractère souche ; une cellule différenciée qui intègre ou colonise une niche peut reprendre une identité de cellule souche.

Les niches sont composées de plusieurs types cellulaires qui interagissent : vaisseaux sanguins, fibroblastes, cellules immunitaires, cellules nerveuses, cellules lymphatiques. Les cellules souches sont intégrées aux unités fonctionnelles tissulaires, aux tissus, et, de manière générale, à l'ensemble de l'organisme. L'interaction de la cellule souche avec son microenvironnement va influencer son maintien ou son engagement dans un stade quiescent, prolifératif ou de différenciation.

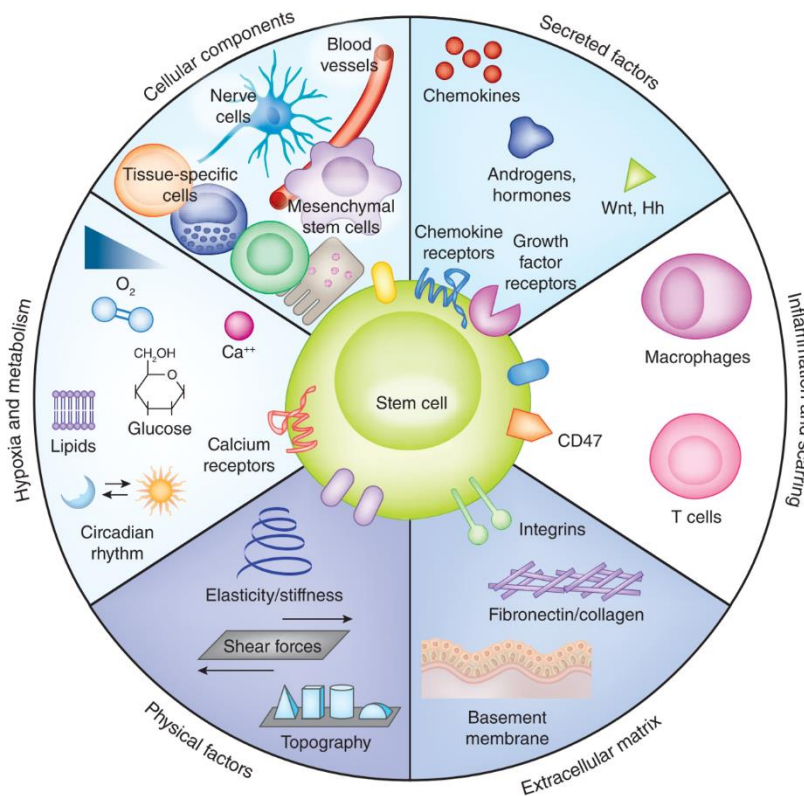


Figure 13. La niche cellulaire

La niche intègre de façon dynamique autour des cellules souches des éléments cellulaires, des facteurs sécrétés, de la matrice extracellulaire, des facteurs physiques chimiques et métaboliques. Les interactions entre les cellules souches et leurs niches sont bidirectionnelles et réciproques. Adapté de « Modulating the stem cell niche for tissue regeneration » par Lane *et al.*, 2014.

On peut décrire des niches lors du développement (cellules souches pluripotentes et progénitrices, Kyrianiou *et al.*, 2020), mais également dans des tissus adultes. Les niches et leurs cellules souches sont indispensables pour l'homéostasie des unités tissulaires (cf. figure 14) (Chacón-Martínez *et al.*, 2018 ; Morrison & Spradling, 2008).

Le maintien ou l'établissement d'une structure tissulaire est intimement liés au destin des cellules souches au sein des niches. La biologie en 3D tente de mimer ces structures supracellulaires et leurs fonctions associées *in vitro*. La culture dite « organoïde » intègre les notions de niches, de signalisations chimiques et mécaniques dans une approche globale biomimétique.

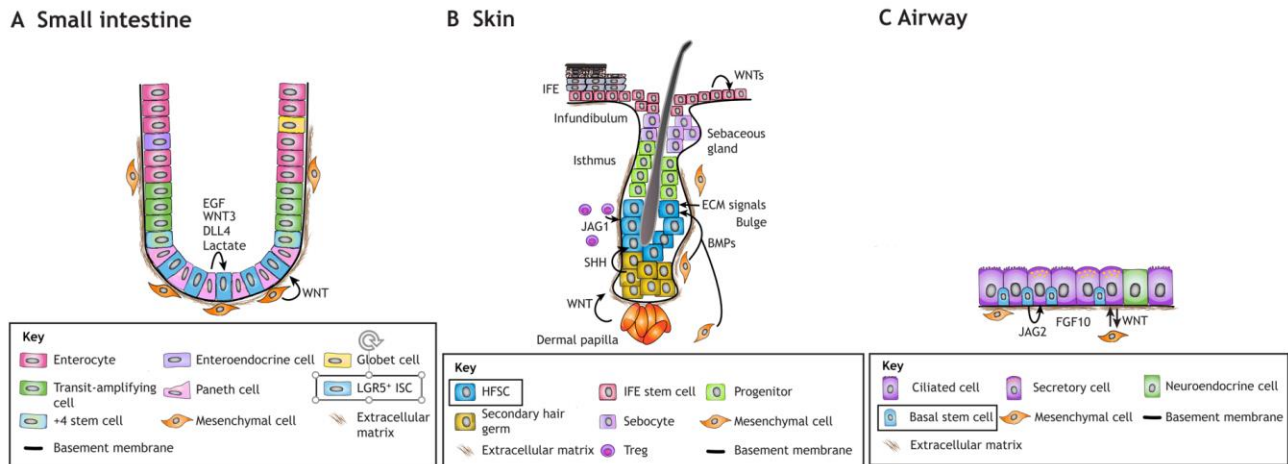


Figure 14. Exemple de cellules souches adultes et leurs niches

Niches des cellules souches intestinales (A), cutanées (B) et des voies respiratoires (C). LGR5 + ISC : cellules souches intestinales ; HFSC : cellules souches du follicule pileux ; *Basal stem cell* : cellules souches des voies aériennes.

2.5 ORGANOÏDES : L'IN VITRO BIOMIMÉTIQUE

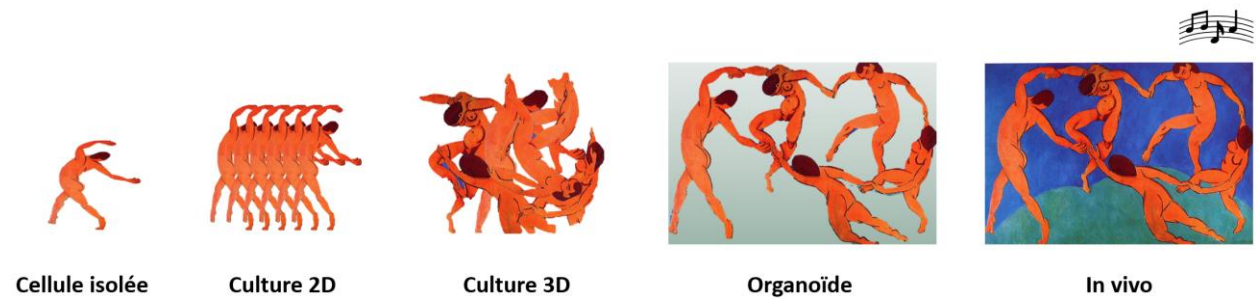
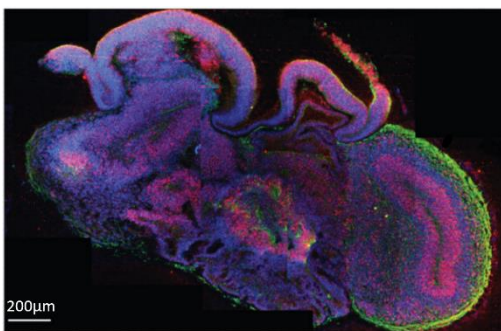


Figure 15. Danse des cellules

La chorégraphie tissulaire inspirée de « La danse » Henri Matisse 1909.

Les organoïdes sont des assemblages pluricellulaires cultivés *in vitro* qui ressemblent à des mini-organes. Ils découlent des cultures en 2D classiques et des protocoles de différenciation historiques et intègrent les progrès de la biologie des cellules souches (M. Li & Belmonte, 2016), de la génétique et de la biophysique. La culture des organoïdes est, par nature, bio-inspirée (cf. figure 15). Elle tente de récapituler *in vitro* les mécanismes décrits par la biologie du développement en intégrant à la fois des paramètres biochimiques et biophysiques. Différentes définitions existent (Simian & Bissell, 2017 ; cf. figure 16)

- Shamir et Ewald, 2014 : « *Various subfields use these terms either interchangeably or distinctly; for example, in the field of mammary gland biology, the term organoids refers to primary explants of epithelial ducts into 3D extracellular matrix (ECM) gels. Conversely, in studies of intestinal biology, organoids can refer to clonal derivatives of primary epithelial stem cells that are grown without mesenchyme or can refer to epithelial–mesenchymal co-cultures that are derived from embryonic stem cells or induced pluripotent stem cells* » (Shamir & Ewald, 2014).
- Lancaster et Knoblich, 2014 : « *Thus, we would like to define an organoid as containing several cell types that develop from stem cells or organ progenitors and self-organize through cell sorting and spatially restricted lineage commitment, similar to the process in vivo* » (Lancaster & Knoblich, 2014).
- Clevers, 2016 « *An organoid is now defined as a 3D structure grown from stem cells and consisting of organ-specific cell types that self-organizes through cell sorting and spatially restricted lineage commitment* » (Clevers, 2016).
- Fatehullah, 2016 : « *Here we define an organoid as an in vitro 3D cellular cluster derived exclusively from primary tissue, embryonic stem cells, or induced pluripotent stem cells, capable of self-renewal and self-organization, and exhibiting similar organ functionality as the tissue of origin* » (Fatehullah et al., 2016).



Lancaster et al., 2013.

Figure 16. Caractéristiques des organoïdes :

- ✓ Culture 3D pluricellulaire
- ✓ Agencement de plusieurs types cellulaires
- ✓ Dérivés à partir de cellules souches
- ✓ Auto-organisation
- ✓ Similarités avec un organe :
 - Développement
 - Histologie
 - Fonction

Ce système de culture permet des interactions complexes, semblables à celles observées dans les niches cellulaires *in vivo*. Le concept d'auto-organisation est clef (cf. figure 17). Dans les bonnes conditions physico-chimiques, les cellules et groupes de cellules vont reprendre leur programme développemental intrinsèque et recréer elles-mêmes leur propre niche. Plus l'organoïde avance dans son auto-organisation, plus il développe sa propre niche, sa propre signalisation locale. Idéalement cette organisation permet à l'organoïde de s'affranchir en partie de signaux artificiels.

Starting cell conditions and stages in organoid derivation

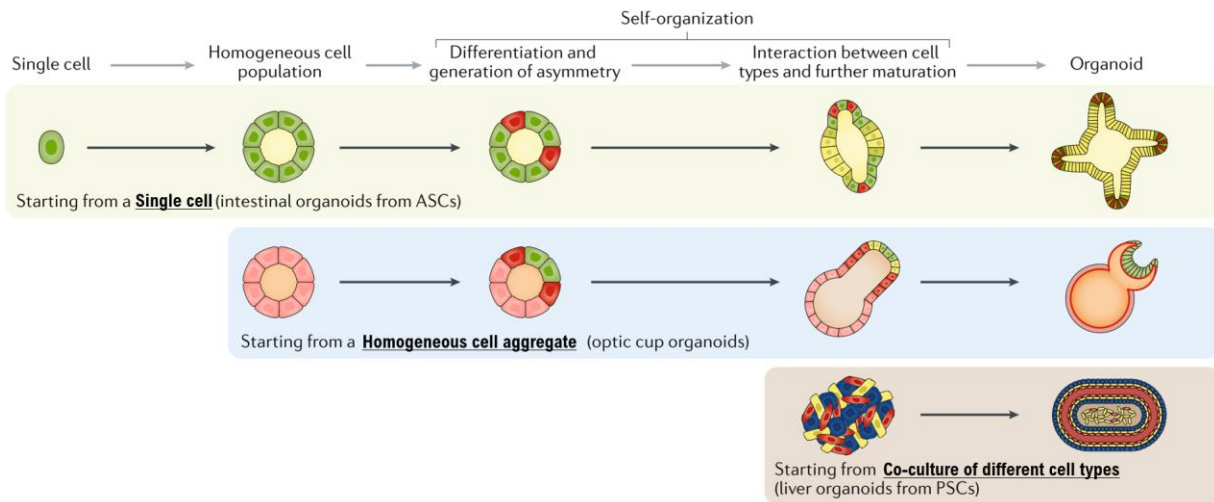


Figure 17. Auto-organisation des organoïdes

L'auto-organisation des cultures organoïdes peut être initiée à partir d'une cellule unique, d'un groupe de cellules homogènes ou d'un regroupement de différents types cellulaires. Adapté de « Progress and potential in organoid research » par Rossi et al., 2018.

L'organoïde se situe à une échelle intermédiaire entre l'échelle cellulaire et l'échelle de l'organe (cf. figure 18). Il reconstitue une unité fonctionnelle tissulaire similaire à l'*in vivo* (Iwasawa & Takebe, 2021). Nous ne sommes pas capables à ce jour de réellement recréer *in vitro* des organes de synthèse, mais l'organoïde est ce qui s'en rapproche le plus.

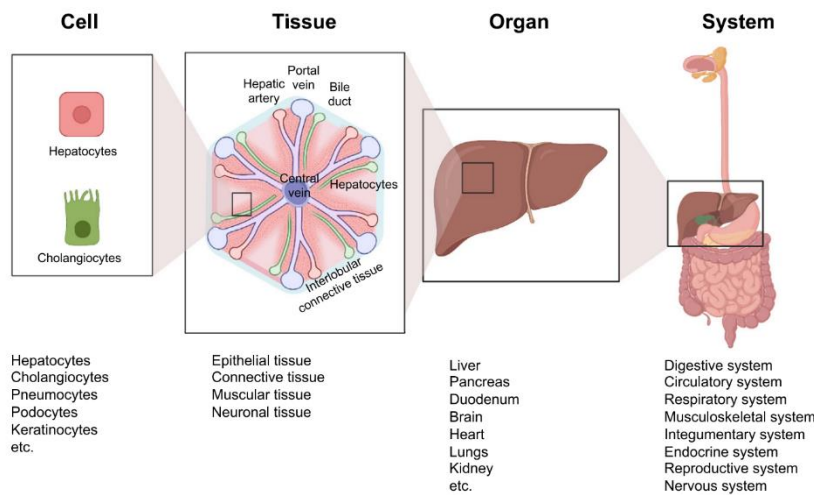


Figure 18. Échelle microtissulaire des organoïdes

Organisation hiérarchique des cellules, tissus, organes, systèmes. Adapté de « Organogenesis in vitro » par Iwasawa & Takebe, 2021.

1^{ère} Première génération d'organoïdes issus de cellules souches adultes ou d'explants

Les premiers succès de cultures en 3D biomimétiques ont pu éclore grâce à la culture d'explants contenant à des degrés variables des cellules souches adultes. En 1952, Moscona montrait, au travers de la technique du « verre de montre », que la dissociation et la réagrégation de cellules issues de l'embryon de poulet pouvaient mener à des structures pseudotissulaires *in vitro* (Moscona & Moscona, 1952).

Mina Bissell et son équipe, furent ensuite parmi les premiers à utiliser des matrices extracellulaires pour développer des modèles tissulaires complexes. En utilisant du Matrigel® et des cellules issues de glandes mammaires, ils réussirent à décrire une morphogénèse *in vitro* avec interaction avec la membrane basale, polarisation épithéliale et sécrétion dirigée (Barcellos-Hoff *et al.*, 1989 ; Petersen *et al.*, 1992).

Le groupe de Hans Clevers a été l'un des premiers à provoquer un engouement pour cette technologie en démontrant que les cellules souches intestinales dissociées pouvaient produire à elles seules des organoïdes intestinaux (Sato *et al.*, 2009).

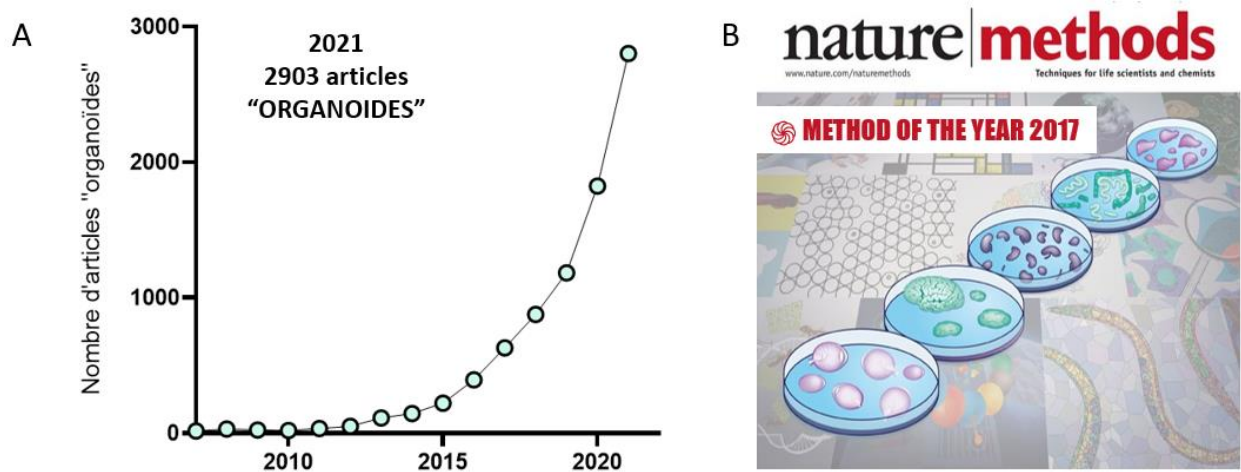


Figure 19. L'essor récent des organoïdes

(A) Nombre d'articles référencés sur PubMed mentionnant le mot « *organoid* ».

(B) Couverture de la revue *Nature Methods* illustrant la méthode de l'année 2017, les organoïdes. « Organoids, the body builders » par Eisenstein, 2018.

L'émergence de la technologie des organoïdes s'est intensifiée à partir des années 2010 (cf. figure 19) et s'appuie sur des avancées dans deux domaines : les systèmes de culture en 3D et les matrices biomimétiques (Bao *et al.*, 2018 ; Simian & Bissell, 2017 ; Velasco *et al.*, 2020).

Des progrès techniques ont été réalisés avec les techniques de gouttes suspendues (Harrison, 1907), de puits non adhérents (Sutherland *et al.*, 1971) ou avec les bioréacteurs (cf. partie dédiée bioréacteur). L'inclusion des cellules dans diverses matrices extracellulaires par les techniques « *gel embedding* » ou « *sandwich* » supporte également le raffinement des cultures en 3D.

Par ailleurs, la mise au point du Matrigel® est un tournant majeur. Encore aujourd'hui, la quasi-totalité des organoïdes est réalisée par inclusion dans du Matrigel®. Cette matrice de membrane basale solubilisée est extraite du sarcome murin d'Engelbreth-Holm-Swarm (EHS), une tumeur riche en protéines de matrice extracellulaire (Barcellos-Hoff *et al.*, 1989 ; Danielson *et al.*, 1992 ; Hayashi *et al.*, 2004 ; Kibbey, 1994 ; Kleinman & Martin, 2005 ; Orkin *et al.*, 1977 ; Swarm, 1963). Ses principaux composants sont la laminine, le collagène de type IV, l'entactine et l'héparane sulfate protéoglycane. Elle contient également des facteurs de croissance présents dans la tumeur EHS. À température ambiante, le Matrigel® se polymérise pour produire une matrice semblable à la matrice basale des mammifères. Son utilisation relativement simple facilitera la large diffusion des modèles en 3D (Simian & Bissell, 2017).

La découverte de la fibronectine et de la laminine, deux protéines clefs de l'interaction cellule-membrane basale, marque une étape importante (Gahmberg & Hakomori, 1973 ; Hynes, 1973 ; Ruoslahti *et al.*, 1973 ; Timpl, 1979). Les progrès des biomatériaux de synthèse tendent à améliorer encore les cultures en 3D. Toutefois, il demeure parfois difficile de se passer du Matrigel® (cf. discussion Partie 1)

2^{ème} Seconde génération d'organoïdes : des cellules souches pour tous les organes

La capacité des cellules souches à s'auto-organiser et à générer des structures ressemblant à l'*in vivo* a ensuite été reproduite à partir de cellules souches pluripotentes. Yoshiki Sasai *et al* ont ainsi pu obtenir des structures corticales et des cupules optiques à partir de PSC (Eiraku *et al.*, 2011). Les « *mini-brains* » et les « *mini-guts* » sont précurseurs puis un nombre croissant d'organes sont reproduits *in vitro* à partir de cellules souches pluripotentes (cf. figure 20) (Clevers, 2016 ; M. A Lancaster *et al.*, 2013 ; M. A. Lancaster & Knoblich, 2014).

Les organoïdes deviennent donc une boîte à outils servant un large éventail d'objectifs (cf. figure 20) (Hofer & Lutolf, 2021 ; M. Li & Belmonte, 2016 ; Madl *et al.*, 2018 ; H. Xu *et al.*, 2018) : modèles développementaux et pathologiques, stratégies de *screening* thérapeutique, médecine régénérative, médecine personnalisée (Lensink *et al.*, 2021 ; Mebarki *et al.*, 2018).

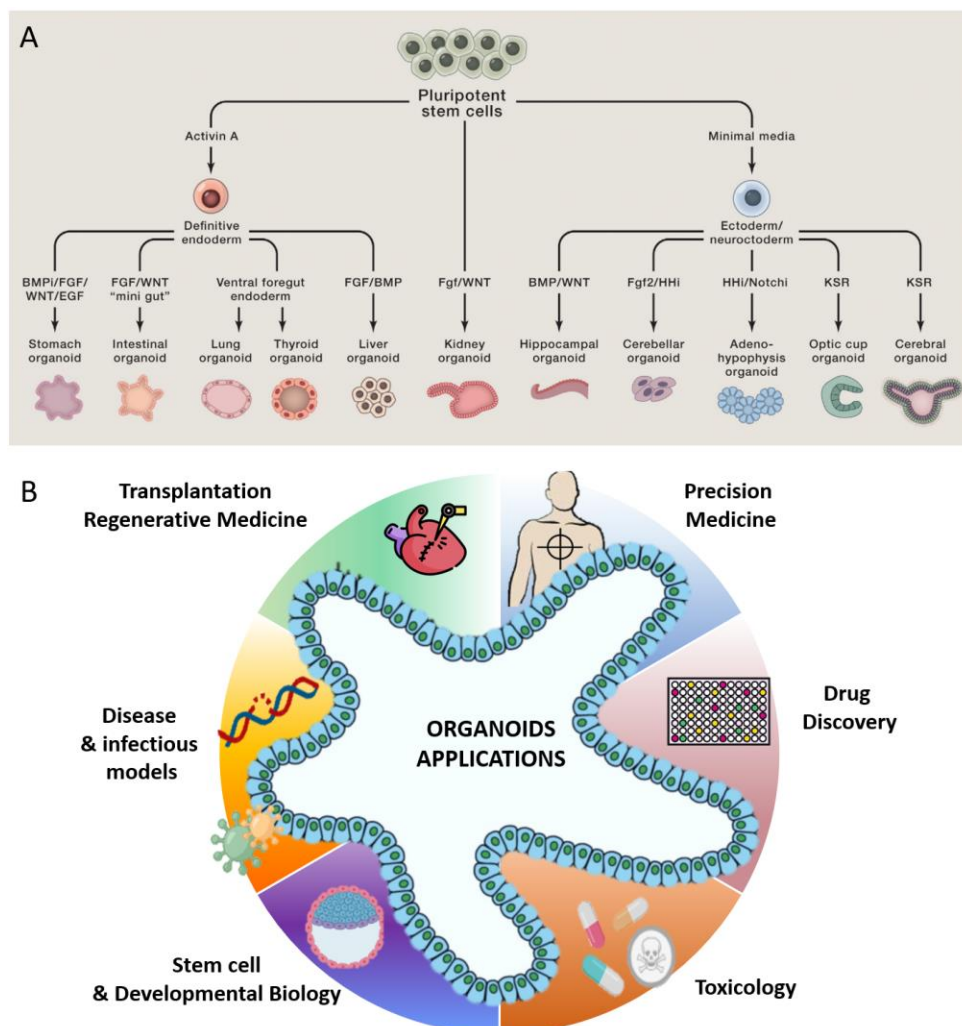


Figure 20. Applications multiples des organoïdes

(A) La technologie organoïde est adaptable à tous les organes. Adapté de « Modeling development and disease with organoids » par Clevers, 2016. (B) Les organoïdes peuvent être utilisés en thérapeutique humaine et en recherche fondamentale.

3^{ème} génération d'organoïdes : des cocultures de plus en plus complexes

Bien qu'ils se rapprochent toujours plus fidèlement de la physiologie, les organoïdes en diffèrent toutefois beaucoup. Ils n'atteignent pas la complexité et la maturité des tissus *in vivo*. Leur absence de vascularisation, d'innervation, de système lymphatique, de cellules immunitaires les éloigne de l'intégration à l'œuvre dans un organisme complet.

Les stratégies de coculture entreprises récemment permettent cependant d'intégrer la composante vasculaire (M. A. Lancaster, 2018 ; Mansour *et al.*, 2018 ; McGuigan & Sefton, 2006 ; Nishiguchi *et al.*, 2018 ; Pham *et al.*, 2018 ; Takebe *et al.*, 2014), de faire interagir deux organoïdes, « *assembloïdes* » (Pas, 2018 ; Sloan *et al.*, 2018), voire de mimer le fonctionnement d'un organisme « *body-on-a-chip* » (Novak *et al.*, 2020) (cf. figure 21).

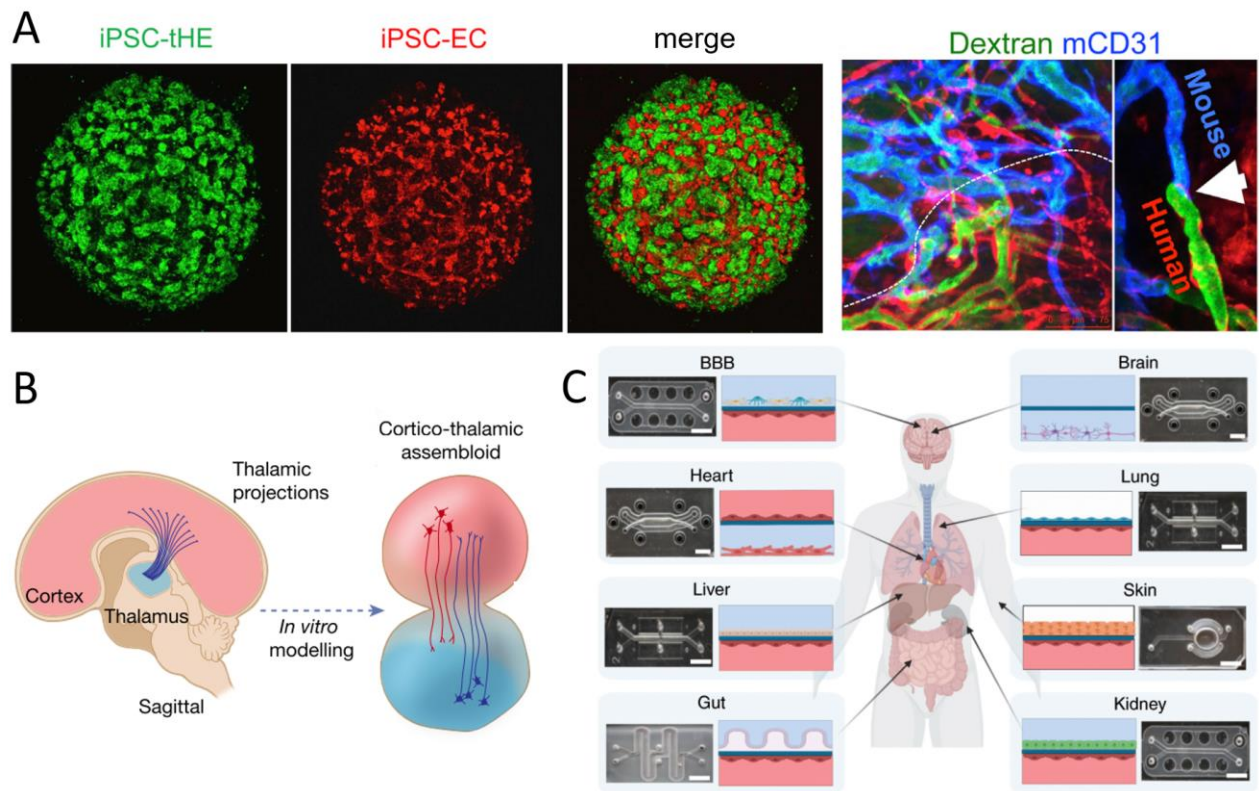


Figure 21. Cocultures et organoïdes

(A) En utilisant des cocultures de progéniteurs d'endoderme hépatique (iPSC-tHE), endothéliaux (iPSC-EC) et mésenchymaux (iPSC-STM), Takebe *et al.* produisent des « bourgeons hépatiques » vascularisés qui sont transplantés chez la souris. Le panel de gauche présente une imagerie confocale illustrant le réseau vasculaire en rouge et les hépatocytes en vert. Le panel de droite montre la connexion vasculaire entre les cellules greffées issues d'iPS humaines et les cellules endothéliales de la souris. Adapté de « Massive and reproducible production of liver buds entirely from human pluripotent stem cells » par Takebe *et al.*, 2017. (B) Paşca *et al.* proposent des « assemblages » pour étudier les interactions tissulaires lors du développement neural. Adapté de « The rise of three-dimensional human brain cultures » par Paşca, 2018. (C) Organes sur puces interconnectées. Adapté de « Robotic fluidic coupling and interrogation of multiple vascularized organ chips » par Novak *et al.*, 2020.

Prochaine génération d'organoïdes

Le développement des prochaines cultures organoïdes repose sur la biophysique, l'ingénierie, la microfabrication, les biomatériaux (Garreta *et al.*, 2021). Ces approches prennent mieux en compte la topologie, les interfaces liquides/gaz, les propriétés physico-chimiques des biomatériaux de culture, la pression tissulaire, les stimulations mécaniques et électriques (cf. figure 22).

Les premiers organoïdes reposaient sur le principe d'auto-organisation spontanée qui mène dans certains cas à des structures complexes et désorganisées. Certains organoïdes développés récemment bénéficient d'une auto-organisation dirigée, grâce à la précision des outils de bio-ingénierie actuels (Andrique *et al.*, 2019 ; J. Laurent *et al.*, 2017 ; Nikolaev *et al.*, 2020 ; Gjorevski *et al.*, 2022). Takebe appelle cette stratégie « *organoids by design* » : en s'inspirant de l'organogénèse, grâce à une démarche globale et interdisciplinaire, la culture des organoïdes se veut rationalisée, contrôlée et reproductible (Hofer & Lutolf, 2021 ; Takebe & Wells, 2019) (cf. figure 22).

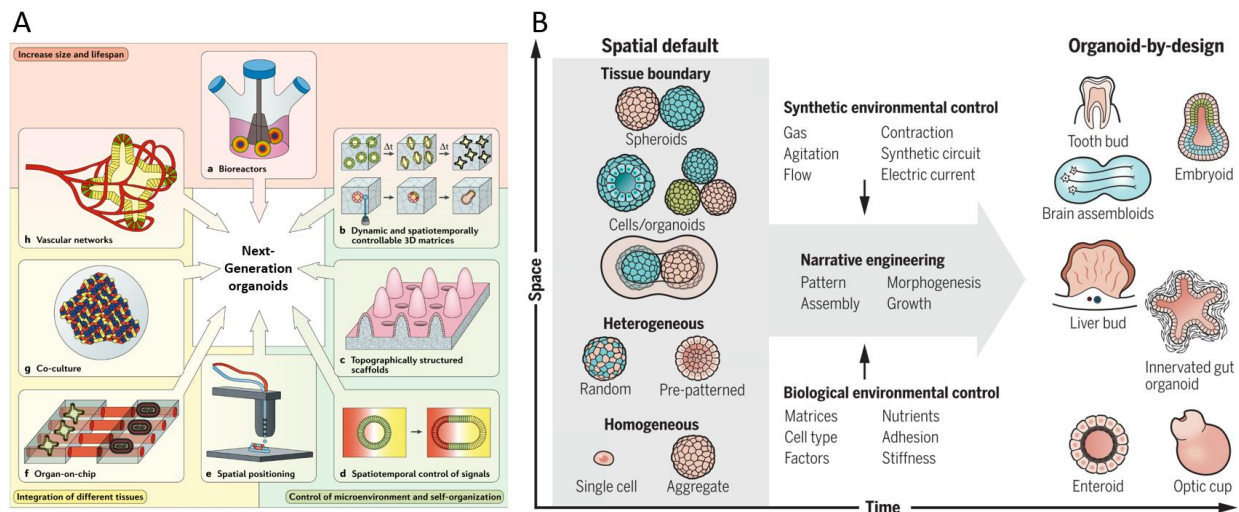


Figure 22. Sophistication des cultures organoïdes

(A) Les différentes approches en bio-ingénierie pour surmonter les limites actuelles des organoïdes. Adapté de « Progress and potential in organoid research » par Rossi *et al.*, 2018. **(B)** L'ingénierie narrative permet de développer de façon contrôlée des systèmes qui s'auto-organisent ; il implémente des paramètres rationalisés pour maximiser la reprise d'un programme développemental. Adapté de « Organoids by Design » par Takebe & Wells, 2019.

2.6 LES ORGANOÏDES CONTRIBUENT À PRÉSERVER L'INTÉGRITÉ DU GÉNOME

« *Why don't we get more cancer?* »

La biologie des cancers a permis de mieux comprendre le rôle du microenvironnement dans la préservation du génome. Les tumeurs présentent souvent une disruption de leur microenvironnement avec une augmentation de la rigidité de leur matrice extracellulaire qui avoisine 4 kPa (Hayward *et al.*, 2021 ; Pickup *et al.*, 2014). Mina Bissell, dans son article *Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression* (M. J. Bissell & Hines, 2011), suggère que le microenvironnement et l'architecture tissulaire forment une barrière à la tumorigénèse. Cette approche pondère les analyses centrées sur le génome et les mutations (cf. figure 23)

Le rôle du microenvironnement et du confinement cellulaire sur la croissance tumorale a été étudié dans des microcapsules par Pierre Nassoy et Kevin Alessandri en 2013. Ainsi, la technologie des capsules cellulaires que nous avons utilisée dans cette thèse a, initialement été développée et appliquée pour la cancérologie.

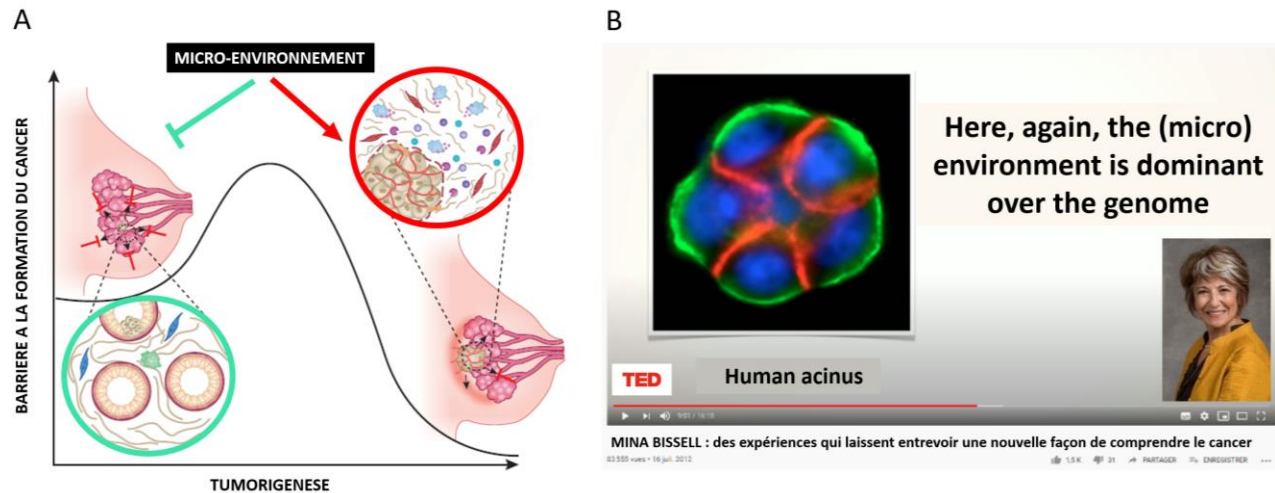


Figure 23. Rôle clé du microenvironnement dans la tumorigénèse

(A) Adapté de « *Why don't we get more cancer?* » par M. J. Bissell & Hines, 2011. (B) TED Talk « Des expériences qui laissent entrevoir une nouvelle façon de comprendre le cancer » (M. J. Bissell, 2012).

Le potentiel génétiquement stabilisant de la culture en organoïdes

Le microenvironnement joue un rôle important dans la tumorigenèse *in vivo*. *In vitro*, l'intégrité génétique des cellules dépend également du microenvironnement et de la biophysique du système de culture (Ben-David & Amon, 2020). Comme cela l'a été décrit par Mina Bissell, la qualité de la niche cellulaire peut contenir l'avancée des cellules mutantes ou au contraire favoriser leur expansion (cf. figure 24). Dans un microenvironnement adapté, les cellules souches exploiteraient leur potentiel développemental de manière contrôlée ; dans un environnement inadapté, le risque de dérive cancéreuse s'exacerberait.

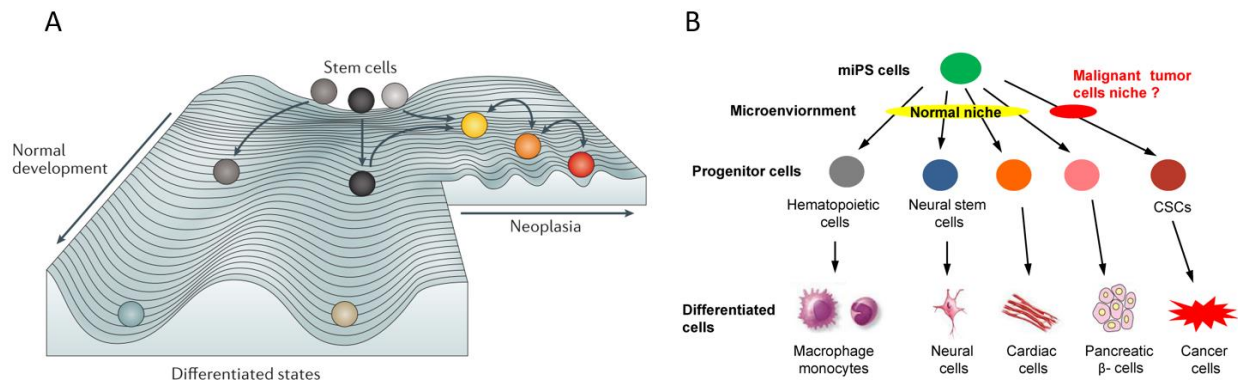


Figure 24. Rôle primordial de la niche pour le contrôle du destin cellulaire

(A) Adapté de « Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression » par Feinberg et al., 2016. Une trajectoire de différenciation « normale » (boules grises) et une trajectoire néoplasique sont illustrées. **(B)** Un microenvironnement cancérogène entraîne les cellules souches vers la voie des cellules souches cancéreuses (CSCs), alors qu'une niche normale induit une différenciation correcte. Hypothèse adaptée de « A model of cancer stem cells derived from mouse induced pluripotent stem cells » par Chen et al., 2012.

Une série d'articles soutient l'idée que « les cultures organoïdes permettent une culture très prolongée sans dérive génétique » (Fatehullah et al., 2016) :

- Foie : *Long-Term Culture of Genome-Stable Bipotent Stem Cells from Adult Human Liver* (Huch et al., 2015).
- Pancréas : *Long-term expansion, genomic stability and in vivo safety of adult human pancreas organoids* (Georgakopoulos et al., 2020).
- Intestin : *Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell : Mechanism and applications* (Sato & Clevers, 2013).
- Prostate : *Identification of multipotent luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures* (Karthaus et al., 2014) & *Single luminal epithelial progenitors can generate prostate organoids in culture* (Chua et al., 2014).

D'autres études s'interrogent sur les mécanismes d'action de cette stabilité génétique tissulaire :

Diminution des aberrations chromosomiques

Dans un article paru en 2018, Knouse *et al.* comparent la qualité de la ségrégation chromosomique avec ou sans architecture tissulaire épithéliale (Knouse *et al.*, 2018 ; Neahring & Dumont, 2018). Ils observent que les agrégats (non polarisés sans lumière interne) ont un fort taux d'erreurs. Ce dernier est comparable à celui observé dans les cultures en 2D. Les cultures organoïdes, avec une architecture épithéliale polarisée et des jonctions matures, restaurent une ségrégation chromosomique aussi efficace qu'*in vivo* (cf. figure 25). Un article de 2019 de Dias Gomes *et al.* souligne l'importance de la polarisation épithéliale pour la bonne ségrégation chromosomique et celle du lien entre biomécanique et intégrité génomique (Dias Gomes *et al.*, 2019).

Élimination des cellules mutantes et contrôle qualité tissulaire

La compétition cellulaire joue un rôle important lors du développement, l'homéostasie tissulaire et la cancérogenèse (Clavería & Torres, 2016). Cette forme de contrôle qualité naturel participe au maintien de la vitalité tissulaire et à l'élimination des cellules mutantes (cf. figure 25). L'étude de l'interaction entre cellules normales et mutées dans les épithéliums (Coloff & Brugge, 2017 ; Hogan *et al.*, 2009 ; Kajita *et al.*, 2014 ; Leung & Brugge, 2012) a permis à la biologie des cancers de décrire des mécanismes d'autodéfense : *EDAC*, *Epithelial defense against cancer* (N. E. Baker, 2020 ; Kajita & Fujita, 2015 ; Tanimura & Fujita, 2020 ; Vishwakarma & Piddini, 2020). Ces mécanismes fortement dépendants des paramètres biophysiques soulignent l'intérêt de la structure microtissulaire pour le maintien de l'intégrité génétique (cf. figure 25).

Les cultures organoïdes ont donc potentiellement un avantage qualitatif par rapport aux cultures conventionnelles, qui ne récapitulent pas le microenvironnement et l'histologie naturelle.

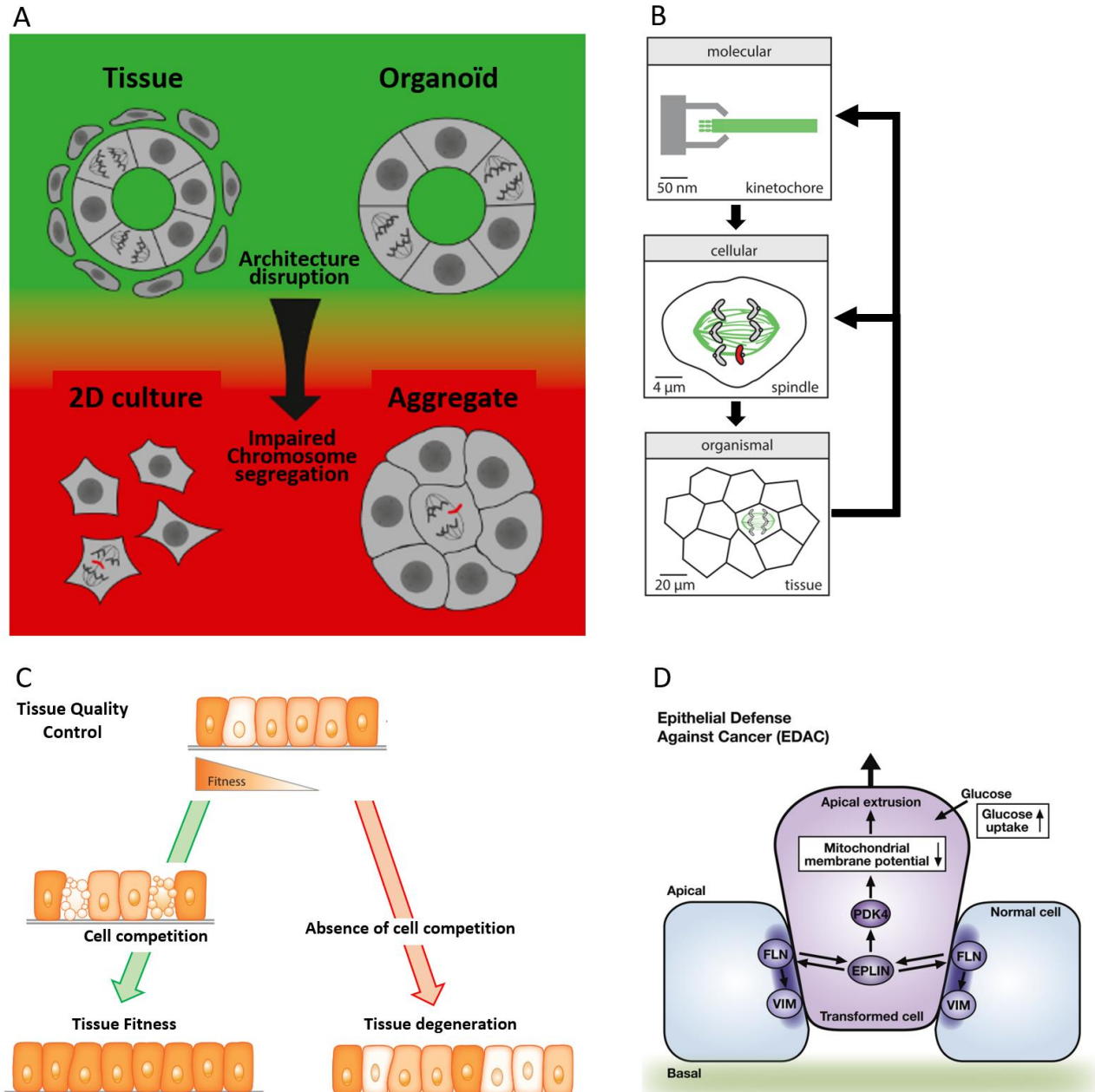


Figure 25. Mécanismes de l'intégrité génétique des organoïdes (page suivante)

(A) En reproduisant l'architecture tissulaire, les organoïdes permettent de restaurer une ségrégation chromosomique correcte. Adapté de « Chromosome segregation fidelity in epithelia requires tissue architecture » par Knouse *et al.*, 2018. (B) Le bon ancrage du fuseau mitotique aux kinétochores des chromosomes permet des divisions cellulaires et une croissance tissulaire correctes. Inversement, l'échelle tissulaire influence également ces mécanismes moléculaires et cellulaires. Adapté de « Chromosome segregation fidelity integrates information across scales » par Neahring & Dumont, 2018. (C) La compétition cellulaire comme vecteur d'un contrôle qualité tissulaire, Adapté de « Cell competition: mechanisms and physiological roles » par Clavería & Torres, 2016. (D) Mécanismes de défense épithéliale contre le cancer, Adapté de « Epithelial defense against cancer (EDAC) ». FLN est mis pour *Filamin*, VIM pour *Vimentin* (filament intermédiaire), EPLIN pour *Epithelial protein lost in neoplasm* (Tanimura & Fujita, 2020).

3. EMBRYOLOGIE

3.1 EMBRYOLOGIE *IN VIVO/EX VIVO*

L'observation des embryons, leur culture *ex vivo* puis l'essor de la procréation médicale assistée ont permis d'effectuer des descriptions précises des stades du développement embryonnaire humain et ont contribué à l'établissement des premières lignées de cellules souches embryonnaires (ES) (cf. figure 26).

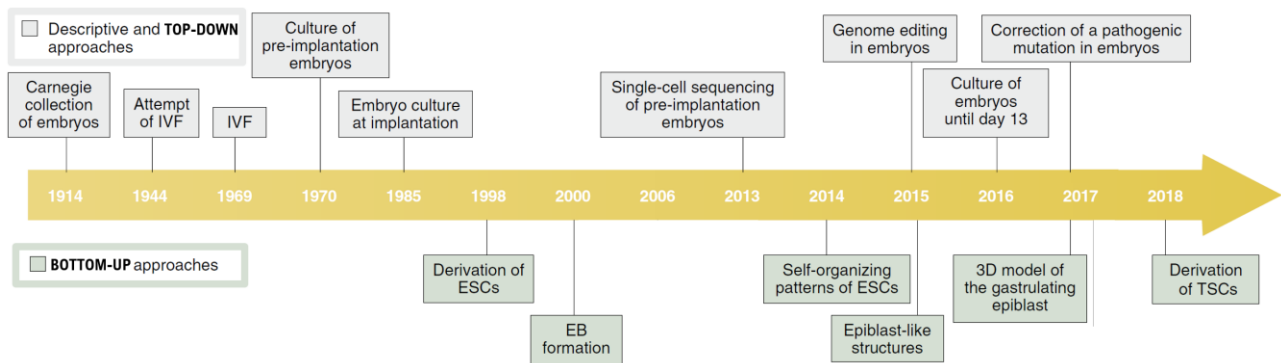


Figure 26. Chronologie de l'embryologie humaine

Approches « descendante » (*top-down*) et « ascendante » (*bottom-up*). IVF : fécondation *in vitro*, ESCs : cellules souches pluripotentes embryonnaires, EB : corps embryoïdes, TSCs : cellules souches trophoblastiques. Adapté de « Deconstructing and reconstructing the mouse and human early embryo » par Shahbazi & Zernicka-Goetz, 2018a.

Il y a 2 400 ans, Aristote fit la première description du développement embryonnaire animal. En observant des embryons de poulets puis en les disséquant, il remarqua que leurs développements ne se faisaient pas par une augmentation continue de la taille, mais par des changements majeurs de formes (Platt, 2014).

Dès 1914, l'Institut Carnegie de Washington collecta des embryons humains afin d'en faire une description histologique fine (cf. figure 27). L'analyse de ces embryons humains à des stades multiples complète les observations qui ont pu être faites chez l'animal (Luckett, 1975).

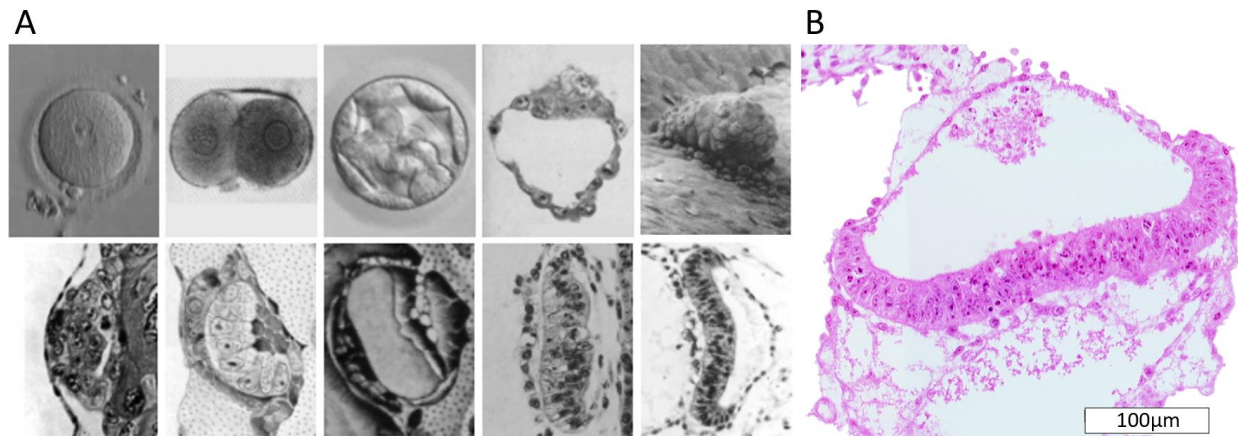


Figure 27. Stades embryologiques Carnegie et structuration de l'épiblaste

Adapté de la collection Carnegie (« The virtual human embryo », 2022). **(A)** Stades Carnegie et jours postfécondation : série du haut (1, J1) (2, J2 - J 3) (3.1, J4) (3.2, J4 - J5) (4, J6) et série du bas (5a1, J7) (5a2, J8) (5b, J9) (5c, J12) (6, J13 - J17). **(B)** Embryon Carnegie stade 7, jours 16 à 19. Le disque épiblastique est légèrement convexe ; à ce stade, la gastrulation a déjà commencé, mais elle n'est pas visible sur cette section (référence 7802, localisation 43-02-01).

Les premières tentatives de fécondations *in vitro* chez l'homme ont eu lieu à partir de 1944. Les travaux pionniers de John Rock, Miriam Menkin et Landrum Shettles, aux États-Unis, et de Robert Edwards, Barry Bavister et Patrick Steptoe, en Angleterre, sont progressivement améliorés. Le début de l'embryogenèse peut être observé *in vitro*. La naissance, le 25 juillet 1978, du premier « bébé-épiprouvette » issu d'une fécondation *in vitro* (FIV), Louise Brown, ouvre la voie à la procréation médicalement assistée. Cette dernière marque l'avènement de progrès technico-scientifiques en embryologie : micromanipulation et micro-injection, milieux de culture sans sérum, conditions hypoxiques, etc. (Niakan *et al.*, 2012 ; Shahbazi & Zernicka-Goetz, 2018a ; Wamaitha & Niakan, 2018).

La culture d'embryons *ex vivo* a permis de faire une description microscopique et histologique des cellules et des structures (Deglincerti *et al.*, 2016a ; O'Leary *et al.*, 2012) (cf. figure 28). Conjointement à la transcriptomique de cellules uniques, en plein essor, la culture d'embryons *in vitro* fournit toujours des indices sur l'embryogenèse (Xiang *et al.*, 2020). Toutefois, cette recherche sur les embryons ne peut dépasser la limite des 14 jours de développement ; limite éthique historique qui renforce le besoin de modèles expérimentaux non issus d'embryons (Taniguchi *et al.*, 2019 ; Warnock, 1985).

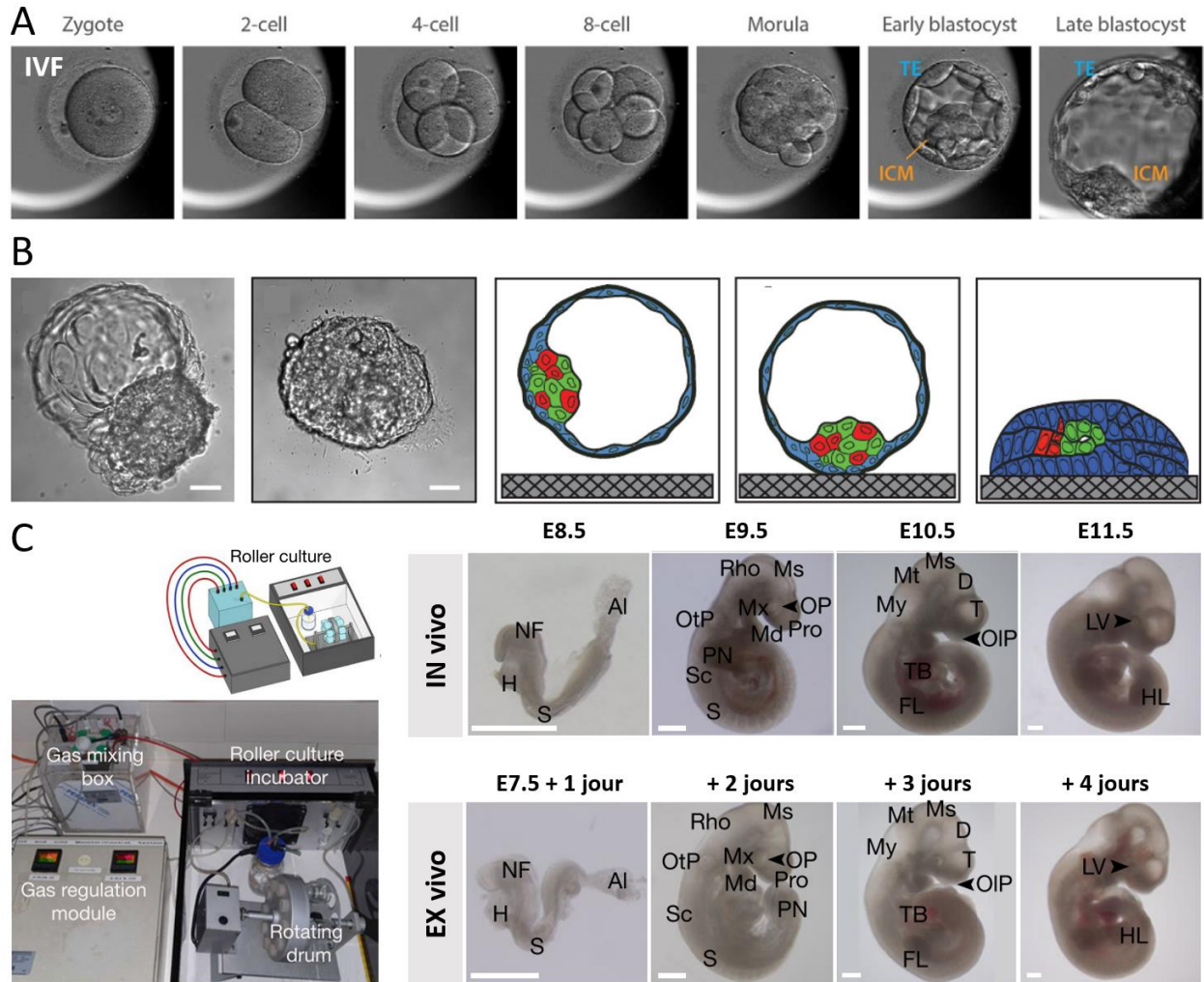


Figure 28. Développement embryonnaire humain *ex vivo* (prégastrulation)

(A) Fécondation *in vitro*, vidéomicroscopie avec Embryoscope™ à partir de la cellule zygote jusqu'au stade blastocyste tardif. Adapté de « Human pre-gastrulation development » par Wamaitha & Niakan, 2018.

(B) Adapté de « Self-organization of the *in vitro* attached human embryo » par Deglincerti *et al.*, 2016.

(C) Adapté de « *Ex utero* mouse embryogenesis from pre-gastrulation to late organogenesis » par Aguilera-Castrejon *et al.*, 2021.

Au cours du développement embryonnaire précoce, différents types cellulaires organisés en structures tridimensionnelles interagissent biochimiquement et mécaniquement. Les cellules souches pluripotentes sont issues de la masse cellulaire interne et constituent l'épiblaste (cf. figures 29 et 30). L'établissement de cette structure épiblastique est essentiel à la formation de l'embryon. Ce phénomène, préservé au cours de l'évolution, est commun à une grande variété d'espèces (Molè *et al.*, 2020 ; Sheng, 2015).

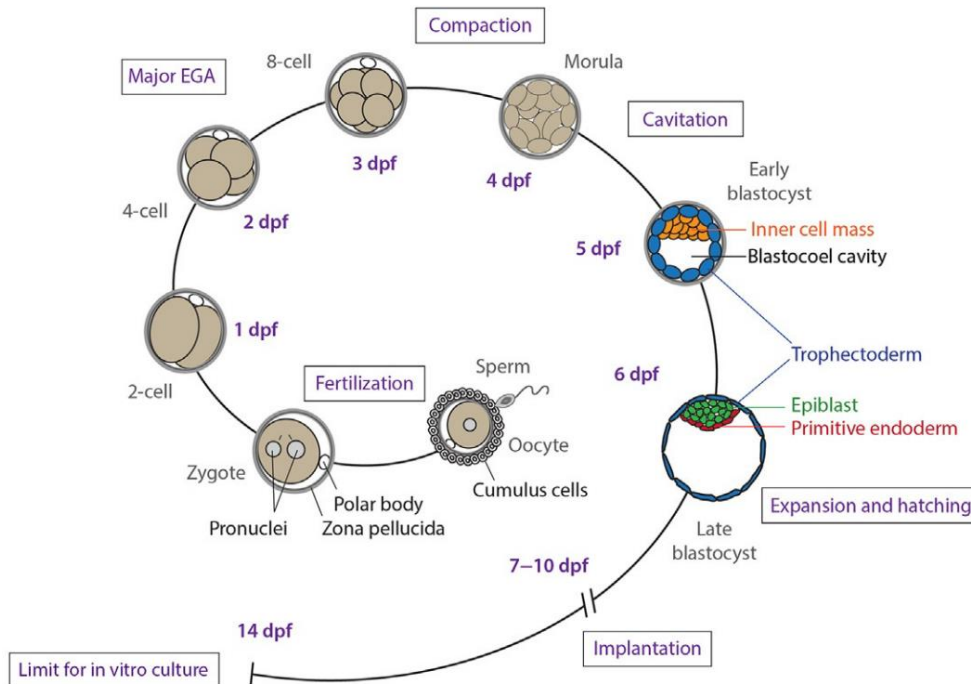
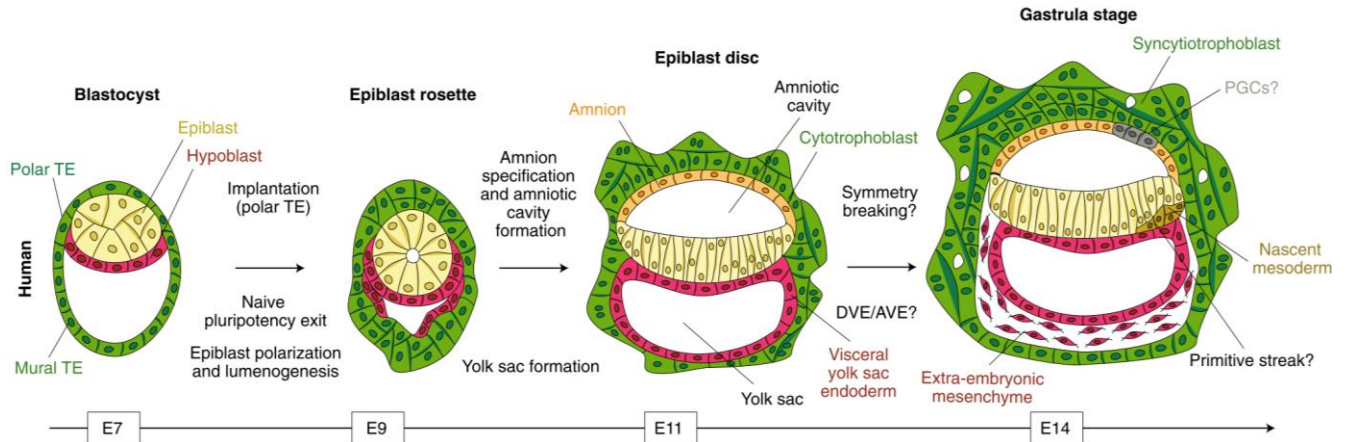


Figure 29. Développement embryonnaire humain précoce

EGA est mis pour activation du génome embryonnaire, DPF pour jour postfécondation. Adapté de « Human pre-gastrulation development » par Wamaitha & Niakan, 2018.

Les cellules souches pluripotentes humaines et la structure épiblastique sont observées au stade péri-implantatoire ; plus précisément au cours de la seconde semaine de développement, entre le stade blastocyste et le stade de gastrula. (Molè *et al.*, 2020 ; Shahbazi, 2020c ; Taniguchi *et al.*, 2019 ; Wamaitha & Niakan, 2018 ; Zhai *et al.*, 2021). Deux étapes importantes encadrent cette fenêtre développementale (cf. figure 30)

- **La formation de la cavité proamniotique** : les futures cellules épiblastiques sont issues de la masse cellulaire interne. La luminogénèse et l'épithélialisation du cyste pluripotent sont associées à une sortie de la pluripotence naïve et au passage au stade de « cellules souches pluripotentes amorcées » (Shahbazi et al., 2017).
- **La gastrulation** : les cellules souches pluripotentes, organisées en disque épiblastique, commencent une transition épithélio-mésenchymateuse associée à un début de différenciation vers les trois feuilletts primordiaux (ectoderme, mésoderme, endoderme). Cette différenciation marque la fin des cellules souches pluripotentes embryonnaires.



TERMES ANGLAIS	TERMES FRANÇAIS	DÉFINITIONS
Endometrium	Endomètre	<i>Innermost lining of the uterus; provides the surface for blastocyst implantation.</i>
Blastocyst	Blastocyste	<i>Pre-implantation embryo ; consists of three cell types: trophoblast, primitive endoderm, and inner cell mass.</i>
Inner cell mass	Masse cellulaire interne	<i>Unpolarized pluripotent stem cells that are considered to be in the naive pluripotent state.</i>
Epiblast	Épiblaste	<i>Pluripotent stem cells that transition from naive to primed state as cells of the ICM undergo apico-basal polarization.</i>
Trophectoderm / trophoblast	Trophectoderme / trophoblaste	<i>Extraembryonic cells that give rise to the chorion.</i>
Extraembryonic primitive endoderm	Endoderme primitif	<i>Extraembryonic cells that give rise to the yolk sac.</i>
Amniotic ectoderm	Amnion	<i>Derived from epiblast cells underlying the invading trophoctoderm during implantation.</i>
Amniotic sac	Sac amniotique	<i>An asymmetric cyst formed by luminal polarization of epiblast cells, with squamous amnion cells on one side and pluripotent epiblast cells on the other side.</i>
Amniotic cavity	Cavité amniotique	<i>Luminal cavity enclosed by the amniotic sac.</i>
Pro-amniotic/epiblast cavity	Cavité amniotique/Cavité épiblastique	<i>Luminal cavity surrounded by recently polarized epiblast cells, before amnion fate determination.</i>
Gastrulation	Gastrulation	<i>Developmental process by which all three embryonic germ layers are established.</i>
Primitive streak	Sillon primitif	<i>Streak-shaped domain that forms in the posterior of the embryonic disc, marking the beginning of gastrulation.</i>

Figure 30. Développement péri-implantatoire de l'épiblaste humain

Vue d'ensemble de l'épiblastogenèse. L'épiblaste émerge à partir de la masse cellulaire interne qui se répartit en une partie hypoblastique et en une partie épiblastique. TE est mis pour *Trophectoderm*, PGCs pour *Primordial germ cells*, E pour *Embryonic day*. Adapté de « Deconstructing and reconstructing the mouse and human early embryo » par Shahbazi & Zernicka-Goetz, 2018a. Tableau adapté de « Opening the black box : Stem cell-based modeling of human post-implantation development » par Taniguchi et al., 2019.

3.2 LES DÉBUTS DES MODÈLES EMBRYONNAIRES

À l'inverse de la biologie du développement descriptive, qui adopte une approche descendante (« *top down* »), l'embryologie de synthèse a pour ambition de reconstruire des embryons ou des structures embryonnaires *in vitro* ; Elle découle d'une approche ascendante (« *bottom up* ») (Metzger *et al.*, 2018 ; Shahbazi & Zernicka-Goetz, 2018a) (cf. figure 26).

Comme pour les cultures organoïdes, c'est l'isolement *in vitro* des lignées de cellules souches qui a permis d'amorcer l'embryologie de synthèse : cellules ES de souris (M. J. Evans & Kaufman, 1981 ; G. R. Martin, 1981), cellules ES humaines (Thomson, 1998), iPS (K. Takahashi *et al.*, 2007 ; K. Takahashi & Yamanaka, 2006). Les études chez la souris sont nombreuses et précèdent habituellement les expérimentations avec les cellules humaines (Molè *et al.*, 2020).

Initialement, des approches par compartimentalisation en 2D ont pu mimer certains aspects de l'embryogenèse comme la gastrulation (cf. figure 31) (Peerani *et al.*, 2007 ; Rico-Varela *et al.*, 2018 ; Warmflash *et al.*, 2014).

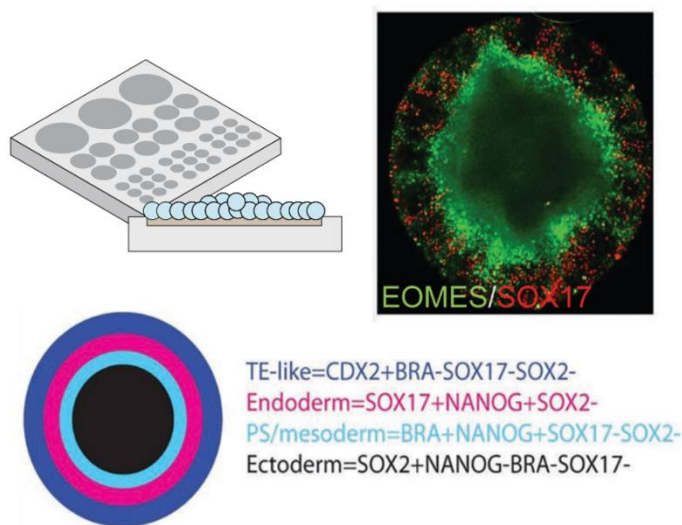


Figure 31. Modèles embryonnaires en 2D

L'ajout de BMP4 sur des colonies en 2D de cellules souches pluripotentes cultivées sur un substrat de forme circulaire permet de reproduire certains aspects de la différenciation ecto-meso-endodermique lors de la gastrulation. Adapté de « Stem-cell-based embryo models for fundamental research and translation » par Fu *et al.*, 2021 ; « In vitro microscale models for embryogenesis » par Rico-Varela *et al.*, 2018 et « A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells » par Warmflash *et al.*, 2014.

L'un des premiers modèles embryonnaires en 3D fut l'établissement des corps embryoïdes (*Embryoid bodies, EBs, cf. figure 32*) (Itskovitz-Eldor *et al.*, 2000 ; Merleau-Ponty, 2019 ; Ten Berge *et al.*, 2008). Ces EBs issus de la différenciation d'agrégats de cellules souches comportent des cellules représentatives des trois feuillets et présentent certains aspects de la gastrulation (Brickman & Serup, 2017 ; S. D. Sheridan *et al.*, 2012 ; van Winkle *et al.*, 2012 ; Zeevaert *et al.*, 2020). Bien qu'ils ne récapitulent pas fidèlement la structuration de l'embryon, ils révèlent les propriétés d'auto-organisation des cellules souches pluripotentes (Shahbazi & Zernicka-Goetz, 2018 a ; Simunovic & Brivanlou, 2017). Ces EBs ont souvent été utilisés comme points de départ pour la culture de différents organoïdes (M. A. Lancaster *et al.*, 2013 ; Nakano *et al.*, 2012). Ils sont toutefois très hétérogènes et plus proches du tératocarcinome que de la gastrulation.

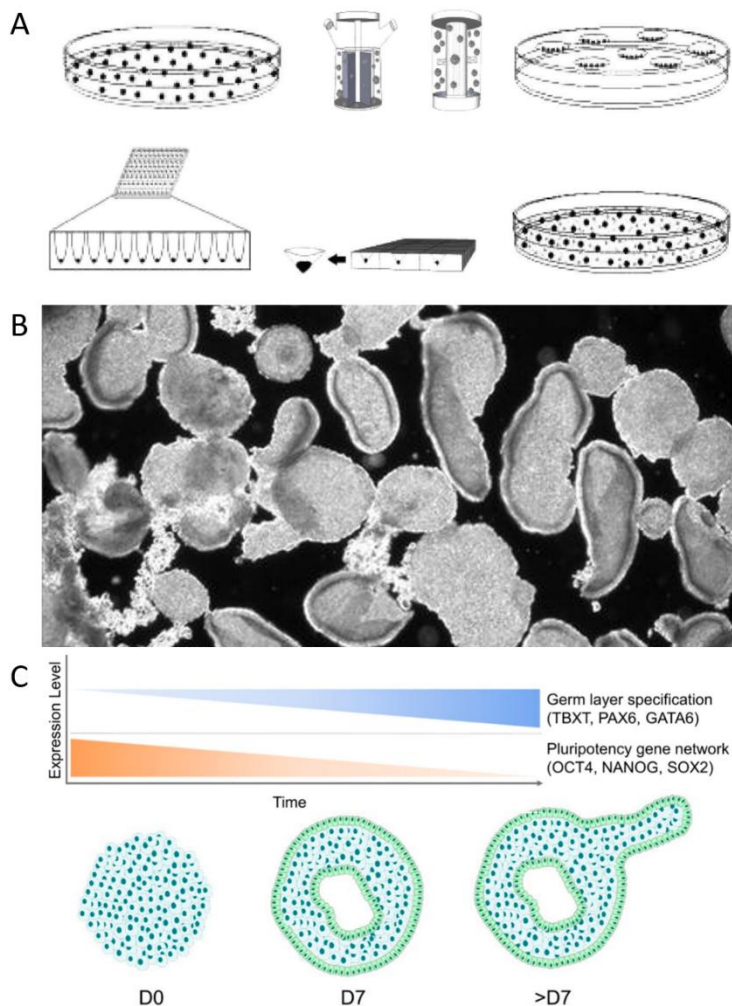


Figure 32. Culture des corps embryoïdes

(A) Aperçu de différents systèmes de culture en 3D permettant d'obtenir des EBs *in vitro* : culture en suspension simple, culture en suspension agitée, cultures rotatives, gouttes suspendues au couvercle d'une boîte de Petri, micropuits en U à faible attachement, microsursfaces indentées, culture incluse en hydrogel. Adapté de « Analysis of embryoid bodies derived from human induced pluripotent stem cells as a means to assess pluripotency » par Sheridan *et al.*, 2012. **(B)** Exemple d'EBs en microscopie conventionnelle, Adapté de « Techniques in embryoid body formation from human pluripotent stem cells » par Shevde & Mael, 2013. **(C)** Différenciation des EBs vers les trois feuillets primordiaux ; Adapté de « Cell Mechanics in Embryoid Bodies » par Zeevaert *et al.*, 2020.

Grâce aux techniques organoïdes (paragraphe 2.5), les structures biologiques en 3D artificielles se sont affinées, ce qui a permis de mieux modéliser les différentes étapes clés du développement (cf. figure 33). Ainsi les dynamiques d'identités cellulaires, l'auto-assemblage, l'auto-organisation et la signalisation physico-chimique sont particulièrement étudiés pour les étapes suivantes (Fu *et al.*, 2021 ; Popovic *et al.*, 2021 ; Ravindran, 2021 ; Resto Irizarry *et al.*, 2020 ; Shahbazi *et al.*, 2019 ; Simunovic & Brivanlou, 2017 ; Taniguchi *et al.*, 2019).

- Luminogénèse > modèles épiblastiques (épiblastoïdes).
- Gastrulation > modèle gastrula (gastruloïdes).
- Implantation.
- Neurulation.
- Embryogenèse.

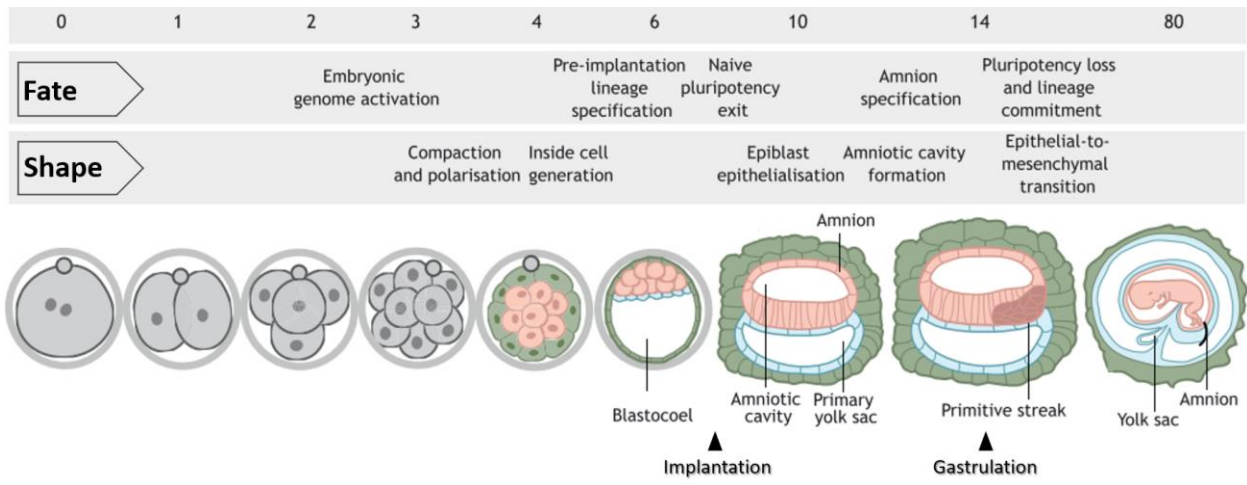


Figure 33. Mécanismes développementaux précoces

Lien entre les événements morphologiques et l'identité cellulaire au cours du développement précoce humain. Adapté de « Mechanisms of human embryo development: From cell fate to tissue shape and back » par Shahbazi, 2020.

3.3 MODÈLES ÉPIBLASTIQUES

Les cellules souches pluripotentes sont associées à la structure épiblastique (cf. paragraphe 3.1). Les modèles épiblastiques en culture sont donc traités en profondeur comme une base technologique de cette thèse (cf. tableau 2 et 3).

Les premiers modèles d'épiblastes issus de cellules souches pluripotentes ont été réalisés en enrobant des cellules dans une matrice extracellulaire. Grâce au Matrigel®, de premiers sphéroïdes ressemblant à l'épiblaste (épiblastoïdes) sont générés chez la souris dès 2014 par le groupe de Magdalena Zernicka-Goetz (Bedzhov & Zernicka-Goetz, 2014). Le Matrigel® est une bonne approximation de la membrane basale séparant l'épithélium épiblastique de l'endoderme primitif (Futaki *et al.*, 2019 ; Li *et al.*, 2017 ; Molè *et al.*, 2021 ; Nakaya *et al.*, 2013 ; Sanders, 1984).

Des expériences similaires sont menées à partir d'ES et d'iPS humaines en 2016 par le même groupe (Shahbazi *et al.*, 2016). Un article très important de Marta Shahbazi et de Magdalena Zernicka-Goetz de 2017 (Shahbazi *et al.*, 2017) souligne le lien entre identité cellulaire et conformation des cellules souches pluripotentes. Il associe la sortie de la pluripotence naïve à la luminogénèse (cf. paragraphe 4.6).

En parallèle, Tanigushi *et al.* décrivent en 2015 et 2017 que la luminogénèse est une propriété intrinsèque des cellules souches pluripotentes isolées (Taniguchi *et al.*, 2015a). Ce phénomène repose sur la sécrétion apicale de vésicules appelées « apicosomes » (Taniguchi *et al.*, 2017). En 2015, un autre groupe montre que ces colonies de cellules souches 3D organisées autour d'un lumen central préservent le caractère souche et la pluripotence des cellules au-delà de 10 passages consécutifs (Freedman *et al.*, 2015a). Les recherches de Zhu *et al.*, parues dans *Lab on a Chip* en 2020, suggèrent également que la viabilité des cellules souches est beaucoup plus importante dans une configuration cystique-épiblastique que dans la configuration agrégat (Y. Zhu *et al.*, 2020).

D'autres expérimentations vont permettre d'étudier leur rupture de symétrie et leur différenciation. Grâce à des matrices relativement rigides, des puits ou des micropoches microfluidiques, ces modèles permettent d'étudier de manière beaucoup plus fidèle et biomimétique que les EBs :

- la mise en place et la différenciation de l'amnion (Shao, Taniguchi, Gurdziel *et al.*, 2017 ; Shao, Taniguchi, Townshend *et al.*, 2017 ; Zheng *et al.*, 2019 ; Y. Zhu *et al.*, 2020) ;
- l'établissement d'un axe embryonnaire antéro-postérieur (Simunovic *et al.*, 2019) ;
- les interactions tissulaires lors de la périgastrulation (Girgin *et al.*, 2021).

Tableau 2. Epiblastoïdes, des colonies de cellules souches pluripotentes 3D autour d'un lumen central

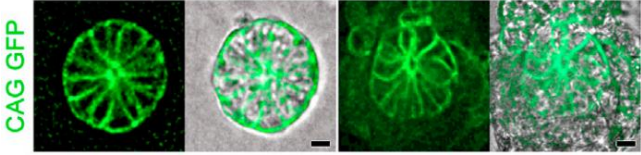
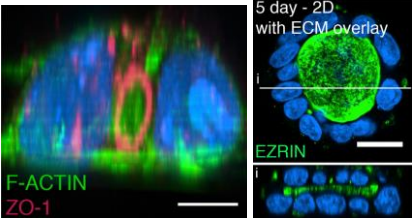
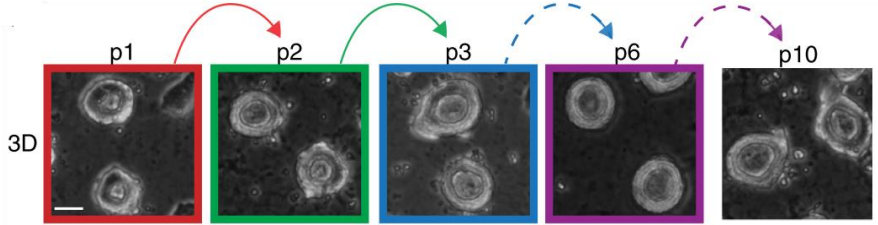
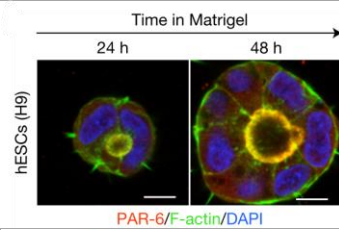
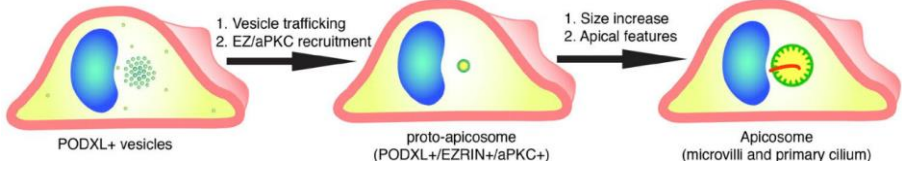
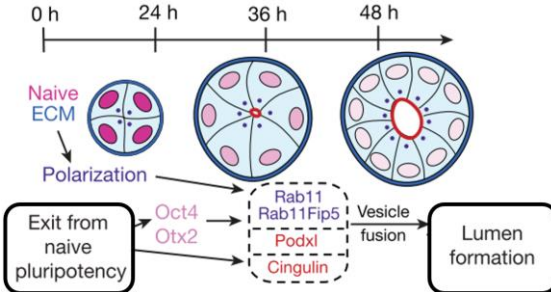
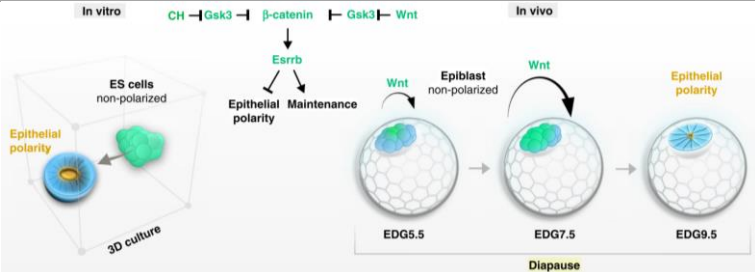
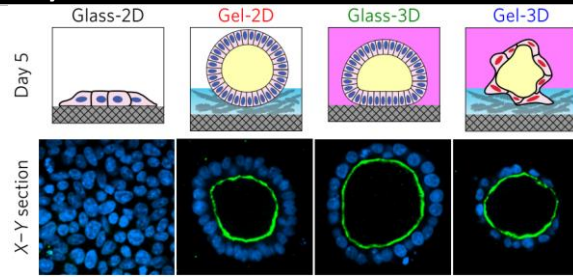
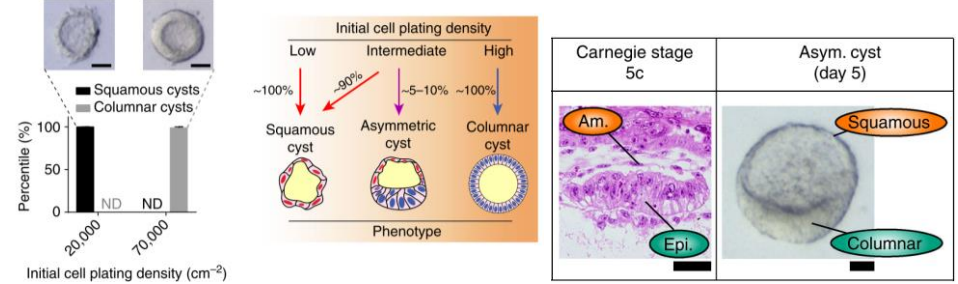
<p>Self-organizing properties of mouse pluripotent cells initiate morphogenesis upon implantation, Bedzhov <i>et al.</i> 2014 Cell</p>	<p>ES cells in matrigel EPI of E4.75-5.0 embryo</p> 
<p>Lumen Formation is an Intrinsic property of isolated human pluripotent stem cells Taniguchi <i>et al.</i> 2015 Stem Cell Reports</p>	
<p>Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids Freedman <i>et al.</i> 2015 Nature Communications</p>	
<p>Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues Shahbazi <i>et al.</i> 2016 Nature Cell Biology</p>	
<p>An apicosome initiates self-organizing morphogenesis of human pluripotent stem cells Taniguchi <i>et al.</i> 2017 Journal of Cell Biology</p>	
<p>Pluripotent state transitions coordinate morphogenesis in mouse and human embryos Shahbazi <i>et al.</i> 2017 Nature</p>	
<p>Wnt/Beta-catenin/Esrrb signalling controls the tissue-scale reorganization and maintenance of the pluripotent lineage during murine embryonic diapause Fan <i>et al.</i> 2020 Nature Communications</p>	

Tableau 3. Epiblastoïdes, rupture de symétrie et différenciation

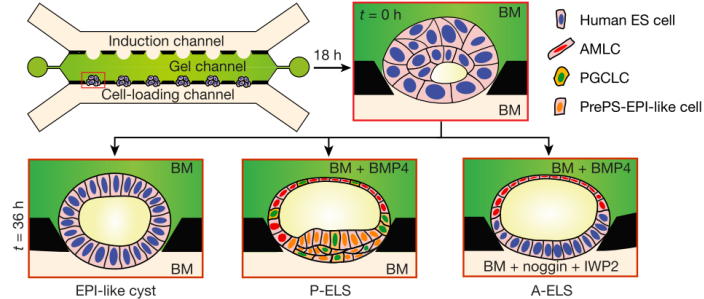
Self-organized amniogenesis by human pluripotent stem cells in a biomimetic implantation-like niche
 Shao *et al.* 2017
 Nature materials



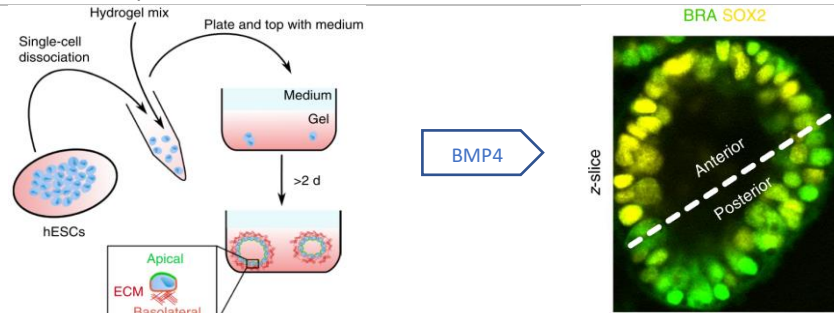
A pluripotent stem cell-based model for post-implantation human amniotic sac Development
 Shao *et al.* 2017
 Nature Communications



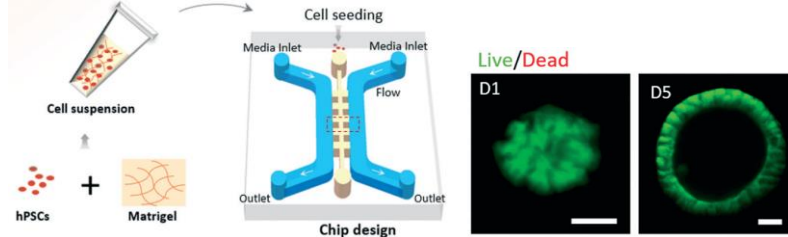
Controlled modelling of human epiblast and amnion development using stem cells
 Zheng *et al.* 2019
 Nature



A 3D model of a human epiblast reveals BMP4-driven symmetry breaking
 Simunovic *et al.* 2019
 Nature cell biology



Amnion-on-a-chip: modeling human amniotic development in mid-gestation from pluripotent stem cells
 Zhu *et al.* 2020
 Lab on a Chip



Bioengineered embryoids mimic post-implantation development in vitro
 Girgin *et al.* 2021
 Nature com.

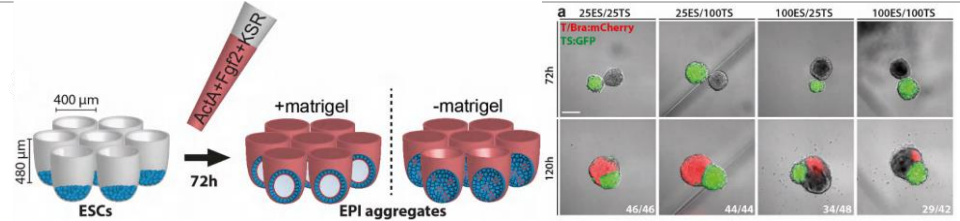
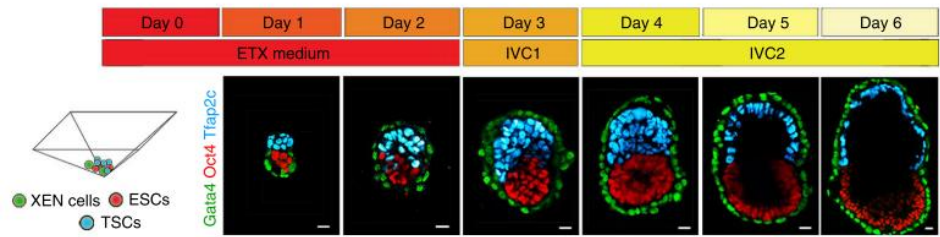
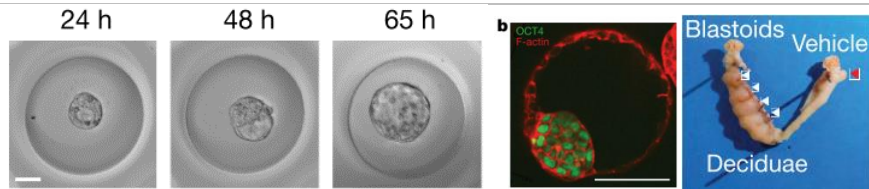


Tableau 4. Vers des modèles embryonnaires complets : gastrulation, neurulation

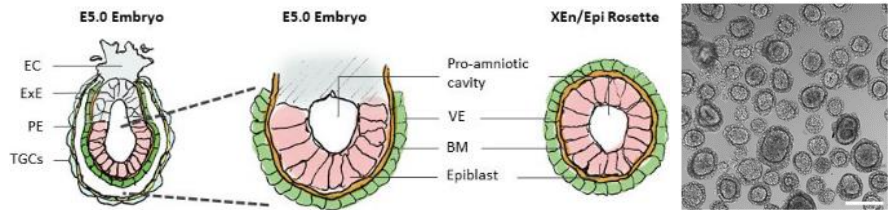
Self-assembly of embryonic and two extra-embryonic stem cell types into gastrulating embryo-like structures
 Sozen *et al.* 2018
 Nature cell biology



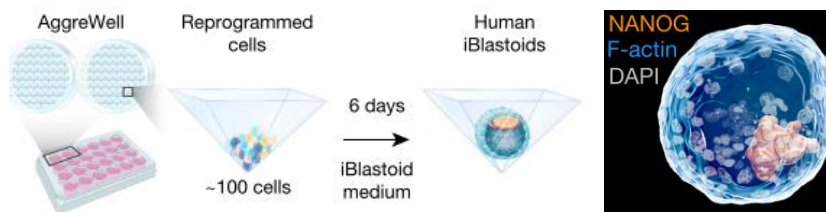
Blastocyst-like structures generated solely from stem cells
 Rivron *et al.* 2018
 Nature



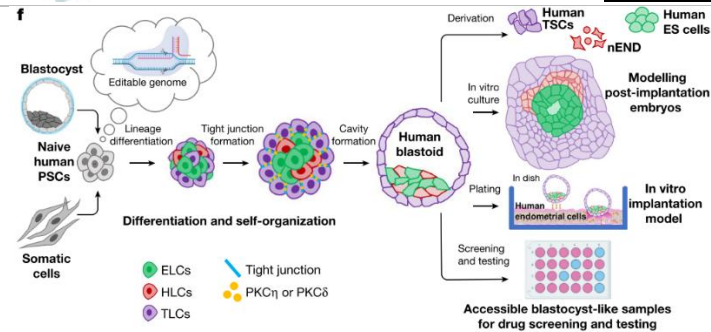
Chemically-defined induction of a primitive endoderm and epiblast-like niche supports post-implantation progression from blastoids
 Vrij *et al.* 2019
 Biorxiv



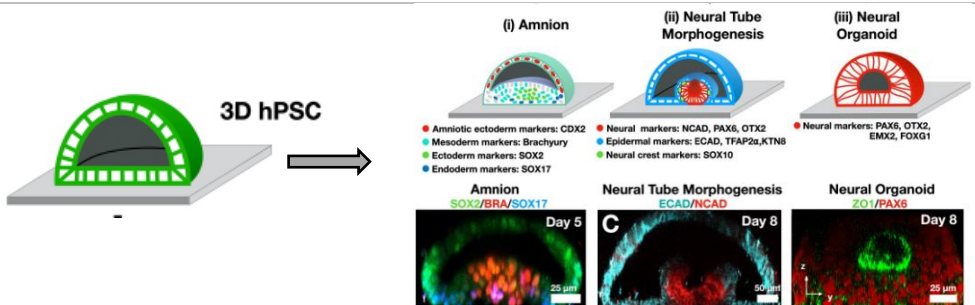
Modelling human blastocysts by reprogramming fibroblasts into iBlastoids
 Liu *et al.* 2021
 Nature



Blastocyst-like structures generated from human pluripotent stem cells
 Yu *et al.* 2021
 Nature



Self-organized morphogenesis of a human neural tube in vitro by geometric constraints
 Karzbrun *et al.* 2021
 BioRxiv



3.4 L'EMBRYOLOGIE DE SYNTHÈSE

Grâce aux progrès acquis dans la reprogrammation cellulaire, il devient possible de produire des cellules souches extraembryonnaires : cellules trophoblastiques et d'endoderme extraembryonnaire (Benchetrit *et al.*, 2019 ; Sozen *et al.*, 2018). Les modèles développementaux auto-organisés les intègrent et miment le développement de l'embryon au stade du blastocyste : les blastoïdes. D'autres modèles élaborés reproduisent des stades plus avancés, tels que la gastrulation ou la neurulation : les gastruloïdes (Beccari *et al.*, 2018; van den Brink *et al.*, 2020) et les neuruloïdes (Karzbrun *et al.*, 2021) (cf. tableau 4).

Progressivement, ces modèles et organoïdes du développement précoce se rapprochent d'embryons artificiels entiers *in vitro* (Pera *et al.*, 2015 ; Pfeffer, 2018). Certains travaux concernant l'étude de l'implantation de blastoïdes (Kagawa *et al.*, 2021) ou sur la gamétogénèse (Yoshino *et al.*, 2021), questionnent sur les limites éthiques de l'embryologie de synthèse.

4. LES CELLULES SOUCHES

4.1 DIFFÉRENTS TYPES DE CELLULES SOUCHES

Une cellule souche est une cellule indifférenciée capable à la fois de générer des cellules spécialisées par différenciation cellulaire et de se renouveler (cf. figure 34). Les cellules souches sont présentes chez tous les êtres vivants multicellulaires. Elles jouent un rôle central au cours du développement, mais aussi dans l'homéostasie tissulaire et la régénération. La croissance des os pendant l'enfance, le gain musculaire d'un sportif, les phénomènes de cicatrisation montrent leur omniprésence dans l'organisme et leur importance dans son bon fonctionnement. Les thérapies cellulaires de remplacement miment des phénomènes naturels. Les cellules qui vieillissent et meurent dans l'organisme sont remplacées grâce aux cellules souches, qui interviennent dans le renouvellement continu de la peau, de la muqueuse intestinale ou du *pool* de globules rouges, entre autres.

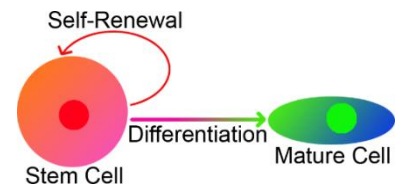


Figure 34. Cellule souche

Il existe de nombreux types de cellules souches. L'autorenouvellement et la différenciation sont les deux caractéristiques communes fonctionnelles qui les distinguent des cellules postmitotiques entièrement différenciées. En fonction de leur potentiel de différenciation, on distingue :

- La cellule souche totipotente à l'origine de l'embryon en entier et aussi le placenta et les tissus extraembryonnaires :
 - la cellule œuf issue de la fertilisation ;
 - dans une certaine mesure, les cellules souches pluripotentes naïves.
- La cellule souche pluripotente à l'origine de toutes les cellules de l'embryon :
 - les cellules souches pluripotentes embryonnaires (ES ou ESC) ;
 - les cellules souches pluripotentes induites (iPS ou iPSC).
- La cellule souche multipotente à l'origine de plusieurs types cellulaires :
 - les cellules souches mésenchymateuses (MSC) : os, adipocytes, cartilage ;
 - les cellules souches hématopoïétiques (HSC) : cellules sanguines (lignées blanches et rouges) ;
 - les cellules souches neurales (NSC) : neurones, cellules gliales, oligodendrocytes.
- La cellule souche oligopotente à l'origine d'un ou deux types cellulaires.
- La cellule unipotente à l'origine d'un seul type de cellules différenciées (cellules souches musculaires).
- La cellule progénitrice est un type cellulaire situé entre les cellules souches et les cellules différenciées. Elle peut engendrer un nombre limité de types cellulaires et surtout elles ont une capacité de division réduite (pas d'auto-renouvellement à l'exact identique).

Certaines cellules souches pluripotentes sont présentes uniquement lors de l'embryogenèse précoce, contrairement aux cellules souches dites « adultes » ou « somatiques », qui persistent dans les tissus. D'un point de vue histologique, certaines sont épithéliales, alors que d'autres sont mésenchymateuses. Certaines sont « quiescentes », là où d'autres sont dans un état « activé », engagées dans la prolifération cellulaire et la régénération. Enfin, l'identité et les fonctions biologiques des cellules souches dépendent grandement de leur contexte, soit *in vivo* soit *in vitro*. Les MSC, par exemple, sont décrites comme des cellules se différenciant *in vitro* alors qu'elles ont davantage des propriétés immunomodulatrices *in vivo* (Caplan, 2017a).

4.2 LES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES

Les cellules souches pluripotentes utilisées par la recherche médico-scientifique correspondent *in vivo* à l'épiblaste lors de l'embryogenèse.

Les cellules souches pluripotentes ont la capacité naturelle de changer d'identité et de devenir différents types cellulaires. Grâce à une configuration de chromatine semi-ouverte « *poised chromatin* », l'entièreté du génome est accessible aux facteurs de transcription et aux outils de modification génique (Feng *et al.*, 2021 ; Gaspar-Maia *et al.*, 2011 ; Meshorer & Misteli, 2006) (cf. figure 35).

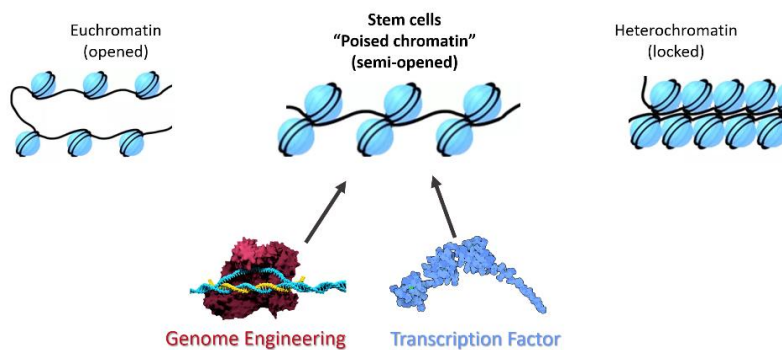


Figure 35. Chromatine semi-ouverte

L'entièreté du génome des cellules souches pluripotentes est globalement accessible. La conservation de cet état semi-ouvert est importante pour maintenir la pluripotence. Lors de la différenciation, l'évolution vers l'hétérochromatine est associée à une spécialisation de l'expression génique.

Lors de la gastrulation, le futur embryon passe d'une monocouche de cellules souches pluripotentes à une structure tridimensionnelle multicouche. L'apparition des trois feuillets primordiaux marque le début de la différenciation cellulaire. L'ectoderme (feuille externe) permet la genèse du système nerveux et de la peau ; le mésoderme (feuille moyen) contribue aux muscles, aux os et aux reins ; l'endoderme (feuille interne) donne le système digestif, les poumons, le foie (cf. figure 36).

Les cellules souches pluripotentes sont à l'origine de toutes les cellules de l'organisme (*soma*), à l'exception des cellules germinales (cf. figure 36). On représente historiquement la différenciation cellulaire par une succession d'identités cellulaires aux nombres finis. Grâce à la génomique de cellules uniques (Harland, 2018 ; Kester & van Oudenaarden, 2018 ; Pennisi, 2018a, 2018b ; Pijuan-Sala *et al.*, 2018), ce modèle classique d'arbre de la différenciation a récemment été complété par un modèle de continuum de différenciation. Ce modèle continu, héritier des vallées épigénétiques de Waddington, retranscrit mieux le caractère dynamique de l'identité cellulaire. Ainsi il propose des chemins de différenciation plutôt que des étapes de différenciation.

Au stade pluripotent, il existe également d'un continuum d'identité cellulaire entre ces cellules naïves au stade morula/blastocyste et les cellules amorcées/primées au stade épiblastique (Blakeley *et al.*, 2015 ; Meistermann *et al.*, 2021 ; Tyser *et al.*, 2020 ; Xiang *et al.*, 2020) (cf. paragraphe 4.6).

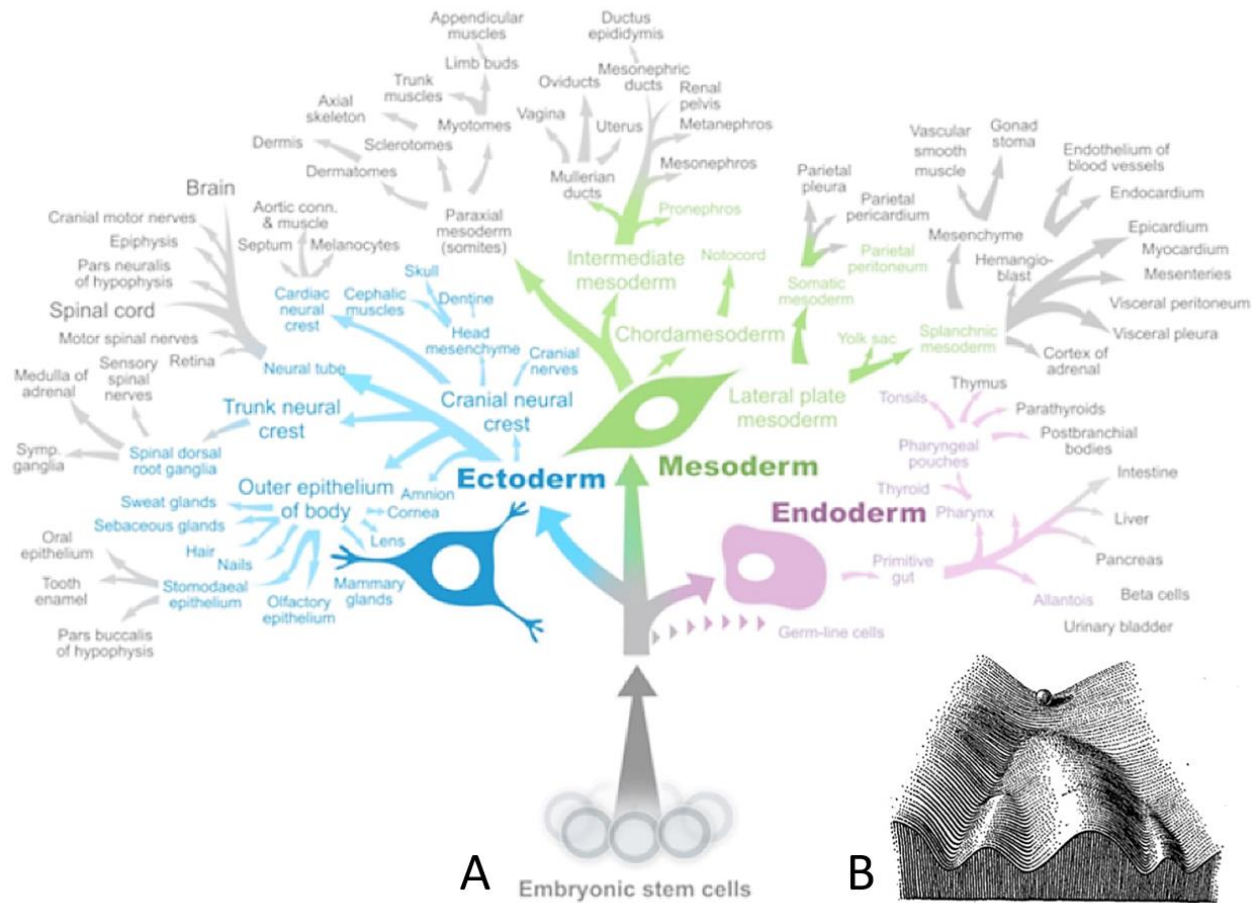


Figure 36. Arbre de la différenciation

(A) Représentation conventionnelle d'une différenciation qui passe par une succession d'étapes, de la cellule pluripotente à la cellule différenciée. **(B)** Grâce aux modèles continus de la différenciation, inspirés des vallées de potentiel épigénétique de Waddington, on peut représenter des chemins de différenciation plutôt que des étapes. (Conrad Waddington, 1957).

4.3 CARACTÈRE SOUCHE : UNE CAPACITÉ INFINIE D'AUTORENOUVELLEMENT

Les cellules souches pluripotentes sont des cellules adaptées à la multiplication cellulaire. Leur cycle cellulaire est extrêmement rapide avec une durée estimée de dix à seize heures (Kapinas *et al.*, 2013 ; L. Liu *et al.*, 2019 ; Orford & Scadden, 2008 ; Padgett & Santos, 2020 ; White & Dalton, 2005 ; Yiangou *et al.*, 2019), alors qu'une cellule somatique a un cycle de près de vingt-quatre heures lorsqu'elle est en phase de division cellulaire (cf. figure 37).

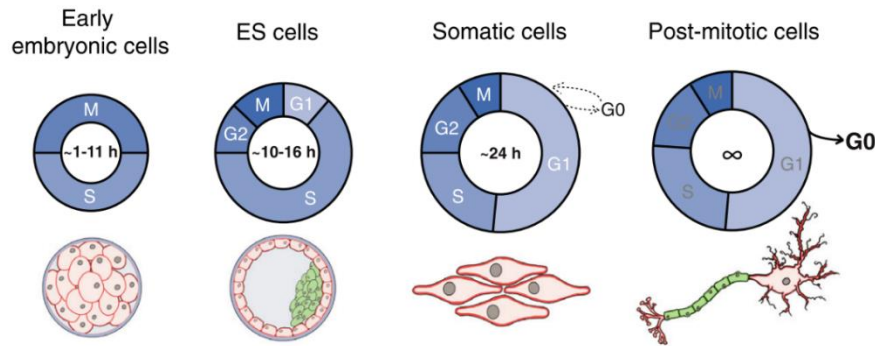


Figure 37. Cycle cellulaire des cellules souches

Adapté de « From clocks to dominoes: Lessons on cell cycle remodelling from embryonic stem cells » par Padgett & Santos, 2020.

Leur volume cytoplasmique est extrêmement faible, le noyau pouvant atteindre 95 % de l'espace intracellulaire (Aiken *et al.*, 2004 ; Wakui, 2017) (cf. figure 38). Ainsi une cellule souche pluripotente ne doit pas créer autant de cytoplasmes qu'une cellule différenciée quand elle se divise. Le temps et l'énergie utilisés pour la multiplication cellulaire sont ainsi minimisés.

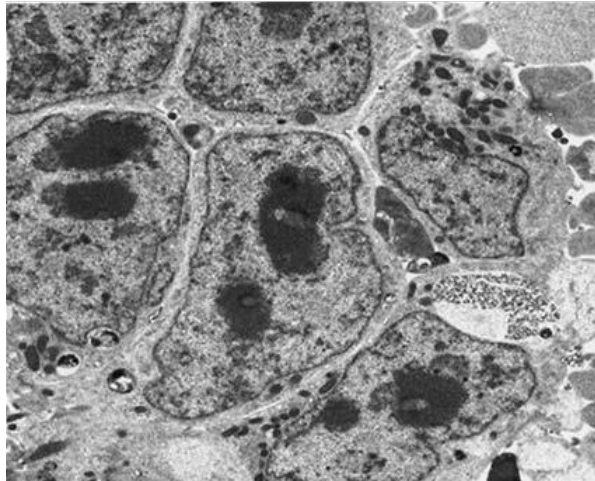


Figure 38. Syncytium pluripotent

La microscopie électronique par transmission x 35 000 montre des cellules souches pluripotentes embryonnaires, des noyaux larges et des cytoplasmes maigres. Adapté de « Digital imaging of stem cells by electron microscopy » par Sathanathan & Nottola, 2007.

Les télomères d'une cellule somatique se raccourcissent lorsqu'elle se divise et l'engagent progressivement dans la voie du vieillissement cellulaire, de la sénescence programmée voire de l'apoptose (cf. figure 39). Les cellules souches pluripotentes expriment la télomérase, qui allonge les télomères et permet de maintenir leur potentiel multiplicatif (N. Desai *et al.*, 2015 ; Fathi *et al.*, 2019 ; Marion *et al.*, 2009 ; Rohani *et al.*, 2014).

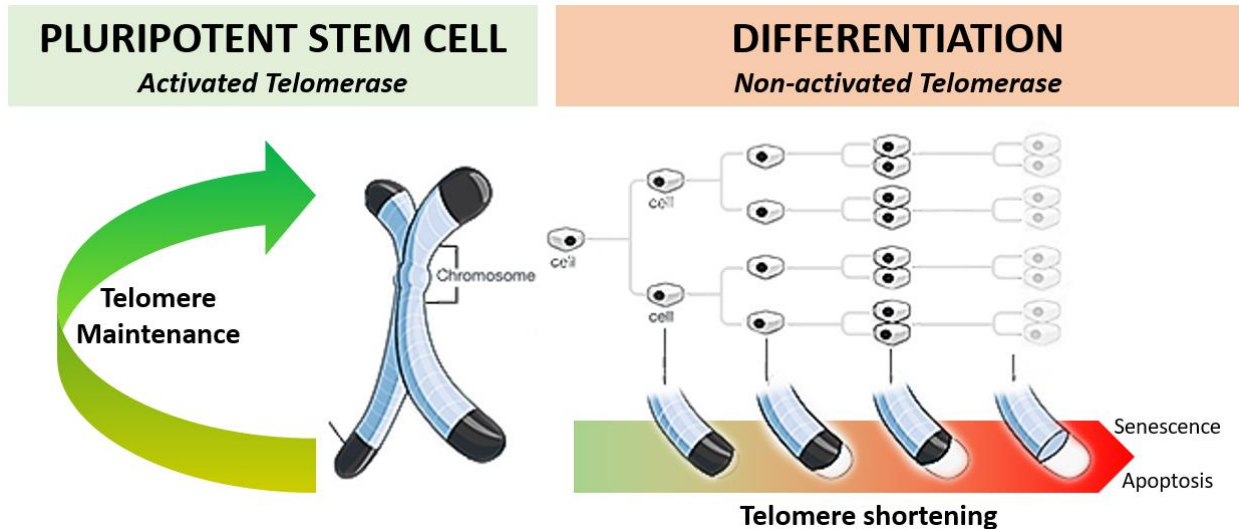


Figure 39. Homéostasie télomérique des cellules souches pluripotentes

Les télomères sont des régions nucléoprotéiques à l'extrémité des chromosomes qui raccourcissent à chaque fois qu'une cellule se divise. Quand les télomères sont trop courts, les voies de la sénescence ou de l'apoptose s'activent. Les cellules souches pluripotentes (embryonnaires ou induites) contrebalancent le raccourcissement des télomères par l'activation de l'enzyme télomérase. Les mécanismes de maintenance des télomères participent à la régulation de l'état pluripotent (F. Li *et al.*, 2020 ; J. S. Z. Li & Denchi, 2018).

Leur capacité à se renouveler indéfiniment est indispensable au bon déroulement des premières étapes de la croissance exponentielle du corps, qui va passer d'une cellule à plus de 30 trillions pour un être humain adulte. Plus du quart des cycles de divisions nécessaires s'effectue ainsi au stade pluripotent (0 à 10 000 = 2^{13} ; 0 à 10 trillions = 2^{45} , donc 13 divisions jusqu'à 10 000 cellules et 45 divisions jusqu'à 30 000 milliards).

Il a été montré qu'elles sont génétiquement plus stables que des cellules somatiques ou d'autres types cellulaires en culture (Kuijk *et al.*, 2018 ; Weissbein *et al.*, 2014) (cf. Partie 2, introduction, génétique des cellules souches pluripotentes). Elles ont également un système d'apoptose pré-amorcée qui leur permet probablement d'éliminer les cellules souches pluripotentes qui seraient trop mutées (Dumitru *et al.*, 2012). Ce système les rend particulièrement sensibles aux conditions de culture : si ces dernières ne sont pas optimales, elles se différencient ou s'engagent dans l'apoptose.

Ces fonctions fondamentales (autorenouvellement rapide et illimité, intégrité génétique, pluripotence, malléabilité génétique et transcriptomique, etc.) permettent aux cellules souches de jouer le rôle *in vivo*, d'« usine de bioproduction cellulaire » mettant en place la masse critique nécessaire à la gastrulation. *In vitro*, ces mêmes caractéristiques en font une très bonne source de cellules thérapeutiques.

4.4 LES FACTEURS INTRINSÈQUES ET EXTRINSÈQUES DE RÉGULATION DE LA PLURIPOTENCE

Facteurs intrinsèques

Le maintien du stade pluripotent dépend de la régulation de l'expression d'un réseau de gène, et en premier lieu des facteurs de transcription OCT4, SOX2 et NANOG. Ces « gènes maîtres » régulent à leur tour de nombreux gènes de pluripotence et participent indirectement au maintien de l'ouverture de la chromatine. Toute déstabilisation de ces trois gènes essentiels provoque la différenciation (cf. figure 40).

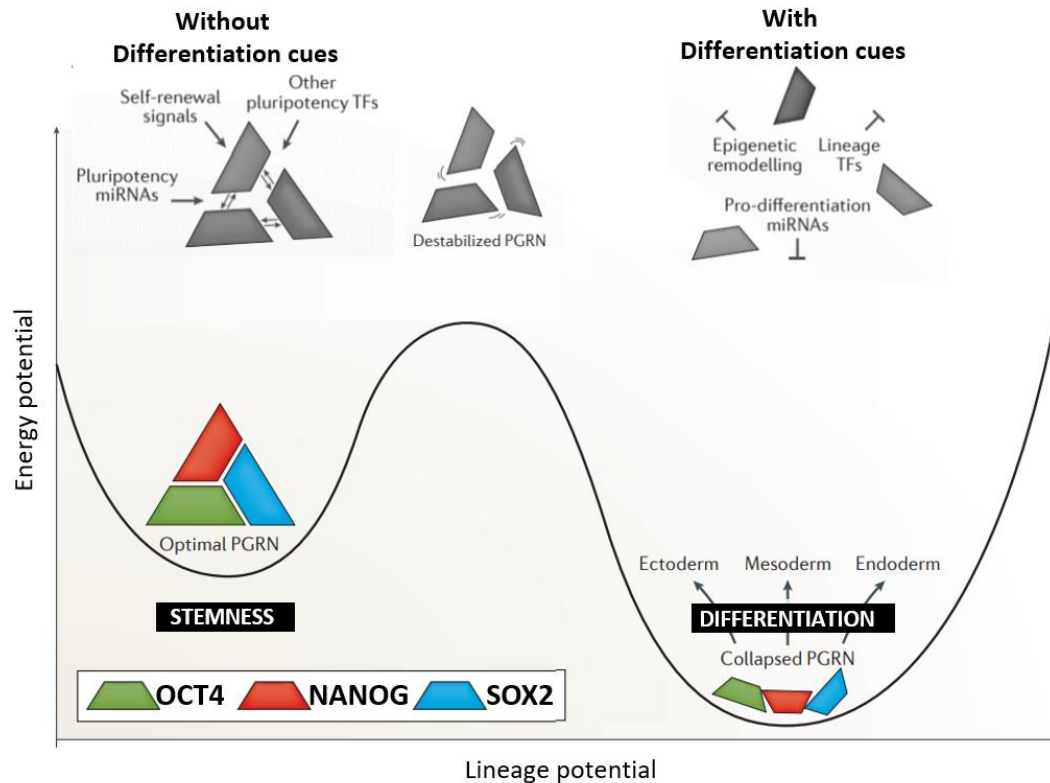


Figure 40. Facteurs intrinsèques : NANOG, OCT4, SOX2, les gènes clés de la pluripotence

Le réseau de régulation génique de la pluripotence peut être considéré comme optimal s'il y a une expression équilibrée des principaux facteurs de transcription de la pluripotence, OCT4, SOX2, NANOG. PGRN est mis pour *Pluripotency gene regulatory network*, TFs pour *Transcription factors*. Adapté de « Ground rules of the pluripotency gene regulatory network » par M. Li & Belmonte, 2017.

Facteurs extrinsèques

La pluripotence est également régulée par des facteurs extrinsèques. *In vivo* ou en culture, les cellules souches pluripotentes ont besoin de l'apport de facteurs exogènes (Lefort, 2015). Cette dépendance des cellules vis-à-vis de facteurs exogènes diffère entre les cellules ES de souris et les cellules ES de primates (homme et singe). Les cellules ES de souris répondent aux signaux LIF et BMP, alors que chez l'homme elles répondent aux signaux bFGF, nodal et activine (Vallier et al., 2005). Cette différence de sensibilité aux signaux cytokiniques s'expliquerait par le fait que la contrepartie murine des hESC serait les mEpi-ESC (cellules issues de l'épiblaste tardif) et non les mESC (issues de la masse interne avant l'individualisation de l'épiblaste et de l'hypoblaste). En effet, tout comme les hESC, les mEpi-ESC requièrent l'activine et le bFGF pour maintenir leur pluripotence et se différencient en présence de LIF et de BMP.

4.5 PLURIPOTENCE NAÏVE FORMATIVE ET AMORCÉE

Durant le développement de l'embryon, juste avant de s'engager dans la différenciation et la gastrulation, les cellules souches pluripotentes passent d'un stade naïf (masse cellulaire interne du blastocyste) à un stade amorcé (partie épiblastique de la gastrula).

Ces deux états de pluripotence sont chacun définis par des attributs fonctionnels, transcriptomiques, épigénétiques, métaboliques, etc. Par ailleurs, l'hypothèse a été émise qu'un stade intermédiaire dit de pluripotence « formative » existerait (Afanassieff et al., 2018 ; Kinoshita & Smith, 2018; Morgani et al., 2017 ; Smith, 2017 ; Verfaillie et al., 2018 ; Yilmaz & Benvenisty, 2019 ; Zimmerlin et al., 2017). Cet état intermédiaire correspondrait à celui de cellules pluripotentes qui ont été « capacitées » pour permettre la différenciation, mais qui n'ont pas été « instruites » vers une voie précise (cf. figure 41). Les deux moteurs de l'avancée des cellules souches dans ce continuum seraient l'épithélialisation complète et l'exposition à des signaux de différenciation. Le lien entre la forme et l'identité jouerait donc un rôle clef (Hamidi et al., 2020a ; Shahbazi, 2020a).

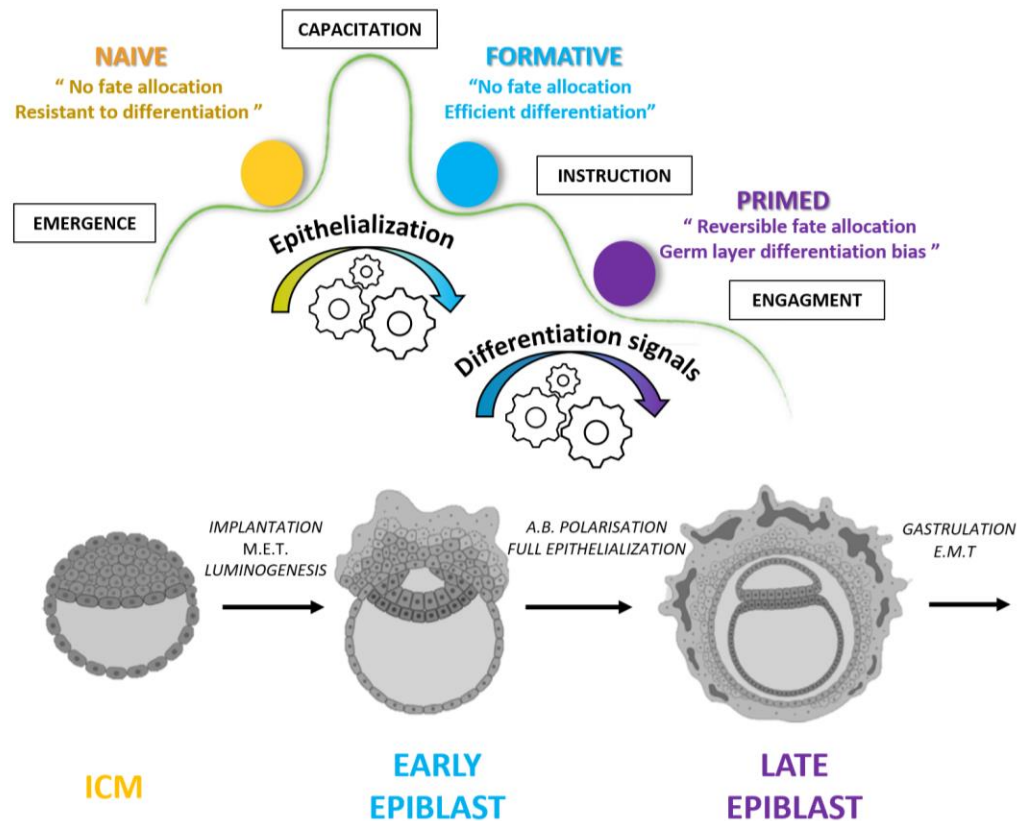
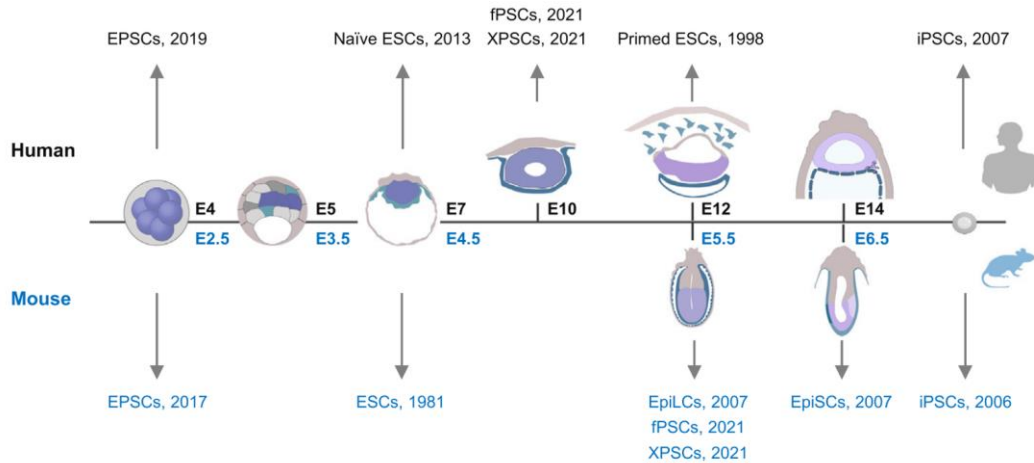


Figure 41. In vivo : l'hypothèse d'un stade formatif de pluripotence (page suivante)

L'épithélialisation de l'épiblaste puis son exposition aux signaux de différenciation sont les deux principaux moteurs de l'évolution d'identité des cellules souches pluripotentes *in vivo*. La présence d'un stade formatif associé à l'épiblaste précoce est une problématique non résolue. Adapté de « Mesenchymal-epithelial transition regulates initiation of pluripotency exit before gastrulation » par Hamidi et al., 2020a, « Pluripotency deconstructed » par Kinoshita & Smith, 2018 ; « Formative Pluripotency: The executive phase in a developmental continuum » par Smith, 2017, « Capturing human naïve pluripotency in the embryo and in the dish » par Zimmerlin et al., 2017 et de « Amnion-specific markers demarcate the realm of various human pluripotent states » par Koto, 2021.

In vitro, les cellules souches pluripotentes humaines amorcées sont les plus utilisées dans le domaine biomédical. Elles ont permis d'établir l'ensemble des protocoles de différenciation. Plus récemment, les biologistes ont tenté de stabiliser en culture des cellules souches formatives ou intermédiaires. Des lignées ont été établies chez l'homme et la souris (Kalkan et al., 2017 ; Watts et al., 2018 ; Zhai et al., 2021) (cf. figure 42).



HUMAN CELL LINES	
Formative pluripotency	Capture of mouse and human stem cells with features of formative pluripotency (Kinoshita et al. , 2021)
Intermediate pluripotent stem cells	Derivation of intermediate pluripotent stem cells amenable to primordial germ cell specification (L. Yu et al. , 2021)
Naive-to-Primed Intermediate	Lipid Deprivation Induces a Stable, Naive-to-Primed Intermediate State of Pluripotency in Human PSCs (Cornacchia et al. , 2019)
MOUSE CELL LINES	
Formative pluripotent	Formative pluripotent stem cells show features of epiblast cells poised for gastrulation (X. Wang et al. , 2021)
Extended pluripotent stem cells	Chemically defined and xeno-free culture condition for human extended pluripotent stem cells (B. Liu et al. , 2021)
Rosette-stage pluripotency	In vitro capture and characterization of embryonic rosette-stage pluripotency between naïve and primed states (Neagu et al. , 2020); Bridging naïve and primed pluripotency (Dundes & Loh, 2020)
High capacity for self-renewal	Unique properties of a subset of human pluripotent stem cells with high capacity for self-renewal (Lau et al. , 2020)
Intermediate pluripotent state	An Intermediate Pluripotent State Controlled by MicroRNAs Is Required for the Naïve-to-Primed Stem Cell Transition (Du et al. , 2018)
Alternative states	Vitamin C and L-Proline Antagonistic Effects Capture Alternative States in the Pluripotency Continuum (D'Aniello et al. , 2017)
Alternative pluripotent state	An alternative pluripotent state confers interspecies chimaeric competency (J. Wu, Okamura, et al. , 2015)
Alternative stem-cell states	Divergent reprogramming routes lead to alternative stem-cell states (Tonge et al. , 2014)
Epiblast stem cells	Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos (Brons et al. , 2007)
Epiblast stem cells	New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells (Tesar et al. , 2007)

Figure 42. Lignées de cellules souches pluripotentes naïves, formatives, amorcées

La frise présente les différentes lignées de cellules souches pluripotentes stabilisées *in vitro* à différents stades de pluripotence. ESCs est mis pour *Embryonic stem cells*, EPSCs pour *Expanded potential stem cells*, fPSCs pour *Formative pluripotent stem cells*, XPSCs pour *Intermediate stem cells between naïve and primed states*, EpiLCs pour *Epiblast-like cells*, EpiSCs pour *Epiblast stem cells*, iPSCs pour *Induced pluripotent stem cells*. Adapté de « Human embryonic development: From peri-implantation to gastrulation » par Zhai et al., 2021.

Le tableau à la suite liste les publications liées à des stades formatifs ou intermédiaires.

4.6 ÉVALUER LE CARACTÈRE SOUCHE ET LA PLURIPOTENCE

Les cellules souches pluripotentes humaines expriment un panel de marqueurs qui peuvent être utilisés pour caractériser leur statut indifférencié (cf. figure 43) :

- les facteurs de transcription OCT4, SOX2 et NANOG ;
- des antigènes de surface : TRA-1-60 (TRA, *Tumor rejection antigen*), TRA-1-81, SSEA-3 (SSEA, *Stage specific embryonic antigens*), SSEA-4 – mais pas SSEA-1, contrairement aux cellules souches pluripotentes de souris – et le CD9 ;
- la phosphatase alcaline.

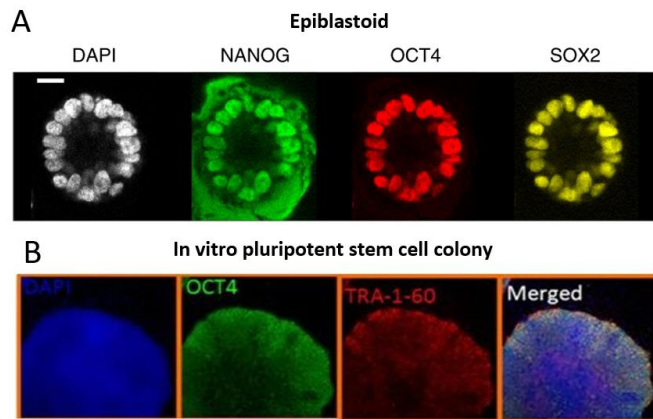


Figure 43. Marquage immunohistochimique de colonies de cellules souches pluripotentes (A) Marquages DAPI, NANOG, OCT4 et SOX2 d'un épiblastoïde, Adapté de « A 3D model of a human epiblast reveals BMP4-driven symmetry breaking » par Simunovic et al., 2019. (B) Colonies de cellules souches pluripotentes humaines exprimant les marqueurs TRA-1-60, OCT4 et DAPI, inspiré d'« Instabilité génomique des cellules souches pluripotentes humaines et de leurs dérivés » par Lefort, 2015.

In vitro, au-delà de l'expression de ces marqueurs, la réalisation de tests de pluripotence est nécessaire pour évaluer la pleine capacité de différenciation des cellules (Lefort, 2015). Il existe différents tests.

- *In vivo* : l'injection chez l'animal permet d'observer la formation de tératomes avec des contingents cellulaires des trois feuillets embryonnaires (Wesselschmidt, 2011).
- *In vitro* : idéalement, des différenciations complètes vers plusieurs types de tissus sont menées pour prouver le caractère fonctionnel complet des cellules. Une solution plus simple consiste à rechercher les marqueurs des trois feuillets embryonnaires à la suite de la formation de corps embryoides.

5. SYSTÈMES DE CULTURE DE CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES

5.1 LES DÉBUTS DE LA CULTURE *IN VITRO*

Les propriétés des cellules souches et en particulier leur capacité de multiplication et de différenciation – intensément optimisée par l'évolution – en font la matière première idéale pour la bioproduction des thérapies cellulaires (K. G. Chen *et al.*, 2014 ; Cyranoski, 2018 ; M. Evans, 2011 ; Karagiannis *et al.*, 2019 ; Rowe & Daley, 2019 ; Yamanaka, 2020).

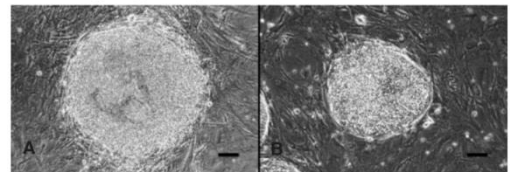
L'émergence des premières lignées de cellules souches pluripotentes embryonnaires est due aux observations faites par la biologie des cancers. Les cellules de tératocarcinome (forme maligne de tératome des gonades) présentent, en effet, des similarités avec les cellules souches. À partir d'une origine cellulaire unique, elles engendrent des structures tissulaires appartenant aux trois feuilletts embryonnaires primitifs. Ces cellules indifférenciées, à l'origine des tératocarcinomes, ont été identifiées chez la souris dès 1964 par Kleinsmith et Pierce (Kleinsmith & Pierce, 1964), puis cultivées *in vitro* assez rapidement (Pierce *et al.*, 1967). Ces expérimentations pionnières ont forgé le concept de « pluripotence » (Feyeux, 2011) et ont également permis de constituer un milieu conditionné propice à la culture des cellules souches pluripotentes.

En 1981, Evans, Kaufman et Martin établissent les premières lignées de cellules souches embryonnaires de souris en disséquant et en cultivant en 2D de la masse cellulaire interne d'embryons au stade blastocyste (M. J. Evans & Kaufman, 1981 ; G. R. Martin, 1981). À l'origine, ces lignées sont cultivées sous forme de colonies circulaires compactes en 2D sur un tapis de fibroblastes embryonnaires de souris (*MEF Feeder cells*), en boîte de Petri, et avec un milieu conditionné par tératocarcinome (G. R. Martin, 1981). Chez l'homme, les premières lignées de cellules souches pluripotentes embryonnaires sont produites par Thomson *et al.* en 1998 à partir d'embryons issus de fécondation *in vitro* (Thomson, 1998) (cf. figure 44). Ces premières lignées ouvrent la voie aux thérapies cellulaires. Toutefois, leur dépendance à une source embryonnaire fait que des frontières éthiques médicales et scientifiques importantes subsistent.

Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts

James A. Thomson,* Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro,
Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall,
Jeffrey M. Jones

Human blastocyst-derived, pluripotent cell lines are described that have normal karyotypes, express high levels of telomerase activity, and express cell surface markers that characterize primate embryonic stem cells but do not characterize other early lineages. After undifferentiated proliferation *in vitro* for 4 to 5 months, these cells still maintained the developmental potential to form trophoblast and derivatives of all three embryonic germ layers, including gut epithelium (endoderm); cartilage, bone, smooth muscle, and striated muscle (mesoderm); and neural epithelium, embryonic ganglia, and stratified squamous epithelium (ectoderm). These cell lines should be useful in human developmental biology, drug discovery, and transplantation medicine.



Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors

Kazutoshi Takahashi,¹ Koji Tanabe,¹ Mari Ohnuki,¹ Megumi Narita,^{1,2}
Tomoko Ichisaka,^{1,2} Kiichiro Tomoda,³ and Shinya Yamanaka^{1,2,3,4,*}

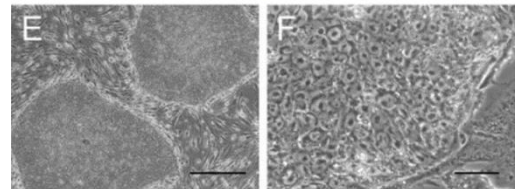


Figure 44. Premières lignées de cellules souches pluripotentes humaines

Articles historiques des premières lignées de cellules souches pluripotentes embryonnaires (*en haut*, Thomson, 1998) et induites (*en bas*, Takahashi *et al.*, 2007).

En 2007, Shinya Yamanaka décrit la génération de cellules souches pluripotentes induites humaines par reprogrammation de cellules somatiques différenciées adultes : « iPS » (K. Takahashi *et al.*, 2007 ; K. Takahashi & Yamanaka, 2006) (cf. figure 44). Cette découverte majeure, héritière des expériences de reprogrammation cellulaire par transfert nucléaire de Gurdon (Gurdon, 1962), ouvre de nombreuses possibilités. Les iPS permettent de se passer de la source embryonnaire et de générer des cellules haplotypées, voire d'envisager des thérapies autologues. Gurdon et Yamanaka reçoivent le prix Nobel de médecine en 2012.

Ces premières cultures *in vitro* reproduisent des signaux biochimiques et cellulaires suffisants au maintien prolongé des cellules souches en culture, mais leur topologie en 2D ne récapitule que partiellement leur niche. Aussi, leur usage thérapeutique est limité par l'utilisation de cellules nourricières animales et de milieux de culture non définis peu reproductibles.

Grâce aux progrès de la biochimie et des biomatériaux, le tapis nourricier de fibroblastes embryonnaires est progressivement remplacé par du Matrigel® (C. Xu *et al.*, 2001), de la fibronectine (Y. Liu *et al.*, 2006), de la vitronectine (Braam *et al.*, 2008), ou de la laminine (Rodin *et al.*, 2010). Le milieu de culture est également raffiné, caractérisé et défini sans élément d'origine animale (G. Chen *et al.*, 2011 ; Ludwig *et al.*, 2006 ; Vallier *et al.*, 2005). La découverte de l'inhibition de la voie ROCK, qui permet d'augmenter la survie cellulaire lors de la dissociation au moment des passages, améliore également la culture des cellules souches *in vitro*, en 2007 (Ohgushi & Sasai, 2011 ; Watanabe *et al.*, 2007).

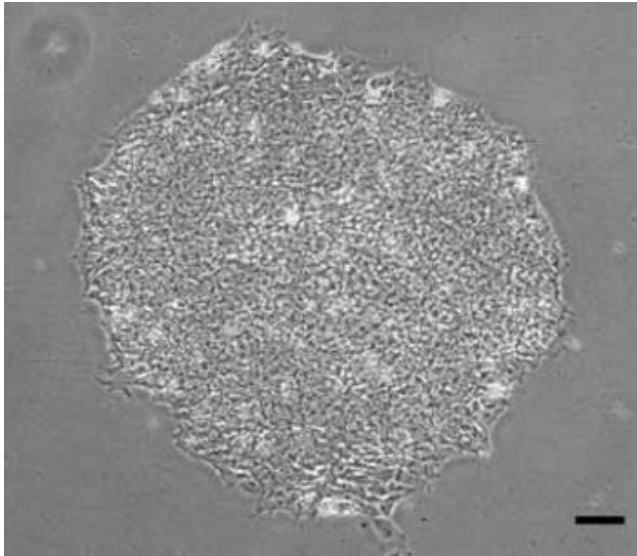


Figure 45. Morphologie typique d'une colonie de cellules souches pluripotentes *in vitro*

Les cellules souches pluripotentes ont, *in vitro*, des caractéristiques morphologiques et phénotypiques particulières. Ce sont des cellules d'environ 14 μm , organisées en colonies circulaires compactes. Sont représentées ici des cellules souches pluripotentes embryonnaires WA16 cultivées avec un milieu TeSR1 et un revêtement Matrigel®. Échelle de 100 μm . Adapté de « Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions » par Ludwig *et al.*, 2006.

5.2 LIMITES DE LA MONTÉE EN ÉCHELLE DES CULTURES EN 2D

Ces vingt dernières années, les conditions de culture se sont progressivement améliorées, ce qui a permis de se passer d'embryons, de coculture nourricière, de facteurs animaux ou non définis (Adil & Schaffer, 2017 ; K. G. Chen *et al.*, 2014 ; W. Liu *et al.*, 2019). Néanmoins, la production demeure encore insuffisante pour les applications médicales. Les besoins en thérapie cellulaire augmentent, ainsi que le nombre de patients concernés. Pour chacun d'entre eux, la dose cellulaire requise se situe entre 100 000 et 10 milliards de cellules. À terme, il faudra donc être en mesure de produire des trillions de cellules dérivées d'ES/iPS pour des millions de patients.

Pour augmenter le volume de production, deux stratégies peuvent être employées : la montée en échelle (« *scale-up* ») et la parallélisation (« *scale-out* ») (Eaker *et al.*, 2017 ; Hourd *et al.*, 2008). Dans la première, on augmente le volume ou on modifie le système de culture unitaire afin d'augmenter le nombre de cellules produites par lot. Dans la deuxième, on multiplie en parallèle le nombre d'unités de culture pour augmenter le nombre total de cellules produites.

La bioproduction de cellules souches en 2D, qui repose sur une stratégie de parallélisation (« *scale-out* » cf. figure 46), permet de produire quelques milliards de cellules. Au-delà de cette échelle, la surface requise, le consommable plastique, la main-d'œuvre nécessaire et les coûts croissent de façon très importante. Afin d'éviter ces écueils, les cellules souches ont été adaptées à des outils de bioproduction en 3D.



Figure 46. Stratégie de parallélisation en 2D : Scale-Out

Adapté de « Progress and challenges in large-scale expansion of human pluripotent stem cells » par Kropp *et al.*, 2017.

5.3 BIORÉACTEUR ET CULTURES EN SUSPENSION 3D

Contrairement à l'approche de parallélisation des systèmes en 2D, les cultures en suspension en bioréacteur permettent une montée en échelle par une augmentation directe du volume de culture (« *scale-up* » cf. figure 47).

Les bioréacteurs régulent activement l'environnement de culture : pH, température, oxygénation, renouvellement ou complémentation du milieu de culture, glucose, lactate, etc. Cette stabilité des paramètres clefs mime l'homéostasie de l'organisme, qui permet aux cellules du corps humain d'être dans un environnement stable et régulé.

Les bioréacteurs ont été développés dans une optique de culture cellulaire à grande échelle. Il en existe plusieurs types (cf. tableau 5). Les bioréacteurs à agitation mécanique horizontale sont les plus utilisés pour la culture en suspension ; ils présentent de nombreux avantages :

- une montée en échelle jusqu'à des volumes de 2 000 litres, voire bien plus (SamsungBioLogics, 2018 ; WuXi, 2021) ;
- une culture de haute densité avec un ratio surface/volume important ;
- une automatisation partielle ou complète limitant les interventions et les erreurs manuelles ;
- une configuration close et à usage unique diminuant le risque de contaminations ;
- une augmentation de la reproductibilité ;
- une diminution des rejets de lots et des coûts ;
- une optimisation par l'industrie pharmaceutique et les régulateurs, ce qui contribue à respecter les critères de bonnes pratiques pharmaceutiques (*Good Manufacturing Practices, GMP*).

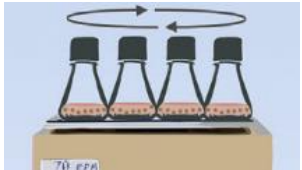
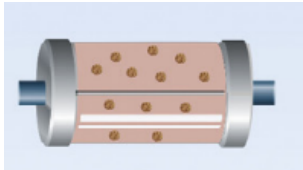
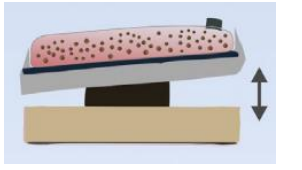

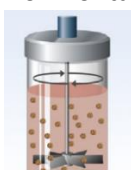

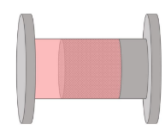
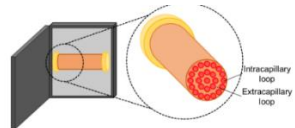
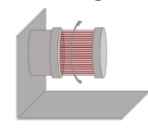
Cultures Agitées (Indirecte)	Rotating Erlenmeyer flask 	Rotating Wall Bioreactor 	Wave Bioreactor 
Bioréacteur à cuves agitées (Directe)	Spinner flask 	Horizontal Blade Bioreactor 	Vertical Wheel Bioreactor 
Bioréacteur Cellules adhérentes	Fixed Bed Bioreactor 	Hollow Fiber Bioreactor 	Rotating Bed Bioreactor 

Tableau 5. Différents types de bioréacteurs

Adapté de « Progress and challenges in large-scale expansion of human pluripotent stem cells » par Kropp et al., 2017 et « Single-use bioreactors for human pluripotent and adult stem cells: Towards regenerative medicine applications » par Nogueira et al., 2021.

5.4 CULTURES DE CELLULES SOUCHES EN BIORÉACTEUR

L'adaptation des cellules souches pluripotentes aux cultures en suspension prend principalement deux formes, celles de microporteurs et d'agrégats (Adil & Schaffer, 2017 ; Kropp *et al.*, 2017 ; McKee & Chaudhry, 2017 ; Polanco *et al.*, 2020 ; Torizal *et al.*, 2019) (cf. figure 47).

Microporteurs

Il s'agit de cellules souches pluripotentes cultivées sous une forme épithéliale à la surface ou dans des biomatériaux en suspension (A. K. L. Chen *et al.*, 2011 ; Nie *et al.*, 2009). Leur culture permet d'augmenter le rapport surface de culture/volume de milieu et de monter en échelle mais ce procédé a plusieurs limites. D'une part, les microporteurs forment des agglomérats difficiles à cultiver, récolter et dissocier. D'autre part, ils subissent une exposition directe à des stress mécaniques (Pandey *et al.*, 2020 ; Rodrigues *et al.*, 2019). Conjointement cela nuit à l'homogénéité des conditions de culture à l'échelle de la cellule.

Agrégats

Dans cette configuration, les cellules souches sont inoculées en suspension de cellules uniques ou par petits amas dans le bioréacteur. Progressivement, par agglomération et division cellulaire, ces amas grossissent jusqu'à former des agrégats composés exclusivement de cellules (Amit *et al.*, 2011 ; Steiner *et al.*, 2010). La couche de cellule la plus à l'extérieur a un accès direct au milieu, alors que toutes les cellules internes adoptent un phénotype non épithélial et ont un accès réduit à l'oxygène et aux nutriments (Sart *et al.*, 2017). Cette configuration en agrégats n'a pas d'équivalent naturel. Les cellules sont donc maintenues dans cet état métastable grâce au milieu de culture qui empêche la différenciation. Les principaux freins de la culture en agrégats sont liés à ces problèmes d'homogénéité et à l'exposition directe des cellules aux contraintes mécaniques.

Le tableau 6 présente les meilleures performances quantitatives de ces cultures en suspension. Malgré les optimisations récentes, la culture d'agrégats et de microporteurs ne peut pas dépasser une échelle de production de quelques litres ou de quelques milliards de cellules. Au-delà de ce volume, les forces mécaniques entravent la croissance cellulaire.

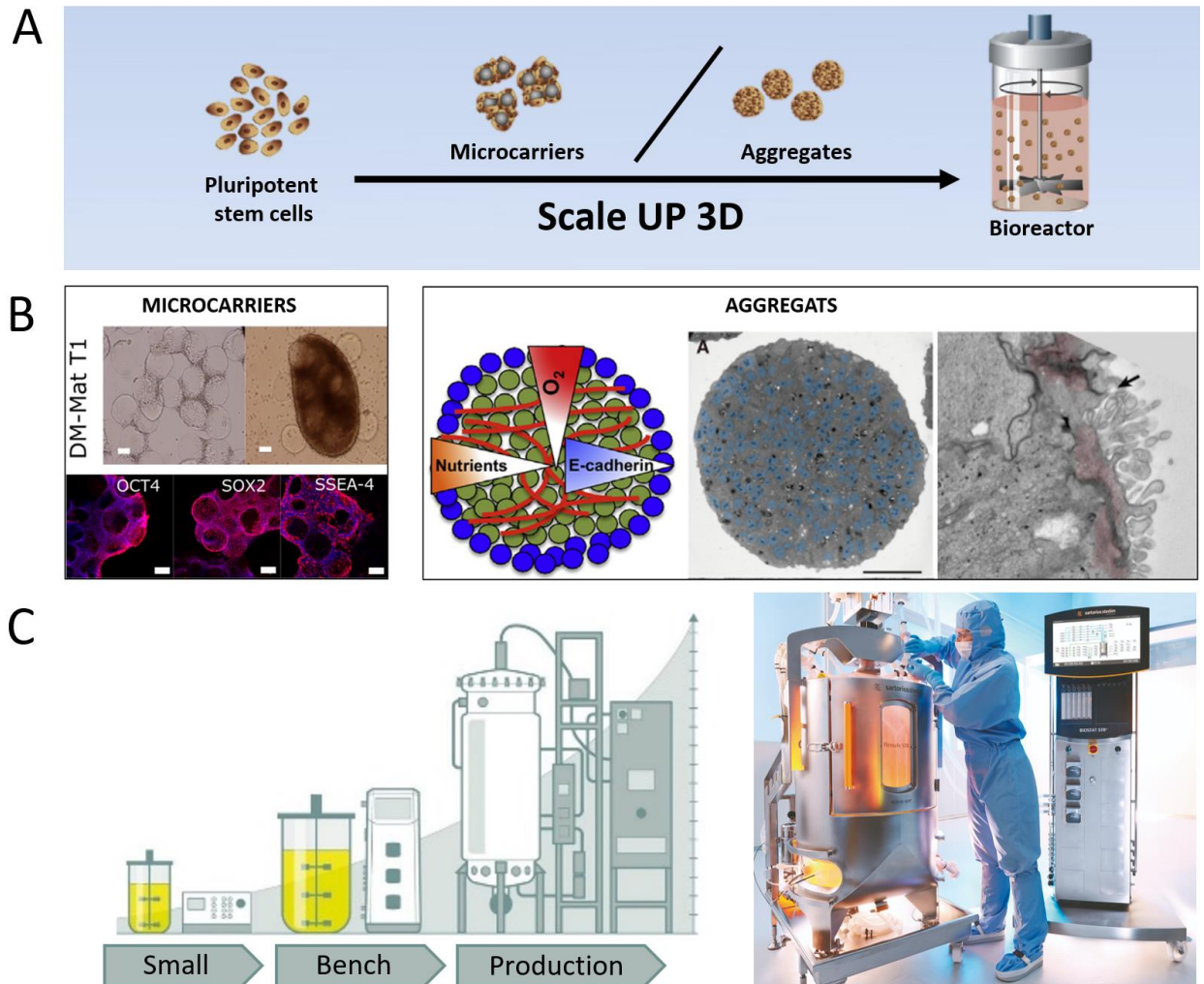
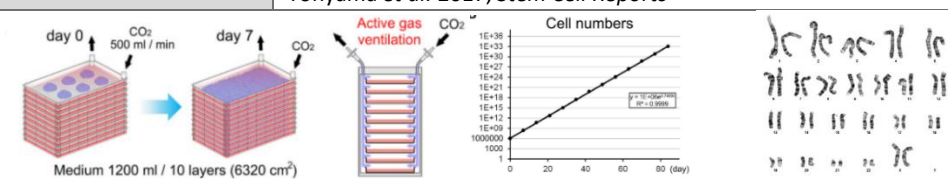
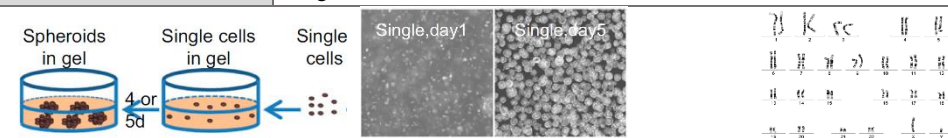
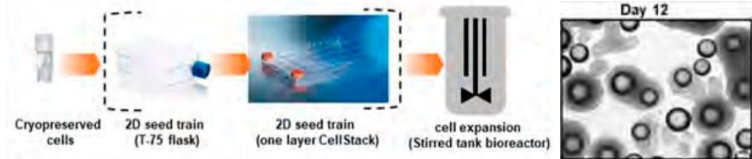
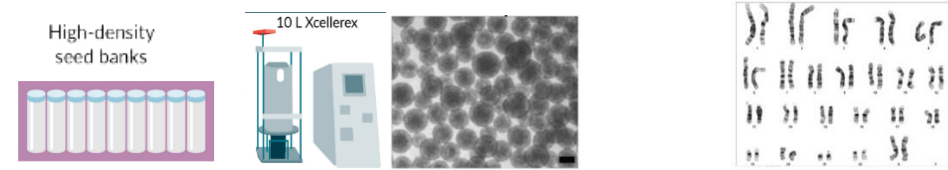
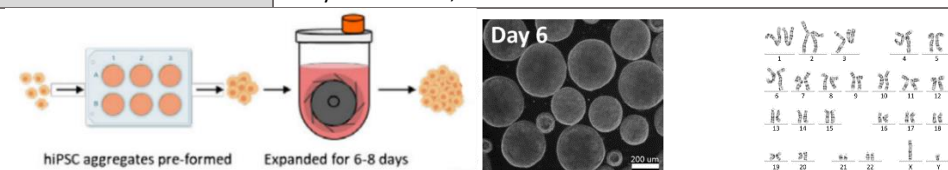
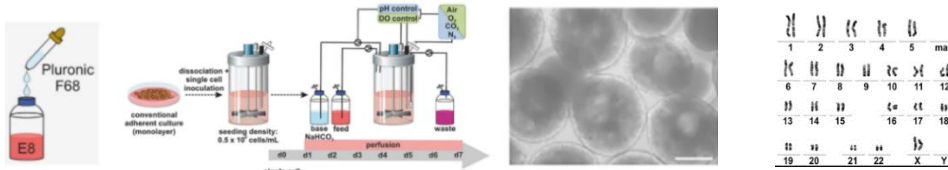


Figure 47. Stratégie de montée en échelle 3D : Scale-Up

(A) Culture en suspension de cellules souches pluripotentes en formats microporteurs ou agrégats. Adapté de « Progress and challenges in large-scale expansion of human pluripotent stem cells » par Kropp et al., 2017. **(B)** Microporteurs agglomérés et structure des agrégats. Adapté de « Dissolvable microcarriers allow scalable expansion and harvesting of human induced pluripotent stem cells under xeno-free conditions » par Rodrigues et al., 2019 , « A 3D sphere culture system containing functional polymers for large-scale human pluripotent stem cell production » par Otsuji et al., 2014 ; « Progress and challenges in large-scale expansion of human pluripotent stem cells » par Kropp et al., 2017 ; « Characterization of 3D pluripotent stem cell aggregates and the impact of their properties on bioprocessing » par Sart *et al.*, 2017. **(C)** Montée en échelle de la culture en bioréacteur : petite échelle, échelle paillasse, production. Adapté de communications commerciales des entreprises Eppendorf et Sartorius.

Tableau 6. Meilleures performances quantitatives des cultures de cellules souches

		Tableau 6. Meilleures performances quantitatives des cultures de cellules souches	
SCALE-OUT	2D multilayer culture plates (CPs) with active gas ventilation (AGV)	x170/7 jours PDT 23h	Efficient Large-Scale 2D Culture System for Human Induced Pluripotent Stem Cells and Differentiated Cardiomyocytes Tohyama <i>et al.</i> 2017, <i>Stem Cell Reports</i>
			
SCALE-UP	Agrégat Gel embedding	x20/5 jours PDT 33h 20 M/mL	A fully defined and scalable 3D culture system for human pluripotent stem cell expansion and differentiation Yuguo Lei & David Schaffer 2013, <i>PNAS</i>
			
SCALE-UP	Microporteur HB-STBR	x90/16 jours PDT 60h 1 à 3L	End-to-end platform for human pluripotent stem cell manufacturing Pandey <i>et al.</i> 2020, <i>International Journal of Molecular Sciences</i>
			
	Agrégat HB-STBR	x40/12 jours PDT 44h 10L STBR pré-ampli en 2D Jusqu'à 36 B/batch	Process development and scale-up of pluripotent stem cell manufacturing Huang <i>et al.</i> 2020, <i>Cell and Gene Therapy Insights</i>
			
SCALE-UP	Agrégat Vertical Wheel STBR	x32/6 jours PDT 29h Pré-clusturrisation static 100ml VWBR	Optimized serial expansion of human induced pluripotent stem cells using low-density inoculation to generate clinically relevant quantities in vertical-wheel bioreactors Borys <i>et al.</i> 2020, <i>Stem Cells Translational Medicine</i>
			
SCALE-UP	Agrégat Surfactant	x70/7 jours PDT 28h 35 M/mL , 5.25 B/batch 150 mL STBR	High density bioprocessing of human pluripotent stem cells by metabolic control and in silico modeling Manstein <i>et al.</i> 2021, <i>Stem Cells Translational Medicine</i>
			

STBR : Stirred Tank Bioreactor, HB : Horizontal blade, PDT : Population Doubling Time, B : billion

5.5 LA LIMITE MÉCANIQUE DES SYSTÈMES EN SUSPENSION NON PROTÉGÉS

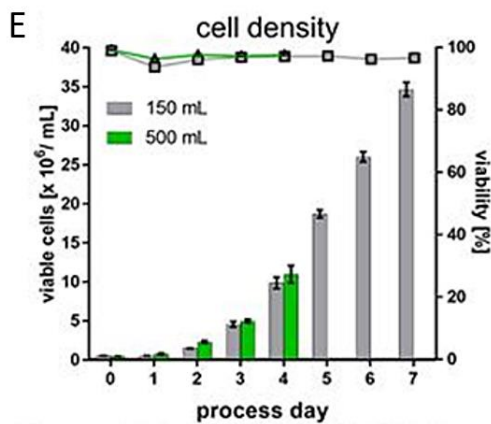
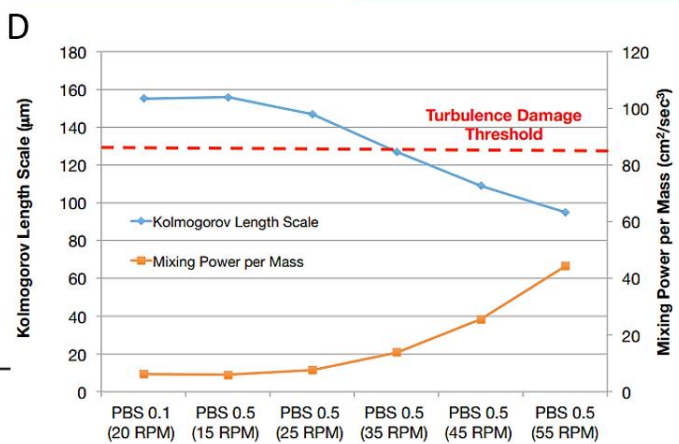
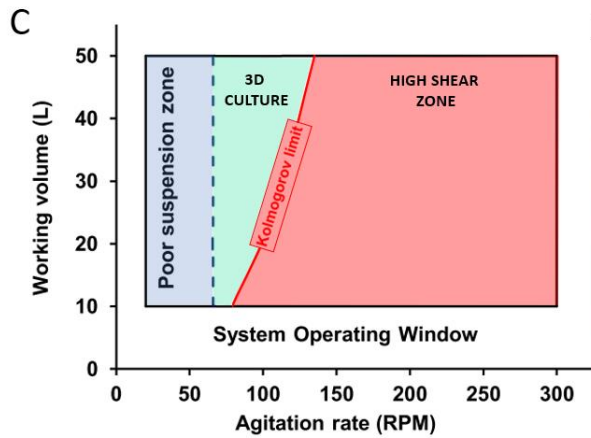
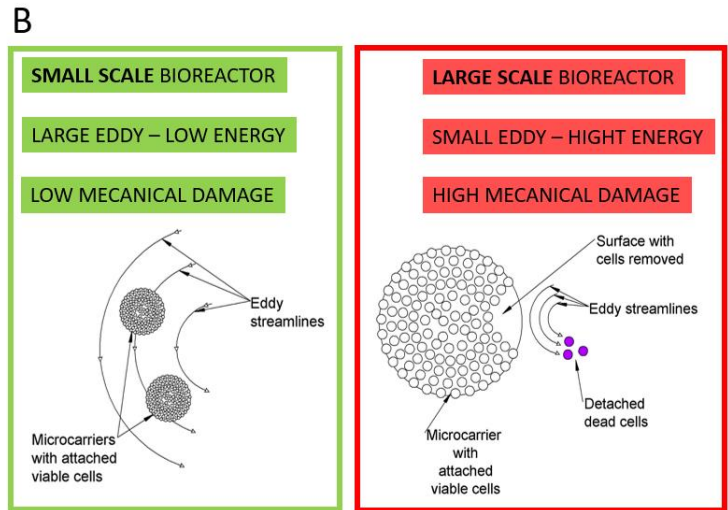
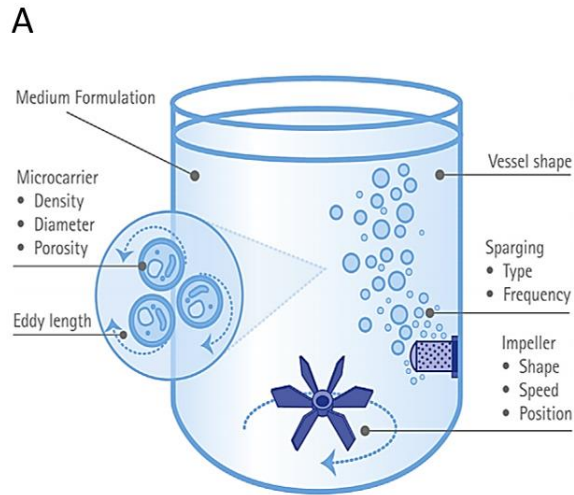
Les systèmes de culture en suspension exposent directement les cellules aux stress mécaniques dus à la culture agitée : impacts cellules/cellules, cellules/hélice, cellules/bioréacteur, cellules/turbulences hydrodynamiques, cellules/bulles d'aération (cf. figure 48). Ce stress mécanique entraîne une augmentation de la mortalité et de la différenciation des cellules souches en culture (Kinney *et al.*, 2011a). Plus la taille du bioréacteur augmente, plus l'agitation minimale nécessaire pour resuspendre et homogénéiser la culture est élevée. Cela implique une augmentation de l'énergie d'agitation par unité de volume et une diminution de la taille des turbulences dites « turbulence de Kolmogorov », (cf. figure 48) (Croughan *et al.*, 2016 ; Lawson *et al.*, 2017 ; B. Lee *et al.*, 2015 ; Ponnuru *et al.*, 2014 ; Schnitzler *et al.*, 2016).

Ainsi, plus la taille du bioréacteur augmente, plus les cellules subissent un stress hydrodynamique important. Les cultures en suspension ont une limite mécanique à leur passage à l'échelle : au-delà de quelques litres, elles deviennent inadaptées pour les configurations « non protégées ».

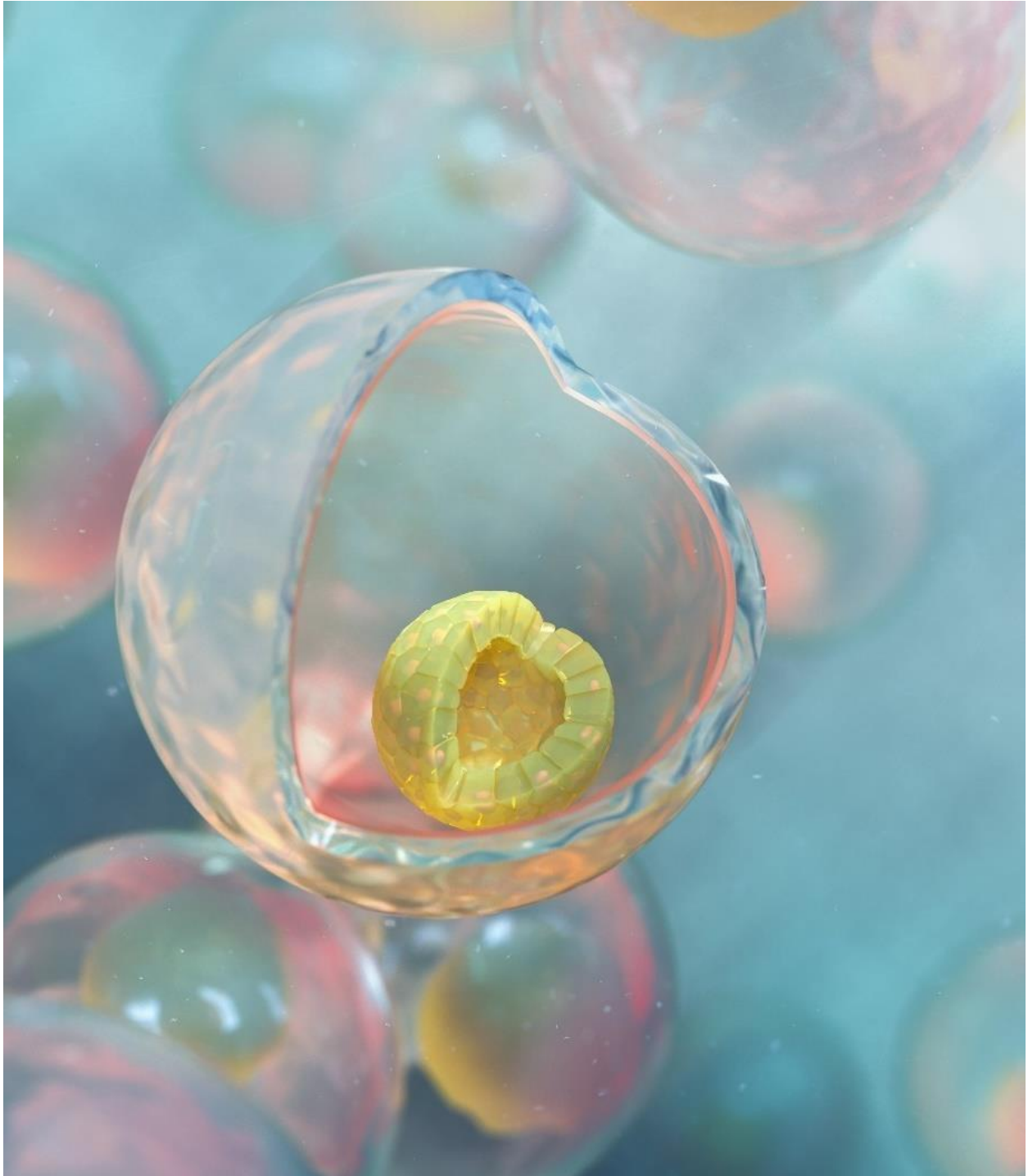
Afin de diminuer l'impact mécanique de l'agitation sur les cellules, deux stratégies ont récemment été mises en place. D'une part, les bioréacteurs à hélice verticale, *vertical wheel* (Borys *et al.*, 2020), permettent de diminuer l'énergie nécessaire pour resuspendre les cellules. D'autre part, l'ajout de surfactant dans le milieu de culture (Manstein *et al.*, 2021) contribue à modifier ses propriétés physiques et à diminuer l'impact cellulaire. Toutefois, dans l'article précédemment cité, les auteurs laissent entrevoir l'omniprésence des contraintes mécaniques (cf. figure 48E). Leur culture d'agrégats de cellules souches atteint une densité record de 35 millions de cellules/mL dans un bioréacteur de 150 mL, et 5 milliards de cellules souches produites en sept jours. Le passage à un réacteur de plus grande taille, 500 mL, abaisse la densité maximale atteinte à 10 millions par mL ; la culture est arrêtée plus tôt (J4) ; le rendement maximal reste finalement inchangé à 5 milliards de cellules. Ainsi, les groupes les plus en pointe de la bioproduction de cellules souches en bioréacteur ont témoigné encore récemment de la limite mécanique des cultures en suspension non protégée

Figure 48. Limites mécaniques des cultures en 3D non protégées (page suivante)

(A - D) L'augmentation de volume du bioréacteur induit une augmentation de l'agitation minimale nécessaire pour la resuspension des colonies en 3D. L'accroissement de l'énergie d'agitation par unité de masse entraîne une diminution de la longueur des turbulences de Kolmogorov et la montée des forces de cisaillement et du stress mécanique. Cela aboutit à une mortalité plus élevée. Adapté de « Bioprocessing of human mesenchymal stem/stromal cells for therapeutic use: Current technologies and challenges » par Schnitzler *et al.*, 2016 ; de « Scale-down model screening study of key process parameters for anchorage-dependent stem cells using Vertical-Wheel Bioreactors » par B. Lee *et al.*, 2015, de « Process development for expansion of human mesenchymal stromal cells in a 50 L single-use stirred tank bioreactor » par Lawson *et al.*, 2017 et de « Novel single-use bioreactors for scale-up of anchorage-dependent cell manufacturing for cell therapies » par Croughan *et al.*, 2016. (E) La limite mécanique des cultures d'agrégats de cellules souches pluripotentes est illustrée par l'article « High density bioprocessing of human pluripotent stem cells by metabolic control and in silico modeling » par Manstein *et al.*, 2021.



PARTIE 1 : LA CAPSULE DE CELLULES SOUCHES



MOTIVATIONS

Grâce aux avancées majeures accomplies dans les domaines scientifique et médical et à un travail interdisciplinaire mené depuis plusieurs décennies, nous avons une meilleure connaissance et une compréhension approfondie des cellules souches, de l'embryologie et des systèmes de culture (Torizal *et al.*, 2019). Toutefois, aucun système de culture de cellules souches pluripotentes ne réunit pour l'instant l'ensemble des critères inhérents à la production de thérapies cellulaires de qualité à une échelle industrielle. Un cahier des charges idéal pourrait contenir les paramètres suivants (cf. figure 49).

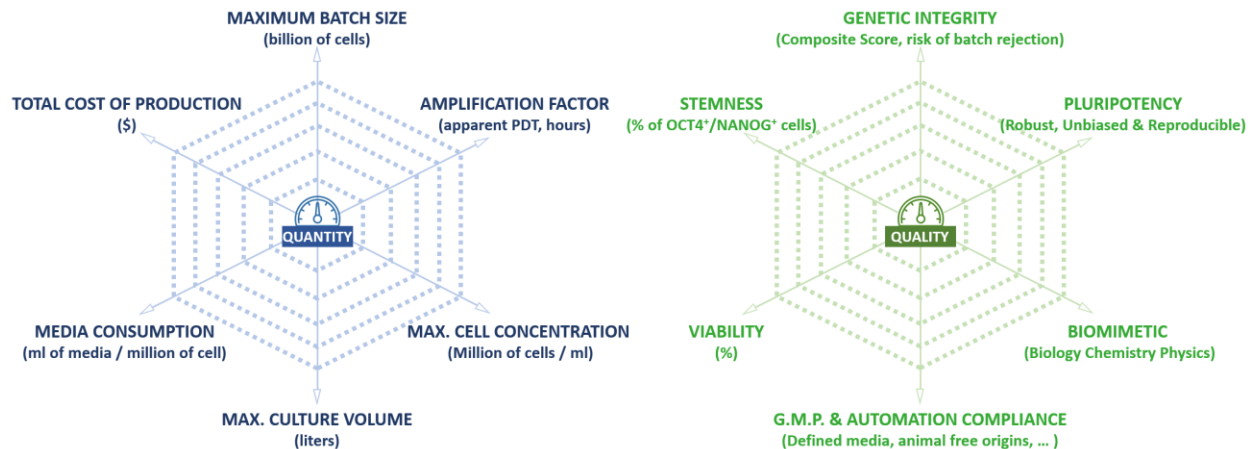


Figure 49. Proposition de cahier des charges et notation des systèmes de culture de cellules souches pluripotentes à visée clinique (Panneau de gauche, quantitatif) : facteur d'amplification, taille des lots produits (entre 10^{10} et 10^{12} cellules), volumes totaux de culture (litres), concentration cellulaire maximale (millions de cellules/mL), coût total, consommation de milieux de culture (mL consommés/milliard de cellules produites). (Panneau de droite, qualitatif) : pourcentage élevé et reproductible de cellules pluripotentes, fraction négligeable de différenciation spontanée en culture, identité cellulaire pertinente biologiquement, viabilité élevée quotidiennement et lors des passages, intégrité génétique préservée en culture prolongée, automatisation, système clos à usage unique, compatible avec les standards réglementaires cliniques, différenciation robuste, sans biais et reproductible.

Nous avons cherché à allier les avantages de la culture en bioréacteur (contrôle continu des paramètres de culture, montée en échelle, automatisation, reproductibilité, etc.) à ceux des modèles développementaux issus de cellules souches (structures épithéliales, pertinence biologique, homogénéité, viabilité, etc.). Afin de combiner ces briques technologiques, nous avons utilisé l'encapsulation microfluidique. Les microcompartiments permettent de concevoir par génie biologique une niche cellulaire interne protégée des contraintes mécaniques externes.

La première partie de cette thèse illustre la bioproduction à grande échelle de cellules souches pluripotentes encapsulées, auto-organisées en épiblastoïdes (cf. figure 48). Nous avons choisi d'utiliser le terme « épiblastoïdes encapsulés » pour y faire référence (cf. paragraphe 4.2, figures 57 et 58).

Les résultats présentés dans cette partie ont été prépubliés le 5 juillet 2021 sur la plateforme BioRxiv, dans l'article C-Stem™: engineering niche-like micro-compartments for optimal and scale-independent expansion of human pluripotent stem cells in bioreactors (Cohen *et al.*, 2021).

1. L'ENCAPSULATION : UN MICROENVIRONNEMENT CONTRÔLÉ ET PROTÉGÉ

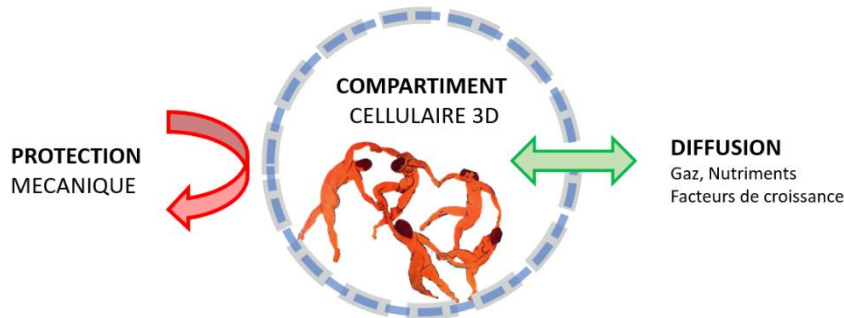


Figure 50. Microcompartiment cellulaire protégé pour la culture en 3D

Les dommages hydrodynamiques empêchent une montée en échelle efficace des cultures cellulaires en 2D ou 3D. Ils induisent également une baisse de la robustesse des procédés du fait de l'inhomogénéité des conditions de culture. En associant la microfluidique à la biologie en 3D il a été possible de développer des cultures cellulaires encapsulées (Shah *et al.*, 2008 ; W. H. Tan & Takeuchi, 2007 ; van Duinen *et al.*, 2015 ; H. Zhang *et al.*, 2006). L'encapsulation cellulaire consiste à contenir des cellules dans un matériel semi-perméable. Les cellules ne peuvent pas le traverser, alors que les nutriments, gaz et facteurs de croissance peuvent diffuser de manière bidirectionnelle.

L'encapsulation a été employée dans la production d'anticorps par culture d'hybridomes ou dans le criblage de molécules anticancéreuses (Baño *et al.*, 1991 ; Dubrot *et al.*, 2010 ; Joseph E. Tyler, 1990 ; Selimoglu & Elibol, 2010). En sus de la culture initiale, la capsule peut aussi protéger les cellules lors de la greffe. L'encapsulation a d'abord été utilisée pour l'immunoprotection de greffon insulino-sécréteurs dans le cadre du diabète (Algire, 1949 ; Ashimova *et al.*, 2019 ; Bisceglie, 1933 ; Bochenek *et al.*, 2018 ; T. Desai & Shea, 2017 ; Dolgin, 2016 ; Duvivier-Kali *et al.*, 2001 ; Hering *et al.*, 2006 ; Lim & Sun, 1980 ; Vegas *et al.*, 2016).

Le principe d'encapsulation remonte à 1964 (Chang, 1964). Depuis, différentes formes et techniques d'encapsulation ont été développées (Aijaz *et al.*, 2018 ; Alessandri, 2013 ; Ching *et al.*, 2017 ; Murua *et al.*, 2008 ; Sánchez *et al.*, 2013 ; Whelehan & Marison, 2011). Il est important de les distinguer, car le terme « *encapsulation* » (surtout en anglais) peut recouvrir plusieurs acceptions. Il ne désigne pas uniquement les capsules creuses décrites dans cette thèse, mais également des cultures en « *gel embedding* », des tubes, des billes pleines et par extension, des contenants cellulaires beaucoup plus gros, comme des dispositifs médicaux d'un centimètre ou plus (T. Desai & Shea, 2017) (cf. tableau 7).

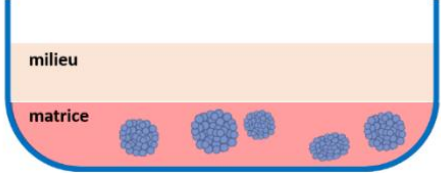
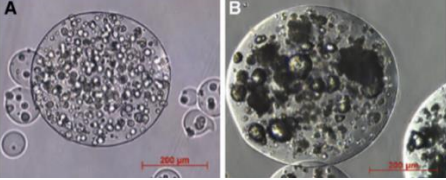
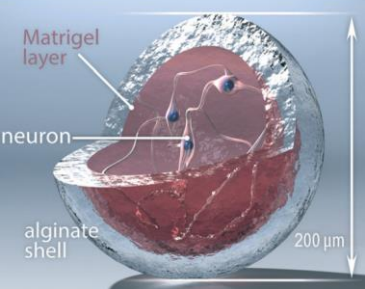
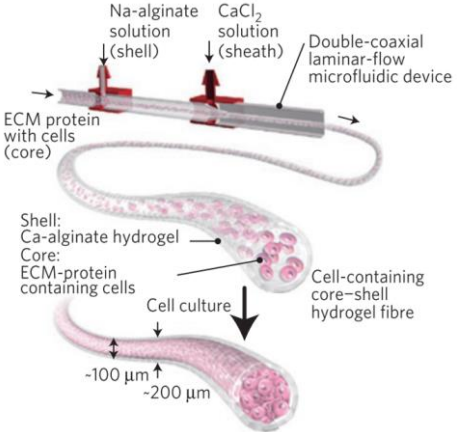
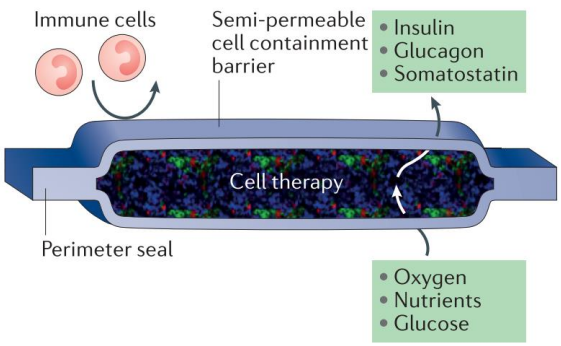
Enrobage Gel 3D		
MICRO Encapsulation	BILLE PLEINE (Bead) 	CAPSULE CREUSE (Core-shell /Hollow capsules) 
MACRO Encapsulation	TUBE 	
DISPOSITIF MEDICAL 		

Tableau 7. Types d'encapsulation

Billes pleines. Adapté de « Cell microencapsulation technology: Towards clinical application » par Murua et al., 2008 et « Differentiation of encapsulated embryonic stem cells after transplantation » par Dean et al., 2006. Capsules creuses. Adapté de « A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human neuronal stem cells (hNSC) » par Alessandri et al., 2016. Tubes. Adapté de « Metre-long cell-laden microfibres exhibit tissue morphologies and functions » par Onoe et al., 2013. Dispositifs médicaux. Adapté de « Advances in islet encapsulation technologies » par Desai & Shea, 2017.

De nombreuses techniques permettent de former des capsules ou des billes contenant des cellules (cf. figure 51). Les gouttelettes peuvent être produites en phase gazeuse (goutte-à-goutte simple [dripping], extrusion avec rupture de jet dans un champ électrostatique, jet avec injecteur vibrant, fragmentation de jet par disque tournant, coextrusion liquide/gaz, etc.) ou en phase liquide (puce microfluidique, émulsion).

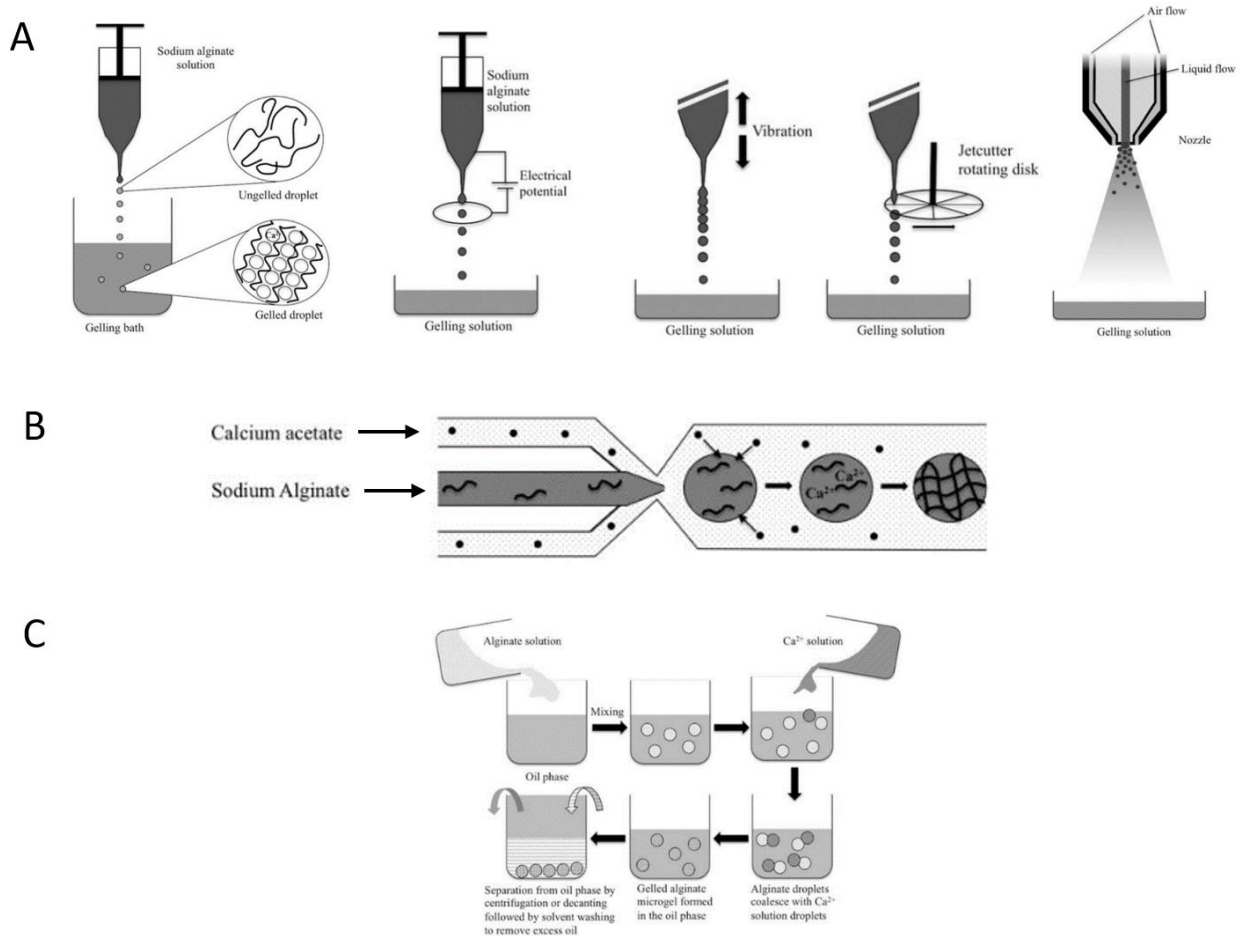


Figure 51. Méthodes d'encapsulations

Encapsulations avec interface air/liquide **(A)**, interface liquide/liquide **(B)** et émulsion **(C)**. Adapté de « Alginate gel particles – A review of production techniques and physical properties » par Ching et al., 2017.

Pour nos expériences, nous avons choisi d'utiliser des capsules creuses d'alginate. Elles ont l'avantage d'assurer à la fois une protection mécanique, grâce à leur coque externe, et de fournir un microenvironnement cellulaire favorable, conçu par génie biologique dans leur partie interne creuse. Les paramètres critiques sont entre autres les types cellulaires associés, la matrice extra-cellulaire et ses propriétés physicochimique (Cordero-Espinoza *et al.*, 2021).

La technique d'encapsulation la plus utilisée, « en puce microfluidique phase liquide », ne fonctionne que pour des débits faibles et utilise des huiles peu biocompatibles, difficiles à manipuler à grande échelle (H. F. Chan *et al.*, 2013 ; McClements & Decker, 2000 ; Sah, 1999 ; H. Zhang *et al.*, 2006 ; K. Zhu *et al.*, 2019). Nous avons donc opté pour la technique de coextrusion microfluidique et d'électrodispersion décrite par Kevin Alessandri et Pierre Nassoy (cf. figure 52) (Alessandri, 2013 ; Alessandri *et al.*, 2013 ; Alessandri, Feyeux, Gurchenkov, Delgado, Trushko, Krause, Vignjević, Nassoy, & Roux, 2016). Ses principales caractéristiques sont les suivantes.

- **Méthode** : les cellules et les éléments de matrices sont injectés au cœur de gouttelettes d'alginate liquide. Quand l'alginate réticule au contact d'un bain de gélation contenant des cations divalents (calcium par exemple), la couche externe d'alginate se rigidifie et capture les cellules dans le microcompartiment interne.
- **Bioproduction** : ces capsules sont homogènes et de taille optimale pour la diffusion des nutriments (200 à 600 μm). Elles sont générées à très haut débit (> 3000 capsules/seconde/injecteur) et n'impactent pas les cellules. Ces capsules réticulées sont toutefois facilement dissoutes pour la collecte cellulaire (chélateur calcium, alginase, rinçage par solution sans cation divalent...).
- **Mécanique** : composée à 98 % d'eau, la coque externe d'alginate est hautement résistante et protège les cellules des stress hydrodynamiques (E. S. Chan *et al.*, 2011 ; Fattahi *et al.*, 2021). La taille de la capsule, sa rigidité, la finesse du maillage, l'épaisseur de la coque ou bien encore la fonctionnalisation de l'hydrogel sont autant de paramètres ajustables en fonction des besoins biologiques ou de production.
- **Biologie** : l'alginate est un biopolymère biodégradable et biocompatible qui n'est pas toxique pour les cellules (Ching *et al.*, 2017 ; Isabelle Goujon, 2004). La porosité de la coque d'alginate réticulé laisse diffuser l'oxygène, les nutriments et les facteurs de croissance de moins de 150 kDa. Du fait de sa transparence, il est facile d'observer directement la croissance cellulaire. Par ailleurs, l'alginate est déjà utilisé dans l'agroalimentaire et dans la pharmacopée humaine.

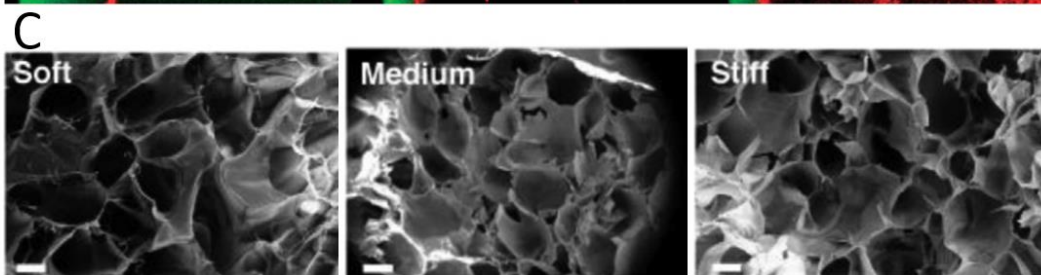
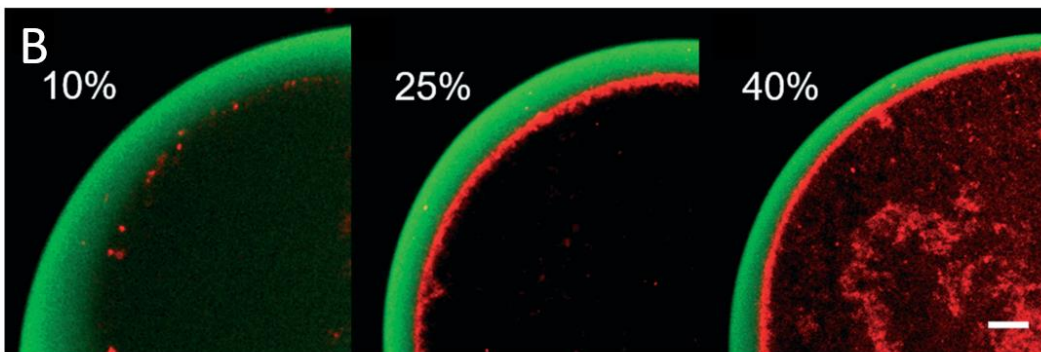
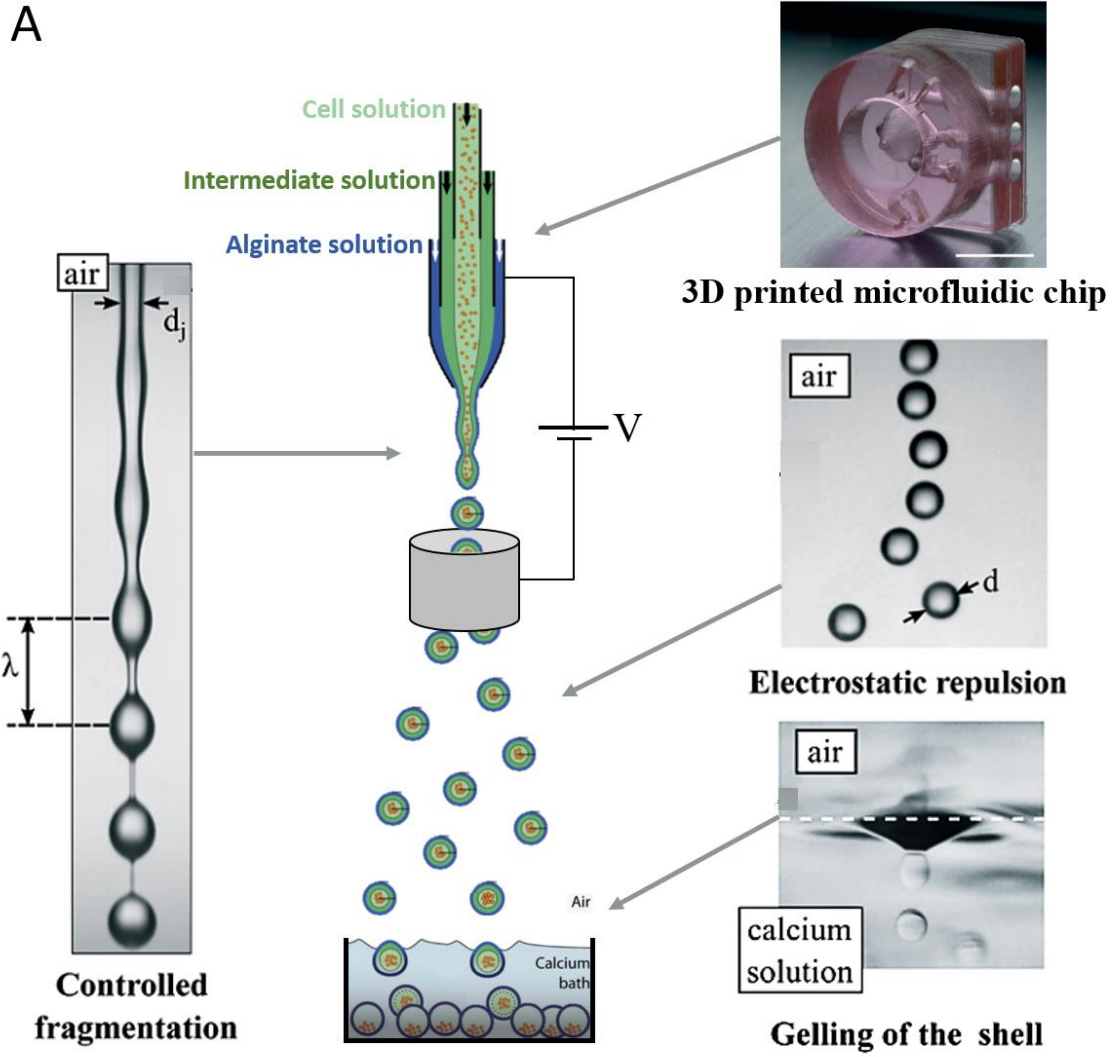


Figure 52. Microencapsulation en haut débit par coextrusion et électrodispersion (page précédente)

(A) Dispositif d'encapsulation en haut débit par coextrusion et répulsion électrostatique des gouttes. Adapté de « Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro » par Alessandri et al., 2013 et « Controlled production of sub-millimeter liquid core hydrogel capsules for parallelized 3D cell culture » par Doméjean et al., 2017. La puce microfluidique permet la coextrusion d'un flux laminaire contenant au centre les cellules. Adapté de « A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human neuronal stem cells (hNSC) » par Alessandri et al., 2016. **(B)** Images confocales du plan équatorial de capsules, créées avec différents pourcentages de matrice Matrigel® : respectivement 10 %, 25 % et 50 % du volume interne (Alessandri, Feyeux, Gurchenkov, Delgado, Trushko, Krause, Vignjević, Nassoy, & Roux, 2016). **(C)** Vue en microscopie électronique à balayage d'hydrogels d'alginate réticulés de différentes rigidités (5, 25 et 40 kPa). Ce panel est obtenu en faisant varier la concentration de calcium réticulant et le pourcentage d'alginate utilisé. Adapté de « T-cell activation is modulated by the 3D mechanical microenvironment » par Majedi et al., 2020.

2. ENCAPSULATION DE CELLULES SOUCHES

Les premiers essais d'encapsulation ont eu lieu peu après la découverte des cellules souches pluripotentes. Ils furent d'abord conduits avec des billes pleines contenant des cellules souches embryonnaires de souris (cf. tableau 8), puis avec des capsules creuses et des cellules humaines (cf. tableau 9). Les cellules souches ont également été encapsulées en tubes creux, une méthode différente de celles citées précédemment (cf. Tableau 10). Ces expériences novatrices ont été menées par les groupes de Robert Langer, Douglas Melton, Shoji Takeushi, Xiaoming He, Minglin Ma, Jianping Fu ou Yuguo Lei. Leurs travaux de génie biologique démontrent que l'encapsulation cellulaire pourrait permettre de répondre à une série de défis comme se passer de cellules nourricières, cryopréserver efficacement les cellules, paralléliser et uniformiser la cultures 3D, étudier les interactions entre cellules souches et microenvironnement, etc.

Dans ces travaux, les cellules souches encapsulées dans les billes et les capsules s'agglomèrent et forment des agrégats similaires à ceux obtenus avec les cultures en suspension libre (cf. figure 47). Les facteurs d'amplification n'y sont pas toujours précisés, car ces articles n'avaient pas pour objectif la bioproduction. De manière générale, ces approches ne permettent pas de dépasser un facteur d'amplification de x 20 par encapsulation (5 à 10 jours), ce qui est comparable ou inférieur à la culture classique en 2D.

Dans nos expériences, nous avons utilisé du Matrigel® comme matrice extracellulaire, le standard utilisé pour les modèles épiblastiques.

Tableau 8. Encapsulation de cellules souches en billes pleines

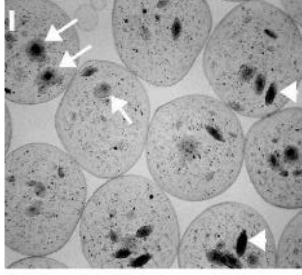
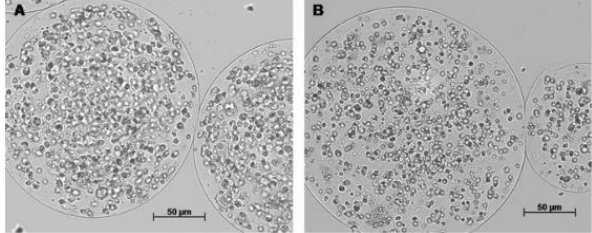
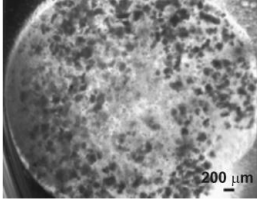

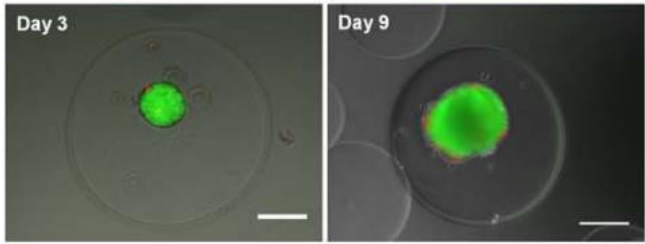
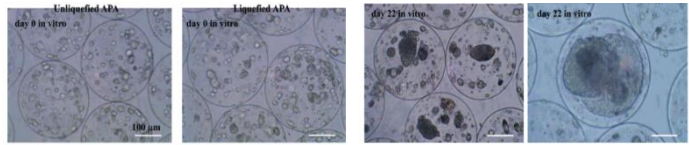
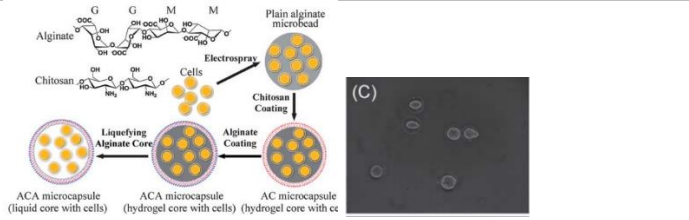
<p>Mass production of embryoid bodies in microbeads Magyar <i>et al.</i> 2001 Annals of the New York Academy of Sciences mESC</p>		
<p>Differentiation of encapsulated embryonic stem cells after transplantation Dean <i>et al.</i> 2006 <i>Transplantation</i> hESC & mESC</p>		
<p>Bioactive hydrogel scaffolds for controllable vascular differentiation of human embryonic stem cells Ferreira <i>et al.</i> 2007 hESC</p>		
<p>The benefit of human embryonic stem cell encapsulation for prolonged feeder-free maintenance Siti-Ismaïl <i>et al.</i> 2008 <i>Biomaterials</i> hESC</p>		
<p>Microencapsulation technology: A powerful tool for integrating expansion and cryopreservation of human embryonic stem cells Serra <i>et al.</i> 2011 <i>Plos</i> hESC</p>		
<p>hESC pour cellules souches pluripotentes embryonnaires humaines, mESC pour cellules souches pluripotentes embryonnaires murines. Adaptés respectivement de (Dean <i>et al.</i>, 2006; Ferreira <i>et al.</i>, 2007; Magyar <i>et al.</i>, 2001; Malpique <i>et al.</i>, 2011; Siti-Ismaïl <i>et al.</i>, 2008)</p>		

Tableau 9. Encapsulation de cellules souches en caspules creuses et en culture d'aggrégats

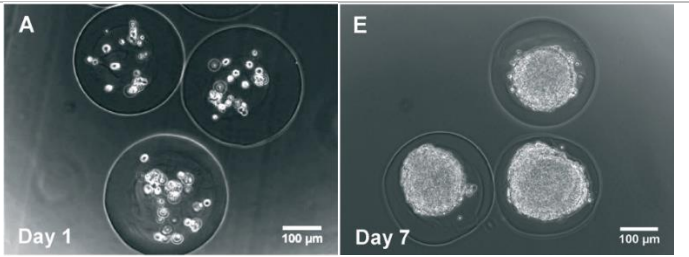
Proliferation and Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells in APA Microcapsule: A Model for Studying the Interaction between Stem Cells and Their Niche
 Wang *et al.* 2006
 mESC



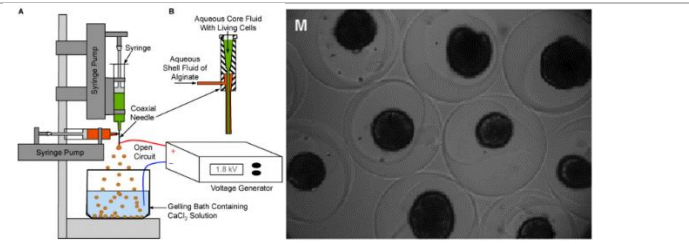
A novel core-shell microcapsule for encapsulation and 3D culture of embryonic stem cells
 Zhang *et al.* 2013
 Journal of Materials Chemistry
 mESC



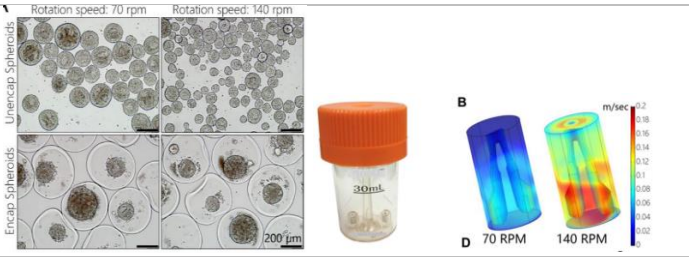
One-step microfluidic generation of pre-hatching embryo-like core-shell microcapsules for miniaturized 3D culture of pluripotent stem cells
 Agarwal *et al.* 2013
 Lab on chip
 mESC



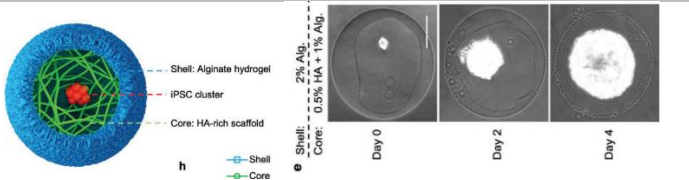
Coaxial electrospay of liquid core-hydrogel shell microcapsules for encapsulation and miniaturized 3D culture of pluripotent stem cells
 Zhao *et al.* 2014
 mESC



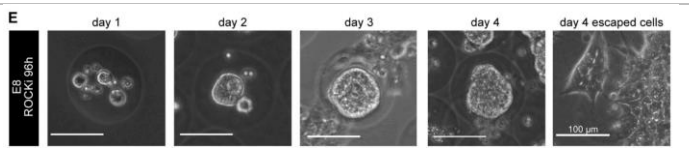
Core-shell hydrogel microcapsules enable formation of human pluripotent stem cell spheroids and their cultivation in a stirred bioreactor
 2021
 hESC & hiPS



Bioinspired 3D Culture in Nanoliter Hyaluronic Acid-Rich Core-Shell Hydrogel Microcapsules Isolates Highly Pluripotent Human iPSCs
 Xu *et al.* 2021
 hiPS



Agarose microgel culture delineates lumenogenesis in naive and primed human pluripotent stem cells
 Schindler *et al.* 2021
 hESC



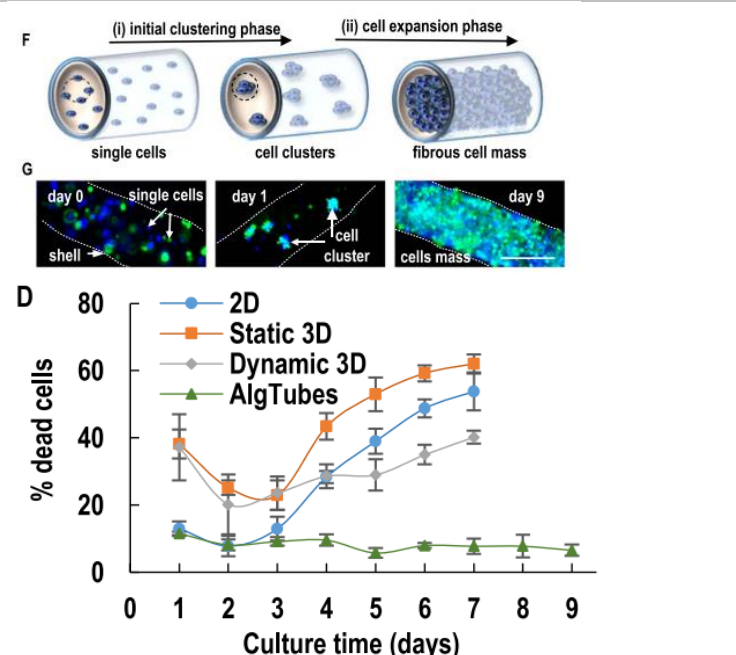
hESC pour cellules souches pluripotentes embryonnaires humaines, mESC pour cellules souches pluripotentes embryonnaires murines, hiPS pour cellules souches pluripotentes humaines induites. Adapté respectivement de (Agarwal et al., 2013; Fattahi et al., 2021; Schindler et al., 2021; Wang et al., 2006; J. Xu et al., 2021; Zhang et al., 2013; Zhao et al., 2014)

Tableau 10. Encapsulation de cellules souches en tubes

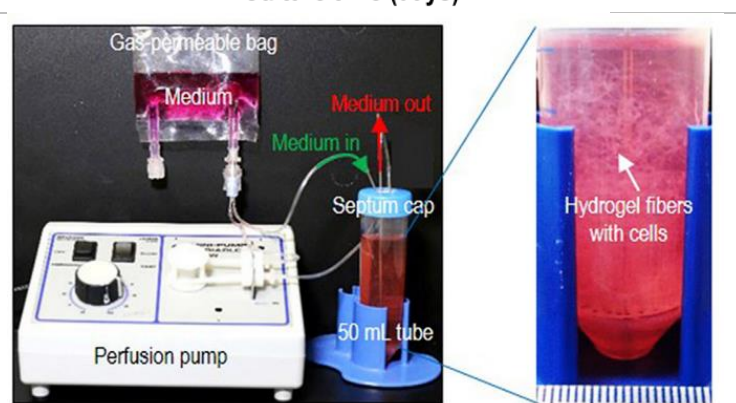
Cell fiber-based three-dimensional culture system for highly efficient expansion of human induced pluripotent stem cells
Ikeda *et al.* 2017
Scientific Reports
hiPS



Scalable and physiologically relevant microenvironments for human pluripotent stem cell expansion and differentiation
Li *et al.* 2018
hESC



A Scalable and Efficient Bioprocess for Manufacturing Human Pluripotent Stem Cells-Derived Endothelial Cells
Lin 2018
hESC & hiPS



hESC pour cellules souches pluripotentes embryonnaires humaines, hiPS pour cellules souches pluripotentes humaines induites. Adapté respectivement de (H Lin, Q Du, Q Li, O Wang, 2018; Ikeda et al., 2017; Q. Li et al., 2018)

3. ARTICLE C-STEM : ENGINEERING NICHE-LIKE MICRO-COMPARTMENTS FOR OPTIMAL AND SCALE-INDEPENDENT EXPANSION OF HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS IN BIOREACTORS

Short title : Scale-independent expansion of biomimetic hPSC colonies

posté en ligne le 5 juillet 2021, BioRxiv DOI : <https://doi.org/10.1101/2021.07.05.451086>

AUTHORS

Philippe J.R. Cohen* ^{1,2}, Elisa Luquet², Justine Pletenka², Andrea Leonard², Elise Warter², Basile Gurchenkov³, Jessica Carrere², Clément Rieu², Jerome Hardouin², Fabien Moncaubeig², Michael Lanero², Eddy Quelennec^{1,2}, Helene Wurtz², Emilie Jamet², Maelle Demarco², Celine Banal¹, Paul Van Liedekerke⁴, Pierre Nassoy^{5,6}, Maxime Feyeux², Nathalie Lefort^{‡1}, Kevin Alessandri^{‡2}

AFFILIATIONS

1 Université de Paris, Imagine Institute, iPSC Core Facility, INSERM UMR U1163, F-75015 Paris, France

2 Treefrog Therapeutics, F-33600 Pessac, France

3 Paris Brain Institute, ICM Paris, F-75013 Paris, France

4 Inria Paris & Sorbonne Université LJLL, 2 Rue Simone IFF, F-75012, Paris, France

5 LP2N, Laboratoire Photonique Numérique et Nanosciences, Univ. Bordeaux, F-33400 Talence, France

6 Institut d'Optique Graduate School & CNRS UMR 5298, F-33400 Talence, France

‡ These authors contributed equally to this work.

* Corresponding author: Philippe J.R. Cohen philippe.cohen@treefrog.fr

ABSTRACT

Human pluripotent stem cells (hPSCs) have emerged as the most promising cellular source for cell therapies. To overcome scale up limitations of classical 2D culture systems, suspension cultures have been developed to meet the need of large-scale culture in regenerative medicine. Despite constant improvements, current protocols relying on the generation of micro-carriers or cell aggregates only achieve moderate amplification performance. Here, guided by reports showing that hPSCs can self-organize *in vitro* into cysts reminiscent of the epiblast stage in embryo development, we developed a physio-mimetic approach for hPSC culture. We engineered stem cell niche microenvironments inside microfluidics-assisted core-shell microcapsules. We demonstrate that lumenized three-dimensional colonies maximize viability and expansion rates while maintaining pluripotency. By optimizing capsule size and culture conditions, we scale-up this method to industrial scale stirred tank bioreactors and achieve an unprecedented hPSC amplification rate of 282-fold in 6.5 days.

TEASER

Optimizing human pluripotent stem cells amplification by recapitulating and protecting biomimetic colonies in a bioreactor

INTRODUCTION

Following pioneering works targeting Parkinson's disease (Lindvall et al., 1989; Parmar et al., 2020), diabetes (Shapiro, 2000; Sneddon et al., 2018), macular degeneration (Mandai et al., 2017) or heart failure (Menasché et al., 2001; Murry & MacLellan, 2020), cell therapies are now addressing an increasing diversity of indications (Deinsberger et al., 2020; J. X. Yu et al., 2020). Therapeutic cells represent a hope for millions of patients worldwide with chronic diseases or unmet medical needs. For each of those patients, the number of required cells range between 10^5 and 10^{10} cells. While academic pre-clinical studies or small-scale clinical trials have already been proved to be successful, a transition to true clinical scale is now urgently needed. To enable treatment of thousands to millions of patients, production capacity must scale while maintaining high-quality cells compatible with transplantation.

Due to their unlimited self-renewal capacity and potency to give rise to any cell type in the body, human pluripotent stem cells (hPSCs) hold great promise to provide the required quantities of therapeutic cells. *In vivo*, a few embryonic stem cells can give rise to the 30×10^{12} cells of the adult human body (Sender et al., 2016) while maintaining their genome integrity. As a consequence, much effort has been dedicated to the isolation and *in vitro* culture of these cells in physiological conditions.

Historically, the first stem cell lines were established by micro-dissecting embryos and manual passaging as two-dimensional (2D) adherent epithelial colonies on a layer of feeder cells (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981; Thomson, 1998). Cell proliferation and pluripotency maintenance were thus achieved *in vitro*. The need for an embryonic source was then alleviated with the discovery that differentiated cells could be reprogrammed into induced pluripotent stem cells (iPSC) (Takahashi et al., 2007). This breakthrough led to pioneer works in developmental cell biology and catalyzed the development of cell therapy applications. Even though a lot of work has been devoted to the development of media and substrate compatible with clinical use, topology of hiPSCs cultures has not been gathering the same attention. Nevertheless, 2D *in vitro* cultures suffer high mortality rates, spontaneous differentiation and genetic drift (Adil & Schaffer, 2017). An estimated 40-fold increase in the number of mutations compared to *in vivo* conditions (Kuijk et al., 2018) often results in rejection of clinical batches due to safety concerns (Garber, 2015; Yamanaka, 2020). In addition, 2D culture systems have limited "scale-out" possibilities: for example, generating 1 trillion pluripotent stem cells, would require almost 1000 m² of plastic dishes and countless handmade passaging (Adil & Schaffer, 2017). The non-scalability and the inability to conserve high quality cells remain the main limitations of 2D culture systems for clinical applications (Yamanaka, 2020).

More recently, 3D hPSCs cultures have been developed to model developmental processes. After seeding stem cells in bulk extracellular matrix (ECM) (Shahbazi et al., 2017; Taniguchi et al., 2015a) or using microfluidic chips (Zheng et al., 2019), cell clusters self-organize into a monolayered epithelium recapitulating numerous features of an epiblast that generates *in vivo* all tissues in an amniote embryo through gastrulation. Even though these elegant approaches allowed to gain much insight into morphogenesis mechanisms (Shahbazi, 2020b), they are not designed for the production of hPSCs per se.

From a bioproduction perspective, significant advances have been achieved by developing 3D suspension cultures and bioreactors. Whether hPSCs are grown as floating aggregates or adherent at the surface of

microcarriers, those systems provide increased surface-to-volume ratio and scale-up potentialities. Additionally, the use of stirred-tank bioreactors (STBR) allowed better control of the culture parameters without direct human intervention. Indeed, stirring-mediated mechanical agitation avoids sedimentation of the aggregates or microcarriers onto the bottom of the culture vessel and heterogeneities in the culture medium compositions. Nonetheless, one intrinsic drawback of agitation is that hydrodynamic shear induces cellular damages (Kinney et al., 2011). This effect is all the more dramatic as the vessel increases in size: the larger the volume of the bioreactor is, the more power per unit of volume needs to be injected for effective homogenization. Even though expansion rates with hPSC aggregates are regularly increased and could reach up to 70-fold within 7 days (Borys et al., 2020; Manstein et al., 2021), the ability of scaling up the volume of the production is still restricted. Typically, this mechanical upper limit makes it difficult to reach batches larger than 1 liter or equivalently few billion cells. Finally, the current bottleneck for industrial scalability is the difficulty to fulfill simultaneously high amplification rate, volume and physiological quality.

In this work, by bridging the gap between two distinct communities, namely developmental biology and stem cells bioprocessing, we show that recapitulation of hPSC niche-like micro-environments allows to optimize the suspension culture of hPSC in STBRs. More precisely, we propose a system that utilizes a high throughput microfluidic encapsulation technology compatible with suspension culture of stem cells in a bioreactor and amenable to the production of large volume batches without any degradation of cell survival in contrast with 2D colony-based systems for instance. Briefly, iPSCs are encapsulated in alginate hollow microcapsules internally coated with ECM components at low cell seeding concentration. We assess the maintenance of stemness and pluripotency upon 3D culture in suspension. We then characterize the cell growth inside the capsules before showing that upscaling to 10 liter stirred-tank bioreactor allows to reach unrivalled amplification factors. Altogether, the C-STEM technology overcomes the scale-up bottleneck faced in cell therapy bioproduction. We discuss that the origins of this performance could be related to unprecedented cell viability of 3D lumenized colonies within these capsules.

RESULTS

• HIGH-THROUGHPUT MICROFLUIDIC ENCAPSULATION OF hiPSCS

Using a microfluidic technique to generate hollow hydrogel spheres (Fig. 1A, Movie S1, and detailed description in the Materials and Methods section) previously developed by us and others (Alessandri et al., 2013; Alessandri, Feyeux, Gurchenkov, Delgado, Trushko, Krause, Vignjević, Nassoy, Roux, et al., 2016; Ma et al., 2013; Zhang et al., 2013) we encapsulated human induced pluripotent stem cells (hiPSC) in liquid core capsules. Briefly, the working principle is the following: a three-layered cylindrical flow is generated using a co-extrusion microfluidic device: the cell suspension is surrounded by an alginate solution. Both solutions are separated by a sorbitol solution to prevent diffusion of calcium released from the cell suspension towards the alginate solution. Upon exiting the microfluidic device at high flow rate (on the order of 120 ml/h for all three solutions), the liquid jet is fragmented into small droplets due to the Plateau-Rayleigh instability. By contrast with the dripping regime obtained at lower flow rate that gives rise to droplets of size in the order of the capillary length (i.e. \sim mm), the droplet radius is here dictated by the extruder's nozzle size (\sim 200 microns diameter) (Tomotika, 1935). This reduced size, which is below the distance over which oxygen and nutrients supply is limited within a tissue, allows to avoid the formation of a necrotic core (Freyei & Sutherland, 1986). Once they fall in a calcium bath, the alginate solution droplets undergo gelation and trap the cell suspension in their interior. Our routine protocol produces capsules at a rate of about 3 kHz (Fig. S1), meaning that a 30 seconds operation generates 100,000 capsules. Morphological analysis shows that capsules are monodisperse in size with mean external radius $R = 205 \mu\text{m} \pm 39 \mu\text{m}$. and that their shape is close to spherical, with a circularity parameter $C = 0.84 \pm 0.04$ (Fig. 1B).

In order to provide a niche-like environment to hiPSCs, Matrigel, an ECM mixture, is co-injected with the cell suspension (Alessandri et al., 2013). Empirically, we found that a minimal volume fraction of 25% was required to form a continuous matrix layer anchored to the inner wall of the capsule, with the excess (if any) being found as floating gel pieces inside the capsule (Alessandri, Feyeux, Gurchenkov, Delgado, Trushko, Krause, Vignjević, Nassoy, Roux, et al., 2016). Most of the experiments reported in these works were performed with 50% of Matrigel in volume fraction. The granularity seen in the core of the capsule (Fig. 1E) thus corresponds to small floating aggregates of ECM. Most encapsulations reported hereafter were performed with a density of 0.4×10^6 cells/ml in the cell/matrix suspension, unless otherwise stated, and led to a mean number of cells per capsule right after encapsulation (day 0) of ~ 2.5 (Fig. 1C), meaning that $\sim 10\%$ of the capsules are empty, consistently with a Poisson distribution. After 6 to 7 days of culture, practically defined as the harvest time under these seeding conditions, 3D colonies of hiPSCs were observed, suggesting, not only that hiPSCs survive, but also that they could proliferate (Fig. 1D). Higher magnification reveals the presence of a lumen (Fig. 1E).

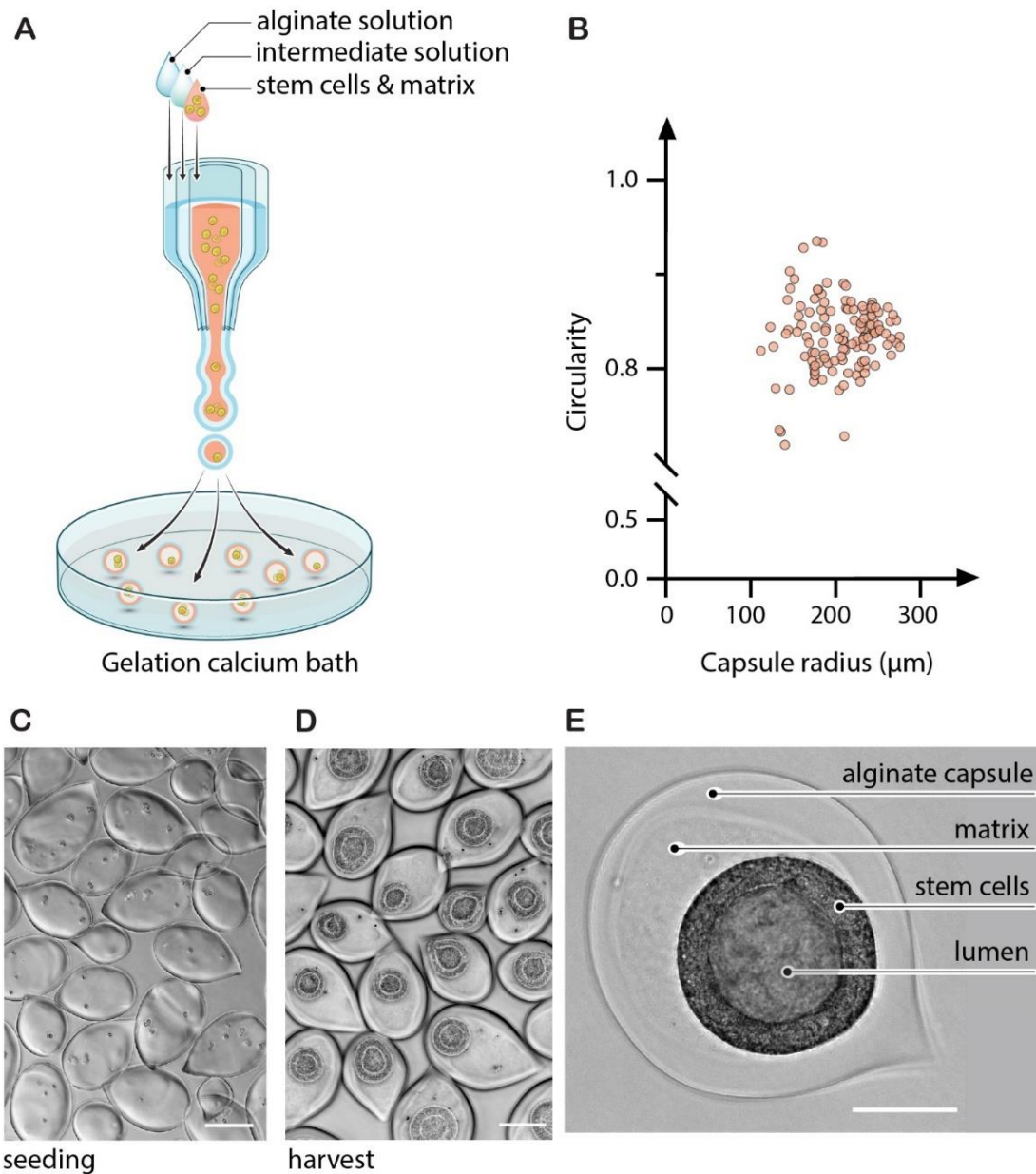


FIGURE 1. ENCAPSULATION OF HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS (HPSCS) AND SUSPENSION CULTURE OF 3D LUMENIZED COLONIES (A) Working principle of the microfluidic encapsulation technique. Co-extrusion of three co-axial flows generates composite cell-and extracellular matrix (ECM)-laden droplets. The outer layer composed of alginate solution undergoes gelation upon contact with a calcium bath. Cells are entrapped in the core-shell capsules and ECM condensates onto the internal wall to form a niche-like environment. (B) Morphometric analysis of the capsules. Graph of capsule circularity as a function of capsule radius for a representative batch of capsules ($n=125$). (C-D) Phase contrast micrographs of the encapsulated hPSCs after seeding at day 0 (C) and before harvest at day 7 (D) of the suspension culture course. Scale bar is $200\mu\text{m}$. (E) Magnified phase contrast image showing the hollow alginate capsule revealing the cyst architecture of the encapsulated hPSC colony. Scale bar= $100\mu\text{m}$.

- **CULTURE, EXPANSION AND STEMNESS OF ENCAPSULATED 3D hiPSC COLONIES**

Using phase contrast imaging, we observed in more details the growth kinetics of these 3D hiPSC colonies. First, hiPSCs form a small cluster (typically during the first 24h) before self-organizing in a cyst structure around a central lumen (Fig. 2A, Movie S2 & S3). Then, the 3D hiPSC colonies grow within the capsules while keeping the same spherical shape. In the early stages, the cells within the monolayer of the cyst have a cuboid cell shape of about 10 μm side (Fig. 2B left, \sim 5 days post-encapsulation). Before harvesting, as seen in the confocal image of a representative 7 day-old hiPSC 3D colony immunostained for actin and nucleus, cells exhibit an elongated morphology perpendicular to the surface of the cyst. Yet, the cyst remains monolayered suggesting a transition towards a pseudostratified columnar epithelium with most nuclei being located on the basal side opposing the lumen. In this stage, the cysts are characterized by a thickness of about \sim 40 μm (Fig. 2B right) and a radius of about \sim 100 μm (Fig. S2, day 7). Note that later stages are ignored. Indeed, if cells are not harvested, cysts become confined by the capsules and further grow inwards leading to a progressive loss of the lumen (Movie S4) and eventually the appearance of “fractures” (Fig S2).

The maintenance of the stemness of the encapsulated 3D hiPSC colonies was then checked. The expression of key self-renewal markers such as OCT4 and SOX2 was first assessed after capsule dissolution, fixation and staining. The alginate shell was dissolved by adapting the protocol of (29): we performed a short rinse of ReLeSR, which serves here as a calcium chelator that gently dissolves the alginate gel. Fixation and immunostaining were carried out following standard protocols (see Materials and Methods section) while preserving the 3D architecture. Image analysis of representative confocal images of individual cysts (Fig. 2C (top row) and Fig. S2) allows to derive that the percentage of cells positive for OCT4 and SOX2 is 97% (Fig. 2D top row). To further assess the consistency of stemness phenotype, we applied the approach pursued in a different context for epiblast-stage hPSCs spheroids by Freedman et al. (Freedman et al., 2015). “Naked” hiPSCs cysts were dissociated and replated into 2D cultures (Fig. 2C). We observed that 2D colonies are readily formed and stemness markers are detected (Fig. 2C-D, bottom row) with a percentage of OCT4 and SOX2 positive cells larger than 98%.

Following this characterization at the scale of individual capsules, we sought to assess the potential variability between capsules and between hiPSC lines. We thus dissociated the bulk suspension cultures, extended staining to OCT4, SOX2 and NANOG and performed flow cytometry (Fig. 2E-F). For 4 different cell lines (see Materials and Methods section) by pooling all experiments ($n = 42$) of each hiPSC line, we found that the mean percentage of positive cells is 93% OCT4, 98% SOX2 and 92% NANOG (Fig. 2F). This finding is in good agreement with the above-described findings at the single 3D colony level, suggesting an overall homogeneity of the stem cell culture.

Note that, if capsules culture was prolonged beyond 7 days, despite drastic changes of topology from cyst to aggregate (Fig. S2 C-E and Movie S4), the stemness of the hiPSCs was not affected, as revealed by OCT4 and SOX2 staining before and after lumen collapse (Fig. S2 B-C), suggesting that harvest timing is not critically stringent with respect to the stemness maintenance.

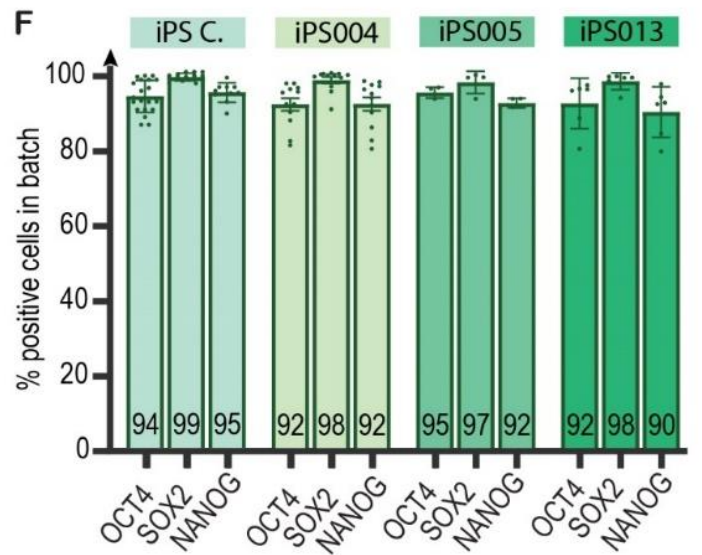
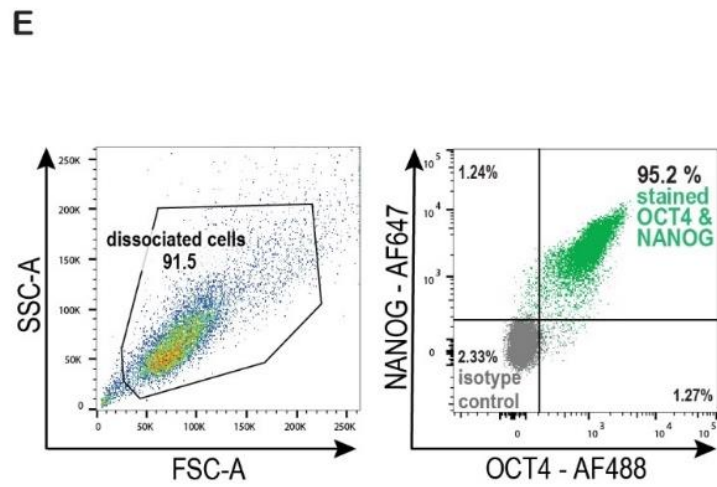
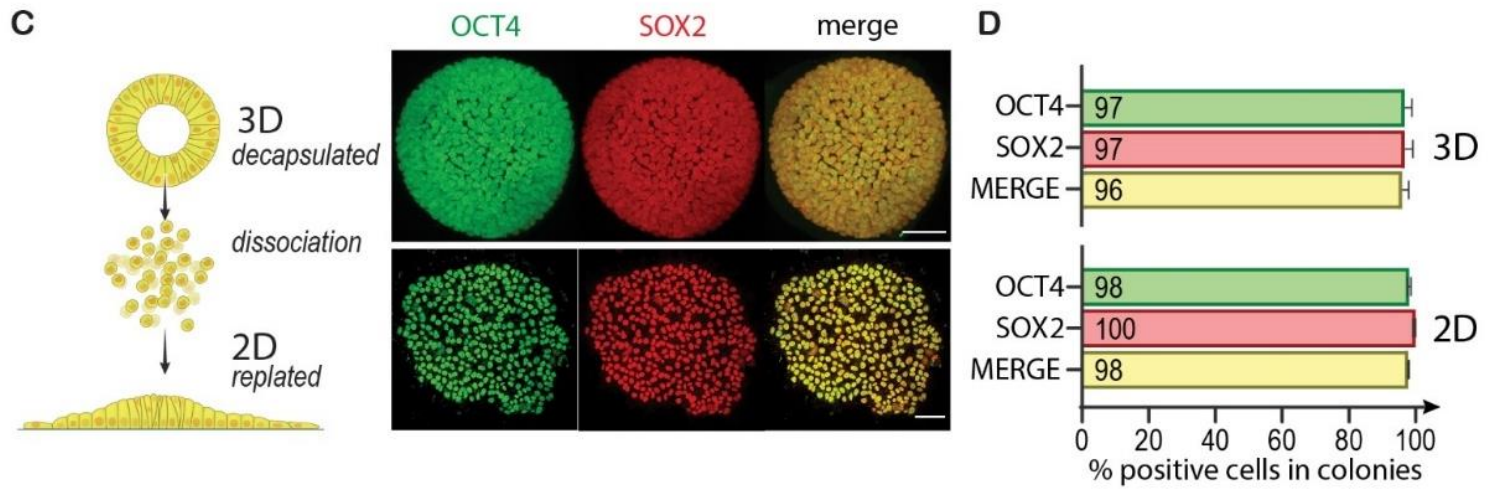
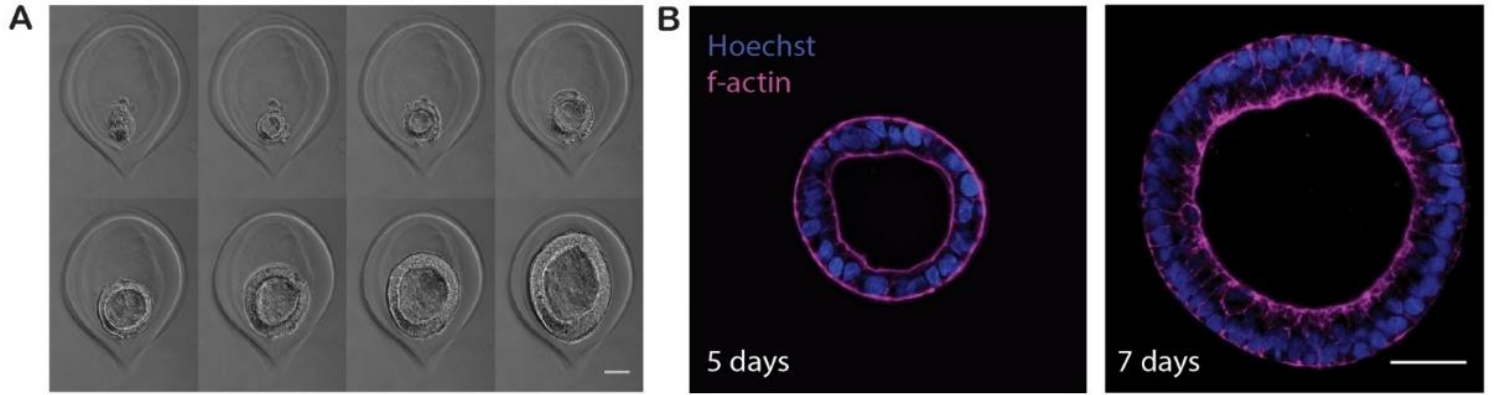


FIGURE 2. MORPHOLOGY, GROWTH AND STEMNESS OF IN CAPSULO SELF-ASSEMBLED 3D HPSC COLONIES

(A) Snapshots of phase-contrast microscopy images showing the growth of a 3D hPSC colony. The time interval between successive images is 12h. The scale bar is 50 μ m. (B) Confocal image of the equatorial plane of a hPSC colony grown in a capsule at day 5 (left) and day 7 (right) cytoskeletal actin is stained in purple (Phalloidin) and nuclei in blue (Hoechst). Scale bar=50 μ m. (C) Left: Cartoon explaining how 3D hPSC colonies are dissociated and replated to form 2D colonies. Right: Immunostaining of a representative encapsulated 3D colony (upper panel, scale bar=50 μ m) and a 2D colony obtained after replating (lower panel, scale bar=100 μ m): OCT4 (green) SOX2 (red) and Merge (OCT4/SOX2). (D) Percentage of cells positive for markers of stemness among 4 representative colonies co-stained for OCT4 and SOX2 in 3D capsules (upper panel) and in 2D (lower panel). Number of counted nuclei: n = 1159 for 3D and n=671 for 2D cells, see also Fig. S3). Error bars show the standard deviation of the mean. (E) Flow cytometry dot-plots for stemness markers (OCT4 and NANOG) of a batch of 3D hPSC colonies after 7 days of culture (T-Flask). (F) Histograms showing the percentage of OCT4, SOX2 and NANOG positive cells in 3D hPSC colonies (culture in T-Flask) analyzed by flow cytometry at 7 days post encapsulation for 4 iPS cell lines (with n>=3 independent biological replicates per cell line, n=42 total number of experiments). Error bars represent the standard error of the mean.

• PLURIPOTENCY AND GENOMIC INTEGRITY OF ENCAPSULATED 3D HIPSC COLONIES

While OCT4, SOX2 and NANOG are often considered as pluripotency markers, they actually are stemness markers. To assess more thoroughly the pluripotency and validate the quality of hPSCs upon 3D culture in their ability to differentiate as bona fide pluripotent stem cells, the most commonly used assay is the trilineage differentiation assay (Sheridan et al., 2012), in which stochastic differentiation is induced. Following a standard protocol (Quelennec et al., 2020) (see Materials and Methods section), decapsulated and dissociated hiPSC (from the three available cell lines) were driven towards early differentiation, as shown by the stainings for specific markers of the 3 germ layers: namely β 3-tubulin (TUJ1) for ectoderm, smooth muscle actin (α -SMA) for mesoderm and a-fetoprotein (AFP) for endoderm (Fig. 3A). Even though the expression level may differ from one cell line to another, all stainings are positive and clearly reveal a differentiation into the three germ layers.

To further quantify the differentiation potential after 3D culture within capsules, we used qPCR Scorecard™ assay to evaluate the transcription profile of the cells obtained in the trilineage assay (Fig. 3B). The set of 94 previously validated qPCR markers of self-renewal, ectoderm, mesoderm, mesoderm and endoderm (Bock et al., 2011; Tsankov et al., 2015) was used to compare standard 2D culture and 3D culture-in-capsules. Fig. 3B shows that, for a given marker and a given cell line, there is a striking similarity between the transcription signatures in 2D and 3D culture conditions, indicating that pluripotency assessed as the *in vitro* differentiation capability of hiPSC clones is definitely not altered in our encapsulated 3D colonies. A pooled analysis by germ layer (Fig. S4) confirms similar differentiation profile between 2D and 3D stem cells.

Finally, to control genomic integrity of the 3D colonies, we performed high resolution SNP (single nucleotide polymorphism) arrays before and after amplification within the capsules (Fig. 3C and Fig. S5) (Assou et al., 2018). Comparative SNP analysis showed the absence of aneuploidies, deletions or duplications, as evidenced by the superimposable karyotypes. The high degree of SNP concordance (>99.8% for all hiPSC lines) before and after encapsulation confirms cell line identity (Fig. 3D).

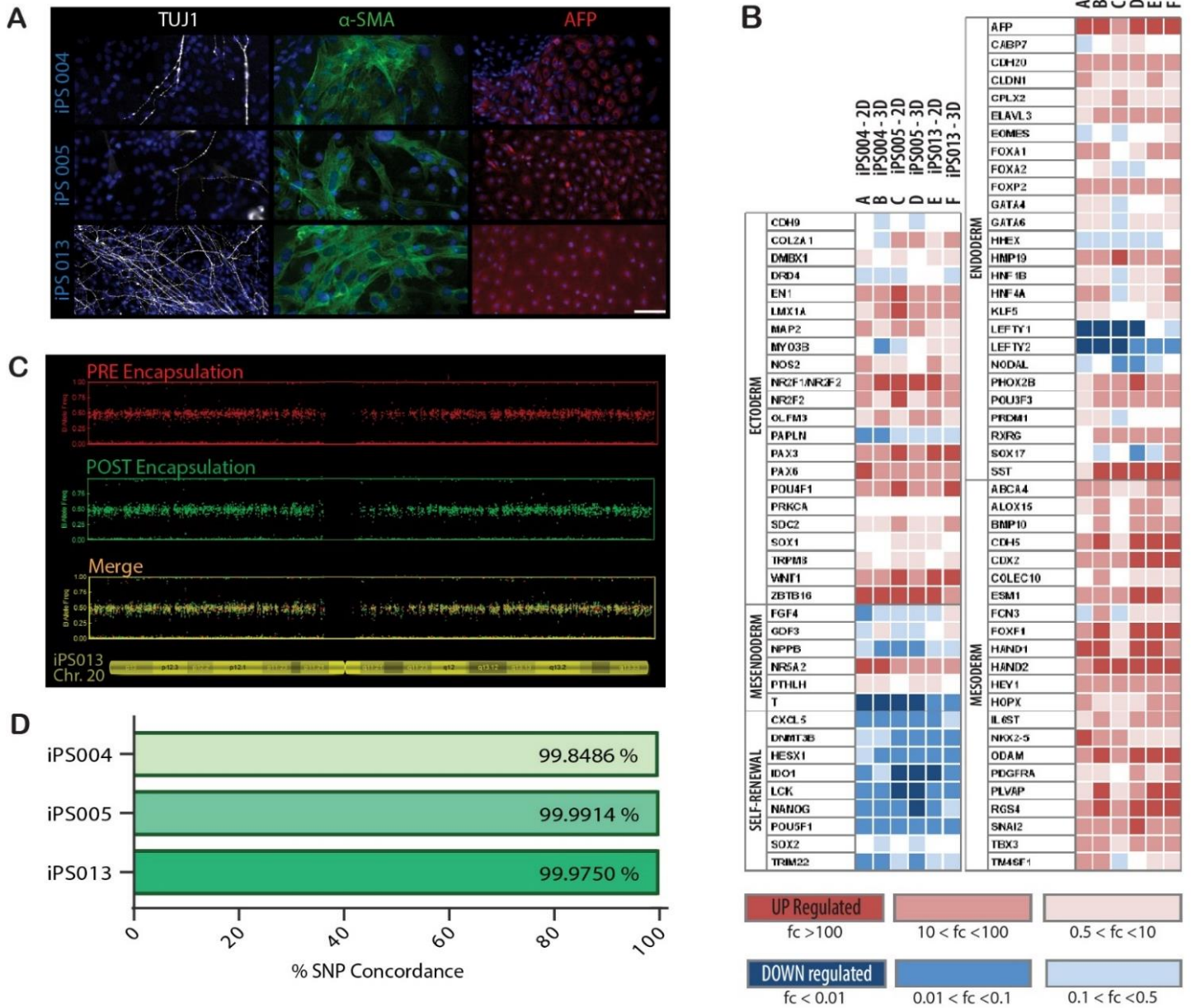


FIGURE 3. MAINTENANCE OF PLURIPOTENCY AND GENOMIC INTEGRITY IN 3D HPSC COLONIES

(A) Microscopy images of immunohistochemistry-based trilineage assay of 3 iPSC lines with 4 stainings: TUJ1 (White, early ectoderm), α -SMA (green, early mesoderm), AFP (Red, early endoderm), Dapi (Blue). (B) Scorecard™ differentiation assay comparing 3 iPSC cell lines expanded in 2D and 3D encapsulated hPSC colonies. (C) Comparison of high-resolution SNP arrays before and after one-week of encapsulation for iPS013 cell line : Zoom on chromosome 20 for pre-encapsulation (red) and post-encapsulation (green). The merge (yellow) is shown to highlight the absence of duplications and deletions. (D) Quantitative analysis yielding genotype SNP concordance before and after one-week of amplification as encapsulated 3D colonies for 3 cell lines .

- **COMPARATIVE GROWTH OF 3D HIPSC COLONIES AT THE SCALE OF A SINGLE CAPSULE, IN A STATIC SUSPENSION AND IN BIOREACTORS**

To evaluate whether the strategy to produce 3D colonies in ECM-coated capsules impacts the growth and expansion rates of hiPSC, we performed a series of systematic experiments to probe the cell growth kinetics. The standard 2D cell cultures were taken as a control. Since the amplification factor is defined as $AF=N(t_0+Dt)/N(t_0)$, where $N(t_0)$ and $N(t_0+Dt)$ are the cell numbers at the initial time t_0 and t_0+Dt respectively, direct cell counting at day 6 after passaging give a mean $AF_{2D}(t=6 \text{ days})\sim 13$. Since, by definition, $AF(Dt)=2^{Dt/PDT}$, with PDT the cell population doubling time, by pooling amplification factors at different harvesting time, we obtain a mean $PDT_{2D}=34h \pm 5$ hours for iPS C line, which falls within the range of data reported in the literature (Adil & Schaffer, 2017; Ludwig et al., 2006; Takahashi et al., 2007).

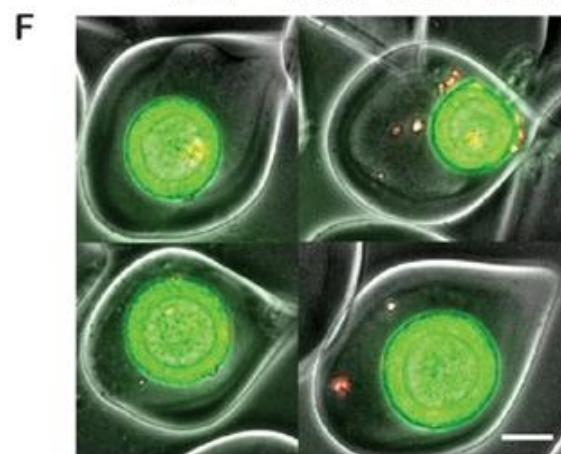
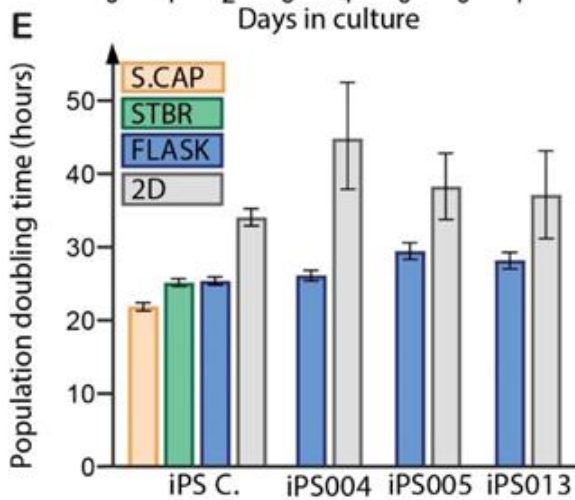
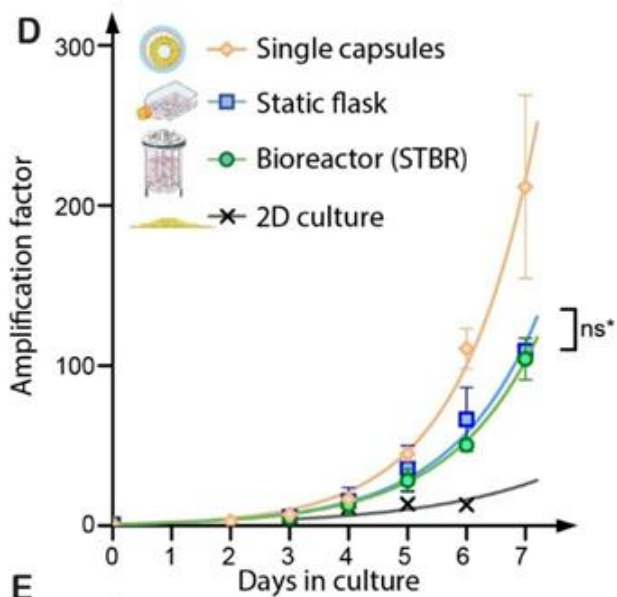
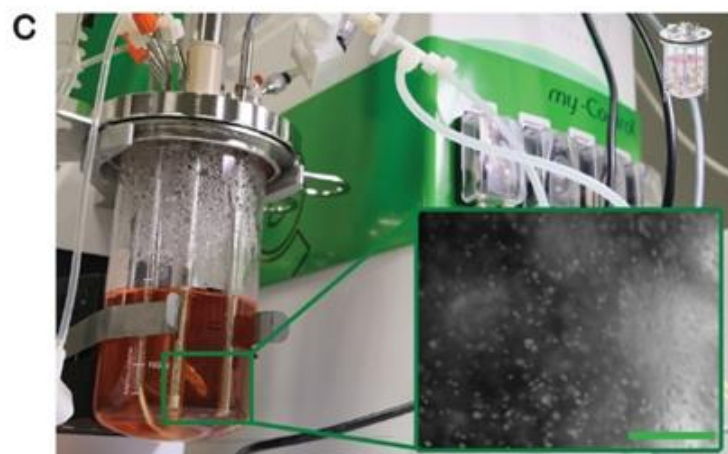
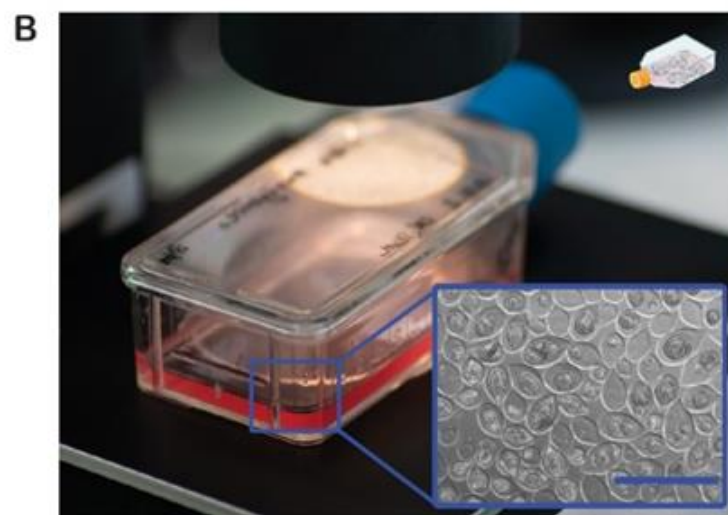
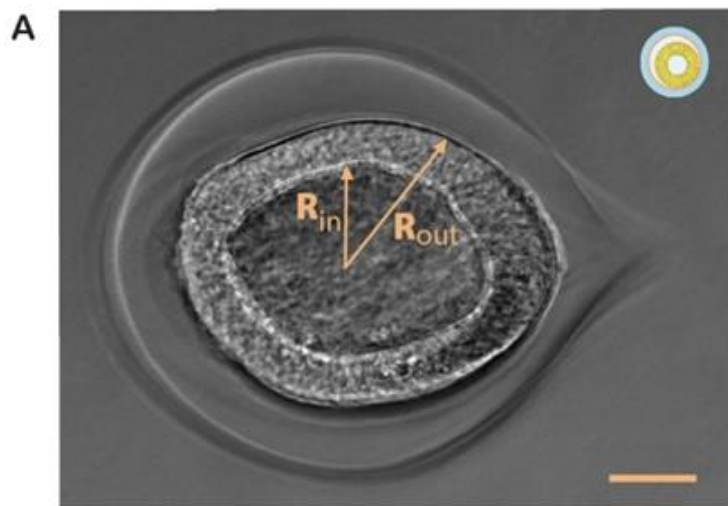
Then, in order to characterize the growth of individual encapsulated 3D hiPSC colonies, we cultured them in 35 mm petri dishes (typically as few as 10 capsules in a volume of medium ~ 5 ml, permitting to conserve the same medium for the whole course of the experiment without any risk of nutrient depletion and acidification). We performed time-lapse phase contrast imaging over a one-week period. We assume that cell volume remains constant, which allows us to derive $AF_{capsule}(Dt)= V(t_0+Dt)/V(t_0)$ by measuring the volume of the cyst $V(t)$ from image analysis: $V(t)=\frac{4\pi}{3}(R_{out}^3 - R_{in}^3)$, where R_{in} and R_{out} are the average internal and external radii of the cyst (see notations on Fig. 4A). Figure 4B shows the evolution of $AF_{capsule}$ as a function of time for individual encapsulated 3D colonies. One immediately observes that $AF_{capsule}(t=7 \text{ days})= 212$. Additionally, since AF increases exponentially as $AF(\Delta t) = \exp\left(\frac{\ln 2 \cdot \Delta t}{PDT_{capsule}}\right)$, one finds $PDT_{capsule} = 22 \pm 1$ hours.

With the perspective of scaling up the production of hiPSCs, we also investigated how the growth of encapsulated 3D hiPSC colonies was impacted when cultured in conditions of i) static bulk suspension in standard T-Flasks (Fig. 4B) and ii) stirred suspension in a benchtop bioreactor (Fig. 4C). STBRs are the most common bioreactors used to culture biological agents for biotechnological applications. Besides their capacity to monitor and adjust the pH and oxygen partial pressure and to refresh the medium, the mechanical agitation provided by the impellers allows better fluid mixing and oxygen transfer ability as compared to static suspension (Kropp et al., 2017). However, the drawback may also be that the shear stress induced by the impellers was shown to cause deleterious effects such as cell death or decrease in cell growth in aggregate- or microcarrier-based cultures (Croughan et al., 1988; Hewitt et al., 2011). Practically, we loaded capsules from a same batch in T-flasks and in a STBR at the same initial density. The bioreactor impeller rotational speed was set to 150 rpm, which is sufficient to maintain medium homogeneity and avoid capsule sedimentation. We could not detect any change in the shape of the capsules and 3D colonies under these stirring conditions. Then, after dissolution of the alginate shell and dissociation of the cysts, we counted the stem cells in both static and stirred culture conditions to derive the amplification factors AF in time. We found $AF_{flask}(7 \text{ days})= 109 \pm 6$ and $AF_{bioreactor}(7 \text{ days})= 104 \pm 18$ (Fig. 4D). From the values of the characteristic times for the exponential variation of AF, we could calculate, as explained above, $PDT_{flask}= 25 \pm 6$ h and $PDT_{STBR}=25 \pm 3$ h (Fig. 4E). Three remarks can be made. First, these PDT values are significantly lower than the ones derived from 2D cultures, indicating again that the expansion is greatly improved in 3D, as evidenced by the low number of dead cells in capsules (Fig. 4F) as compared with 2D colonies (Fig. S6). Second, the AF values are about twice as low as the one derived from

the measurements at the single capsule level. Third, the absence of statistical difference between the two culture systems suggests that, while the impeller-induced shear stress does not affect cell viability, stirred suspension culture in a benchtop bioreactor with expected better homogenization does not enhance the expansion under the experimental conditions selected here.

Additionally, we performed flow cytometry analysis and found that more than 92% of the cells are positive for SOX2, NANOG and OCT4. Stemness thus remains high and similar between static and stirred cultures (Fig. S7), indicating that, by contrast with previous reports (Kehoe et al., 2010), shear stress does not trigger the differentiation of hiPSC colonies grown in hollow capsules. Finally, in order to confirm that the amplification factors reported above are not hiPSC line specific, we carried out the same series of experiments for the other 3 cell lines in static culture (Fig. 4E). Not only are the differences between cell lines not significant, but their PDT in 3D is also found very close to the value derived for the commercial hiPSC line that we have extensively investigated in this section, i.e. $PDT_{flask} = 27 \pm 2$ h by averaging over all 3 cell lines.

FIGURE 4. AMPLIFICATION OF 3D HIPSC COLONIES AT THE SCALE OF A SINGLE CAPSULE, IN A STATIC SUSPENSION AND IN BIOREACTORS (A) Micrograph of a 3D hPSC colony in a capsule and notations used in the next for the internal and external radii of the cyst. (B) Static suspension culture of encapsulated 3D hPSCs. Insert : Phase contrast image showing 3D hiPSCs colonies in capsules. Scale bar is 1000 μm . (C) Stirred suspension culture of encapsulated 3D hPSCs in a 500 ml benchtop STBR. Insert : Picture of the flowing capsules in the bioreactor. Scale bar is 4 mm. (D) Amplification factor as a function of time for single capsules (orange, n= 6), static culture (blue, n=2), stirred culture in a benchtop (volume 500ml) bioreactor (green, n=2), and conventional 2D cultures (grey). Last points in the graph correspond to the harvest time. (E) Population doubling time of encapsulated hPSC colonies in single capsules (S-CAP, orange), in a flask (FLASK, blue, n=42) and a benchtop bioreactor (STBR, green, n=2) and in standard 2D cultures (2D, grey). Error bars represent the standard error of the mean. (F) Fluorescence microscopy image of 4 representative encapsulated 3D hPSC colonies stained with Live/dead (green/red)). Scale bar is 100 μm . All data shown here were obtained with iPS C line, except panel 4D that collects data for the 4 available cell lines.



- **OPTIMIZED CULTURE CONDITIONS: IMPACT OF CAPSULE SIZE AND OXYGEN TENSION**

As shown above, the static or stirred batch cultures of hiPSC colonies in capsules yielded amplification at day 7 about twice as low as the one measured at the single capsule level. Although this difference only corresponds to a 3h difference in PDT, we sought to address this issue and find out solutions to further improve the amplification of hiPSC in batch for large-scale production. We investigated the impact of two possible parameters.

First, we tested whether hiPSC amplification depends on the cell seeding density. The most obvious way would be to increase the volume fraction of cells in the core solution loaded to the microfluidic injector. However, this would lead to earlier and more frequent harvesting. Instead, we pursued a different strategy. We kept the cell density constant but increased the size of the capsules by changing the size of the nozzle (Alessandri et al., 2013). Doing so, for a given volume of the encapsulation cell suspension, the number of produced capsules is indeed reduced by $(R_{big}/R_{small})^3$ but the mean number of cells per capsule, l , is increased by the same fold. In the context of sparse distribution, Poisson statistics applies and the generation of 300 μm in radius capsules instead of 200 μm leads to an increase in l by about 3 fold. The immediate consequence is that the probability to have capsules containing no cell is decreased from about 8% to negligible ($\sim 0.03\%$). But, more importantly, the probability to have capsules with only one cell that may die or exhibit some lag phase before proliferation goes from 20% to 0.3%. High occurrence of capsules loaded with only one cell is expected to lower the effective amplification factor and thus to increase the doubling time of the cell population. Fig. 5A shows representative phase contrast images of 300 μm in radius capsules filled with hPSC colonies. Noteworthy, most capsules contain several cysts, suggesting that cyst growth was nucleated from several cell aggregates. More quantitatively, after monitoring the growth kinetics in benchtop STBR, derivation of the time constant reveals shorter doubling time in big capsules: $PDT_{big} = 22\text{h} \pm 1\text{h} < PDT_{small} = 25\text{h} \pm 1\text{h}$ (Fig. 5B).

Second, we pursued along our physiomimetic approach. Among all factors that make a stem cell niche, we have already recapitulated interactions with the ECM. However, until now, we have omitted to consider oxygen tension, which is known to be naturally low in developing embryos (Simon & Keith, 2008). This low level of oxygen was further shown to be key to reduce mutation rates and epigenetic alterations (Okazaki & Maltepe, 2006; Thompson et al., 2020) as well as to improve the expansion rate (Abecasis et al., 2017) while reducing the probability of unwanted differentiation (Ezashi et al., 2005). We thus performed the same culture experiments in big capsules (300 μm radius) by decreasing the dissolved oxygen level (DO) from 100% to 20%. (see Materials and Methods section). Under these hypoxic conditions, the population doubling time derived from the growth kinetics was found to be $PDT_{big}^{hypoxia} = 20.4\text{h}$ (Fig. 5B), i.e, slightly but significantly shorter than in normoxic conditions. Remarkably, this value is better than the one found at the single capsule level in normoxia, suggesting that the optimization of capsule size and oxygen tension allowed to upscale the production of hPSCs in a bench-scale bioreactor without any degradation of the expansion efficiency.

In order to assess whether this protocol is not only theoretically scalable but can be truly upscaled to an industrial level, we carried out a final experiment in duplicate in a 10 L STBR (Fig. 5C, S8 and Movie S5) by keeping all other parameters constant. Figure 5D shows the the expansion-fold as a function of time. The

two curves from these two independent experiments are superimposable and we found $AF_{10L\ STBR}(6.5\ days)=277$, corresponding to a doubling time $PDT_{10L\ STBR}=19.6\ h$.

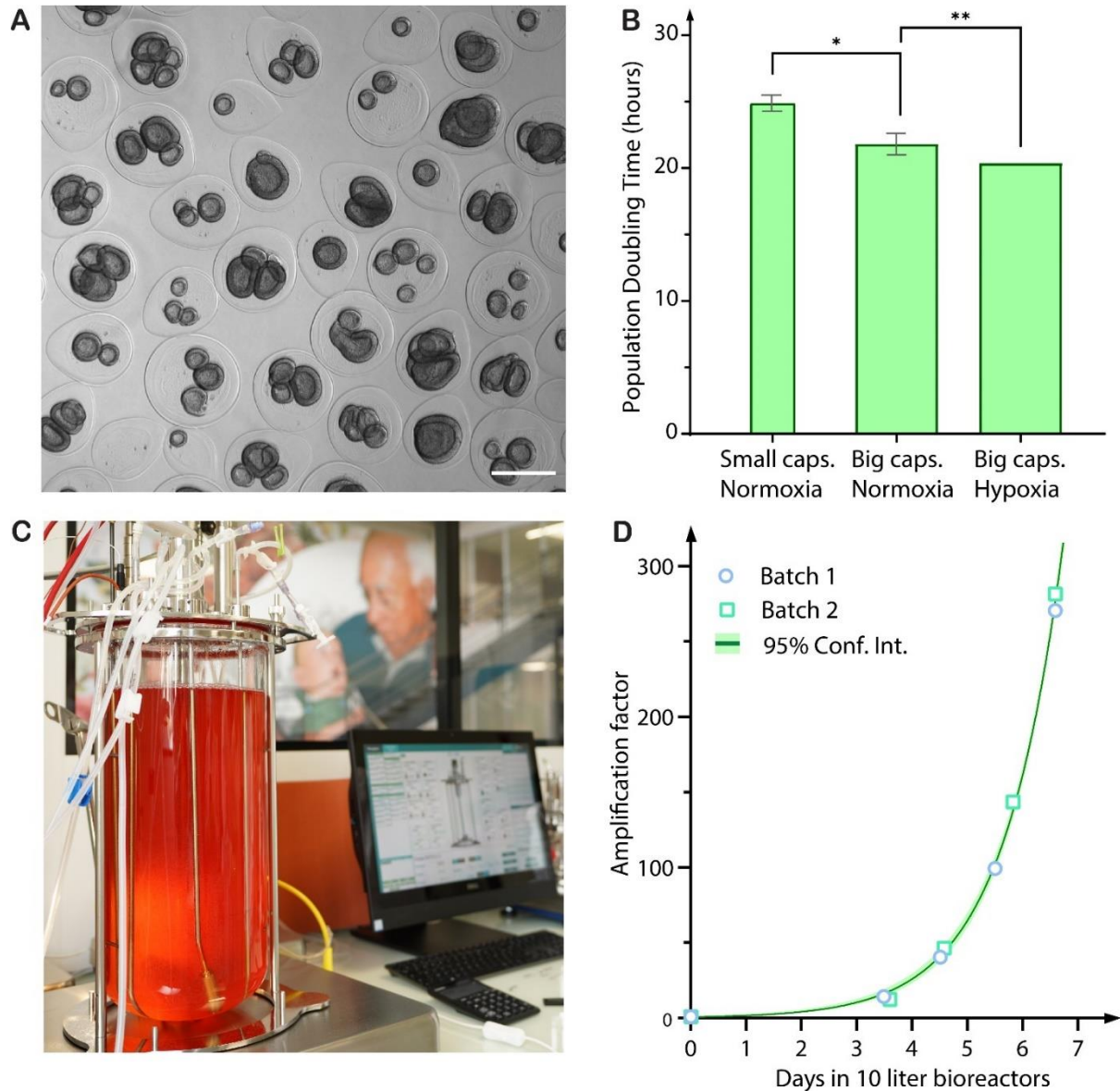


FIGURE 5. IMPACT OF CAPSULE SIZE AND OXYGEN TENSION ON HPSC AMPLIFICATION AND SCALABILITY IN STIRRED TANK BIOREACTORS (A) Phase contrast image showing 3D hiPSCs colonies in capsules referred to as “big” in the main text (with an average radius of 300µm). Scale bar = 500µm. (B) Population doubling time of encapsulated 3D hiPSCs colonies cultivated in benchtop bioreactors by varying the size of the capsules and the oxygen tension conditions (normoxic versus hypoxic). Mean and standard deviation (* p<0,001 and ** p <0,01). (C) Picture of a 10 liter industrial stirred tank bioreactor used to test the scalability of the stem cell capsule culture system. (D) Graph of amplification factor of hiPSCs grown in 10 liter bioreactors over a week, in ‘Big capsules’ and hypoxic conditions; Data were obtained from 2 independent batches and from 2 independent encapsulations. Light green band shows the 95% confidence interval of the fitting curve.

These data were obtained without passaging. In order to assess the robustness of the approach for a seed train of passaging and demonstrate that the technology can be integrated into a classical cell therapy production, we performed serial passaging. At harvest after about 7 days, the capsules were dissolved, the 3D colonies were dissociated and cells re-encapsulated following the same protocol (Fig. 6). We found that expansion-fold and stemness were preserved over two consecutive encapsulations within 14 days (Fig. S9).

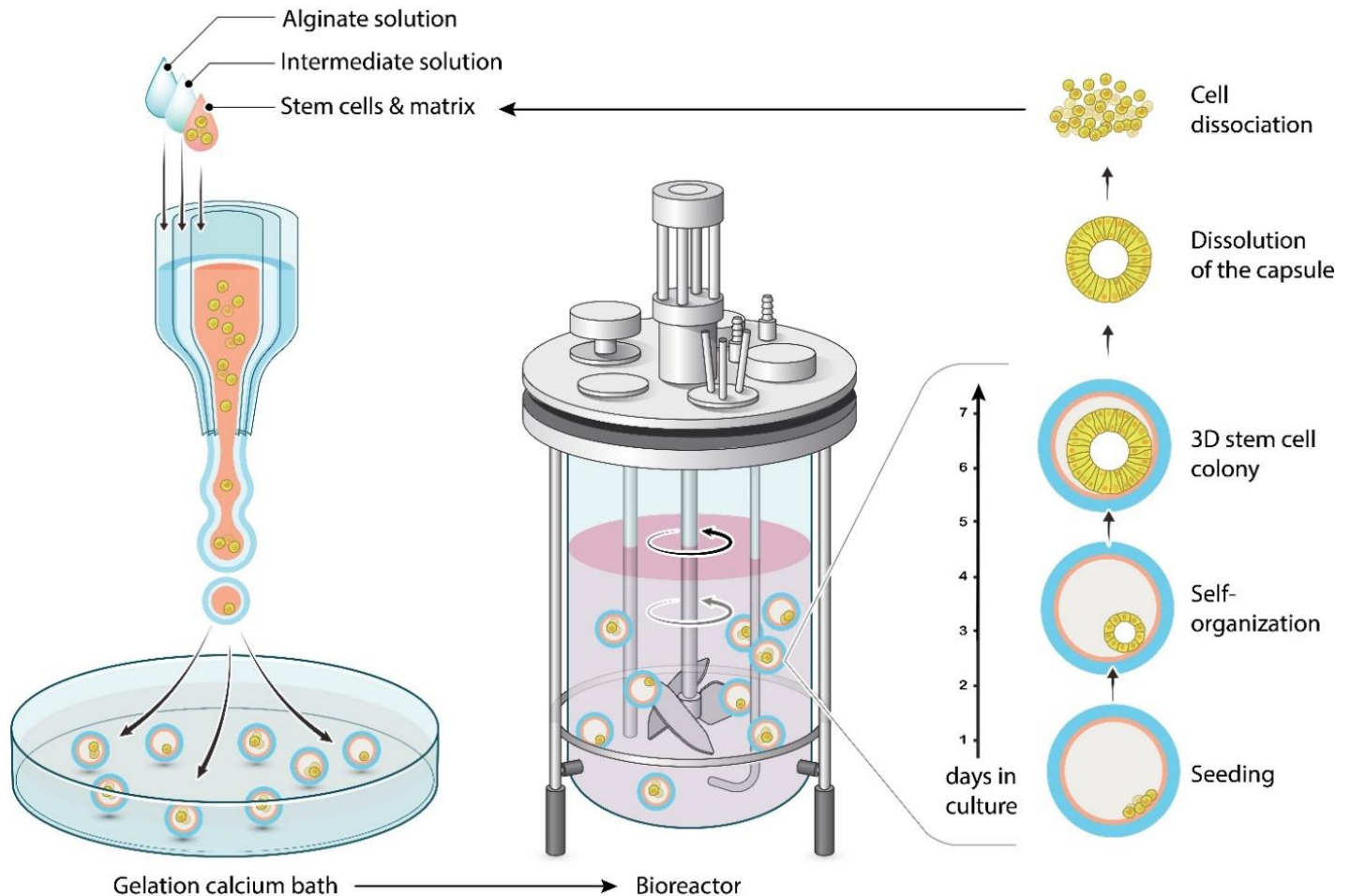


FIGURE 6. C-STEM PIPELINE: ENCAPSULATION AND SCALE-INDEPENDENT CULTURE OF ENCAPSULATED 3D HPSC COLONIES IN BIOREACTORS. After encapsulation using the microfluidic extrusion technique (left panel), hPSC in matrix-laden capsules are transferred to suspension culture in a bioreactor (middle panel). Under controlled conditions provided by the bioreactor, hPSC cells self-organize into cysts which are protected by the capsules. These growing 3D colonies are harvested and dissociated after capsule dissolution. Subsequent cell suspension may then serve for another encapsulation and expansion.

DISCUSSION

In this work, we have developed an *in vitro* culture system for hiPSCs, that we named C-STEM (Fig. 6) and combines the benefits of biomimetic 3D culture and scalable bioreactor-based production. By contrast with other approaches using scaffold embedding in bulk matrix (Lei & Schaffer, 2013a) or hydrogel beads (Serra et al., 2011; Swioklo et al., 2017), our hollow capsules allow in-situ engineering of stem cell niche-like microenvironment. With biological and topological cues driving 3D self-organization of hiPSCs colonies that are reminiscent of epiblasts (Shahbazi & Zernicka-Goetz, 2018b). While cell-cell interactions are not impaired due to the absence of enwrapping scaffold, the presence of the shell also provides mechanical protection against impeller damage and turbulence-induced so-called Kolmogorov eddies during stirring (Ponnuru et al., 2014). Besides exploiting both the biomimetic and protective properties of the developed C-STEM platform, we have finally refined the culture conditions by optimizing the initial mean number of cells per capsule and the oxygen tension. Combination of all these critical factors allowed us to upscale the production of hPSCs and demonstrate that the amplification efficiency is scale-independent. In particular, we could reach 282-fold amplification in 6.5 days in a 10 L stirred-tank bioreactor.

To the best of our knowledge, this level of both amplification and scalability is unmatched in the field (Adil & Schaffer, 2017; Polanco et al., 2020). This technical and quantitative tour de force is actually related to the higher cell viability obtained in our hollow capsules as compared with 2D cultures or other 3D suspension cultures. Since the amplification factor $AF(t)$ of a culture system is given by $AF(t) = 2^{t/PDT}$, where PDT is the population doubling time and accounts both for cell division and cell death, we may rewrite it as $AF(t) = 2^{(k_+ - k_-)t}$, where k_+ and k_- are respectively the division and death rate of cells. Thus, the upper theoretical limit for AF is obtained for $k_-=0$ (i.e. infinite death time), which then yields a minimal PDT_{min} value, equal to k_+ . Quite surprisingly, the measurement of k_+ or the duration of the cell cycle $t_+=1/k_+$ of hiPSC has been overlooked in the literature. The sole report we are aware of arises from a recent work in which cell cycle kinetics was tracked using a rainbow reporter in primed pluripotent stem cells (El-Nachef et al., 2020). The obtained cell cycle duration was found to be $t_+\sim 14$ h. While the question of “gemellarity” between embryonic stem cells (ESC) and hiPSC is still under debate (Narsinh et al., 2011), this value is also consistent with previous estimates of $t_+=11-16$ -h for the cell cycle duration in human and mammalian ESC (L. Liu et al., 2019; Orford & Scadden, 2008; Padgett & Santos, 2020). By assuming that the duration of the cell cycle in the 3D cyst topology is identical to the value obtained in 2D cultures with $AF(t=6.5 \text{ days})=282$ corresponding to $PDT=19$ h, we find that the doubling time of the encapsulated hiPSC colonies is only $5\text{h}\pm 2\text{h}$ longer than the intrinsic cell cycle duration. The difference corresponds to a death rate $k_-=1/53\text{h}^{-1}$. By comparison, in the seminal Yamanaka’s paper (14), doubling times in 2D hiPSC colonies of about 45 h indicate that $k_-=1/20\text{h}^{-1}$. More meaningful than the death rate k_- , the fraction of dead cells can be roughly estimated as $\phi_{dead} \approx \frac{2^{k_-t} - 1}{2^{k_+t} - 1} = 2.6\%$ at $t=6.5$ days, while cell counting gives 1.30% in bioreactors and 1.97% in flasks (Fig.S6). In 2D cultures, we measured a fraction of dead cells of the order of 12% at harvest, even though this value under-estimates the cumulated mortality which is drastically impacted by cell passaging and confluency (Q. Li et al., 2018). Further expansion improvement is theoretically within reach by vanishing the cell death rate. Taking again $t_+\sim 14$ h for the cell cycle length of hiPSC, the glass ceiling is calculated to be $AF_{max}(t=6.5 \text{ d})\sim 2200$. However, the value of $t_+\sim 14$ h cannot be taken as granted. For instance, a cell density-dependence on the proliferation rate has been reported.

Indeed, hPSC exhibit a decelerated proliferation due to a prolonged G1 phase as cell density increases (J. Wu, Fan, et al., 2015). Similarly, smaller expansion folds were observed when the inoculation density either as single cells or pre-clusters in a synthetic hydrogel exceeds 10^6 cells/mL (Lei & Schaffer, 2013a). We may then anticipate that the actual average cell cycle duration could be longer than the one reported above upon single-cell lineage tracking in small colonies of hPSCs. As a consequence, even though future work should aim at a rigorous *in situ* measurement of the division rate within the encapsulated hiPSC cysts, we cannot exclude that the unprecedented hiPSC expansion rates reported in this work are approaching the glass ceiling.

Among other specificities of the C-STEM technology, we mentioned the protective role of the alginate shell and the scale-independence of the culture conditions. By contrast with other suspension cultures that need to design specific low-shear impellers (e.g. the vertical-wheel bioreactor, (Borys et al., 2021; Nogueira et al., 2019), or to add shear-dampener polymers (e.g. pluronics, (Manstein et al., 2021)) in order to avoid stirring-induced cell damages, our capsules permit the use of standard industrial scale bioreactors.

However, all the benefits cannot be assigned to this sole shielding effect. Indeed, previous works had already proposed to embed either hESC aggregates or microcarriers within hydrogel beads (which are referred to as capsules in these original works) (Serra et al., 2011) to improve cell viability. Nonetheless, expansion rates were not reported to be larger than 10 in 19 days. Similarly, two recent works describe stem cells encapsulation in hollow capsules (Fattahi et al., 2021; Horiguchi & Sakai, 2015). However, the absence of ECM leads to the formation of aggregates and a modest amplification (estimated to 70-fold in 8 days from the size of the encapsulated spheroids). We thus propose that the significant amplification increase obtained with the C-STEM technology mostly originates from the stem cell niche-like environment that is engineered within each capsule and that drives hiPSC multicellular organization into cysts.

Interestingly, numerous studies have recently proposed biomimetic controllable environments that can be used to develop hPSC-based embryo models and more specifically epiblast models (Resto Irizarry et al., 2020; Shahbazi, 2020b; Vianello & Lutolf, 2019). In all cases, these 3D stem cell niche mimics drive PSCs self-organization, luminogenesis, and polarization into pseudo-stratified epithelia (Shahbazi et al., 2017; Taniguchi et al., 2015a; Zheng et al., 2019). This cyst configuration, which seems to be key in developmental processes, may be regarded as an optimized configuration for hPSC expansion with minimal loss of viability (Zhu et al., 2020). First, it is well accepted that 2D hiPSC cultures exhibit intra-colony heterogeneities in pluripotency marker genes (Hamidi et al., 2020c), viability (Barbaric et al., 2014) and cell morphology (Wakao et al., 2012), which are very striking between the center and the edges of the colonies. In this respect, the closed spherical symmetry of a cyst intrinsically suppresses the “center-edge phenotype” and may result in more homogeneous cell population (Hashimoto & Sasaki, 2019). Additionally, whereas cellular crowding or compaction are known to inhibit proliferation or even trigger apoptosis via caspase-dependent mechanisms (Levayer et al., 2016) a cyst configuration is less prone to stress building in bulk due to the presence of a lumen. Similarly, fast proliferation rate may contribute to stress relaxation and reduce cell extrusion occurrence as observed in epithelia under compression (Fadul & Rosenblatt, 2018; Hannezo & Heisenberg, 2019). Besides mechanical stress, chemical stresses are known to increase the mutation rate (Halliwell et al., 2020; Thompson et al., 2020). The use of bioreactors

with precise adjustment of physioxia, pH, lactate, glucose and nutriments supply is thus instrumental and could be optimized beyond the present achievement.

Finally, relying on the observation that chromosome segregation fidelity is unambiguously higher in native contexts of epithelia of primary cells (Knouse et al., 2018; McKinley et al., 2018), it also becomes tempting to speculate that, beyond the gain in amplification it provides, the preserved histology of our *in-vitro* epiblast-like colonies could also be beneficial to the maintenance of the genetic integrity (Singla et al., 2020).

In summary, our work has shown that hollow alginate capsules with reconstituted niche-like microenvironment can promote the formation and growth of 3D hPSC colonies and provide the necessary protection for scaling up the production in stirred tank bioreactors. Self-organized encapsulated epiblast-like colonies seem to be instrumental for optimal expansion by preserving stem cells physiological properties. We have demonstrated that our biomimetic stem cell platform C-STEM can deliver unprecedented scalability and we anticipate that cell quality is preserved on the basis of extremely high viability, which is taken as a primary signature of cell fitness. Future works should focus on assessing the hPSCs quality in *in vivo*-like culture systems, since the emergence of mutations during culture may be the last limitation to overcome for cell therapy bioproduction.

SUPPLEMENTARY FIGURES & MOVIES

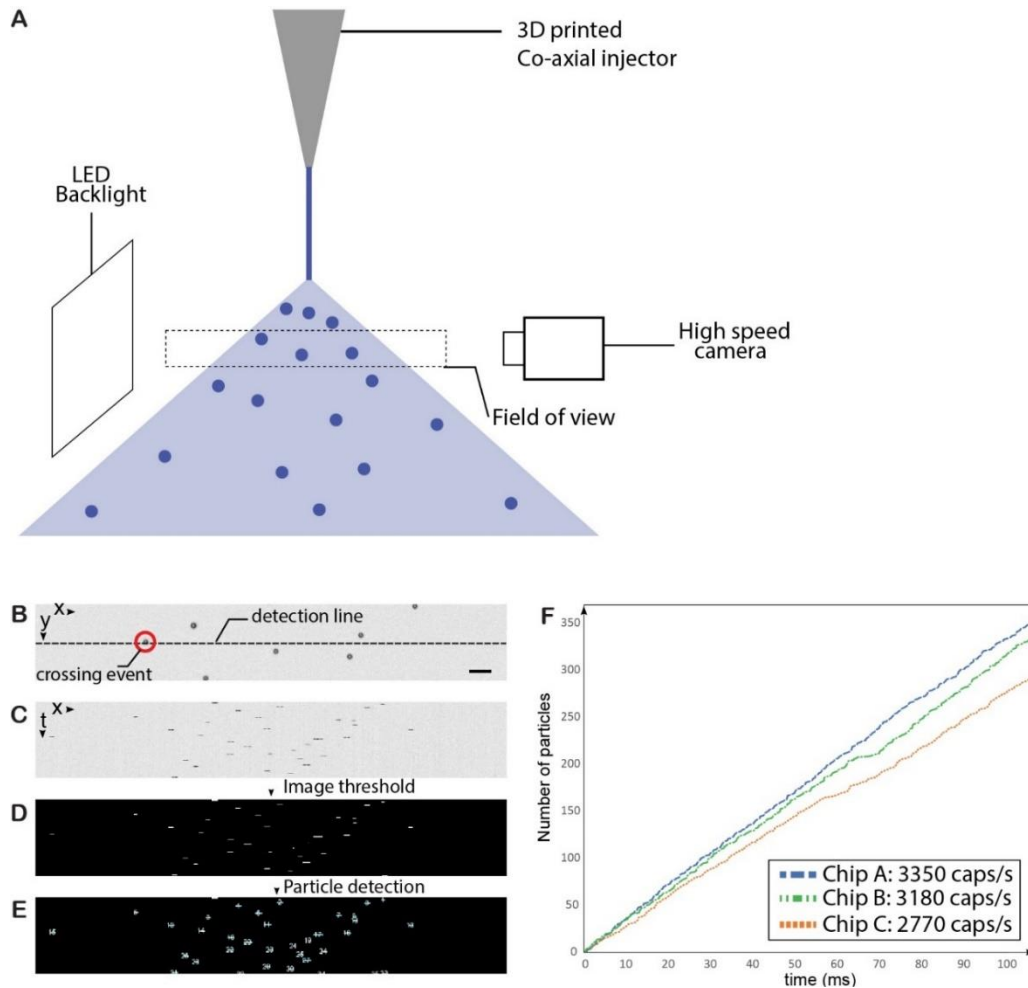


Fig. S1. Optical measurement of the capsule production rate.

(A) Sketch of the experimental setup. The capsules exiting the nozzle are illuminated with a LED backlight (PHLOX 200mx200mm) and imaged using a high-speed camera (HSC Phantom VEO1310L) at a frame rate of 10,000 fps and a spatial resolution is 30px/mm. (B) Snapshot showing a typical shadow image of the capsule spray. Scale bar is 1mm. The algorithm increments the account of counts capsules every time one of them crosses the detection line (dashed-white in (b)), and stores the time of the event. Details of the detection algorithm are shown proposed in (c-e). (C) Space-time representation of the crossing events, evidenced by stacking the intensity variations of the detection line over time. Each crossing event corresponds to a black spot in the image. (D) Intensity threshold of (c). Elementary binary operations are performed to ensure that each crossing event corresponds to a single white spot. (E) Particle analysis (using ImageJ plugin). Each white spot is counted independently, and its coordinates are stored by the algorithm, providing details on the time and location of the crossing event. (F) Example of typical production curves for three different spraying nozzles (chips A, B and C). The corresponding production rates are included in the legend. The values are usually estimated with longer datasets (recordings >500 ms).

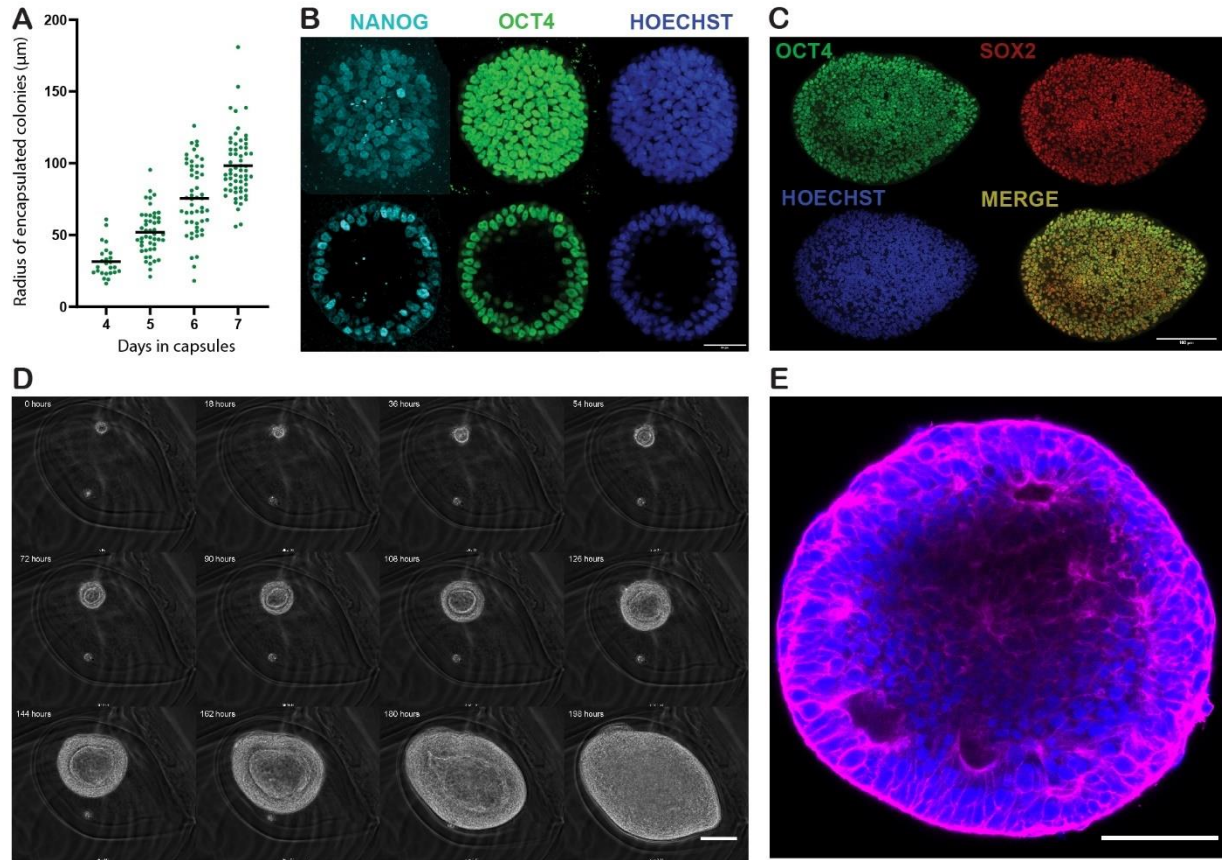


Fig. S2. Phenotype of encapsulated 3D hPSC colonies

(A) Graph of hPSC cyst radius as a function of time. Radii were measured by monitoring $n=25, 47, 52, 61$ capsules at days 4, 5, 6 and 7 respectively. (B) 3D hPSC colony co-stained for stemness markers NANOG (cyan) and OCT4 (green) and with Hoechst (blue). Projection of maxima (upper panel) and equatorial plane (lower panel) of confocal images. Scale bar is $50\mu\text{m}$. (C) Confocal equatorial plane of a fully confluent hPSC capsule ($t=10$ days post-encapsulation) co-stained for OCT4 (green), SOX2 (red), and nuclei (Hoechst, blue) and showing that the lumen has collapsed. Scale bar is $100\mu\text{m}$. (D) Sequence of phase-contrast microscopy images showing luminogenesis, growth and collapse of an encapsulated epiblast-like colony. The time interval between successive images is 18h. Scale bar= $100\mu\text{m}$. (E) Confocal equatorial plane of a collapsed 3D hPSC colony co-stained for F-actin (Phalloidin, magenta) and nuclei (Hoechst, blue), Scale bar= $100\mu\text{m}$.

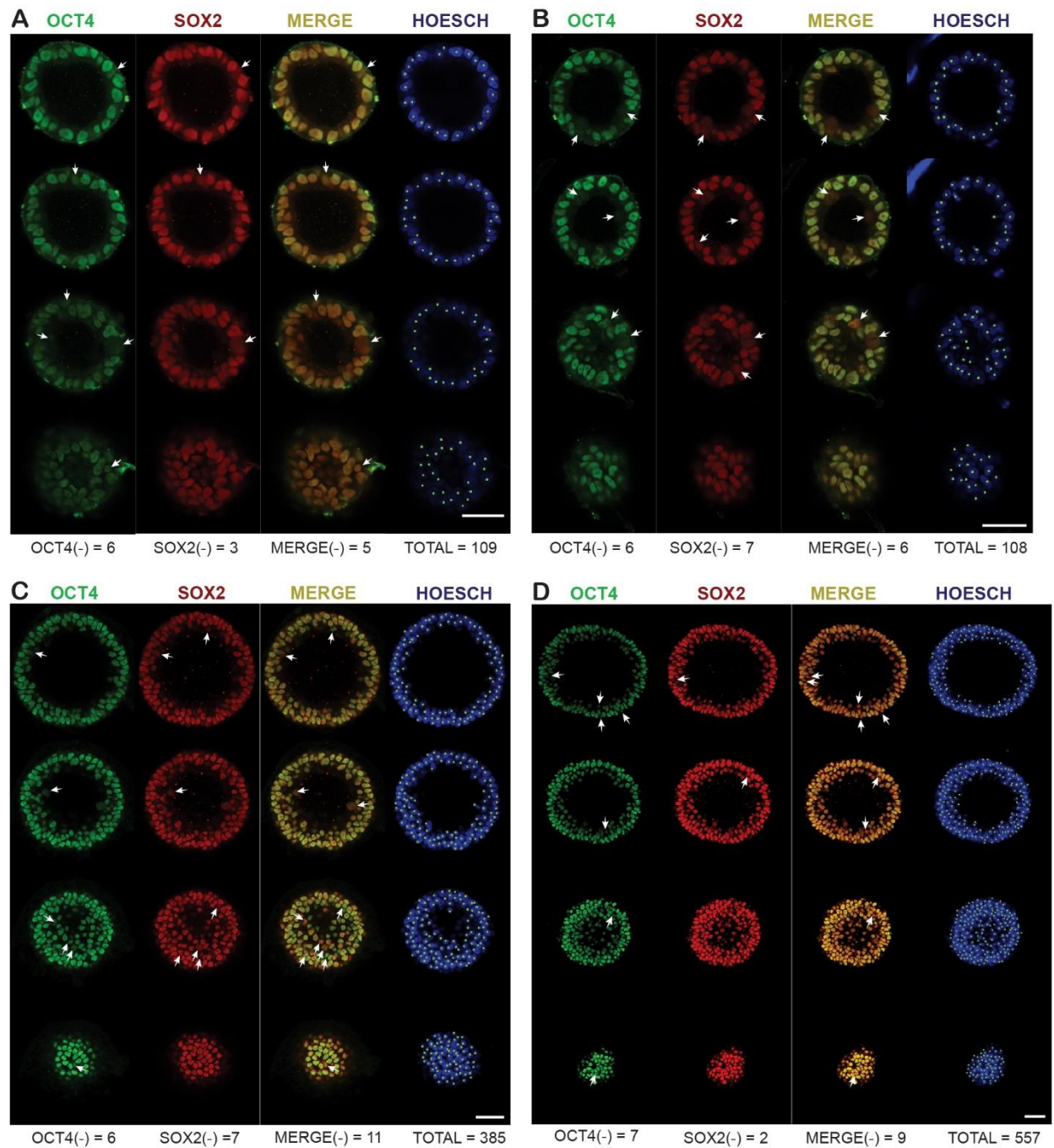


Fig. S3. Stemness staining of encapsulated 3D hPSC colonies

Four different representative encapsulated hPSC colonies co-stained for OCT4 (green) SOX2 (red) and nuclei (Hoechst, blue). The 2 colonies in the upper panels (A) and (B) are collected at day 5. The 2 colonies in the lower panels (C) and (D) are collected at day 7. White arrows and dots illustrate the quantification method used to determine OCT4 (green) and SOX2 (red) co-staining and the percentage of positive cells within the encapsulated cysts shown in Figure 2D of the main text. Scale bars are 50 μm .

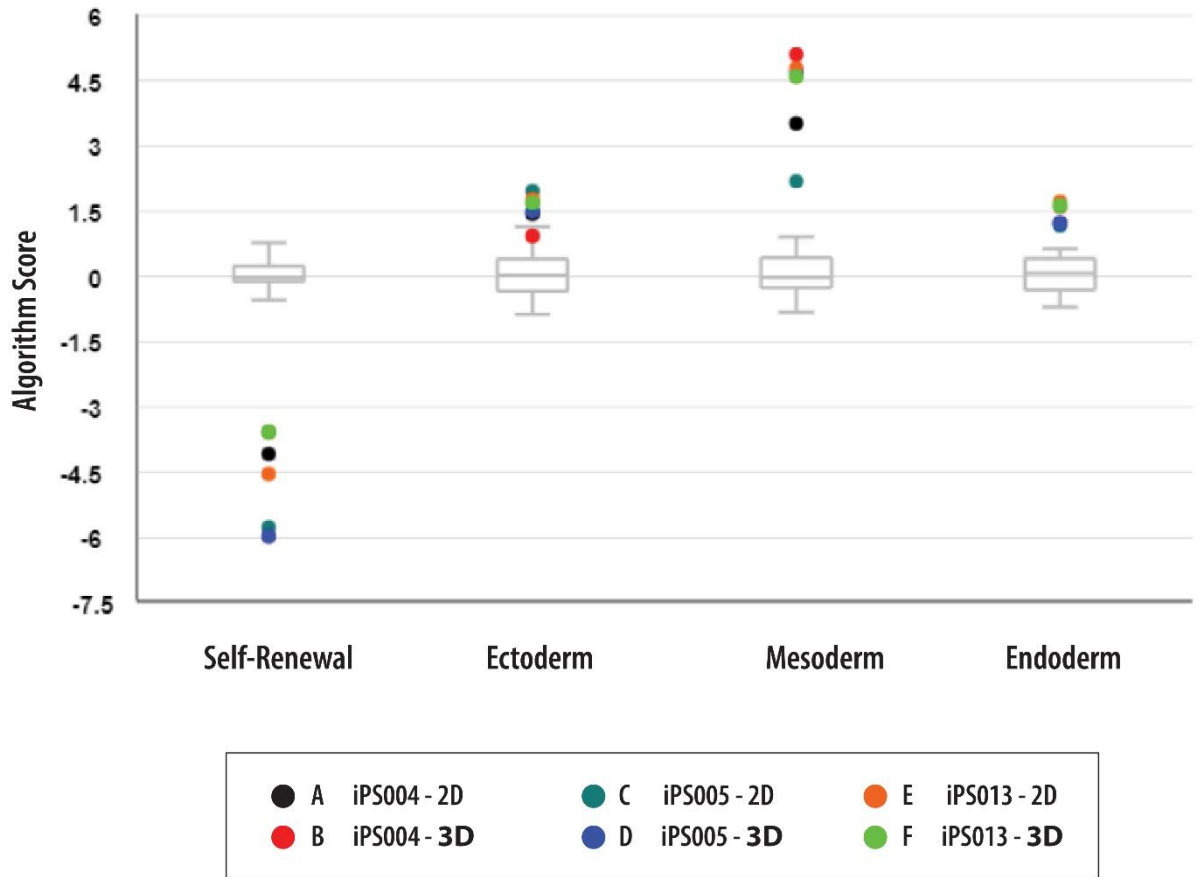
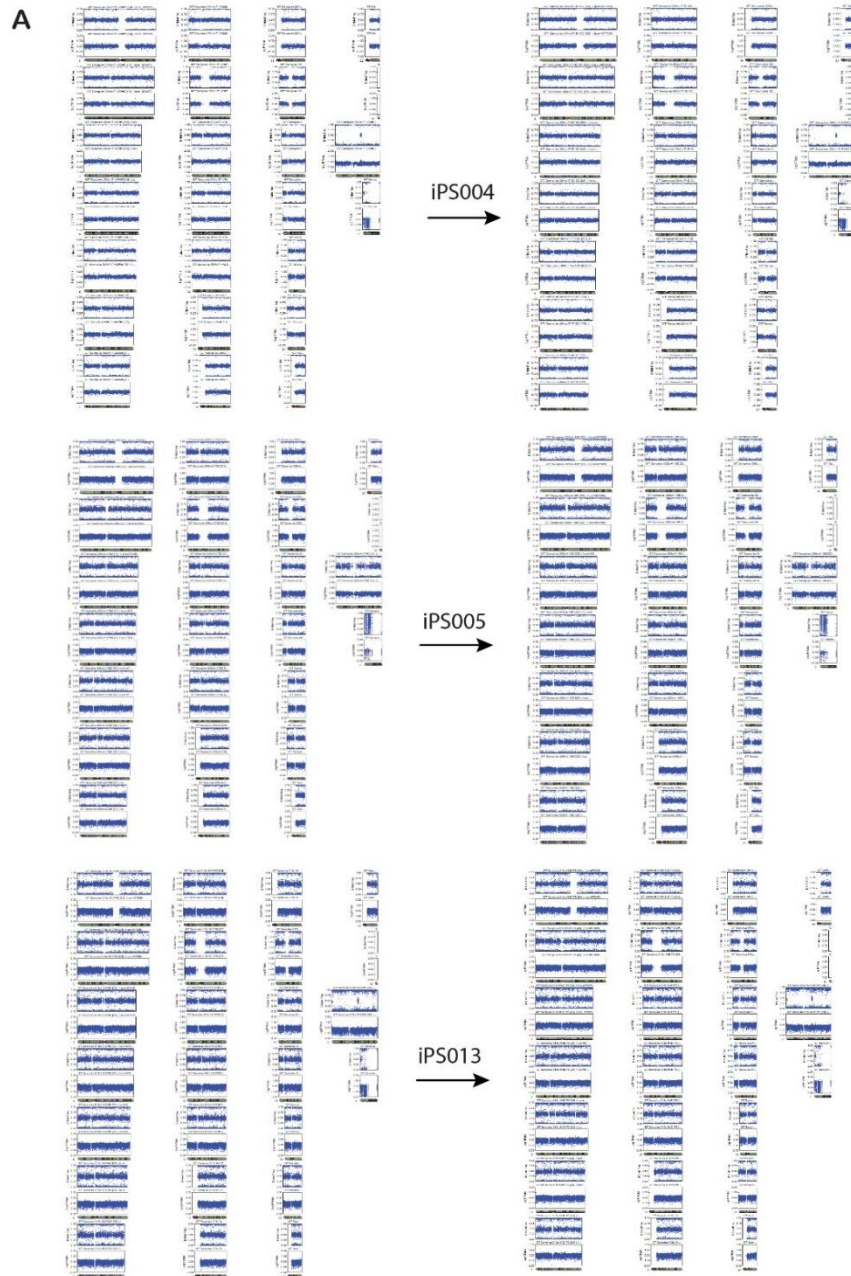


Fig. S4. Scorecard quantitative comparison of gene expression profiles from trilineage differentiation assays of 2D and 3D hPSC colonies

2D cultures and 3D *in capsulo* cultures of hPSC were assessed with trilineage differentiation assay and scorecard qPCR panel. Three iPSC lines were differentiated and analyzed. Algorithm score generated by the manufacturer confirm a consistent decreased of the self-renewal genes compared to the undifferentiated reference. Up-regulation of the 3 germs layers means that both 2D and 3D stem cell colonies can engage in differentiation. The grey box plot indicates the undifferentiated reference.



B

	Concordance of SNP Pre vs Post encapsulation			
	% concordance	Number of match	Informative SNP	Total SNP
iPS004	99,849%	304066	304527	305445
iPS005	99,991%	302217	302243	305445
iPS013	99,975%	300471	300546	305445

Fig. S5. Analysis of high-resolution SNP arrays before and after C-STEM amplification

(A) Qualitative analysis of high-resolution SNP arrays before and after one-week of encapsulation: pre-encapsulation (left) and post-encapsulation (right). Absence of duplications and deletions for the 3 distinct iPS cell lines (iPS004 top row, iPS005 middle row, iPS013 lower row). (B) Table summarizing the SNP concordance analysis.

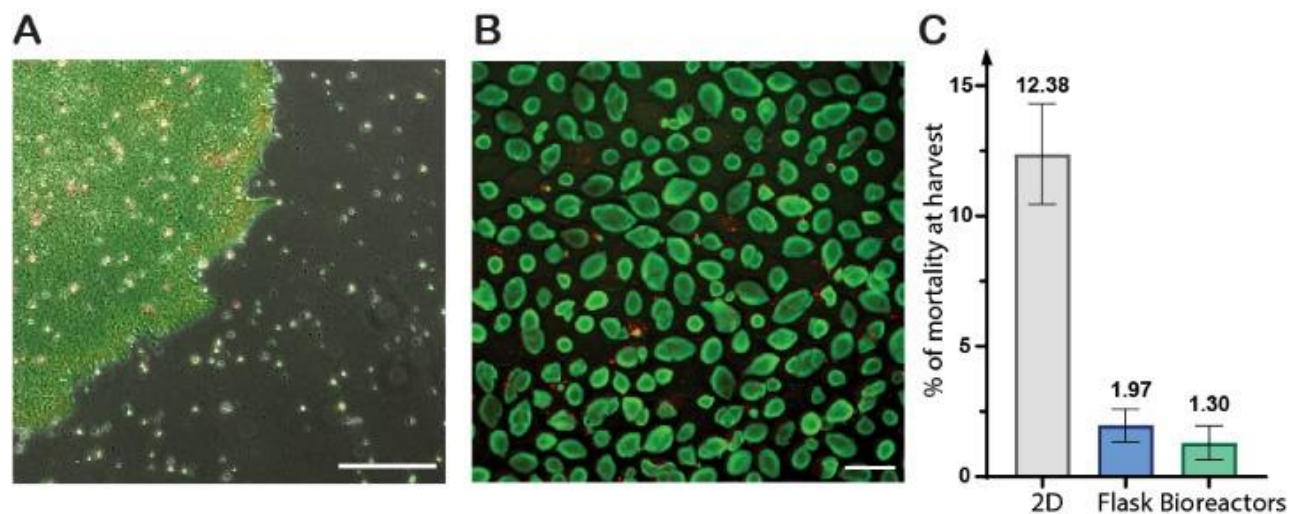


Fig. S6. Cell viability in 2D and encapsulated 3D hPSC cultures

Fluorescence microscopy image of a 2D stem cell colony stained for live (Calcein, green) and dead (ethidium, red). Pictures were taken before daily media changes to avoid removal of free-floating cells. Scale bar is 500 μm . (B) Fluorescence microscopy image of live (green) & dead (red) staining of 3D hPSC colonies at day 7 post encapsulation. Scale bar is 500 μm . (C) Percentage of cell mortality at harvest for 2D culture and encapsulated 3D hPSC colonies. Stem cells cultivated in 2D were harvested at day 4, 5 or 6 before reaching confluency. Stem cells cultivated for 6 to 7 days in capsules were harvested and dissociated after capsule dissolution. Viability was assessed with Nucleo counter NC3000. The 'count and viability assay' use the cell stain Acridine Orange for cell detection, and the nucleic acid stain DAPI for detecting non-viable cells.

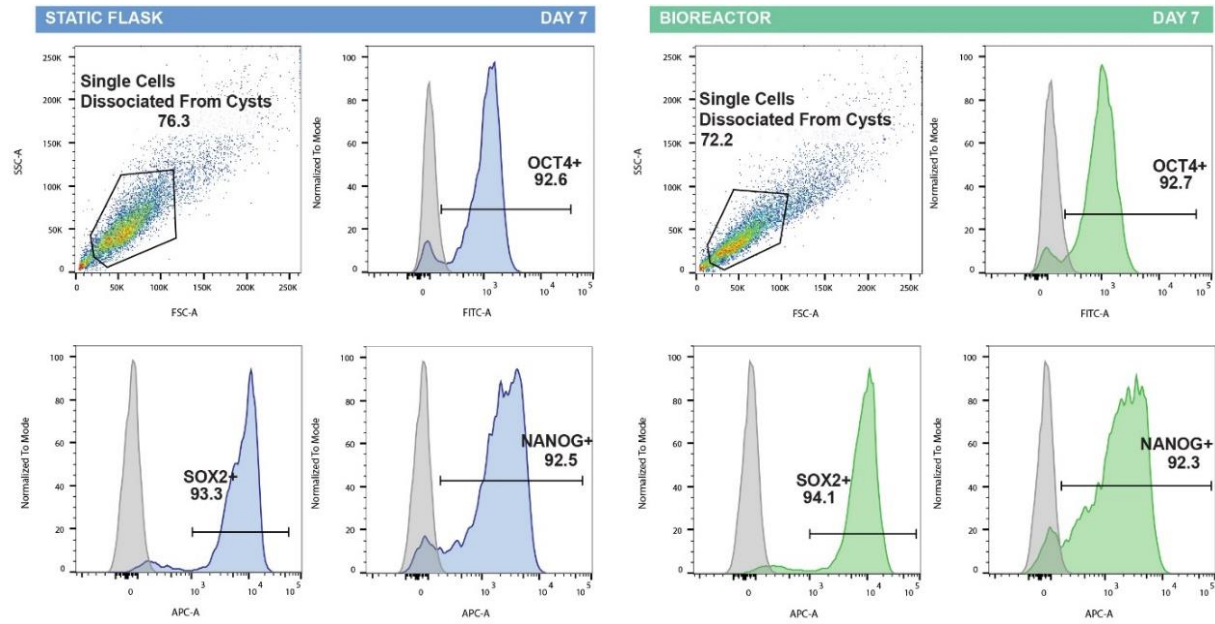


Fig. S7. Encapsulated epiblast-like colonies resilience to hydrodynamic damages

From one encapsulation batch, 2 suspension cultures were seeded in parallel: capsules were cultivated either in static suspension (flasks) or in constantly agitated suspension (500ml stirred tank bioreactor). after 7 days of suspension culture, capsules were collected, dissolved; 3D stem cell colonies were dissociated, fixed and stained for stem cell markers OCT4, SOX2 and NANOG. Fig. S7 shows flow cytometry dot-plots of the two different culture conditions (static flask versus stirred suspension in a bioreactor)

10L Batch n°1					
Target Oxygen Level	20% DO	hPSC seeded	56 millions	Viability at harvest	99,5 %
Max working volume	10.2 L	hPSC produced	15.2 billions	OCT4+ at harvest	92.0 %
Min % Capsule Volume	4,5 - 15%	Amplification factor	x271/ 6.59 days	SOX2+ at harvest	99.6 %
Max Cells / ml of Capsules	33,92 m/ml	Population Doubling Time	19.4 hours	NANOG+ at harvest	97.0 %
		Population Doubling Level	8.08		

10L Batch n°2					
Target Oxygen Level	20% DO	hPSC seeded	51 millions	Viability at harvest	99,7 %
Max working volume	9.7 L	hPSC produced	14.52 billions	OCT4+ at harvest	96.7 %
Min % Capsule Volume	3,9 - 14 %	Amplification factor	x282/ 6.69 days	SOX2+ at harvest	99.7 %
Max Cells / ml of Capsules	33.80 m/ml	Population Doubling Time	19.73 hours	NANOG+ at harvest	98.4 %
		Population Doubling Level	8.14		

Fig. S8. Key parameters and results of C-STEM scale-up in 10 liter bioreactor

Encapsulation of hiPSCs and suspension culture was performed for 2 separated runs. Target oxygen level of 20% Dissolved Oxygen is described as an hypoxic condition (conversely to bioreactors with 100% dissolved oxygen level that are described as normoxic). A fed batch feeding strategy was applied resulting in increasing working volume and decreasing capsule concentration. The cell density can be expressed in millions of cells per milliliter of capsules. The volume of capsule harvested being measured in graduated glass cylinder and reported to the cell quantity. Amplification factor (AF), and Population doubling time (PDT) are defined following main text description. Population doubling level (PDL) is defined as $PDL(Dt) = \ln(AF) / \ln(2)$. Viability was assessed by nucleocounter NC-3000 (Chemometech). Decapsulated and dissociated cells were fixed and stained for OCT4, SOX2 and NANOG and analyzed by flowcytometry, BD Accuri C6 plus (Table S1).

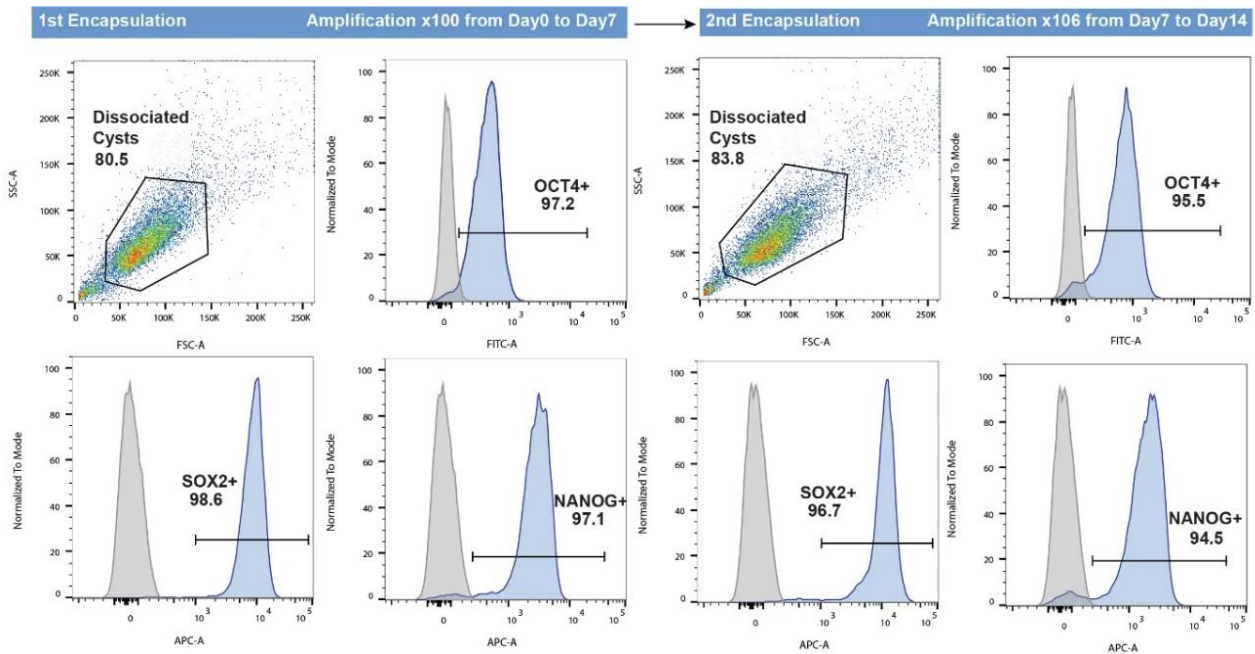
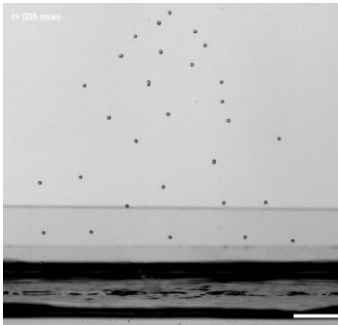


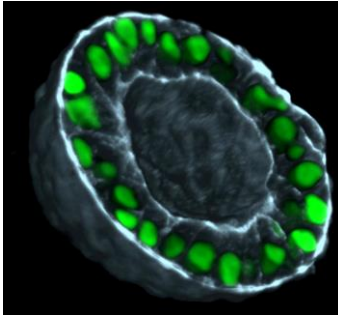
Fig. S9. Stemness maintenance assessment of hiPSCs through 2 consecutive encapsulations

After a first encapsulation of hiPSCs and 7 days of suspension culture, capsules were collected and dissolved, and 3D colonies were dissociated, resuspended and used for another round of encapsulation/suspension culture. At day 7 and 14 cells were dissociated, fixed, and stained for the stemness markers OCT4, SOX2, and NANOG. Individual histograms from flow cytometry show stable phenotypes.



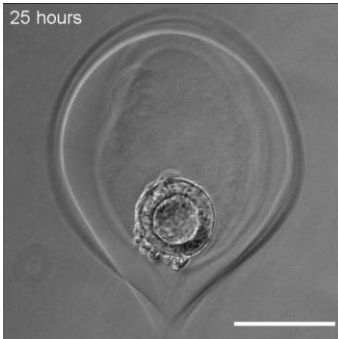
MOVIE S1. Formation and collection of capsules in calcium bath.

Video taken with a high speed camera showing how the train of droplets splays during the encapsulation process under electric field. Acquisition was performed at a frame rate of 10.000 fps. Scale bar is 1mm.



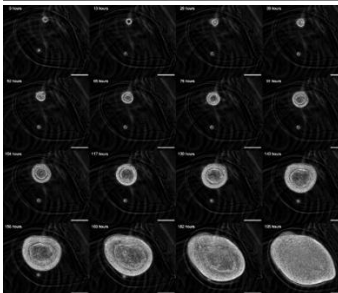
MOVIE S2. 3D rendering of an equatorially sectioned 3D hPSC colony.

The image shows nuclear localization of OCT4 (green) and phalloidin (gray). The diameter of the cyst is 110 μm .



MOVIE S3. Time-lapse of an encapsulated 3D hPSC colony : between encapsulation and harvest

Phase contrast sequence (using Biostation Nikon IM) of a growing hPSC colony inside a capsule. Video starts at day 1 after encapsulation. Scale bar is 100 μm .



MOVIE S4. Time-lapse of an encapsulated 3D hPSC colony : between encapsulation and lumen collapse.

Phase contrast sequence (using Biostation Nikon IM) of a growing hPSC colony inside a capsule. Video starts at day 1 after encapsulation. prolonged until full collapse of the lumen. Scale bar is 100 μm .



MOVIE S5. Encapsulated 3D hPSCs colonies cultured in a 10 liter stirred-tank bioreactor.

Video taken with a Digital Single-Lens Reflex camera shows the flow of hPSC-laden capsules induced by the motion of the bioreactor's impeller.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statements

The generation, use and storage of hiPSCs were performed with approval from the “Comité de Protection des Personnes” (CPP) Ile de France (DC 2015-2595 and 2016-A00773-48).

Human pluripotent stem cell lines

Throughout the present work, we used 4 hiPSC lines. Among these, 3 hiPS cells, namely IMAGINi004-A (referred to as iPS004), IMAGINi005-A (iPS005) and IMAGINi013-A (iPS013) were derived from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) according to the protocol described in (Queleu et al., 2020). Briefly, PBMCs were transduced using the CytoTune-iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (ThermoFisher Scientific) following the manufacturer's instructions. After 2-3 weeks, colonies were manually picked and expanded at least 10 passages. The 4th hiPSC line is a commercial line from ThermoFisher: Gibco™ episomal hiPSC line (A18945) generated using cord blood derived CD34+ progenitors with 7 episomally expressed factors (Oct4, Sox2, Klf4, Myc, Nanog, Lin28, and SV40 T). This commercial cell line is referred to as iPS C. For the sake of availability, in order to allow other groups to reproduce our findings, all experiments reported here were performed with iPS C, except for those that are described in Figures 2F, 3A,B,D 4E and Figures S4 S5, which were carried out to demonstrate that the findings were not cell line-dependent.

2D hiPSC culture

All hiPSC lines were maintained on Matrigel (Corning Ref. 354234) and cultured in mTeSR1 medium (StemCell Technologies 85875). Cultures were fed daily, passaged with an enzyme-free reagent, ReLeSR (StemCell Technologies 05873) every 3-6 days (around 80% confluency) and replated as small clusters (between 100 and 200 μm) at a density of about 5000-10000 cells/ cm^2 . Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

3D hiPSC Encapsulation

Prior to encapsulation, 2D stem cell colonies were detached using ReLeSR for 1 minute and dissociated into a near single cell solution using Accutase (Stem Cell Technologies 07920). HiPSCs were then mixed in a 50/50 volume ratio with Matrigel at 4°C to keep the suspension in a liquid state. The final concentration of cells in the cell/matrix solution was thus between 0.4-1.0 $\times 10^6$ viable cells/mL, referred to as the encapsulation density. The encapsulation system is similar to the one described in (Alessandri, Feyeux, Gurchenkov, Delgado, Trushko, Krause, Vignjević, Nassoy, Roux, et al., 2016). In brief, ethylene tetrafluoroethylene (ETFE,) tubings are connected to the three inlets of a 3D printed (using the DLP Micro Plus Hi-Res printer from EnvisionTEC) microfluidic co-laminar flow device. An extruded and polished glass microcapillary tip (of diameter $\sim 100 \mu\text{m}$ for most experiments reported in this work, at the exception of those shown in Fig. 5A-B that were carried out with a nozzle diameter of 150 μm) is glued to the outlet of the nozzle for a better control of the flow. The cell/matrix suspension is loaded into the inner channel of the 3-way device, which is kept refrigerated thanks to an in-line cooling system in order to prevent premature gelation of Matrigel. A solution of sodium alginate (Novamatrix Pronova SLG100, 0,25 g #4202101 at 2% in distilled water) is injected into the outer channel. To prevent alginate gelation within the microfluidic device due to calcium release from the suspended cells, a calcium-free solution (Sorbitol 300mM, Sigma-Aldrich 85529) is used in the intermediate channel of the co-extrusion chip and serves as a barrier against calcium diffusion. Typical flow rates for the 3 solutions were on the order of 120 ml/h for all three channels: (alginate solution, the sorbitol solution and the cell+matrix suspension). At these rates,

the composite solution forms a liquid jet that fragments into droplets (of about twice the size of the nozzle) due to the spontaneous Rayleigh-Plateau instability. To avoid subsequent coalescence of the train of droplet, an alginate charging part and a copper ring are connected to a high voltage (2000V) generator are introduced. A high-speed camera (PHANTOM VEO 1310L) was used to visualize droplet formation and splay (Fig. S1 and Movie S1). When the composite droplets contact the collecting calcium bath (at 100mM), the outer layer of alginate readily gels. As a consequence, the inner cell/matrix solution remains entrapped inside a closed, spherical and permeable micro-compartment. Within 1 min following encapsulation, capsules are rinsed with medium (DMEM) to reduce the basal calcium concentration. Finally, they are transferred to suspension culture medium.

Re-encapsulation was performed by dissolution of alginate shells using short rReleSR rinse, followed by cell dissociation using TrypLE (Trypsin-based, dissociation enzyme, ThermoFischer) for 20 minutes at 37°. Then the obtained cells were processed following the classic encapsulation protocol.

3D stem cell suspension culture in static T-Flasks or bioreactors

Static suspension cultures of encapsulated hiPSC were carried out using T-Flasks (from 5 to 30 ml) maintained in a cell culture incubator at 37°C and 5% CO₂. The medium (mTeSR1) was supplemented with 10µM Y-27632 for ROCK inhibition only during the first 24 hours of culture. From culture day 3, the medium was exchanged every day as described hereafter. The contents of the T-Flasks were transferred into Falcon Tubes. After capsules sedimentation (within a few minutes), the supernatant was removed and replenished as the capsules were transferred back into a T-Flasks. The volume of culture medium was kept constant for the first 4 days of culture (~ 4× the capsules volume). Then, the volume was steadily increased every day in order to maintain a cell concentration below 10⁶ cells/mL.

Stirred suspension cultures were performed in different bioreactors. For all experiments reported in Fig. 4 and Fig. 5A-B, we used benchtop STBRs, including a 30 mL (Minibio, ABLE® Bioreactor Systems) or 500 mL bioreactors (Applikon Biotechnology & Global Process Concept). For the experiments reported in Fig. 5C-D, we used a 10 liter -scale bioreactor (Global Process Concept).

In all cases, the bioreactors were inoculated with 15% capsule-to-medium volume. The bioreactor culture starts at a volume representing 30% of the final working volume. At Day1, the medium was replaced with fresh medium without ROCK inhibitor. From day 2 to 5, the culture is performed in a fed-batch mode up to the final working volume (Kropp et al., 2017). Then, we switched to repeated-batch mode, where 90% of the media was daily renewed to maintain sufficient nutrient supply. The final capsule-to-medium volume was 4.2 ± 0.3% and the pH was maintained at 7.2 ± 0.2.

Dissolved Oxygen (DO) level is calibrated at 100% in starting conditions by injecting air into the bioreactor headspace. During the run, the oxygen level is monitored and controlled. In normoxic conditions the oxygen is controlled at 100% while in hypoxic conditions the set point is at 20% DO. Oxygen level is regulated by sparging nitrogen and/or air to maintain the set point. 10L scale bioreactors were regulated in hypoxic conditions. During one week of culture, the stirring speed is set at 150 rpm that is sufficient to keep capsules resuspension and bioreactor homogeneity along the run.

Time-lapse microscopy of encapsulated cyst growth and image analysis

Time-lapse microscopy was performed using a Nikon Biostation IM microscope with a 10x objective. Capsules containing hiPSCs were transferred to a 35 mm Petri dish 24 hours after encapsulation. Approximately 10 to 20 capsules were placed in the petri dish containing 5 mL of fresh Y-27632-free mTeSR1 medium. Cyst growth was monitored over 7 days. Practically, images were taken every 6 to 10

minutes at preselected Z-focal planes to ensure acquisition at proper focus in case of undesired drift. Image analysis was performed using ImageJ. The external and internal effective radii of the cysts, R_{out} and R_{in} , were measured from the equatorial corresponding cross sections S according to $R_{out,in}=(S_{out,in}/\pi)^{1/2}$ after applying appropriate bandpass filters and thresholds. The volume V of the cells was calculated as $V=4\pi/3(R_{out}^3-R_{in}^3)$. Capsule circularity was defined as $C=a^2/b^2$, where a and b are the short and long axes of the approximated ellipse.

In vitro trilineage differentiation

Small cell clusters were collected from hiPSC cultures (2D or decapsulated-dissociated 3D hiPSCs colonies) and transferred into low attachment dishes (Corning, Ultra-low attachment 6 well plate). Three-dimensional aggregates of cells that are an amalgam of the three developmental germ layers (Embryoid bodies) are obtained and cultured in suspension for 7 to 9 days with DMEM/F-12 medium containing 20% pluriQ Serum Replacement (GlobalStem), 1% non-essential amino acids, 1% penicillin-streptomycin and 0.2% β -mercaptoethanol (ThermoFisher Scientific) in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Culture medium was refreshed every two days. EBs were then collected for RNA analyses or transferred onto gelatin-coated dishes for 1 week. For immunocytochemistry analysis, cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature (RT). After washing in PBS/1%BSA blocking solution for 1 hour, cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies, washed 3 times in PBS, and incubated with secondary antibodies for 2 hours at RT. Antibodies were diluted in PBS/1%BSA/0.1%triton solution. The list of antibodies used in this work and their origin are listed in Table S1. Nuclei were stained with a DAPI solution. Immuno-fluorescence staining was analyzed using the Celena S™ Digital Imaging System (Logos Biosystems).

RNA extraction and RT-PCR analyses

Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). cDNA was synthesized using a high capacity cDNA RT kit (ThermoFisher Scientific) from 1 μ g of total RNA. The expression of pluripotency markers as well as the trilineage differentiation potential of the cells were evaluated by TaqMan® hiPSC Scorecard™ assay according to the manufacturer's protocol. This scorecard compares the gene expression pattern of key pluripotency and germ lineage markers relative to a reference standard that consists of 9 different human ES and iPS lines. Data analysis was performed using the cloud based TaqMan® hiPSC Scorecard™ analysis software.

DNA isolation, genomic stability and authenticity analysis

DNA isolation was performed using the PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen). Molecular karyotype was performed using an Infinium Core-24 v1.2 Kit (Illumina) containing 300000 SNPs. Data were analyzed with BeadStudio/GenomeStudio software (Illumina). The percentage of SNP concordance between iPSC samples before and 7 days after encapsulation was assessed for the 3 derived iPSC cell lines. SNP files of all samples were extracted from genome studio software. The percentage of concordance between two paired samples (before and after encapsulation) was evaluated by comparing the genotype of each informative SNP (Fig. S5)

Flow cytometry analysis

The hiPSCs colonies were dissociated with Accutase for 10 minutes at 37°C for 2D cultures or with TrypLE Select (ThermoFisher Scientific 11598846) for 30 minutes at 37°C for 3D cultures after capsule removal.

Then, cells were fixed and permeabilized using the Transcription Factor Staining Buffer Set (ThermoFisher 11500597). Cells were suspended in the permeabilization buffer at a density of $0.5-1 \times 10^6$ cells in 100 μ l and incubated with the specific antibodies or isotype controls (Table S1) for 45 minutes at room temperature in the dark. Cells were washed twice with the staining buffer and analyzed using either BD Canto II (at the TBMCore CNRS UMS 3427 – INSERM US 005) or a BD Accuri™ C6 plus and data was post-processed with FlowJo software.

Cell growth and viability analysis

Cell counting was performed using the Nucleo counter NC3000 or NC200 (Chemometec). Live/dead analysis was performed using CalceinAM/Ethidium homodimer-1 (ThermoFisher L3224) according to the manufacturer recommendations, and samples were imaged using either the EVOS FL or EVOS M5000 auto Imaging system (ThermoFischer).

Immunostaining, Microscopy, and Image Analysis

For daily brightfield imaging of 2D cultures and encapsulated hiPSC cysts, a widefield EVOS FL or EVOS M5000 automated microscope was used. Encapsulated 3D hiPSC colonies were harvested for confocal microscopy at several timepoints. The alginate capsule was removed prior to fixation by incubating the samples in PBS without divalent cations for at least 5 minutes with agitation at RT. Both 2D and 3D stem cell colonies were fixed with 4% PFA for 30-60 minutes at RT in the dark. Following fixation, the samples were washed 3x with 0.1% Tween20 in PBS. A permeabilization step was done in parallel with excess PFA quenching in a PBS solution containing 0.3% Triton X-100 and 100 mM Glycine for 30 minutes, followed by 3x washing with 0.1% Tween20 in PBS. The samples were incubated in primary and secondary antibodies (Table S1) in 1% BSA + 0.1% Tween20 in PBS overnight at 4° with gentle orbital agitation, including a 3x rinsing with 1% BSA + 0.1% Tween20 in PBS after each incubation. To maintain alginate capsules during fixation and staining, the decapsulation step was skipped and all solutions (including 4% PFA) were supplemented with calcium and magnesium. All samples were imaged on either a Leica SP5 or SP8 confocal microscope (Bordeaux Imaging Center, BIC).

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using GraphPad Prism8. To test significant differences between bioreactor and flask, 2wayANOVA with sidak's multiple comparison test was used. To compare between 2 groups, a student T-test was used. All statistical significance is reported in terms of p-values <0.05.

ACKNOWLEDGMENTS

Funding : This work was supported in part by funding grants from European commission H2020-EIC-SMEInst (grant agreement number: 881113 C-stemGMP), iLAB2018 Bpi France, Region Nouvelle Aquitaine and Agence Nationale pour la Recherche (ANR-17-C18-0026-02). We acknowledge the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France BioImaging supported by the French Research Agency (ANR-10-INBS-04). We also acknowledge the TBMCore facility. (CNRS UMS 3427 – INSERM US 005). We also thank Nicolas Doulet and Marion Pilorge for helping build the collaboration between Treefrog Therapeutics and the Imagine Institute.

Author contributions : KA NL MF designed the project and supervised experiments and analysis; PC performed the experiments, analyzed the data and wrote the article; Experiments were performed both at the Imagine Institute and at Treefrog Therapeutics (TFT). AL helped performing experiments, analysing the data and writing the article; EL FM ML designed bioreactor cultures and scale-up, EL JP HW EJ MD performed bioreactor cultures; JC EW EQ CB EP contributed to 2D cultures, encapsulations, trilineage assay and SNP analysis; BG contributed to data analysis and writing.; PVL proposed a mathematical formulation for PDT and viability. PN helped analyze the growth of 3D colonies and write the manuscript. KA CR JH conceived and produced the microfluidic chips and performed high speed camera recordings.

Competing interests : MF and KA are the founders of TFT; MF, KA, PC and PN are shareholders of Treefrog therapeutics. MF KA and PN have a patent pertaining to discoveries presented in this manuscript. Patent no: WO2018096277A1.

Data and materials availability : All data are available in the main text or the supplementary materials.

Table S1. Antibody list

List of antibodies used for flow cytometry, trilineage assay and immune fluorescence microscopy.

Antibodies used for flow cytometry	
Nanog Hu – Alexa Fluor647 Clone N3-355	BD (Ref. 561300)
OCT3/4 Hu, Ms – Alexa Fluor 488 – clone 40/oct3	BD (Ref. 560253)
SOX2 Hu Alexa Fluor 647 – Clone O30-678	BD (Ref. 562139)
Mouse igG1k – Alexa Fluor 488 – clone MOPC 21	BD (Ref. 557721)
Mouse igG1k, Alexa Fluor 647 clone MOPC 21	BD (Ref. 557732)

Antibodies used for trilineage assay	
Monoclonal anti-Tubuline beta 3 (Mouse) 1:1000	Biologend Cat#801202
Monoclonal anti actin, alpha-smooth muscle (Mouse) – FITC 1:300	Sigma-Aldrich Cat#F3777
Monoclonal anti-Alpha foeto protein (Mouse) 1:60	R&D system Cat#MAB1369
Goat anti-Mouse alexa Fluor plus 555 1:1000	Thermo fisher Scientific Cat#A32732

Antibodies used for immunostaining and microscopy	
OCT 3/4 mouse IgG2b (1/200)	Santa Cruz Biotechnology sc-5279 E1818
SOX2 Rabbit Polyclonal (1/1000)	Sigma Aldrich AB5603 3153252
Secondary Donkey anti-mouse IgG H+L Alexa Fluor Plus 488 1/500	Thermo/Invitrogen A32766 TF271737A
Secondary donkey anti-rabbit IgG H+L Alexa Fluor Plus 555 1/500	Thermo/Invitrogen A32794 TH271030
Phalloidin Alexa Fluor 647 at 1:500	Thermo A22287 2015553
Hoechst 33342 at 1:1000	

4. DISCUSSION COMPLÉMENTAIRE DE LA PARTIE 1

4.1 BIOPRODUCTION DE CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES

Montée en échelle de la culture de cellules souches pluripotentes

Notre système réunit les conditions nécessaires à la culture de cellules souches pluripotentes humaines pour les premières étapes de commercialisation de thérapies cellulaires issues de cellules souches : facteur d'amplification de 276 en 6,5 jours, lot homogène de 15 milliards de cellules souches, bioréacteur de 10 litres. À titre de comparaison, la seule tentative menée à cette échelle a abouti à un facteur d'amplification de dix à quinze fois inférieur (S. Huang et *al.*, 2020). Pour que notre système soit viable au point de vue économique, il nous faudra toutefois encore augmenter le volume de production, améliorer la concentration cellulaire et diminuer les coûts.

Un process de bioproduction insensible à l'échelle

L'environnement cellulaire est maintenu à toutes les échelles testées, grâce à la protection fournie par la capsule d'hydrogel (cf. figures 53 et 54). D'après des expériences préliminaires menées, notre système est compatible avec l'agitation mécanique de bioréacteurs supérieurs à 100 litres. La protection offerte par les capsules ouvre également la voie à l'automatisation et au criblage haut débit de procédés en thérapie cellulaire.

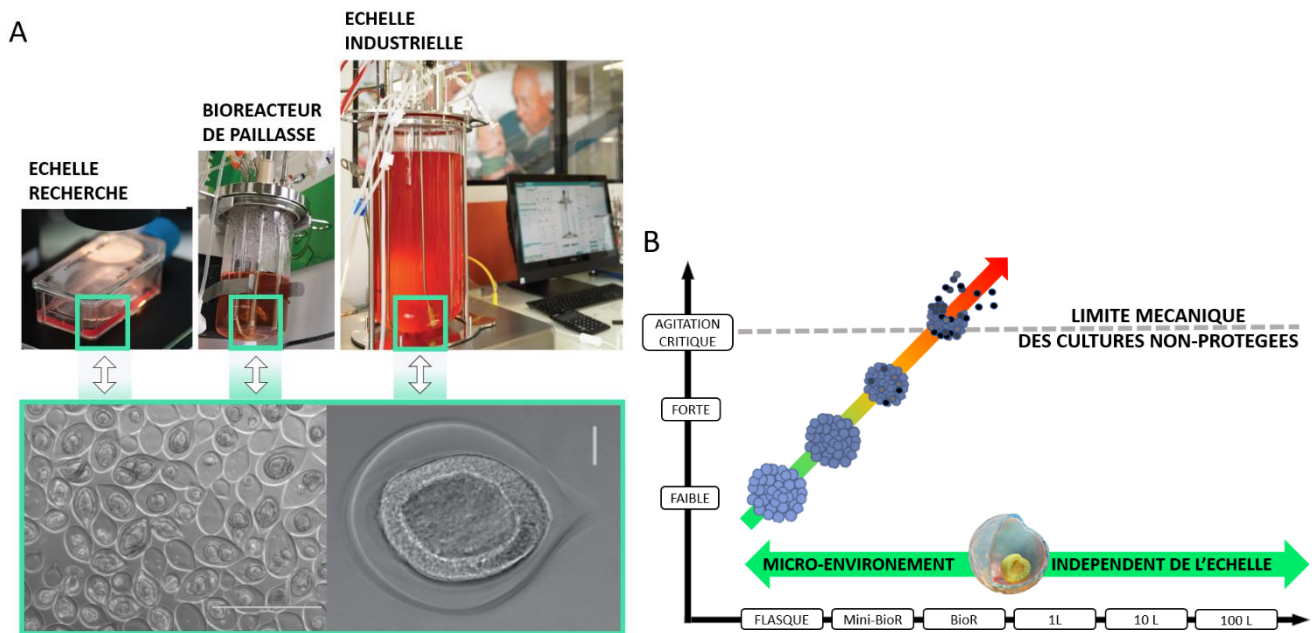


Figure 53. Un process de bioproduction insensible à l'échelle

Le microenvironnement des colonies de cellules souches reste globalement insensible aux changements d'échelles.

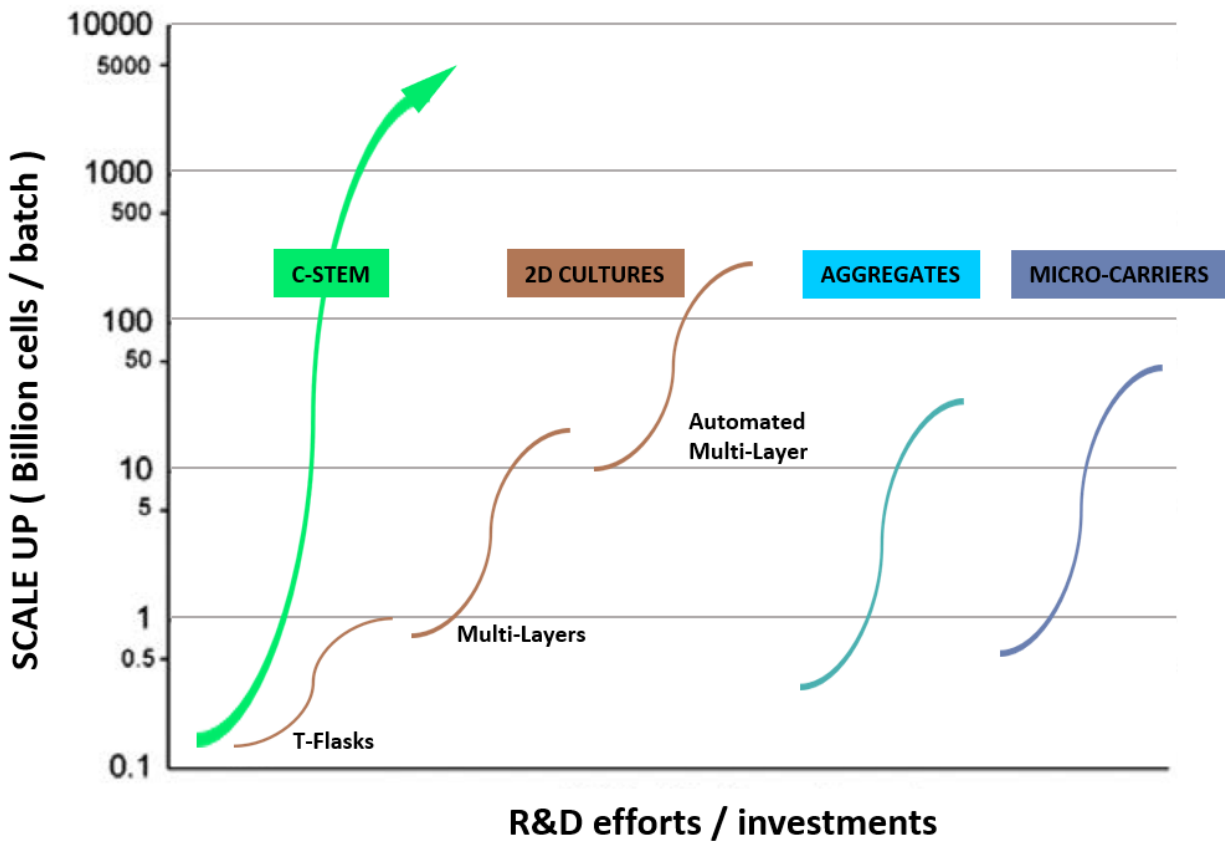


Figure 54. Sécurisation et accélération de la montée en échelle de la production cellulaire

La culture encapsulée en bioréacteur avec la technologie C-Stem™ a permis d'atteindre rapidement une échelle industrielle. Il a fallu moins de deux ans à TreeFrog Therapeutics pour passer d'un prototype académique à un bioréacteur de 10 litres. La constance des paramètres du microenvironnement est appréciable pour la culture de différentes lignées de cellules souches, mais aussi pour la montée en échelle d'un protocole de différenciation. Nous espérons que cette plateforme de culture pourra diminuer le temps entre la preuve de concept et l'application clinique d'une nouvelle thérapie cellulaire. Graphique représentant la difficulté de changement d'échelle pour la bioproduction cellulaire. Adapté de « Characterization and impact of the hydrodynamics on the performance of umbilical-cord derived stem cells culture in stirred tank bioreactors » par Loubière, 2019, et de « Allogeneic cell therapy bioprocess economics and optimization: Single-use cell expansion technologies » par Simaria et al., 2014.

Défis à venir. Pour que notre technologie soit une alternative crédible aux systèmes de culture existants, il faut qu'elle réponde à la « douleur » du domaine : montée à l'échelle et qualité des cellules (cf. figure 49). Pour une adoption massive sur des applications cliniques il faudra également poursuivre son développement (cf. figure 55).

BIO INGENIERIE	ENCAPSULATION
<ul style="list-style-type: none"> • Milieux, matrices et facteurs entièrement définis et sans origines animales • Modifications géniques intégrées • Intégrité génétique globale et stratégie d'évaluation • Contrôler et harmoniser la différenciation <i>in capsulo</i> • Transfert de technologie vers la clinique • Concentration cellulaire (M/ml) et capsulaire (caps/ml) • Volume milieu consommé / million de cellules produites • Cout total de production faible 	<ul style="list-style-type: none"> • Augmenter les débits d'encapsulation et de traitement d'aval des capsules • Contrôle qualité en ligne non destructeur • Stratégie de tri automatisé des capsules • Automatisation avancée dont dé-capsulation et ré-encapsulation • Prototypage rapide et criblage haut débit • Système entièrement clos, usage unique, GMP et compatible avec la thérapie humaine

Figure 55. Prochains défis pour une culture encapsulée à grande échelle et de grade clinique
Liste non exhaustive des problématiques à venir pour la transition clinique du système de culture C-Stem™.

Une approche pluridisciplinaire globale devra être mise en œuvre : biologie, imagerie, génétique et « omics », ingénierie, biophysique, microfluidique, microfabrication, criblage, robotisation et automatisation avancées, plateforme d'expérimentation animale, stratégie data, modélisation et simulation (jumeaux numériques). Par ailleurs, les milieux de culture et les matrices seront optimisés pour s'adapter au mieux aux spécificités des épiblastoïdes. Le Matrigel® étant d'origine animale, il est peu compatible avec les normes cliniques. Des alternatives synthétiques définies et reproductibles devront être développées (Aisenbrey & Murphy, 2020; Broguiere et al., 2018; Caiazza et al., 2016; Huang et al., 2017; Indana et al., 2021; Kratochvil et al., 2019; Kyprianou et al., 2020; Madl & Heilshorn, 2018; Pijuan-Galitó et al., 2016; Salo et al., 2015).

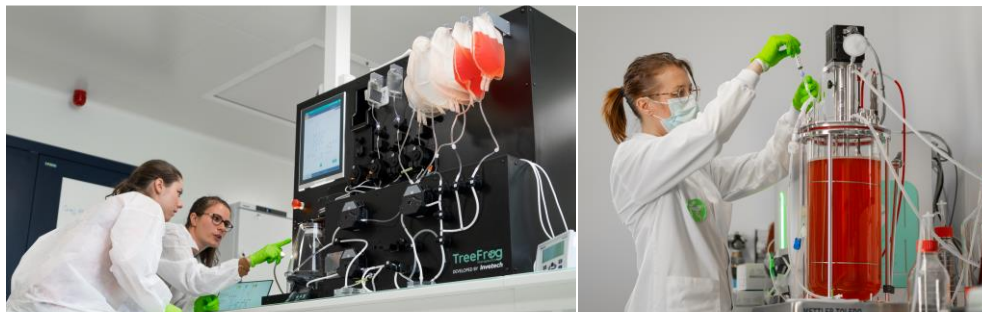


Figure 56. Encapsulation à grande échelle et culture en bioréacteur
(A) Encapsulateur automatisé GMP. **(B)** Bioréacteur de 10 litres. Crédit photo : Éliisa Luquet, Justine Pletenka, Helene Wurtz, TreeFrog Therapeutics.

4.2 CULTURE DE CELLULES SOUCHES EMBRYOMIMÉTIQUE : LES ÉPIBLASTOÏDES

Les épiblastes *in vivo*, et les épiblastoïdes *in capsulo*, arborent de nombreuses similarités histologiques et développementales (cf. figures 57 et 58).

- **Luminogénèse** : l'auto-organisation cystique autour d'une lumière centrale ressemble à la formation de la cavité pro-amniotique.
- **Épithélialisation et polarisation** : transition progressive d'un épithélium cuboïde à un épithélium pseudostratifié similaire à l'épaississement et à la polarisation progressive observée lors de la transition de la rosette vers le disque épiblastique.
- **Séquence développementale** : 4 à 10 jours correspondant aux stades développementaux Carnegie 5 à 6/7. Cette fenêtre développementale est associée avec la luminogénèse amniotique et l'implantation embryonnaire à son début et avec la gastrulation à la fin (*Embryologie humaine*, n. d.; *Stades Carnegies*, n. d. ; Herttg *et al.*, 1956).
- **Taille** : structures de 50 à 300 µm avec un épaississement progressif de l'épithélium de 10 à 45 µm.
- **Croissance** : L'amplification permise à ce jour par C-Stem™ (x 276 en 6,5 jours, soit un Temps de Doublement de Population (PDT) moyen apparent de 19 h) est une rupture majeure avec les autres systèmes de culture (2D/agrégats ; PDT de 30 à 60 h). Elle se rapproche de l'hyper-expansion observée dans l'embryon. Même s'il est difficile d'évaluer précisément l'amplification réelle des cellules souches pluripotentes dans l'embryon humain *in vivo*, des observations *ex vivo* permettent d'estimer un PDT proche de 13 h entre le jour 7 et le jour 11 (de 17 à 328 cellules épiblastiques de J 7,5 à J 10,5) (Deglincerti *et al.*, 2016b ; Shahbazi *et al.*, 2016 ; Xiang *et al.*, 2020). Nos résultats concordent avec d'autres systèmes de culture qui utilisent des cystes de cellules souches à petite échelle pour étudier la différenciation (Simunovic *et al.*, 2019 ; Zheng *et al.*, 2019). En extrapolant les données de ces articles, on peut estimer qu'ils obtiennent un PDT d'environ 20 h.
- **Facteurs de transcription de la pluripotence** : expression forte et homogène des facteurs de transcriptions clés de la pluripotence (OCT4, NANOG, SOX2), également exprimés par les cellules d'épiblaste.
- **Fonction microtissulaire** : les cystes récapitulent également la fonction de l'épiblaste *in vivo* : amplification exponentielle du nombre de cellules souches par autorenouvellement, tout en préservant les intégrités de la pluripotence et du génome.

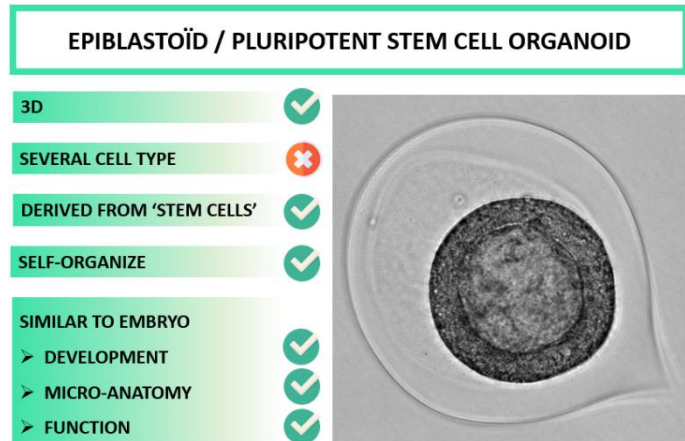


Figure 57. Épiblastoïde

Les colonies cystiques de cellules souches pluripotentes encapsulées récapitulent l'épiblastogénèse.

Ainsi, nous proposons que les colonies en 3D de cellules souches encapsulées ressemblant à l'épiblaste puissent être désignées comme des épiblastoïdes encapsulés (cf. figure 57).

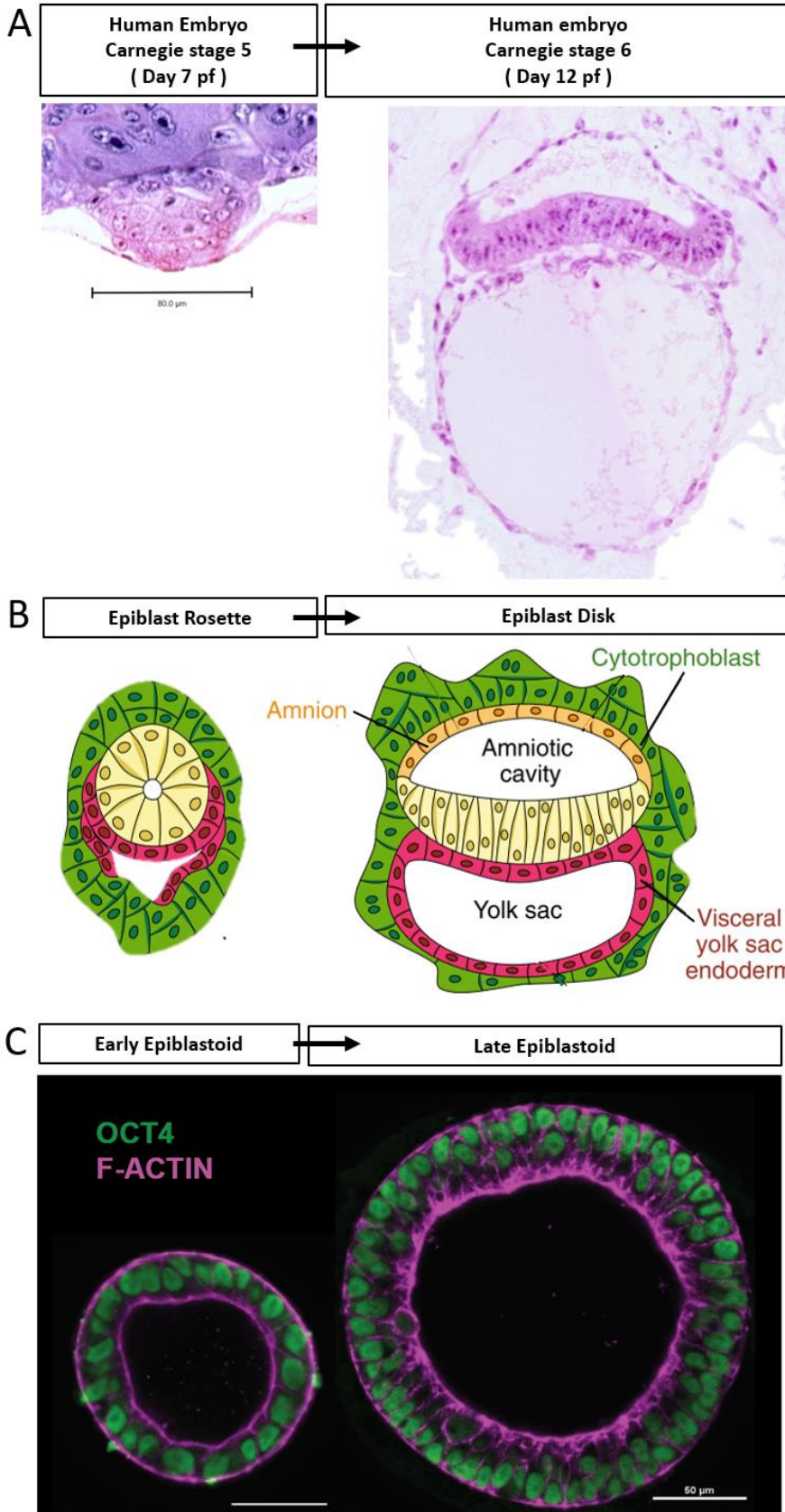


Figure 58. Épiblastogenèse

(A) Observations microscopiques d'embryons humains aux stades de Carnegie 5a1 (Embryo#8020, location: 06-02-02) et de Carnegie 6 (Embryo#7801, location:12-01-01). Adapté de « The Virtual Human Embryo », 2022. **(B)** Schémas de la rosette épiblastique (~J9) et du disque épiblastique (~J11). Adapté de « Deconstructing and reconstructing the mouse and human early embryo » par Shahbazi & Zernicka-Goetz, 2018b. **(C)** Épiblastoïdes cultivés en capsules : stade précoce (cuboïde, diamètre de 100 μm) et tardif (pseudostratifié, diamètre de 200 μm).

4.3 LES AVANTAGES DU FORMAT ÉPIBLASTIQUE

L'augmentation majeure du facteur d'amplification en culture épiblastoïdes peut être due à une diminution de la mortalité cellulaire dans les capsules ou à un raccourcissement du cycle cellulaire. Nos observations corroborent l'hypothèse que cet accroissement s'explique en partie par une baisse de la mortalité. Nous postulons que ce gain de croissance est également inhérent à la biomécanique épiblastoïde (cf. figure 59).

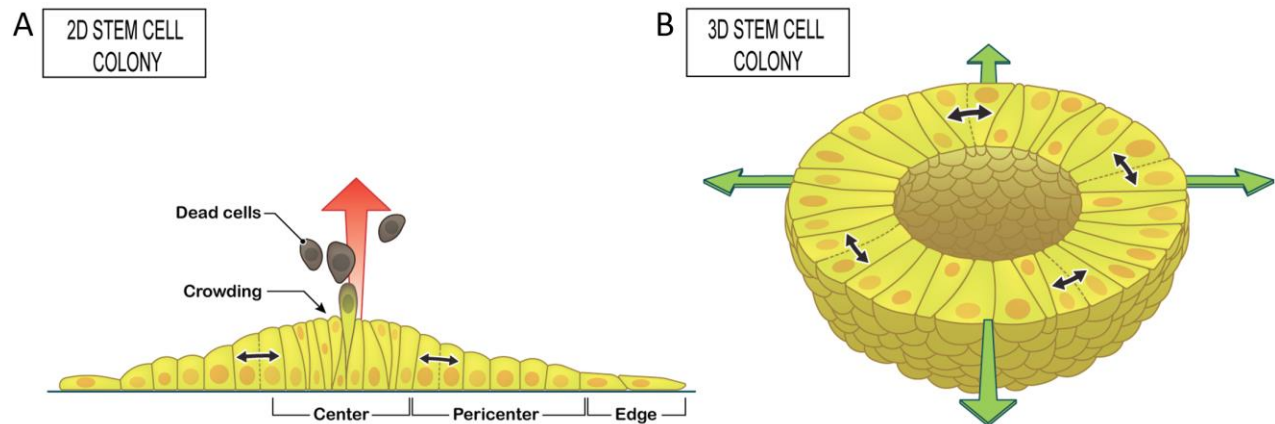


Figure 59. Modèle de croissance des colonies de cellules souches pluripotentes en 2D et 3D

(A) Représentation schématique d'une colonie de cellules souches pluripotentes en culture 2D conventionnelle (vue de profil). Les divisions cellulaires centrales provoquent un encombrement, une augmentation des pressions et une extrusion apicale d'une partie des cellules. **(B)** Représentation schématique d'une colonie en 3D de cellules souches pluripotentes (épiblastoïde, section équatoriale). Les divisions cellulaires entraînent un agrandissement de la structure, faisant de la place pour l'émergence de nouvelles cellules.

Entassement (« *Crowding* »)

En 2D, les divisions cellulaires provoquent inéluctablement une confluence et une augmentation des pressions latérales au centre des colonies. L'adhérence au substrat de culture de la colonie oppose une résistance à l'extension latérale d'autant plus forte que la densité cellulaire augmente. Cela engendre des différences mécaniques majeures entre le bord libre des colonies et le centre. En configuration épiblastique, l'arrivée de nouvelles cellules par mitoses peut être compensée par une augmentation de la taille du cyste. L'augmentation progressive de son diamètre permet de contrôler la pression latérale dans l'épithélium, accommodant en continu la croissance de la population cellulaire. Les cellules ont donc de la place pour se multiplier. La capsule creuse à cœur partiellement liquide, la malléabilité de la matrice utilisée (environ 500 Pa et remodelable par les métalloprotéases) et la configuration cystique contribuent à éviter le confinement et la compression cellulaire observés avec l'encapsulation par billes pleines ou la culture en agrégats.

Étirement (« *Stretching* »)

Il serait intéressant d'évaluer si des forces d'étirement sont impliquées dans la vitesse des divisions cellulaires des cellules souches épiblastoïdes, comme dans l'homéostasie d'autres épithéliums (Gudipaty *et al.*, 2017 ; Hannezo & Heisenberg, 2019) (cf. figure 60).

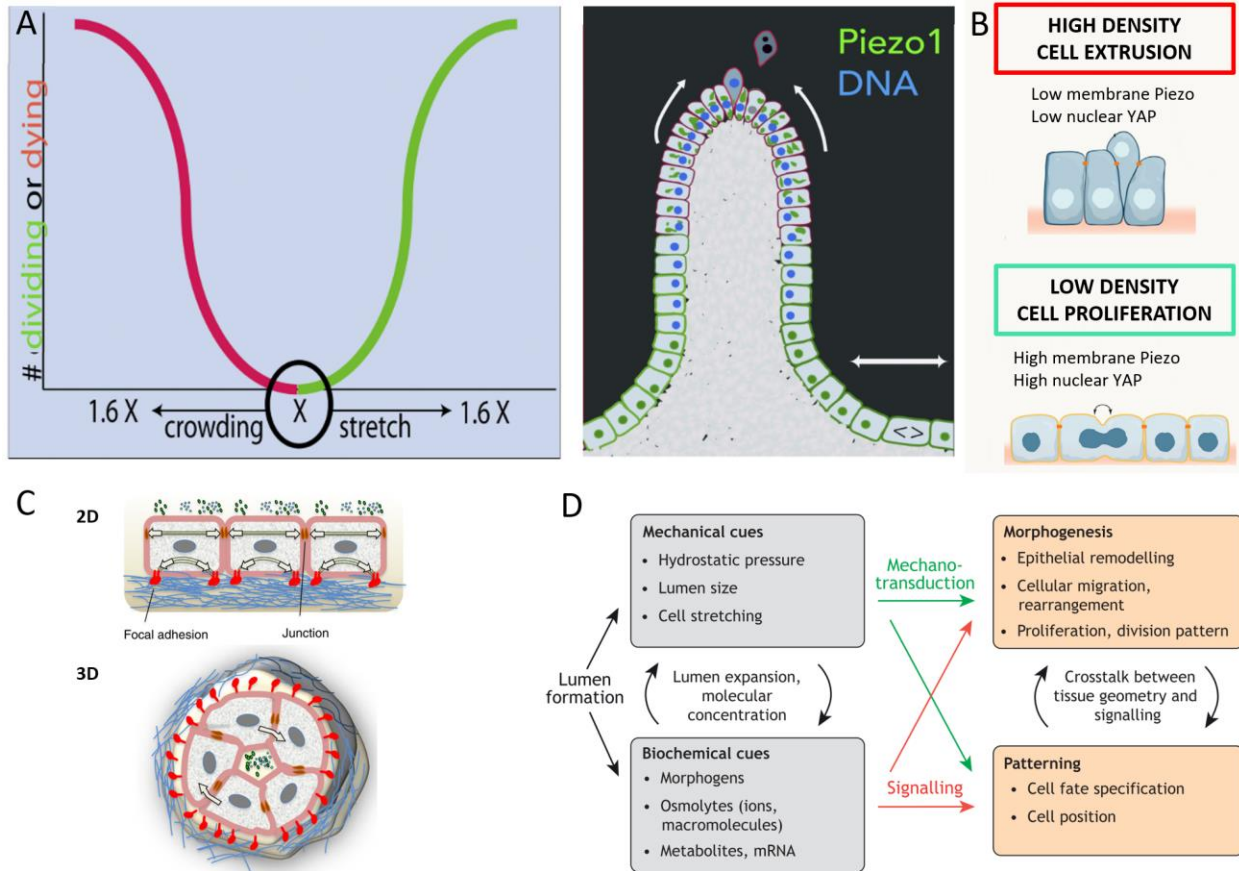


Figure 60. Étirement/Compression et rôle du lumen en dehors de l'épiblastogenèse

(A) Modèle proposé par Gudipaty *et al.* montrant comment le canal ionique Piezo 1 contrôle les divisions cellulaires en cas d'étirement de l'épithélium et l'extrusion en cas d'encombrement cellulaire. Adapté de « Mechanical stretch triggers rapid epithelial cell division through Piezo 1 » par Gudipaty *et al.*, 2017. **(B)** Quand elles sont étirées ou à faible densité, les cellules se divisent davantage ; quand elles sont compressées ou à haute densité, des cellules sont extrudées. Le canal ionique mécanosensible Piezo 1 et la voie de signalisation YAP/TAZ sont des voies privilégiées de mécano-transduction et d'homéostasie tissulaire. Adapté de « Mechanochemical feedback loops in development and disease » par Hannezo & Heisenberg, 2019. **(C)** En 2D, l'adhésion à une surface plane rigide génère des fibres de stress d'actine basale et un transfert de forces contractiles vers la partie apicale des cellules. Dans un microenvironnement en 3D, la courbure et la tendresse de la matrice limitent la formation de fibres de stress d'actine. Les cellules sont exposées à des forces dans l'ensemble de la structure, aussi bien dans une direction plane que perpendiculaire à l'assise cellulaire. Les facteurs sécrétés sont concentrés au niveau du lumen interne. Adapté de « Extracellular matrix: A dynamic microenvironment for stem cell niche » par Gattazzo *et al.*, 2014. **(D)** L'interaction de la signalisation mécanique et biochimique durant la formation du lumen contribue à une coordination fine de la morphogénèse et du destin cellulaire. Adapté de « Integration of luminal pressure and signalling in tissue self-organization » par C. J. Chan & Hiiragi, 2020.

L'organisation en épiblastoïdes pourrait maintenir la viabilité et l'homogénéité de l'identité cellulaire.

Pas de cœur nécrotique, car il n'y a pas de cœur

Malgré la grande taille des colonies en 3D (100 à 400 µm de diamètre), l'organisation en monocouche des cellules permet à chacune d'elle d'accéder directement à l'oxygénation, aux nutriments et aux facteurs de croissance, contrairement aux agrégats qui présentent des gradients d'oxygénation et de facteurs de l'extérieur vers l'intérieur (Alessandri *et al.*, 2013 ; Sart *et al.*, 2017).

Pas d'effet bord, car il n'y a pas de bord

Le format de culture cystique ne présente pas d'hétérogénéité bord/centre comme pour les colonies en 2D (cf. figure 61) (Hamidi *et al.*, 2020b ; Hough *et al.*, 2009 ; Y. Kim *et al.*, 2021 ; Lau *et al.*, 2020 ; Taniguchi *et al.*, 2019 ; Wakui, 2017 ; Z. Zhang *et al.*, 2019). Toutes les cellules souches d'un cyste ont un accès direct aux mêmes signaux : les pôles cellulaires apicaux sont tous orientés vers le lumen central, les pôles basaux latéraux vers l'extérieur du cyste. La symétrie centrale des cystes permet une homogénéité morphologique et mécanique (*entassement, étirement* et pression). L'uniformité de l'identité cellulaire est ainsi le miroir de l'uniformité de la mécanotransduction (Y. Kim *et al.*, 2021).

Une protection contre la différenciation non contrôlée

Certains travaux récents menés par le groupe de Marta Shahbazi suggèrent que l'architecture épiblastique, complètement épithélialisée, augmente le seuil de signalisation requis pour amorcer une différenciation mésodermique (M. Shahbazi, ISSCR 2021, travaux non publiés). Ainsi les cellules souches pluripotentes amplifiées *in vitro* dans C-Stem™ auraient une pluripotence plus stable que dans des systèmes de culture 2D ou agrégats, qui n'ont pas une épithélialisation aussi prononcée (Hamidi *et al.*, 2020 c ; Persa & Niessen, 2019). Enfin, une autre propriété du lumen épiblastique pourrait renforcer cette stabilité ; il concentre les facteurs autocrines excrétés aux pôles apicaux des cellules jusqu'à 2500 fois plus élevés que les niveaux mesurés dans le surnageant des cultures en 2D (M. Shahbazi, *In the stem cell jungle podcast*, 2022).

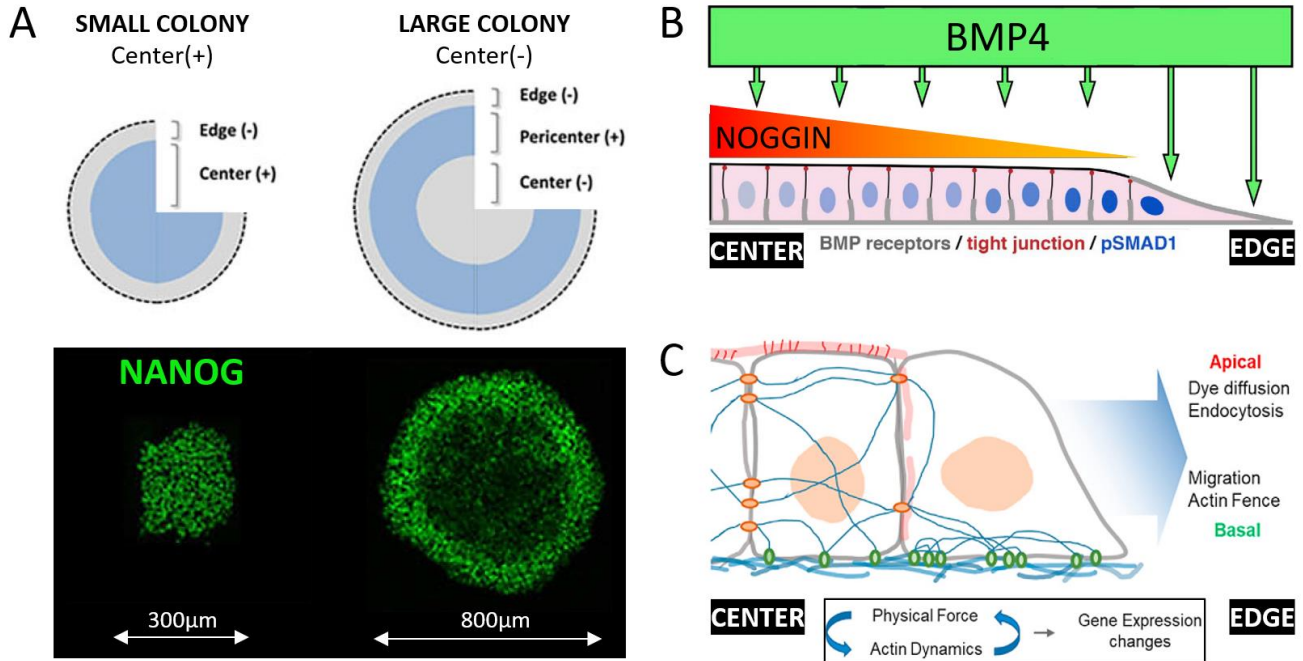


Figure 61. « Effet bord » et hétérogénéité des colonies de cellules souches pluripotentes en 2D

(A) Au-delà de 300 µm de diamètre, une colonie de cellules souches en 2D présente une hétérogénéité bord/centre qui se traduit par une baisse d'expression centrale des facteurs de transcription NANOG et OCT4. Adapté de « Mesenchymal-epithelial transition regulates initiation of pluripotency exit before gastrulation » par Hamidi et al., 2020b. (B) Les jonctions serrées du pôle apical (protéine ZO1, en rouge sur la figure) scellent la surface des colonies. En situation physiologique, ce cloisonnement des pôles cellulaires apicaux et baso-latéraux implique que les récepteurs membranaires de ces deux domaines distincts n'ont pas un accès égal aux molécules de signalisation. Cette séparation n'est pas présente à la périphérie des colonies : les récepteurs apicaux et basaux ont la même exposition. Lors d'une exposition au BMP4 (facteur de croissance impliqué dans la différenciation précoce des cellules souches pluripotentes), l'hétérogénéité d'accessibilité des récepteurs au BMP4 entre le bord et le centre des colonies peut entraîner des différences de signalisation et expliquer des différences d'identité cellulaire bord/centre. Adapté de « Opening the black box: Stem cell-based modeling of human post-implantation development » par Taniguchi et al., 2019. (C) La différence de forces mécaniques entre le bord et le centre des colonies induit une différence d'expression génique qui provoque des différences de fonction et d'identité entre le bord et le centre de la colonie. Adapté de « Cell position within human pluripotent stem cell colonies determines apical specialization via an actin cytoskeleton-based mechanism » par Kim et al., 2021.

4.4 ÉTHIQUE DES ÉPIBLASTOÏDES

Les recherches sur les cellules souches soulèvent des questions éthiques. La crainte d'une utilisation abusive des chimères, la génération de gamètes, d'embryons, l'implantation *in vivo* de structures embryonnaires de synthèse, la génération d'organes, le clonage et le transhumanisme ont entraîné de longue date des réflexions éthiques (Clark *et al.*, 2021 ; King & Perrin, 2014 ; Mollaki, 2021 ; Rivron & Pera, 2018 ; Saha *et al.*, 2010 ; Sipp *et al.*, 2018 ; Towns, 2017).

Au vu de l'évolution extrêmement rapide des structures embryoides issues de cellules souches, plusieurs mises à jour récentes proposent des adaptations à la règle des 14 jours (Daley *et al.*, 2016 ; ISSCR, 2021 ; Sawai *et al.*, 2020). Eu égard à ces nouvelles recommandations, nous précisons que les épiblastoïdes appartiennent à la catégorie 1 ISSCR2021 (International Society for Stem Cell Research). Ils n'ont donc pas à faire l'objet d'une supervision particulière, et ce pour plusieurs raisons (cf. figure 62).

- Ils ne peuvent en aucun cas évoluer vers un embryon complet.
- Ils sont dépourvus de cellules extraembryonnaires ou de cellules germinales.
- Ils correspondent à un stade péri-implantatoire et pré-gastrulation.
- Ils ne sont pas issus d'embryons ou de cellules souches embryonnaires, mais d'iPS.
- Ils ont un potentiel de développement « passif » leur permettant de se différencier vers les 3 feuillets primordiaux.

CATEGORY 1	CATEGORY 2	CATEGORY 3
<p>1A Exempt from review by a specialized oversight process</p> <ul style="list-style-type: none"> • Most <i>in vitro</i> pluripotent stem cell research • Most <i>in vitro</i> organoid research • Transfer of human stem cells into postnatal animal hosts 	<p>2 Reviewed by a specialized oversight process</p> <ul style="list-style-type: none"> • Procurement of embryos, or gametes for the creation of embryos, for <i>in vitro</i> research • Derivation of cell lines from human embryos • Genetic alteration of embryos or gametes • <i>In vitro</i> culture of human embryos for research until the formation of the primitive streak or 14 days from fertilization, whichever occurs first • Human cells transplanted into nonhuman embryos that are gestated in a non-human uterus • Integrated stem cell-based embryo models • Transferring human embryos following MRT into a human uterus 	<p>3A Not allowed; currently unsafe</p> <ul style="list-style-type: none"> • Heritable genome editing • Transferring mtDNA-modified (not including MRT) embryos into a uterus • Using gametes differentiated from human stem cells for reproduction
<p>1B Reportable, but not typically reviewed by a specialized oversight process</p> <ul style="list-style-type: none"> • Non-integrated stem cell-based embryo models • <i>In vitro</i> culture of chimeric embryos (human cells into non-human embryos) • <i>In vitro</i> gametogenesis without fertilization or generation of embryos 		<p>3B Not allowed: lacks compelling scientific rationale or is ethically concerning</p> <ul style="list-style-type: none"> • Gestating human stem cell-based embryo models • Human reproductive cloning • Breeding human-animal chimeras where there may be human germ cells. • Transferring human-animal chimeric embryo(s) to a human or ape uterus • Transferring human embryo(s), irrespective of origins, to an animal uterus

Figure 62. Recommandations 2021 de l'ISSCR pour les cellules souches et modèles embryonnaires

Les épiblastoïdes appartiennent à la catégorie 1 (*Non-integrated stem cell-based human embryo model*). Les modèles embryonnaires issus de cellules souches sont rattachés à la catégorie 2 (*Integrated stem cell-based human embryo model, blastoids, gastruloids*) s'ils contiennent des types cellulaires extraembryonnaires leur permettant potentiellement de poursuivre un développement intégré. Adapté de « ISSCR guidelines for stem cell research and clinical translation: The 2021 update » par Lovell-Badge et al., 2021, et de « Human embryo research, stem cell-derived embryo models and in vitro gametogenesis: Considerations leading to the revised ISSCR guidelines » par Clark et al., 2021.

5. CONCLUSION DE LA PARTIE 1

La microfluidique permet de transférer les modèles biomimétiques académiques vers des applications thérapeutiques à grande échelle.

POINTS CLÉS

BIOPRODUCTION À GRANDE ÉCHELLE DE CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES

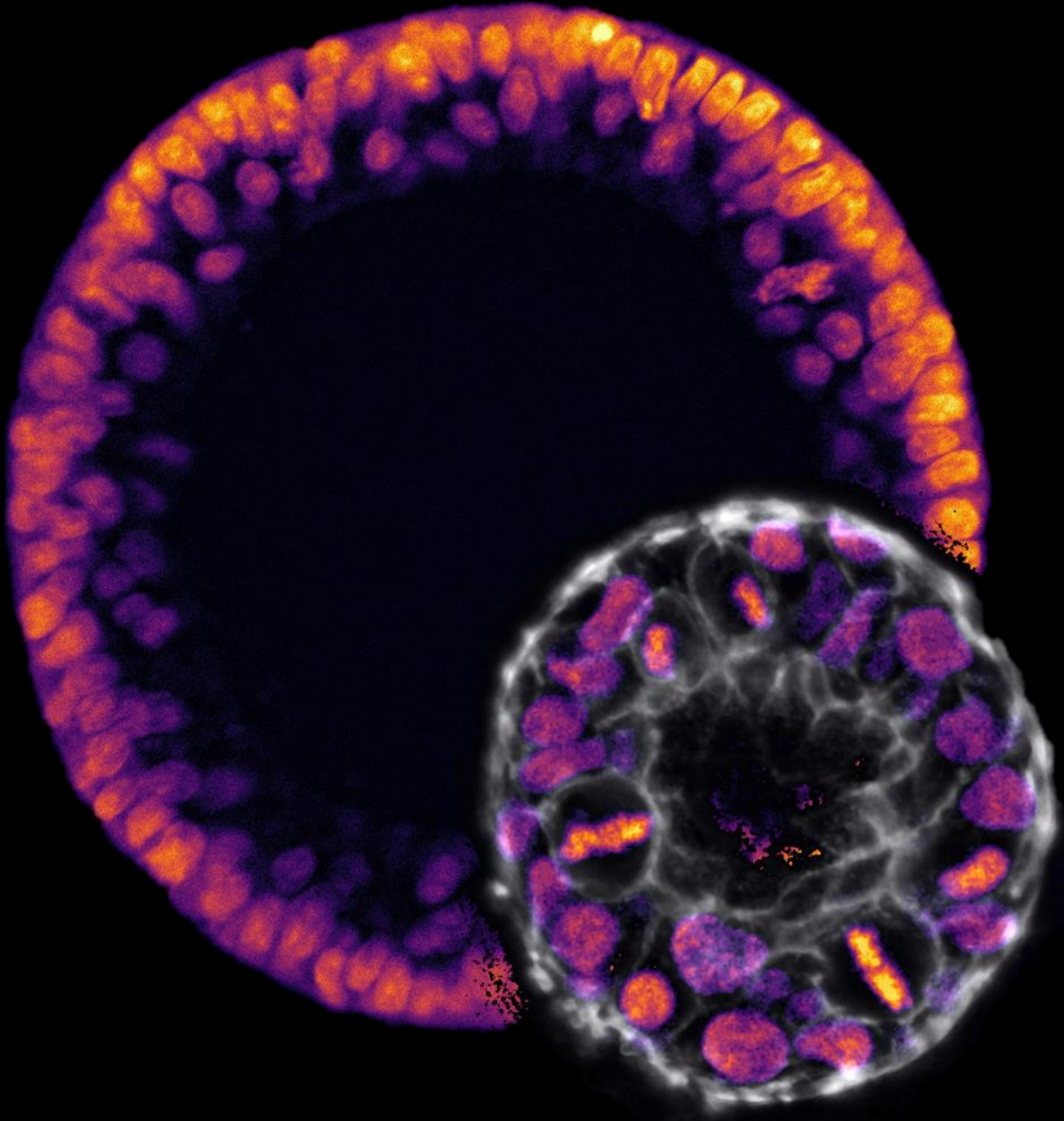
- 1^{re} culture à grande échelle d'épiblastoïdes encapsulés en bioréacteur.
- 3 000 microcapsules creuses/seconde/injecteur microfluidique.
- Amplification supérieure à 100/semaine avec toutes les lignées iPS testées. À notre connaissance, l'amplification la plus élevée observée *in vitro*, proche des taux de croissances *in vivo*.

Optimisation des paramètres de culture en bioréacteur : hypoxie et grandes capsules

- facteur d'amplification x 282/6,5 jours (PDT apparent ~19 h) ;
- lot de 15 milliards de cellules souches pluripotentes ;
- bioréacteur de 10 litres.

- Auto-organisation des cellules souches pluripotentes en colonies 3D et maintien du caractère souche et de la pluripotence en culture.
- Épiblastoïdes encapsulés semblables à l'épiblaste.
Leur évolution en capsule durant 5 à 7 jours est similaire à l'épiblastogenèse (épiblaste rosette puis disque épiblastique).
- Épiblastoïdes encapsulés homogènes et symétriques sans effet de bord ou cœur nécrotique.
- Gain de viabilité cellulaire (> 98 %).
- Indépendance de l'échelle à tous les volumes testés.

PARTIE 2 : GÉNÉTIQUE DES ÉPIBLASTOÏDES



MOTIVATIONS

Les cellules souches pluripotentes transmettent fidèlement l'information génétique (Weissbein *et al.*, 2014) : iPS et ES ont un taux de mutation 10 à 100 fois plus faible que les cellules somatiques (Cervantes *et al.*, 2002 ; Cooper *et al.*, 2017 ; Rouhani *et al.*, 2016). L'intégrité génétique est essentielle pour leur survie (Dumitru *et al.*, 2012), de même que pour le maintien de leur capacité d'autorenouvellement (Su *et al.*, 2019). En culture, elles ont également une intégrité génétique meilleure que les cellules souches adultes (Kuijk *et al.*, 2018).

Malgré leurs propriétés intrinsèques de faible fréquence mutationnelle, elles accumulent *in vitro* des mutations au moins 40 fois plus rapidement qu'*in vivo* (Kuijk *et al.*, 2018). Ces dernières touchent particulièrement les gènes associés aux cancers (Avior *et al.*, 2019 ; Merkle *et al.*, 2017) ; certains essais cliniques ont dû être interrompus à cause de mutations (Garber, 2015 ; C. Sheridan, 2021). Afin de garantir la sécurité des thérapies cellulaires, il est essentiel de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans cette dérive génétique. L'enjeu est d'autant plus important que ces thérapies cellulaires peuvent être constituées de milliards de cellules potentiellement modifiées génétiquement pour échapper au système immunitaire et que ces dernières peuvent rester dans l'organisme pendant des dizaines d'années.

Nous souhaitons examiner si la protection et le biomimétisme fourni par notre système de culture, sont une amélioration pour la montée en échelle de la bioproduction des thérapies cellulaires.

1. INTRODUCTION : GÉNÉTIQUE DES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES

1.1 IMPORTANCE DE L'INTÉGRITÉ GÉNÉTIQUE POUR LES THÉRAPIES CELLULAIRES

Le bon fonctionnement cellulaire dépend de l'intégrité du génome et l'accumulation de mutations peut fausser la modélisation des maladies, la biologie du développement, le *drug screening* ou les thérapies cellulaires (Ben-David, 2014). Pour que les cellules souches pluripotentes en culture constituent une source illimitée de cellules thérapeutiques, il est nécessaire que la transmission de l'information génétique soit le plus fidèle possible. Certaines mutations peuvent entraîner des dysfonctionnements et des biais d'identité cellulaires et leur conséquences vont au-delà de la sécurité thérapeutiques seule.

Sécurité thérapeutique :

- risque tumorigène (par dérive progressive de cellules différenciées excessivement mutées) ;
- effets indésirables dus à la présence de cellules extrathérapeutiques (par exemple, la présence de cellules sérotoninergiques dans une thérapie de remplacement dopaminergique pour la maladie de Parkinson (Carta *et al.*, 2010).

Efficacité thérapeutique :

- cellules dysfonctionnantes induisant des thérapies cellulaires pauci-efficaces (par altération d'un ou de plusieurs gènes clés pour la fonction cellulaire).

Production/Effort R&D :

- difficultés pour l'amplification des cellules souches ;
- complications pour la différenciation cellulaire (incomplète ou biaisée) ;
- manque d'homogénéité et reproductibilité intralignée et interlignée ;
- rejet de lot clinique, interruption d'essai clinique, coûts élevés.

1.2 NÉCESSITÉ D'UNE STRATÉGIE GLOBALE

Il est nécessaire de concevoir une stratégie globale pour produire des thérapies cellulaires plus sûres. La sélection d'une source cellulaire, le procédé de reprogrammation choisi, la méthode de différenciation et la procédure de greffe sont autant d'étapes où les mutations peuvent être générées et sélectionnées.

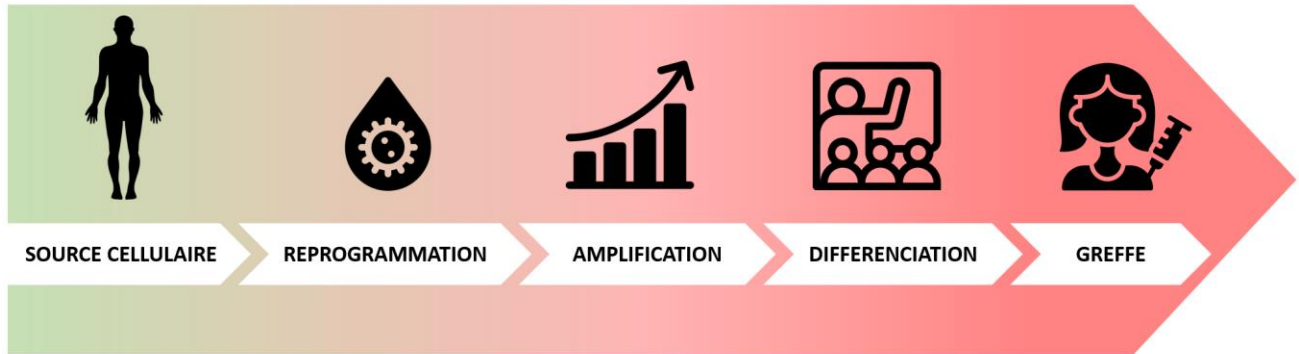
Une partie des mutations présentes dans les lignées iPS peut être causée par la méthode de reprogrammation et la source cellulaire initiale (Araki *et al.*, 2020 ; Attwood & Edel, 2019 ; D'Antonio *et al.*, 2018 ; S. M. Hussein *et al.*, 2011 ; J. Ji *et al.*, 2012 ; Steichen *et al.*, 2019 ; Turinetti *et al.*, 2017). Toutefois, des progrès récents ont été faits dans le domaine de la reprogrammation. Ils permettent d'envisager une génération initiale d'iPS de très bonne qualité (Araki *et al.*, 2020 ; K. Wang *et al.*, 2019).

De nos jours, la source principale des mutations et le goulot d'étranglement technologique concernent l'amplification des cellules souches dans des systèmes de culture *in vitro* (Yamanaka, 2020). Récemment, les acteurs de la bioproduction des cellules souches à visée thérapeutique ont développé de nouvelles stratégies. Ainsi l'entreprise Lonza propose de caractériser les lots de manière exhaustive avant chaque étape clef, permettant une stratégie pas-à-pas vers le produit final.

Cependant, il n'y a pas de contrôle qualité qui puisse certifier une sécurité ou une pureté génétique à 100 % de ces objets biologiques. Ainsi, la surveillance des cellules greffées devrait être poursuivie pendant toute la durée de leur persistance dans l'organisme. Idéalement, une stratégie de neutralisation ou de retrait complet, rapide et facile des cellules doit être anticipée. Dans cette optique, l'utilisation de gènes suicides (« *safety switch* ») (di Stasi *et al.*, 2011 ; Sahillioglu & Schumacher, 2021 ; Shi *et al.*, 2020) et les chambres cellulaires extractibles (Shapiro *et al.*, 2021 ; Yang *et al.*, 2021) devraient jouer un rôle important dans les années à venir.

D'autres risques doivent également être maîtrisés : présence de cellules souches résiduelles dans le produit final, existence de cellules différenciées indésirables, etc. En somme, rendre les thérapies cellulaires sûres et acceptables représente un défi global. Cela demande de prendre en compte des paramètres biologiques, technologiques, mais également de considérer d'autres types d'exigences : analyse de données complexes, régulation et psychologie (cf. figure 63).

EXIGENCES CELLULAIRES



EXIGENCES NON CELLULAIRES



Figure 63. Approche globale pour la sécurité et l'acceptabilité des thérapies cellulaires

La multiplication des cellules souches pluripotentes *in vitro* est l'une des multiples étapes nécessaires à l'élaboration de thérapies cellulaires sûres et maîtrisées.

1.3 DÉRIVE GÉNÉTIQUE DES CELLULES SOUCHES DURANT LEUR AMPLIFICATION *IN VITRO*

Le caryotypage a permis de montrer que les premières lignées embryonnaires humaines avaient un certain degré d'intégrité génétique (Brimble *et al.*, 2004). Toutefois, le caryotypage standard ne détecte que des aneuploïdies ou des remaniements chromosomiques de grande taille (>10 mégabases).

À partir de 2004, il a été montré que la reprogrammation et la culture prolongée des cellules souches pouvaient être associées à une dérive génétique (D. Baker *et al.*, 2007 ; Buzzard *et al.*, 2004 ; Draper *et al.*, 2004 ; Maitra *et al.*, 2005).

L'utilisation de techniques cytogénétiques de plus en plus sensibles, la cytogénétique moléculaire puis l'essor du séquençage ont permis de caractériser de manière plus précise cette dérive génétique (Kanchan *et al.*, 2020 ; L. C. Laurent *et al.*, 2011 ; Panopoulos *et al.*, 2017). Shinya Yamanaka précise, en 2020, que « l'expansion *in vitro* des cellules souches cause inévitablement des altérations génétiques » (Yamanaka, 2020).

On observe plusieurs types de mutations lors de la culture *in vitro* de cellules souches pluripotentes (J. Halliwell *et al.*, 2020 ; Kanchan *et al.*, 2020 ; L. C. Laurent *et al.*, 2011) (cf. figure 64).

- Aberrations chromosomiques et variants structuraux : aneuploïdie (trisomie, monosomie), insertion, délétion, variation du nombre de copies (CNV), inversions, duplications, translocations équilibrée ou non équilibrée.
- Mutations ponctuelles : insertion ou délétion de nucléotides (*Single nucleotide variant*, SNV).
- Aberrations épigénétiques (Bar & Benvenisty, 2019 ; Nazor *et al.*, 2012 ; Rohani *et al.*, 2014).
- Des mutations de l'ADN mitochondrial (Deuse *et al.*, 2019 ; Kosanke *et al.*, 2021), des réductions de la longueur des télomères (Fathi *et al.*, 2019 ; Rivera *et al.*, 2017 ; Rohani *et al.*, 2014 ; von Zglinicki, 2002), une dérive HLA et une érosion de l'inactivation du chromosome X ont également été relevées.

Certaines mutations sont observées de manière récurrente lors d'une culture prolongée en 2D.

- Les mutations ponctuelles les plus fréquentes concernent le gène P53, le « gardien du génome » (Avior *et al.*, 2019 ; Baumann, 2017 ; Merkle *et al.*, 2017).
- À l'échelle du chromosome, les trisomies 12, 17 et 20 sont fréquentes (D. Baker *et al.*, 2007 ; Draper *et al.*, 2004).
- Le variant structural le plus commun est l'amplification de la partie 11 du bras long du chromosome 20 : « 20q11.21 » (J. A. Halliwell *et al.*, 2021 ; Lefort *et al.*, 2008).

En sus des mutations récurrentes, il faut aussi considérer des mutations non récurrentes et des modifications génétiques que l'on ne peut pas encore détecter.

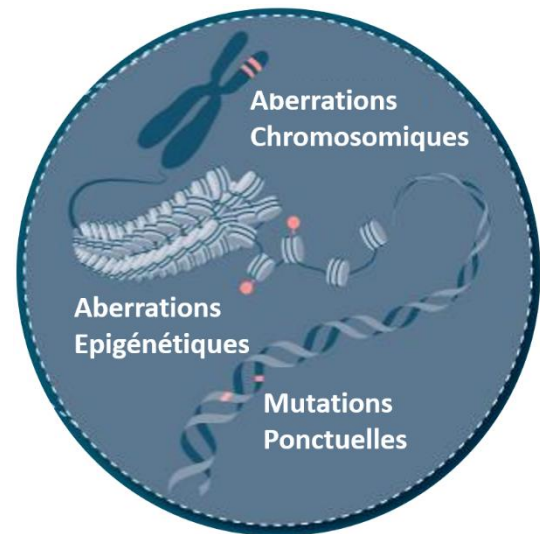


Figure 64. Principaux types de mutations

Dans cette seconde partie, nous avons choisi d'étudier la mutation 20q11.21 (variant structurel par duplication). Cette dernière, fréquente en culture *in vitro*, a des répercussions sur la différenciation et *in vivo* elle est fréquemment associée à différents cancers : sein, poumon, mélanome, hépatocarcinome, vessie, colon, etc. (Jo et al., 2020; Lefort et al., 2008). Vingt-trois gènes, a minima, se situent dans cette région amplifiée (cf. figure 65). Ils sont impliqués aux mécanismes de survie cellulaire (BCL2L1, PDRG1), de croissance cellulaire (ID1) ou de cycle cellulaire (TPX2, KIF3B) (Lefort *et al.*, 2008). L'avantage sélectif des cellules mutantes 20q11.21 en culture pourrait s'expliquer par différentes raisons :

- un cycle cellulaire plus rapide
- une meilleure survie cellulaire (Avery et al., 2013).
- une sélection manuelle lors des passages. En pratique ces cellules mutées 20q11.21 présentent des colonies dont l'aspect net est plus résilient ; en cas de passage manuel, l'opérateur pourrait, sur cette base, sélectionner ce mutant.
- l'indépendance vis-à-vis du FGF2 des cellules mutées (Werbowetski-Ogilvie et al., 2009).

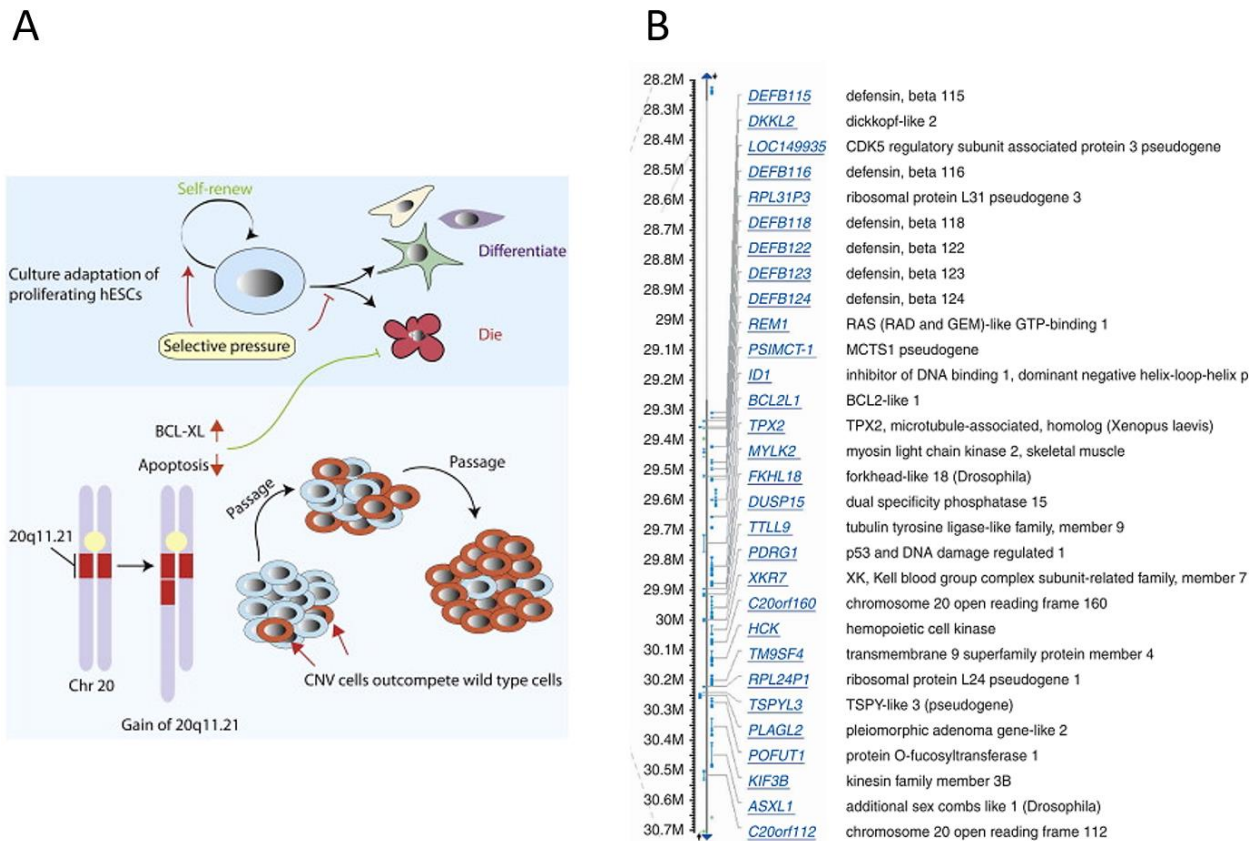


Figure 65. Amplification chromosomique 20q11.21

(A) L'amplification de la région 20q11.21 confère un avantage sélectif aux cellules souches pluripotentes. Adapté de « BCL-XL mediates the strong selective advantage of a 20q11.21 amplification commonly found in human embryonic stem cell cultures » par Avery et al., 2013. (B) Liste des gènes présents dans la région chromosomique 20q11.21. Adapté de « Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21 » par Lefort et al., 2008.

1.4 IN VITRO : ADAPTATION DES CELLULES AUX CONDITIONS DE CULTURE

Des cellules souches présentes au sein d'une même culture et issues d'un clone initial identique divergent progressivement par accumulation de mutations successives. Certaines d'entre elles sont neutres, mais d'autres peuvent conférer un avantage sélectif. Dans un environnement rigoureux, quand les nutriments sont rares ou que la place est insuffisante, les cellules les plus aptes survivent et se développent.

In vitro, au fil du temps passé en culture, par mutagenèse et sélection, les cellules s'adaptent aux conditions de culture (D. Baker *et al.*, 2007 ; Barbaric *et al.*, 2014) (cf. figure 66).

Les fonctions cellulaires pouvant contribuer à l'avantage sélectif sont nombreuses : les circuits du cycle cellulaire, de l'apoptose, de la différenciation, de l'adhésion cellulaire, de la réparation de l'ADN sont autant de processus clefs (J. Halliwell *et al.*, 2020 ; Price *et al.*, 2021).

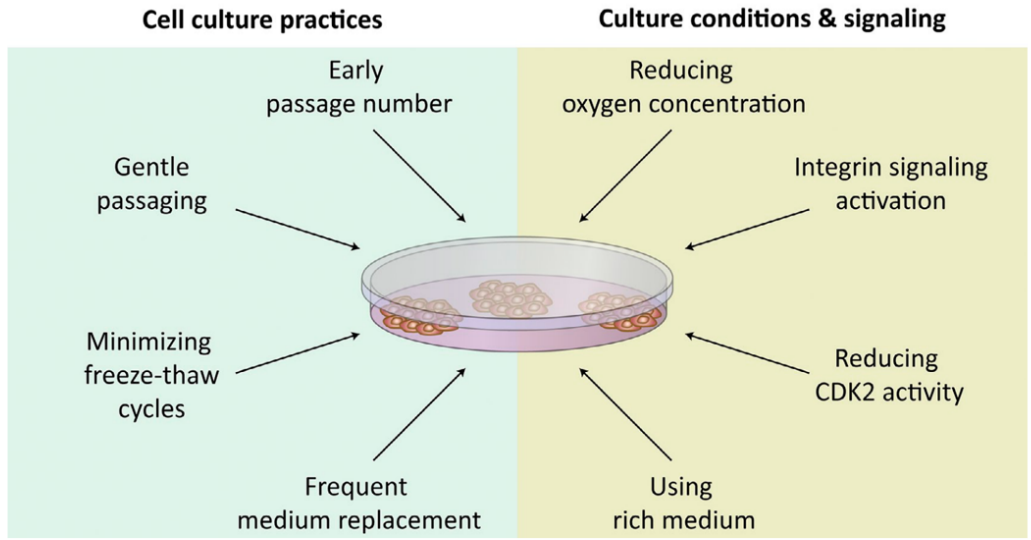
Différents paramètres de culture tels que la matrice utilisée, le passage par dissociation enzymatique ou la dissociation en cellules uniques influencent grandement cette dérive génétique (Bai, 2013 ; Bai *et al.*, 2013, 2015 ; Garitaonandia *et al.*, 2015 ; Weissbein *et al.*, 2014). Grâce au biomimétisme et à la diminution du stress oxydatif induit, des améliorations des conditions de cultures ont récemment été proposées pour diminuer le taux de mutation :

- Milieux riches en nucléosides : « Nucleosides Rescue Replication-Mediated Genome Instability of Human Pluripotent Stem Cells » (J. A. Halliwell *et al.*, 2020)
- Physioxie (hypoxie) : « Low rates of mutation in clinical grade human pluripotent stem cells under different culture conditions » (Thompson *et al.*, 2020).

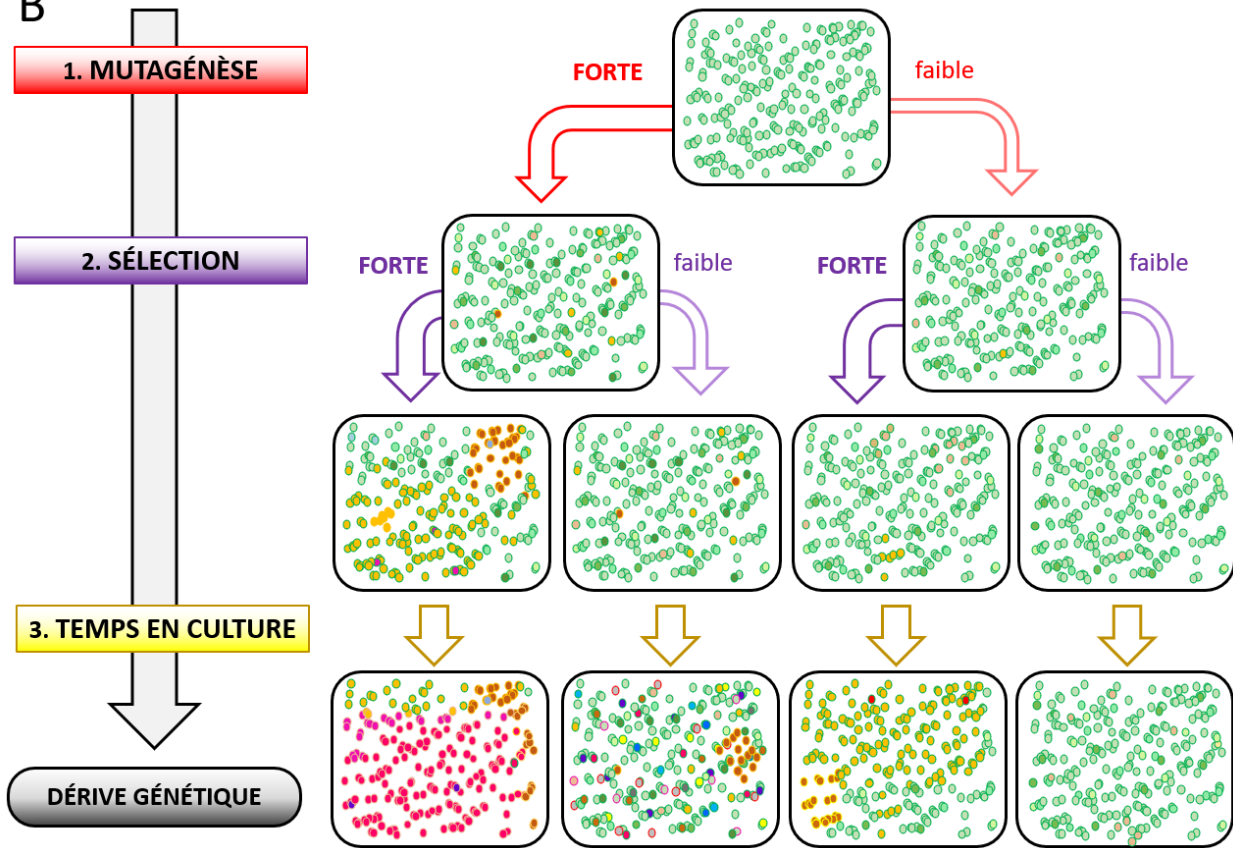
Figure 66. Adaptation des cellules souches aux conditions de culture (page suivante)

(A) Stratégies et conditions de culture favorables à l'intégrité génétique des cellules souches pluripotentes. Adapté de « Genome maintenance in pluripotent stem cells » par Weissbein *et al.*, 2014. **(B)** Rouages de la dérive génétique en culture. La mutagenèse, la sélection et le temps prolongé en culture constituent les trois moteurs de la dérive génétique. Idéalement, pour préserver la qualité des cellules, il faut agir en synergie sur trois points : qu'il y ait peu de mutagenèse, peu de sélection des mutants et un temps en culture minimal.

A



B



1.5 *IN VIVO* : CONTRÔLE QUALITÉ ÉPIBLASTIQUE

La sélection positive des cellules mutées par avantage compétitif peut être contrebalancée par des processus de sélection négative, c'est-à-dire une élimination des cellules « anormales ». Ces processus de compétition cellulaire au niveau microtissulaire constituent une forme de contrôle qualité naturel (cf. paragraphe intégrité génétique des organoïdes et figure 25).

Dans l'épithélium épiblastique, des anomalies de certaines fonctions ou d'identités cellulaires, des anomalies chromosomiques (Bolton *et al.*, 2016 ; Sancho *et al.*, 2013) ou mitochondriales (Lima *et al.*, 2021) peuvent être éliminées activement (cf. figure 67). Les voies de signalisation YAP/TAZ (Hashimoto & Sasaki, 2019), MYC (Clavería *et al.*, 2013 ; Díaz-Díaz *et al.*, 2017), P53 et mTOR (Bowling *et al.*, 2018 ; Singla *et al.*, 2020 ; G. Zhang *et al.*, 2017), particulièrement étudiées, participent à l'élimination des cellules non adaptées.

Lewis Wolpert disait en 1986 « *It is not birth, marriage or death, but gastrulation which is truly the most important time in your life* ». L'embryon et plus particulièrement l'épiblaste, opèreraient un contrôle qualité naturel, une « sélection purifiante » (Lima *et al.*, 2021). Celle-ci garantit l'identité, la vitalité et l'intégrité génétique avant de s'engager dans la gastrulation et la différenciation.

S'appuyant sur la capacité des organoïdes à préserver l'intégrité génétique de manière comparable à *l'in vivo*, Magdalena Zernicka-Goezt *et al.* (Singla *et al.*, 2020) utilisent un modèle épiblastoïde *in vitro* pour étudier les mécanismes d'élimination des cellules aneuploïdes dans les épiblastes. Les résultats suggèrent que les cellules aneuploïdes sont éliminées des épiblastoïdes par apoptose autophagique, ce qui laisse une place suffisante aux cellules euploïdes pour proliférer (cf. figure 68).

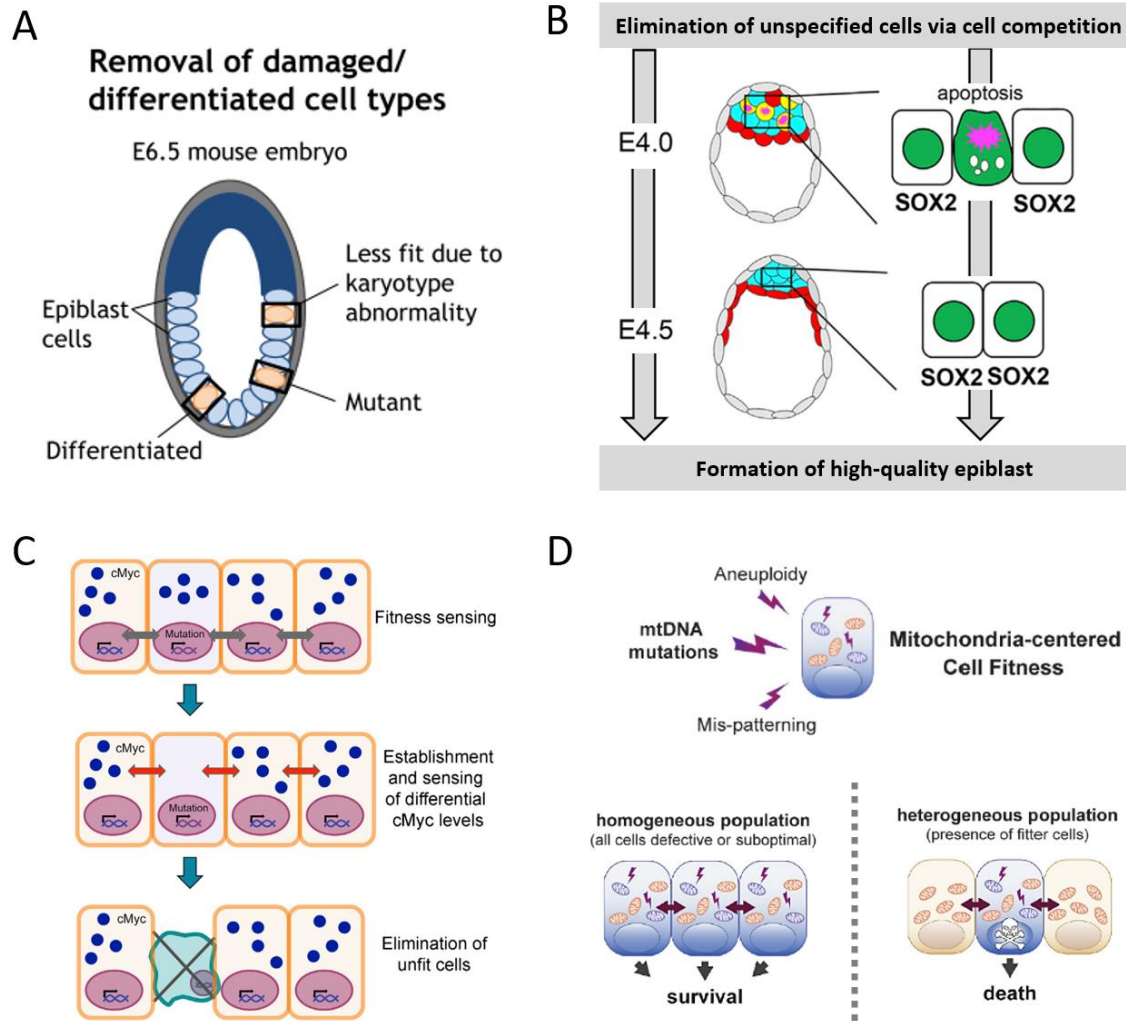


Figure 67. Contrôle qualité de l'épiblaste *in vivo*

(A) Adapté de « Cell competition: The winners and losers of fitness selection » par Bowling et al., 2019. (B) Adapté de « Epiblast formation by TEAD-YAP-dependent expression of pluripotency factors and competitive elimination of unspecified cells » par Hashimoto & Sasaki, 2019. (C) Adapté de « Competitive interactions eliminate unfit embryonic stem cells at the onset of differentiation » par Sancho et al., 2013. (D) Adapté de « Cell competition acts as a purifying selection to eliminate cells with mitochondrial defects during early mouse development » par Lima et al., 2021.

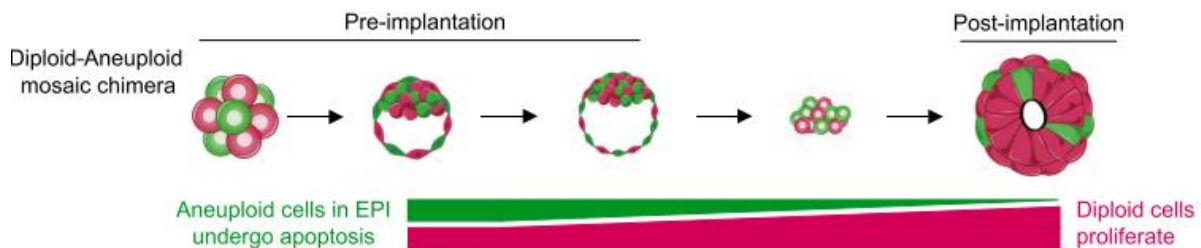


Figure 68. Contrôle qualité épiblastoïde *in vitro*

Adapté de « Autophagy-mediated apoptosis eliminates aneuploid cells in a mouse model of chromosome mosaicism » par Singla et al., 2020.

2. RÉSULTATS

Dans cette sous-partie expérimentale, nous nous sommes principalement intéressé à la sélection positive de la mutation 20q11.21 (partie 2.1 des résultats). Au vu de l'importance de la structure tissulaire dans l'intégrité génétique des organoïdes et des épiblastes, nous présentons des données préliminaires sur la structure de nos colonies en 3D (partie 2.2 des résultats).

2.1 COMPARAISON DE LA SÉLECTION D'UNE MUTATION 20q11.21 LORS DE CULTURES PROLONGÉES EN AGRÉGATS, 2D ET ÉPIBLASTOÏDES ENCAPSULÉS

Nous souhaitons évaluer la capacité des cultures d'épiblastoïdes encapsulés à préserver la qualité génomique. Pour l'article « C-stem : Engineering niche-like micro-compartments for optimal and scale-independent expansion of human pluripotent stem cells in bioreactors » nous avons procédé à un contrôle par caryotype SNP haute résolution avant et après une amplification capsulaire d'une semaine. Bien que ce test nous ait permis d'évaluer les cellules produites, il ne nous permet pas de jugement sur l'intégrité génétique à long terme. Il ne nous a pas permis non plus, d'étudier les mécanismes de mutagenèse ou de sélection propres aux épiblastoïdes.

Dans cette seconde partie, nous avons choisi d'étudier la sélection en culture prolongée de l'aberration chromosomique récurrente la plus fréquente, 20q11.21.

Le lot congelé de la ligné iPS utilisée dans cette partie présente une caractéristique clef que nous avons exploitée : la présence de cellules mutées 20q11.21 indétectable avant que la mise en culture ne la révèle. Nous avons alors utilisé ce lot contenant moins de 1 % de cellules mutées et avons évalué la vitesse d'émergence de cette mutation dans trois systèmes distincts : 2D standard, agrégats en suspension agitée et épiblastoïdes encapsulés en suspension agitée. Nous avons choisi des paramètres de culture représentant les conditions optimales standards de ces systèmes (cf. figure 69).

Cette expérience nous a aussi permis de suivre la stabilité génotypique après de multiples réencapsulations. La stabilité phénotypique était également caractérisée tout au long de la culture.

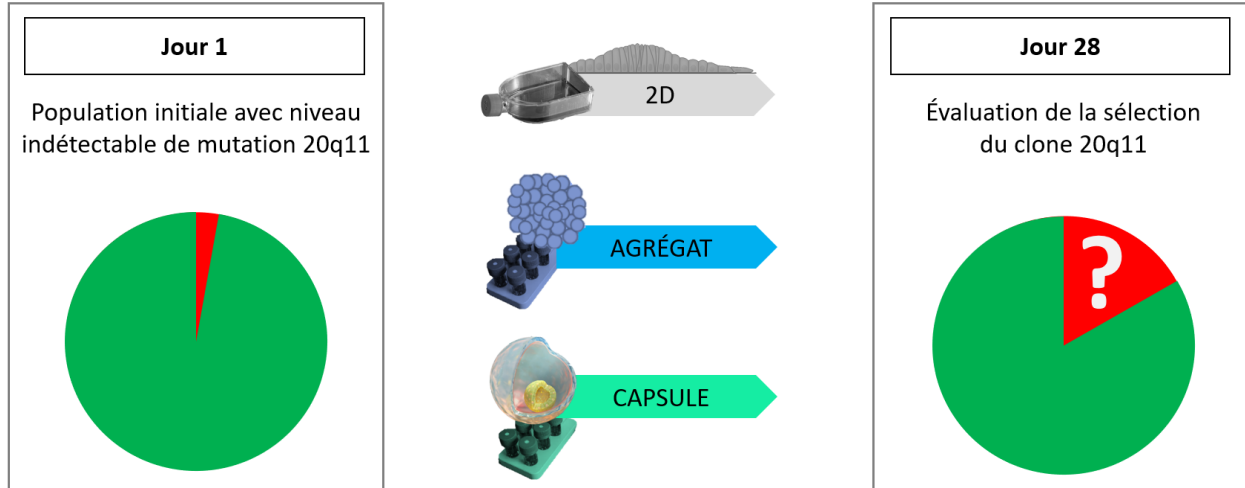


Figure 69. Plan expérimental QC-Stem

Évaluation de la sélection d'un clone muté 20q11.21 lors d'une culture prolongée d'iPS (lignée IMAGINE005) dans deux systèmes de culture conventionnels et sous forme d'épiblastoïdes encapsulés C-Stem. [2D] Culture en 2D conventionnelle en flasques statiques : passage tous les 4 jours +/- 1 jour en fonction de la confluence, dissociation enzymatique brève et incomplète pour ensemencement de petits amas cellulaires sur un revêtement Matrigel®. [Agréats] Culture en 3D conventionnelle, agrégats en suspension agitée : passage tous les 5 jours. [Capsules] Culture en 3D encapsulée en suspension agitée, passage tous les 7 jours par dissociation enzymatique partielle et réencapsulation. Le protocole est un protocole « Matrigel®, petite capsule, normoxie ». [Protocoles] Milieux de culture mTeSR1 sans antibiotique, avec renouvellement quotidien pour tous les bras expérimentaux. Tous les passages étaient enzymatiques avec une dissociation partielle et 24 heures d'inhibition ROCK. Tous les *coatings* (2D et capsules) ont été faits avec le même lot de Matrigel®. Les cultures des agrégats et des capsules en suspension ont été réalisées avec un bioréacteur 30mL Able Bioreactor Minibio (bioréacteur minimaliste avec agitation continue, mais pas de contrôle actif des paramètres de culture).

Aucune contamination n'a été constatée à la suite des 28 jours de culture et des quatre réencapsulations. Pour la 2D et les agrégats, respectivement six et cinq passages ont été nécessaires. Pour chacun des trois bras expérimentaux, chaque passage a permis un échantillonnage pour caractérisation génotypique et phénotypique. L'évaluation de l'amplification, de la viabilité et des marqueurs de pluripotence a tout d'abord contribué à évaluer le bon déroulement et la conformité des systèmes de culture (cf. figure 70).

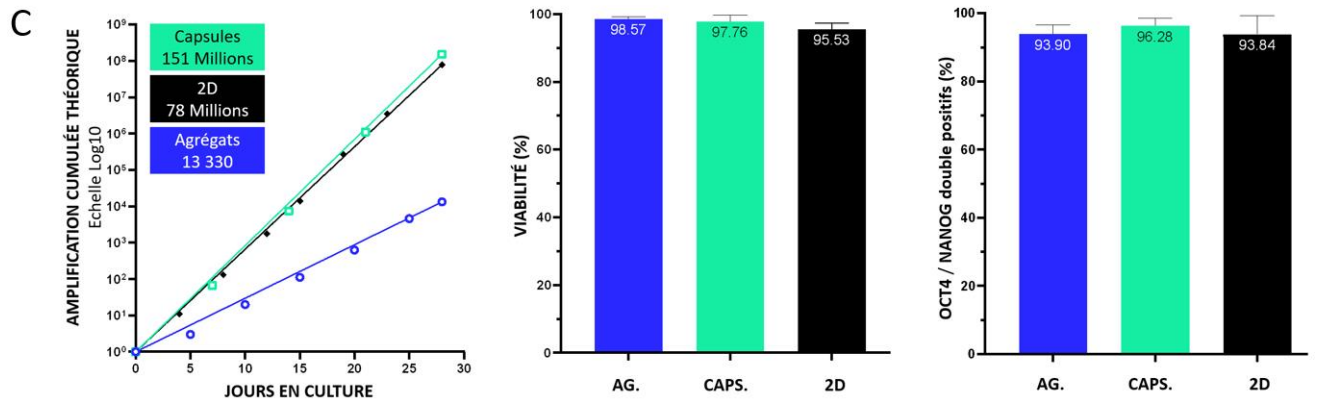
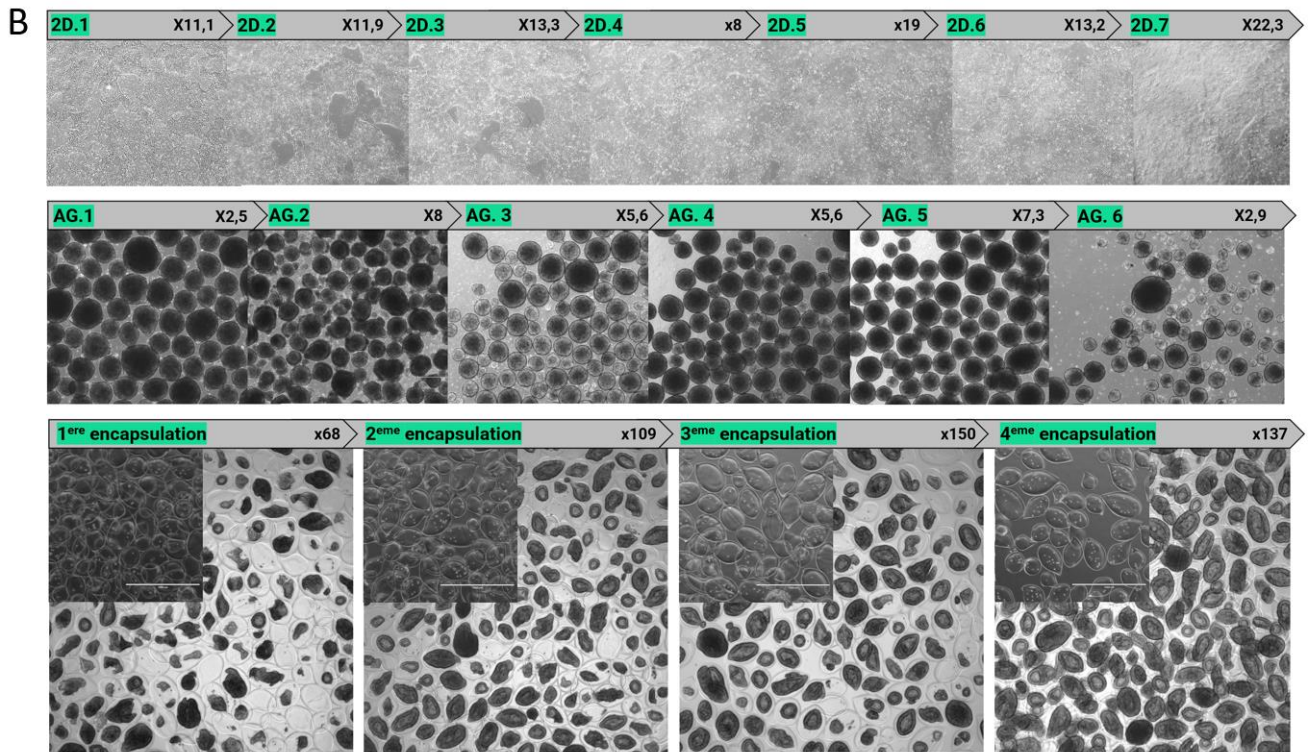
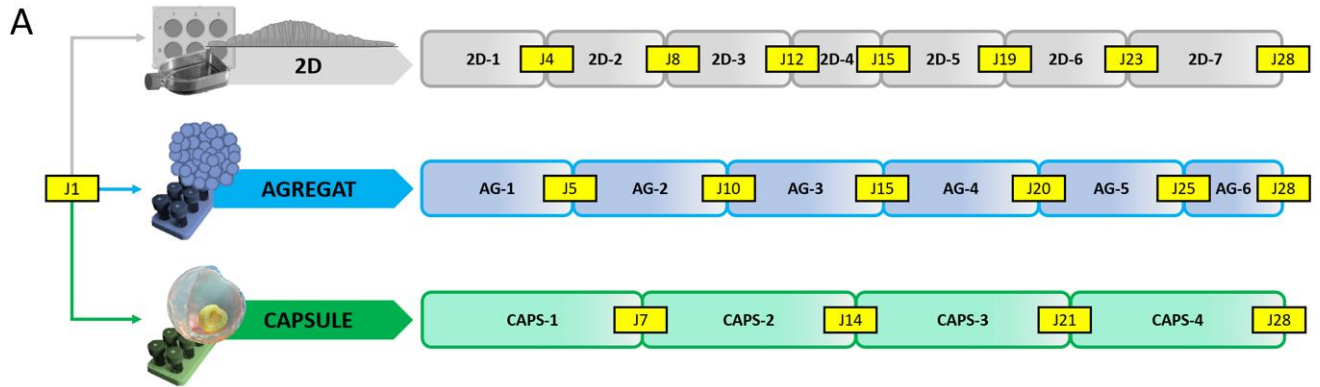
L'amplification moyenne par passage a été respectivement de $14,1 \pm 4,9$ sd, $5,3 \pm 2,2$, et 116 ± 36 pour la culture en 2D, les agrégats et les capsules. L'amplification cumulée théorique a atteint 151 millions en 28 jours pour les capsules avec un nombre de cycle « *Population Doubling Level* » = PDL=27,2. Pour la 2D, ce résultat quantitatif a été similaire, avec un facteur d'amplification cumulé de 78 millions (PDL = 26,2). L'amplification cumulée des agrégats a été très inférieure et s'est établie à 13 330 en 28 jours (PDL = 13,7) (cf. figure 70). On observe que le facteur d'amplification a tendance à augmenter, au fur et à mesure des encapsulations successives.

La viabilité moyenne au moment des passages a été supérieure à 95 % pour chacun des trois systèmes, ce qui est conforme aux bonnes pratiques de culture de cellules souches pluripotentes. Pour la culture en 2D, nous avons également quantifié la proportion de cellules flottantes qui surnageaient quotidiennement dans les flasques. En effet, bien que ce phénomène soit commun, il nous a paru important de le quantifier. Ainsi, avec des conditions conformes aux standards (sans dissociation complète, avec ROCK inhibition), nous avons mesuré à J1 et à J2 36,5 % de cellules perdues quotidiennement (mortes ou surnageantes). Entre J2 et J5 (avant confluence), le nombre de cellules perdues quotidiennement s'est stabilisé entre 10 et 18 %. Au total, environ 25 % des cellules produites en cinq jours de passage sont mortes ou ont été perdues dans le surnageant. Ces résultats concordent avec la littérature (Q. Li *et al.*, 2018). Ils montrent qu'en dépit de la viabilité apparente élevée des cultures 2D, la mortalité et la pression de sélection y sont, en réalité, très fortes.

L'évaluation à chaque passage par cytométrie en flux des marqueurs de pluripotence OCT4 et NANOG a permis de montrer également la maintenance phénotypique pour chacun des trois bras expérimentaux. D'un point de vue morphologique, les phénotypes de colonies en 2D, agrégats ou épiblastoïdes se sont montrés stables au cours du temps et des passages. On note que la culture en capsules de colonies cystiques est particulièrement homogène à J28 (cf. figure 70).

Figure 70. Résultats QC-Stem : morphologie, amplification, viabilité et cytométrie (page suivante)

(A) Représentation des trois bras expérimentaux et des passages successifs et réencapsulations nécessaires. **(B)** Images microscopiques représentatives des colonies en 2D et 3D au moment de chaque passage, le facteur d'amplification apparent étant précisé pour chaque passage. **(C)** Facteur d'amplification cumulé théorique en fonction du nombre de jours en culture, viabilité moyenne au moment des passages, pourcentage moyen de cellules souches doublement positives pour les marqueurs OCT4 et NANOG en cytométrie en flux au moment des passages.



La mutation 20q11.21 a été suivie principalement par ddPCR (à chaque passage, Stemgenomics) et par SNP haute résolution (au début et à la fin; collaboration avec l'Institut Curie, plateforme de génomique, David Gentien).

Afin de rechercher des anomalies non récurrentes et de couvrir l'ensemble du génome, une analyse par puce SNP haute résolution a été réalisée (cf. figure 71). Les 2 millions de sondes ont permis de détecter des anomalies à partir de 1 Mb (distance moyenne inter-sondes de 700 bases).

La seule apparition de mutation structurale détectable entre J1 et J28, se situe sur le chromosome 20. La mutation observée est une duplication chromosomique hétérozygote incluant la région 20q11.21 et semblant couvrir l'intégralité du bras (20q). Une cellule mutée comporte trois copies de cette région 20q11.21, au lieu de deux. On observe également une perte chromosomique hétérozygote sur l'ensemble du petit bras du chromosome 20. À J28, les fréquences alléliques permettent d'estimer le pourcentage de cellules mutées à 50 %, 50 % et 10 %, respectivement pour les cultures en 2D, agrégats et encapsulées.

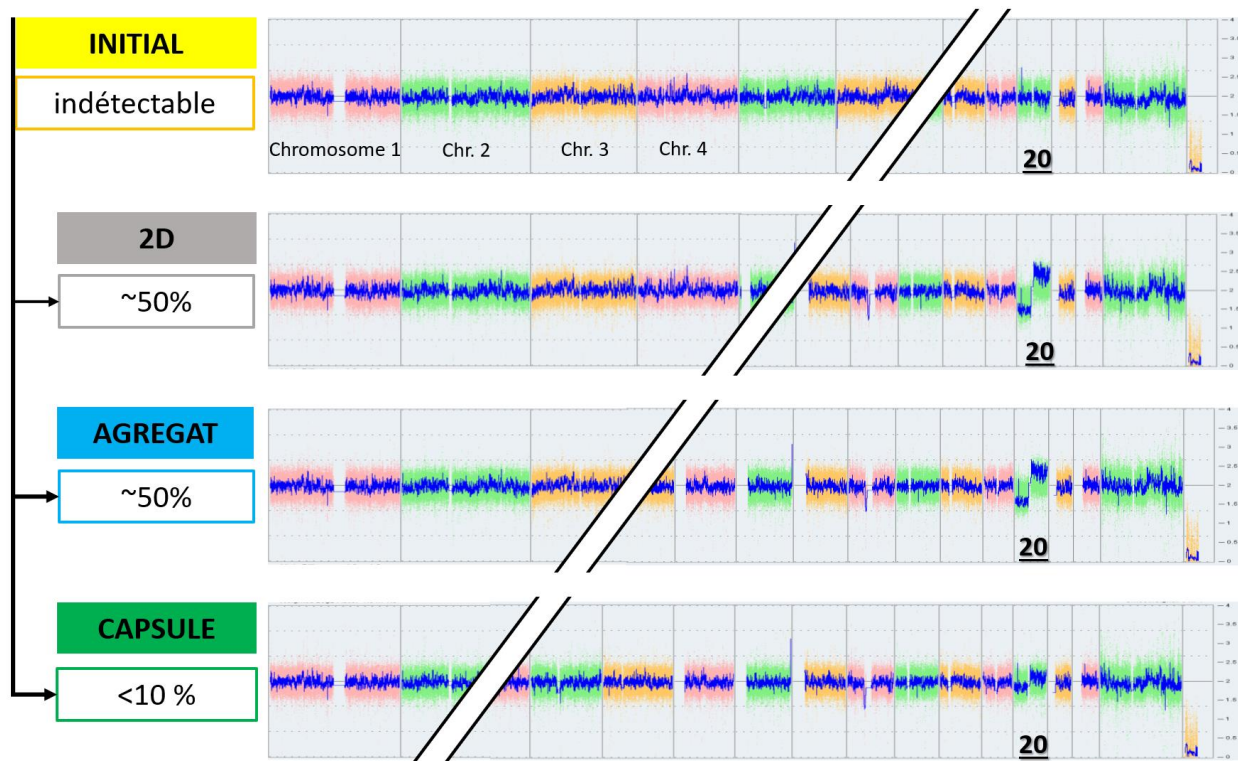


Figure 71. Résultats QC-Stem : analyse SNP des génomes initiaux et finaux

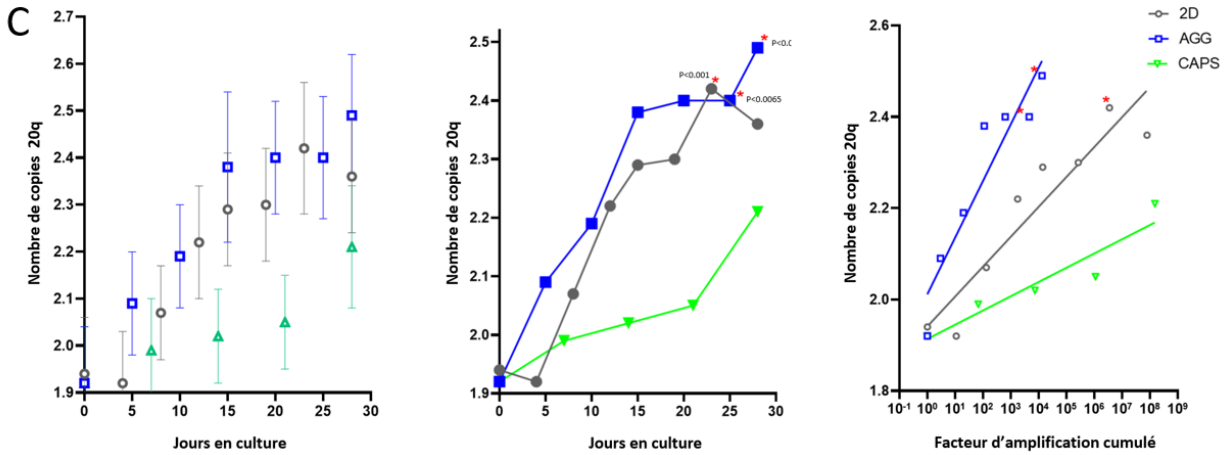
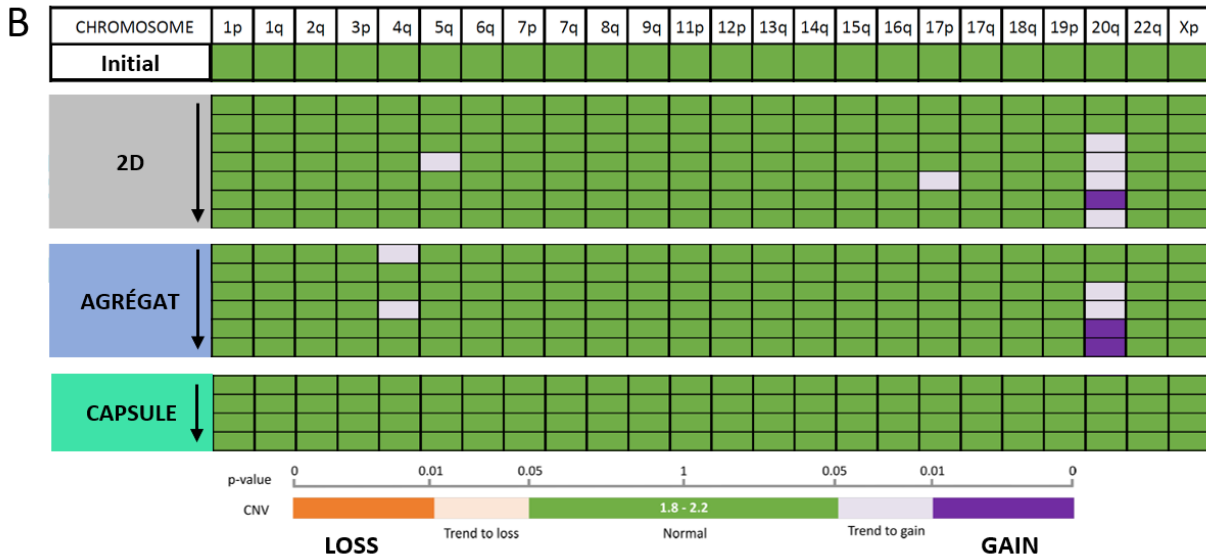
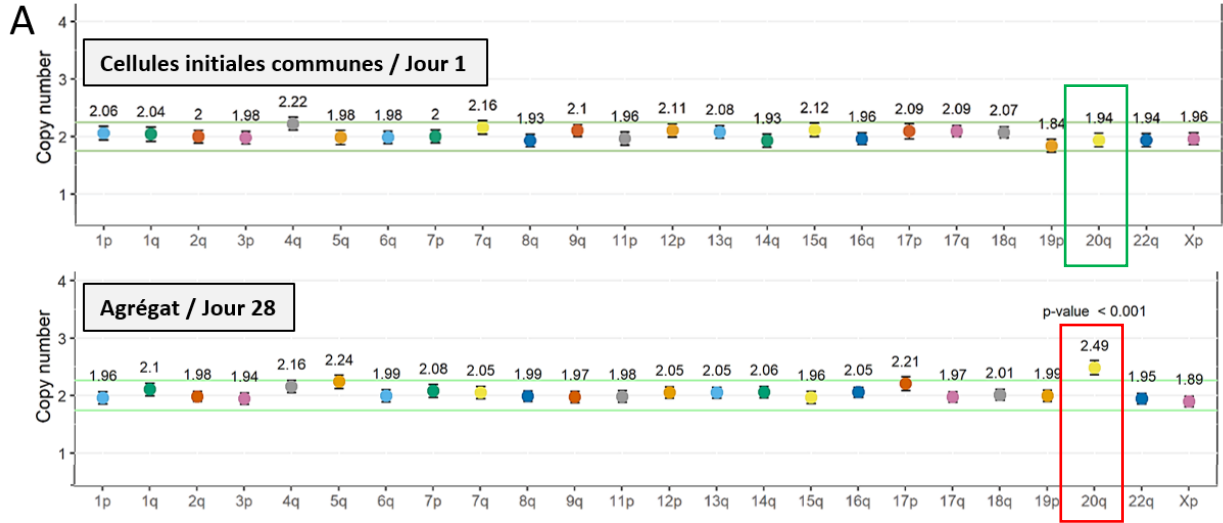
Caryotypes virtuels issues d'une puce *Genome-wide human SNP Array 6.0 affymetrix* de Thermo Fisher. Ces analyses ont été réalisées à l'Institut Curie (plateforme de génomique, David Gentien).

Pour suivre la dynamique de sélection au cours du temps, des échantillons ont été analysés à chaque passage avec un panel ddPCR ciblant 24 anomalies chromosomiques récurrentes pour les cellules souches pluripotentes (*Stemgenomics, Digital droplet PCR, iCS-digital™ 24 sondes*; Assou *et al.*, 2020; cf. figure 72) Seule la région 20q a montré une augmentation significative du nombre moyen de copies. En début de culture, le nombre de copies moyen 20q11.21 était initialement proche de deux, témoignant d'une proportion très faible de cellules mutées à J1. Par la suite, une augmentation du nombre moyen de copies a témoigné d'une sélection positive du clone mutant et de son pourcentage grandissant en culture. Un nombre de copies moyen de 2,5 copies sur l'échantillon correspond environ à 50 % de cellules mutées. On observe que la sélection des cellules mutées dans les capsules est au moins quatre fois plus lente que dans le bras expérimental agrégats et deux fois plus lente que dans le bras en 2D.

Un caryotypage très haute résolution, par marquage de fragments d'ADN très longs et l'utilisation de puces nanofluidiques a également été réalisée par l'équipe de David Gentien à la plateforme de génomique de l'Institut Curie (« *optical genome mapping* » Bionano). Elle corrobore les analyses ddPCR et SNP.

Figure 72. Résultats QC-Stem : évaluation de la dérivation génétique par ddPCR (page suivante)

(A) Panel ddPCR StemGenomics iCS digital 24 sondes : résultats pour l'échantillon initial (J0) et pour l'échantillon agrégat (J28). La seule déviation significative est observée pour la région 20q11.21 de l'échantillon agrégats. **(B)** Vue d'ensemble des analyses ddPCR réalisées à chaque passage. En vert figurent les sondes non significatives (sans gain ou perte chromosomique) ; en violet, les sondes significatives. **(C)** Évolution temporelle du nombre moyen de copies 20q11.21 en fonction du temps en culture ou rapportée au facteur d'amplification cumulé. La moyenne des écarts-types de l'ensemble des échantillons était de 0,12.



2.2 MAINTENANCE ET HOMOGENÉITÉ DES STRUCTURES ÉPITHÉLIALES

La structure épiblastoïde explique probablement, une partie du gain de qualité observé (cf. paragraphe 2.6 organoïdes et paragraphe 3.3 modèles épiblastiques).

Pour approfondir cette piste nous nous sommes intéressés aux différentes conformations des épiblastoïdes encapsulés. La croissance des colonies 3D en capsules est symétrique et homogène (cf. article C-Stem, figure 2). Des observations vidéo-microscopiques complémentaires nous ont permis d'observer les situations suivantes.

- Lorsque plusieurs cystes se développent dans un même microcompartiment capsulaire, ceux rentrant en contact peuvent fusionner s'ils sont petits ou se repousser s'ils sont plus gros. Dans les deux cas, le phénotype épithélial est stable (cf. figure 73A).
- Si un cyste croît au-delà des dimensions physiologiques (épaisseur de l'épithélium > 60 μm), on peut observer une « fracture » de l'épithélium et la formation de lumens secondaires intra-épithéliaux (cf. figure 73B-C).

Ces phénomènes de fusions de cystes et de lumens secondaires contrebalancent les fluctuations d'ensemencement des capsules et contribuent au maintien d'une homogénéité phénotypique des cellules en culture.

L'étude fine de la structure des cystes en microscopie confocale, nous permet d'en décrire les aspects suivants (cf. figure 73D-F).

Cystes de petite taille (~100 μm) :

- aspect cuboïde de l'épithélium ;
- tendance à l'orientation des mitoses de manière tangente à épithélium.

Cystes de grande taille (~200 μm) :

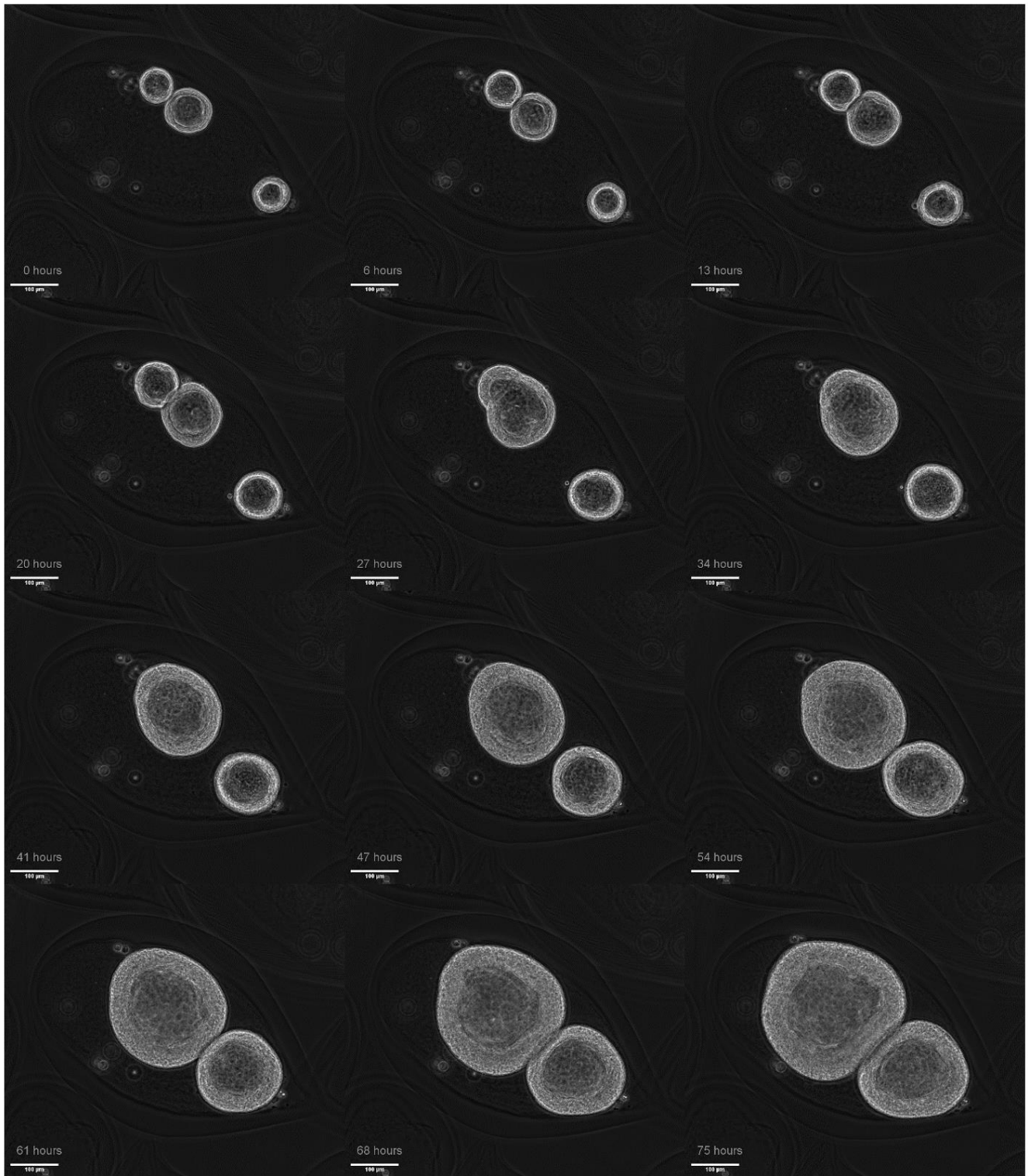
- aspect pseudostratifié ;
- noyaux semblant être répartis en deux strates, avec la majorité des noyaux du côté basal de l'épithélium ;
- mitoses à la face apicale de l'épithélium.

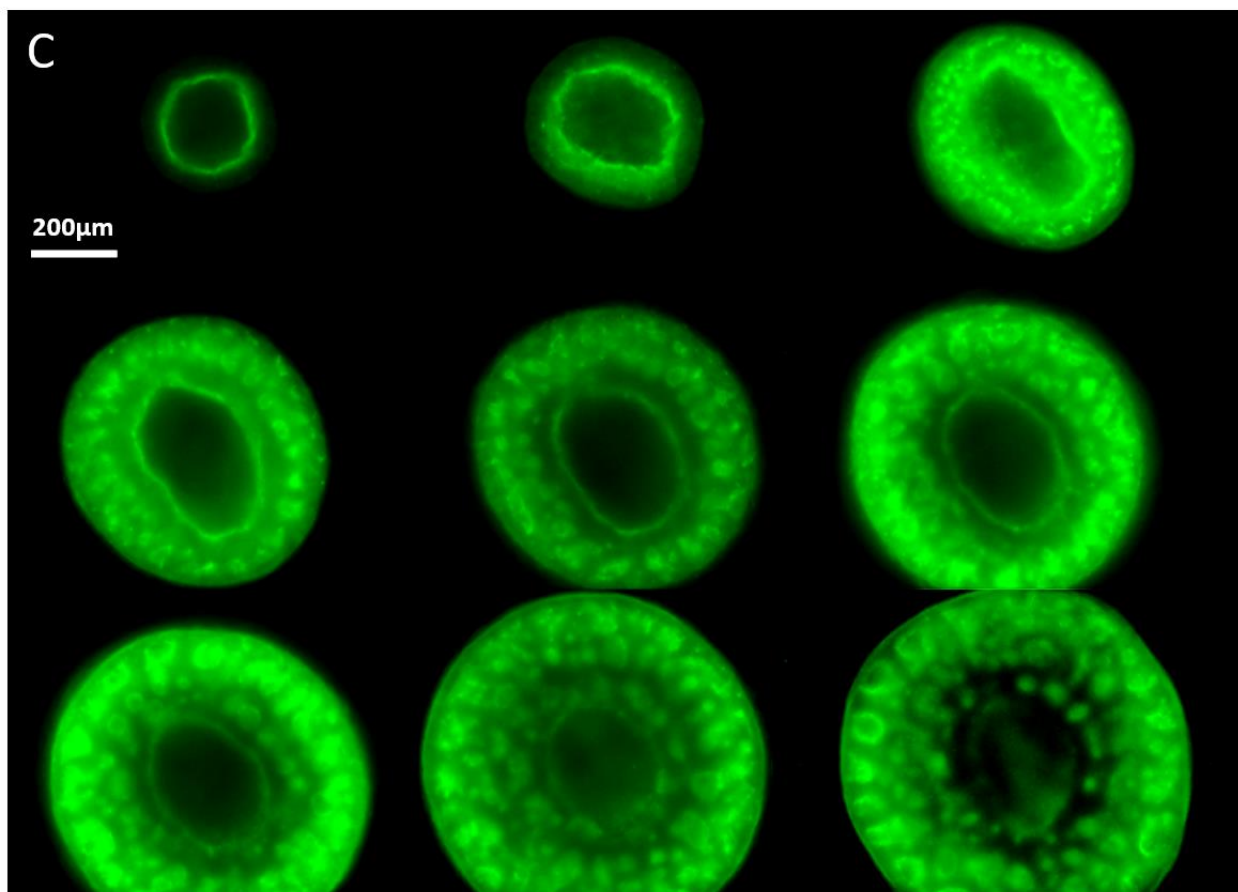
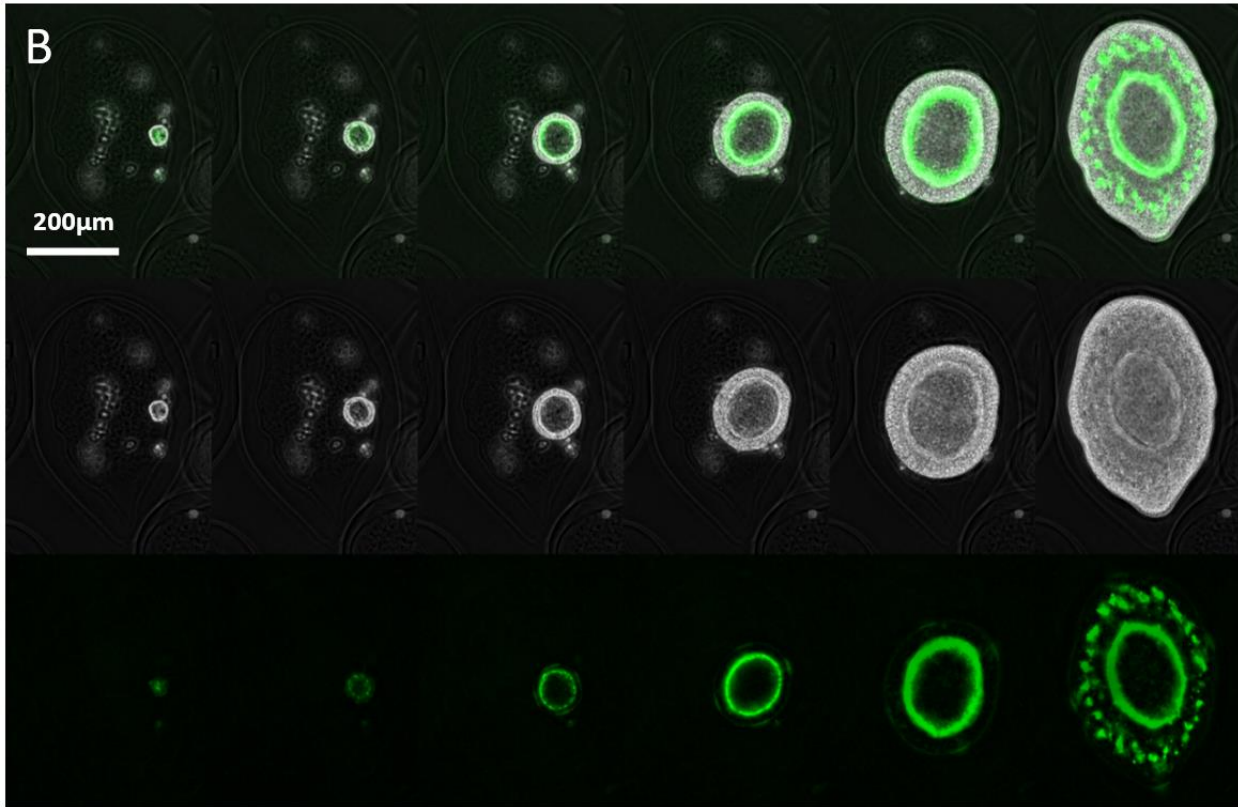
Ce travail préliminaire sur l'orientation des mitoses dans les épiblastoïdes encapsulés présente une ressemblance frappante avec celle présentée dans Knouse *et al* (introduction générale et figure 25).

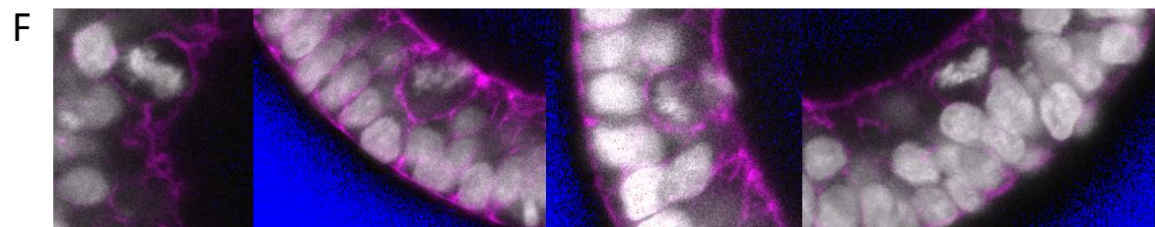
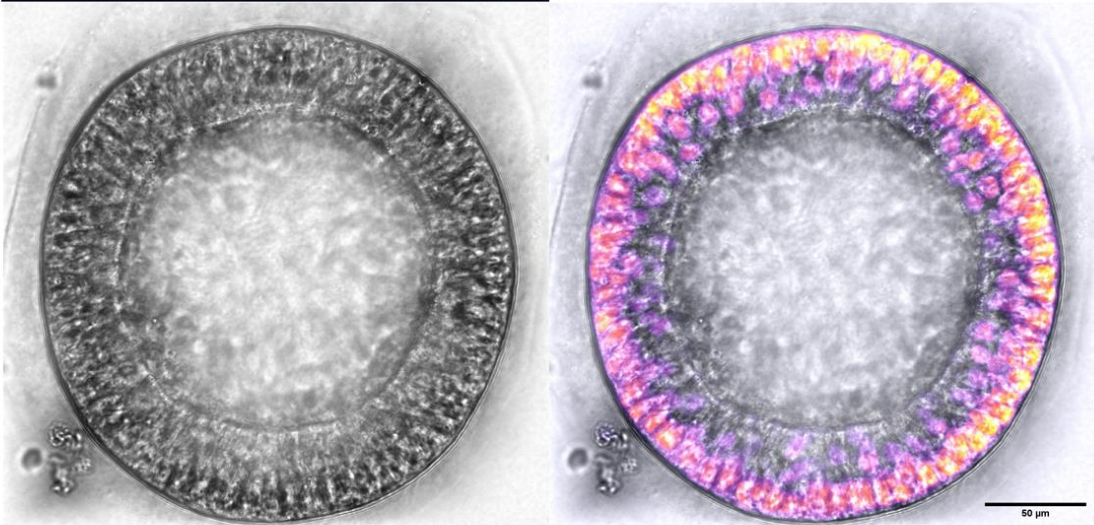
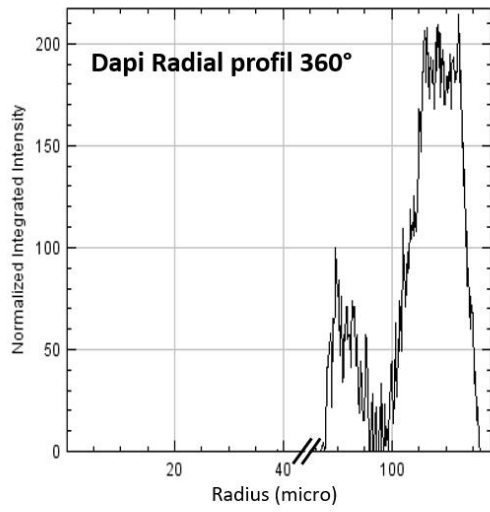
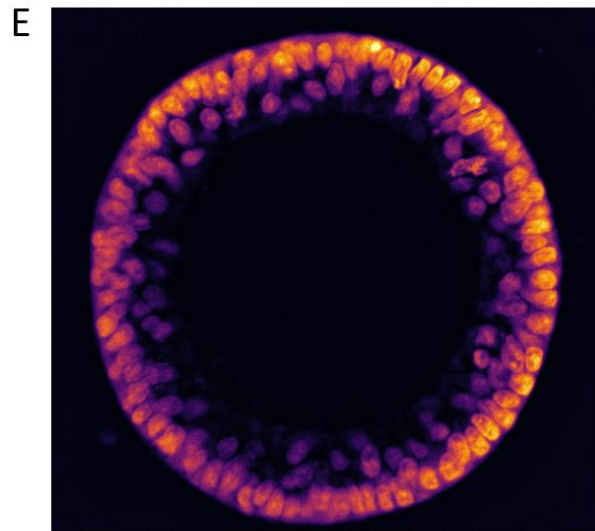
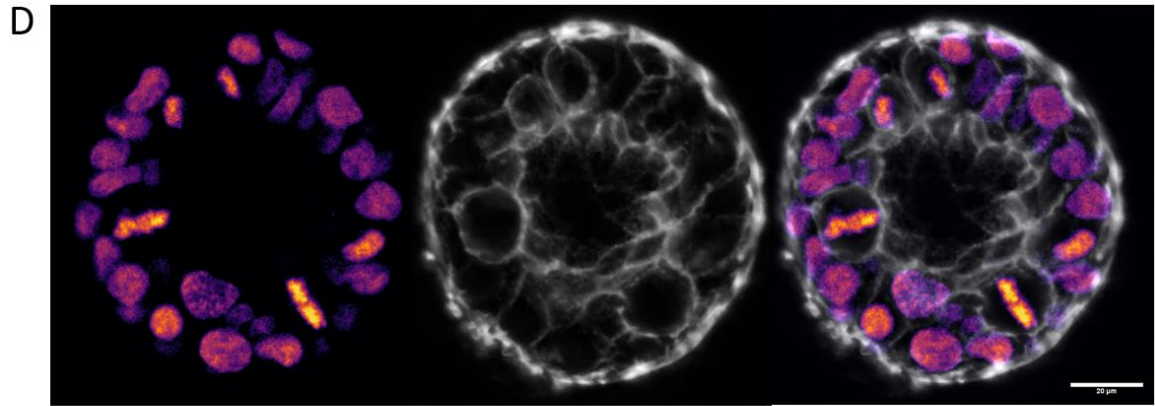
Figure 73. Épithélium épiblastique (pages suivantes)

(A) Fusion de deux petits épiblastoïdes sans perte de la configuration cystique, puis contact de deux épiblastoïdes de plus grande taille qui se repoussent, sans effondrement de leur configuration cystique. **(B-C)** Observation d'une ou de plusieurs rangées de lumens secondaires intraépithéliales. Lignée reportrice utilisée exprimant intrinsèquement ZO1-GFP (les protéines de jonction serrées apparaissent en vert, lignée Allen Institute, AICS-0023 cl.20). **(D)** Microscopie confocale avec marquage des noyaux et de l'actine (DAPI et phalloïdine) d'un épiblastoïde encapsulé d'environ 100 μm de diamètre (coupe équatoriale). **(E)** Microscopie confocale avec marquage des noyaux (DAPI) et image transmise d'un épiblastoïde encapsulé d'environ 200 μm de diamètre (coupe équatoriale). Le profil d'intensité radial du signal DAPI montre une organisation des noyaux en deux couches et une répartition des noyaux prédominante à la base du cyste. **(F)** Position apicale de mitoses dans un épithélium pseudostratifié d'un épiblastoïde encapsulé.

A







Identité cellulaire des cellules souches pluripotentes *in capsulo*

Il nous reste à déterminer, parmi les nuances de pluripotence, si les épiblastoïdes encapsulés sont constitués de cellules souches « amorcées » similaires aux standards biomédicaux actuels (cf. introduction générale, paragraphe 4.5). L'idée que la dimension des cultures impacte le stade de pluripotence a récemment été débattue ; Par exemple, les agrégats en 3D, qui n'ont pas d'organisation épithéliale, développent une mémoire épigénétique de manière passive et tendent à exprimer partiellement des gènes naïfs (Thanuthanakhun *et al.*, 2021).

Nous avons tout d'abord comparé les cellules d'épiblastoïdes encapsulés avec des cellules de cultures conventionnelles en 2D et des agrégats d'iPS. Pour ce faire, nous avons utilisé un panel qPCR couvrant un ensemble de gènes associés à la pluripotence naïve et à la pluripotence amorcée (cf. figure 74). Les profils d'expression obtenus sont très ressemblants, et l'on peut penser que les cellules d'épiblastoïdes encapsulés sont plus proches d'un statut amorcé conventionnel que d'un stade naïf. Ceci paraît cohérent avec l'utilisation commune, pour ces trois bras expérimentaux, d'un même milieu « amorcé » (MTSR1). Pour analyser avec plus de finesse l'identité des cellules issues d'épiblastoïdes, il faudrait utiliser la transcriptomique en cellules uniques, des profilages épigénétiques et des tests de différenciation germinale. Il serait également intéressant d'évaluer cette identité cellulaire à des stades précoces et tardifs de la croissance épiblastoïde, et d'estimer la stabilité de cette identité cellulaire au cours de plusieurs encapsulations successives.

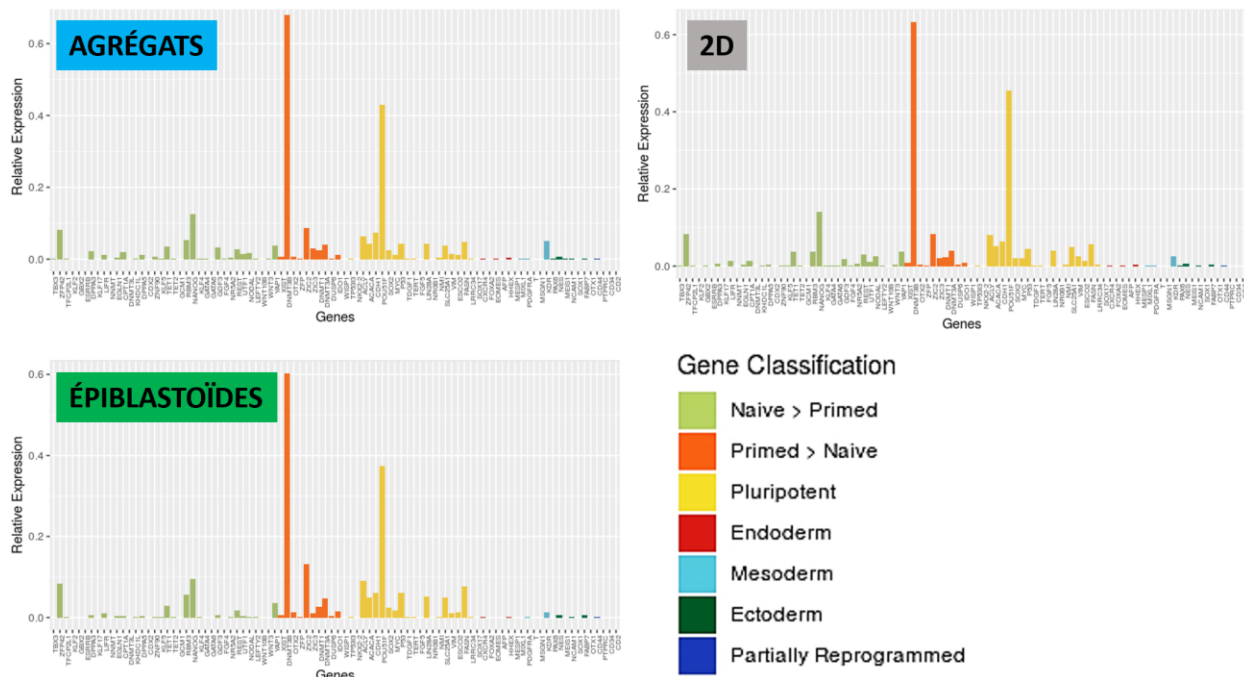


Figure 74. Panels qPCR comparés : 2D, agrégats, épiblastoïdes encapsulés

Référence du panel : Human Pluripotent Stem Cell Naïve State qPCR Array *StemCell Technologies*

3. DISCUSSION DE LA PARTIE 2

3.1 SÉLECTION EN CULTURE DE LA MUTATION 20q11.21

Nous avons choisi d'étudier la sélection en culture de l'aberration chromosomique la plus fréquente, 20q11.21, de manière comparative et pendant 28 jours. Dans ce cadre expérimental précis, nous avons constaté que la sélection du clone mutant 20q11.21 est environ deux à quatre fois plus lente dans le système épiblastoïde qu'en agrégats ou en culture 2D classique. Cela pourrait s'expliquer par :

- Une meilleure viabilité.
- Une fréquence de dissociation/passage plus faible.
- Une meilleure amplification qui permet de réduire le temps en culture pour atteindre le nombre de cellules nécessaire.
- Il est également envisageable que la compartimentalisation par microcapsules permette de limiter la sélection positive des cellules mutantes. Si celles-ci se multipliaient plus vite, les « cloisons étanches » contiendraient leur croissance.

La mortalité élevée des cellules souches pluripotentes in vitro, nous a poussé à d'abord étudier la sélection positive des cellules mutantes en culture. Toutefois, pour bien comprendre les différents systèmes de culture, on doit également s'intéresser aux mécanismes de mutagenèse, de correction et de sélection négative dans chacun d'eux (Araki *et al.*, 2020 ; J. Halliwell *et al.*, 2020 ; S. M. I. Hussein *et al.*, 2013 ; Mani *et al.*, 2020 ; Tichy, 2011 ; Weissbein *et al.*, 2014) (cf. figure 75).

La génétique comparée avec les cultures 2D/agrégats pourrait être poursuivie avec d'autres types de mutations (cf. Partie2, introduction, paragraphe 1.3). Les différences épigénétiques et les différences d'inactivation du chromosome X semblent être une voie de recherche importante (Lopes, 2021 ; Thanuthanakhun *et al.*, 2021).

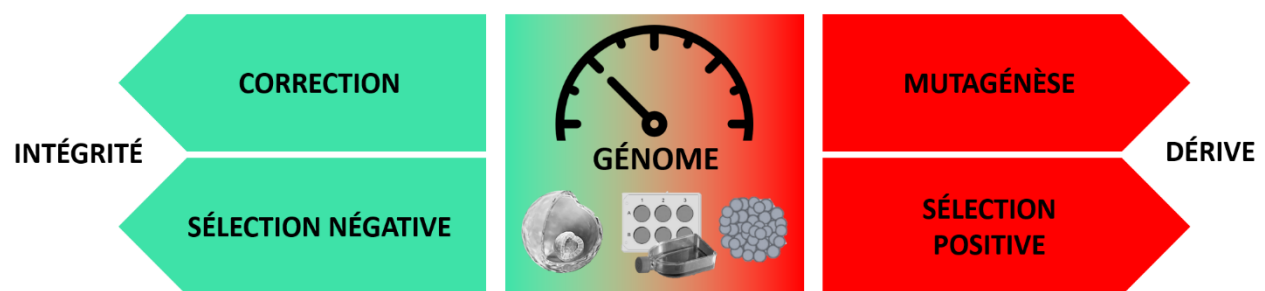


Figure 75. L'équilibre dynamique du génome, entre intégrité et dérive

Il faudra également répéter ces évaluations durant l'évolution de C-Stem™. Les nouveaux paramètres physiologiques susceptibles d'améliorer la stabilité génétique incluent la culture hypoxique, la supplémentation nucléosidique, une nouvelle matrice ou la formulation du milieu et un changement significatif de bioréacteur.

Il serait particulièrement intéressant d'estimer le taux de mutations lors de cultures prolongées, comme cela a été proposé dans certaines études (Cervantes *et al.*, 2002 ; S. M. I. Hussein *et al.*, 2013 ; Sverdlov & Mineev, 2013 ; Thompson *et al.*, 2020), ou d'évaluer la résistance des épiblastoïdes à des stress oxydatifs ou mutationnels (Singla *et al.*, 2020). L'utilisation de tests ne se limitant pas aux mutations récurrentes connues (en 2D) permettrait également de rechercher d'éventuelles mutations qui auraient été sélectionnées spécifiquement lors d'une culture épiblastoïde.

De nouvelles technologies, en cours de développement, devrait détecter des perturbations invisibles jusqu'à présent : séquençage génome entier ou exome à très haute profondeur de lecture, *multi-omics* en cellules uniques, *optical genome mapping* (Bionano®), épigénome, longs ARN non codants (Bouckenheimer, 2016 ; Bouckenheimer *et al.*, 2016). De plus, l'imagerie en 4D devrait également permettre d'investiguer les défauts de ségrégation chromosomique (Knouse *et al.*, 2018), mais également sur les phénomènes de sélection positive ou négative (Singla *et al.*, 2020).

Le contrôle qualité des cellules souches à visée clinique est essentiel. Il n'existe pas aujourd'hui de méthode unique d'évaluation. Il faut combiner les tests à des étapes régulières de l'expansion et de la différenciation (Andrews *et al.*, 2017 ; Assou *et al.*, 2018 ; Ben-David, 2014 ; Bhutani *et al.*, 2016 ; Bock *et al.*, 2011 ; D'Antonio *et al.*, 2017, 2018 ; Jo *et al.*, 2020 ; Kanchan *et al.*, 2020 ; L. C. Laurent *et al.*, 2011 ; McIntire *et al.*, 2020 ; Merkle *et al.*, 2020 ; Panopoulos *et al.*, 2017 ; Peterson & Loring, 2014 ; Popp *et al.*, 2018 ; Rohani *et al.*, 2018 ; Steeg *et al.*, 2021 ; Sullivan *et al.*, 2018) ; (Blokzijl *et al.*, 2016 ; M. Kim *et al.*, 2017 ; J. Loring, 2016 ; Steichen *et al.*, 2019 ; Varela *et al.*, 2012).

L'interprétation des données génétiques brutes est également un défi : même lorsqu'on identifie une mutation pro-oncogène acquise en culture, l'impact fonctionnel et les risques réels de tumorigenèse sont difficiles à établir (Attwood & Edel, 2019 ; Avior *et al.*, 2019 ; Peterson & Loring, 2014 ; Yamanaka, 2020).

Les facteurs d'amplifications des divers systèmes de culture peuvent être exprimés sur des durées variées compliquant leur comparaison directe. Le temps moyen de cycle cellulaire (*Population Doubling Time* PDT) est un paramètre de croissance très utilisé mais il n'intègre pas la contrainte du nombre de cellules initiales. Certains systèmes de culture sont dépendant d'une pré-amplification en 2D importante avant de pouvoir ensemercer des cultures en suspension (« *high-density seed banks* », S. Huang *et al.*, 2020). Si l'on définit le *million to trillion time* (MTT) comme étant le temps nécessaire pour passer d'un million à un trillion de cellules souches pluripotentes en culture, on peut facilement comparer C-Stem™ aux systèmes de culture existants. La durée d'amplification en culture constitue un critère composite quantitatif et qualitatif. Avec notre système encapsulé, il faut environ 19 jours et trois passages, alors que les agrégats et cultures en 2D nécessitent un temps en culture et un nombre de passages deux à trois fois plus élevés (cf. figure 76).

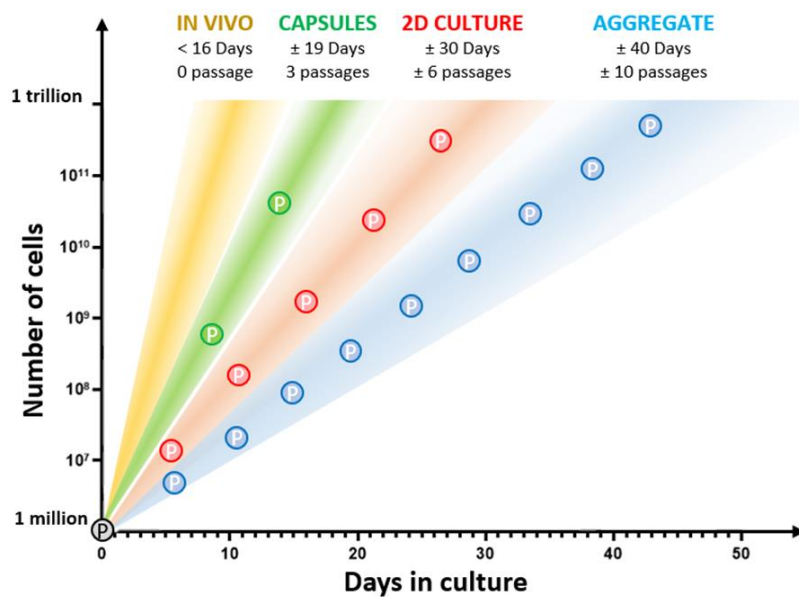


Figure 76. 'Million to Trillion Time'
Représentation illustrative des temps en culture et du nombre de passages (P) nécessaires pour atteindre une production d'un trillion de cellules souches pluripotentes. Les zones colorées traduisent les gammes de performance des différents systèmes dans la littérature. (*In vivo* : courbe théorique si la croissance de l'épiblaste se poursuivait jusqu'à un trillion de cellules souches).

3.2 CONTRÔLE QUALITÉ TISSULAIRE DES ÉPIBLASTOÏDES

L'étude de la mutagenèse et de la compétition cellulaire soulève une interrogation : notre culture d'épiblastoïdes encapsulés est-elle suffisamment proche de l'*in vivo* pour en récapituler le contrôle qualité tissulaire ?

Il serait intéressant d'observer et d'évaluer la ségrégation chromosomique dans les épiblastoïdes (Knouse *et al.*, 2018). La comparaison des mécanismes tissulaires dans différents systèmes de culture pourrait être utile. On pourrait ainsi déterminer si ces processus sont altérés dans des cultures en 2D et agrégats dont l'épithélialisation est absente ou incomplète. En outre, il serait important de comprendre si l'épaississement de l'épithélium pseudostratifié joue un rôle dans ces mécanismes. De plus, il faudrait déterminer quelles mutations sont détectées puis éliminées, si certaines échappent à ce mécanisme et sont sélectionnées positivement (Price *et al.*, 2021).

Les mécanismes de défense épithéliale contre les cancers, décrits en cancérologie, ont pu être observés dans des modèles développementaux (Z. Ji *et al.*, 2021 ; Morata & Ripoll, 1975). Sont-ils également impliqués dans la détection et l'élimination des cellules souches pluripotentes mutantes ? Quels paramètres biophysiques du microenvironnement et du cyste influent sur cette compétition cellulaire ?

3.3 MODÈLE PROPOSÉ

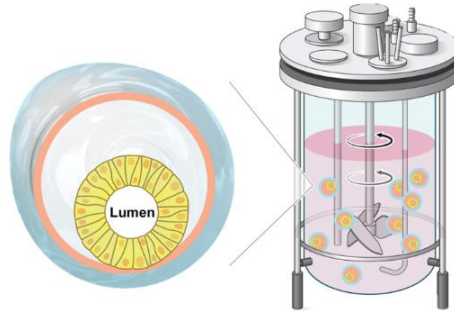
Nous avons montré que la culture encapsulée de colonies de cellules souches en 3D est reproductible et stable dans le temps. Les encapsulations successives permettent de maintenir une bonne viabilité, un facteur d'amplification élevé, une expression très forte des marqueurs de la pluripotence et la morphologie épiblastique. L'interdisciplinarité est la clef de voûte de ces résultats.

- La motivation vient des observations en embryologie.
- La production de capsules vient de la microfluidique.
- Les approches en bioréacteurs viennent de la bioproduction industrielle.
- La formation d'épiblastoïdes vient d'une convergence entre l'embryologie *in vitro* et les organoïdes.

Nous proposons que cette interdisciplinarité sera nécessaire pour maintenir l'intégrité génétique des cellules souche pluripotentes en culture (cf. figure 77).

Les résultats présentés dans cette partie sont centrés sur la sélection positive d'une mutation connue. Pour prouver la supériorité de la culture en bioréacteur d'épiblastes encapsulés par rapport aux standards actuels, il faudra caractériser profondément la dérive des épiblastes encapsulés en culture. Dans cette optique, TreeFrog travaille en partenariat avec le consortium QC-Stem (TreeFrog Therapeutics, 2020). Il réunit l'institut des maladies génétiques Imagine (Paris), le FBRI (Kobe), le Harvard Stem Cell Institute (Boston) et le Dana-Farber Cancer Institute (Boston). Sa vocation est de renforcer l'étude sur la génétique des cellules souches encapsulées.

**IN VIVO-LIKE GENOMIC INTEGRITY
of EPIBLASTOIDS IN ENCAPSULATED NICHES**



- ↘ Mutagenesis ↗ Repair
- ↘ Mutant selection ↗ Mutant elimination
- ↘ Total time in culture

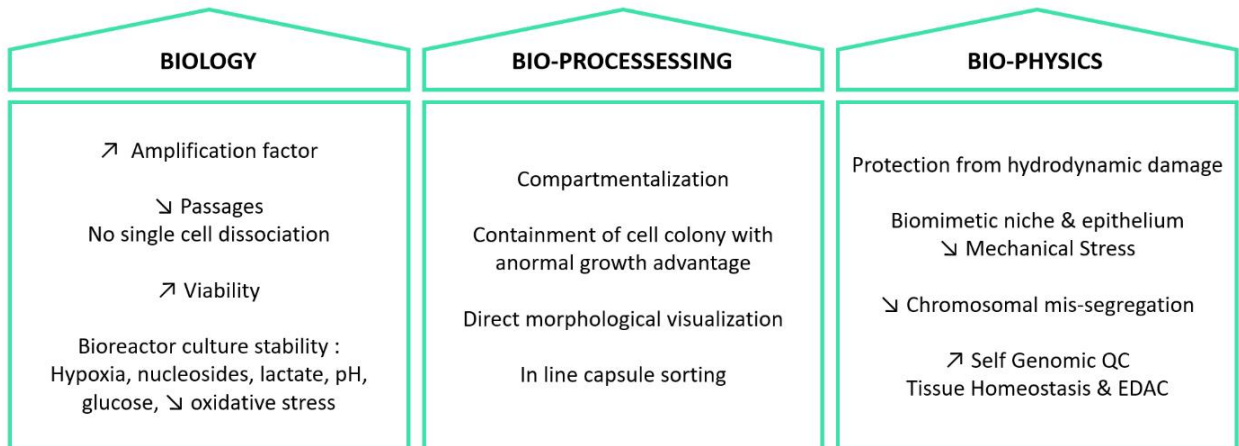


Figure 77. Comment C-Stem pourrait préserver l'intégrité génétique ?

Cette figure présente les mécanismes dont on suppose qu'ils peuvent assurer une intégrité génétique proche de l'*in vivo* lors de l'expansion des cellules souches pluripotentes. L'encapsulation permet de cultiver des micro-tissus dans des niches biomimétiques protégées. Elle fait converger la biologie, la biophysique et le bioprocessing.

4. CONCLUSION DE LA PARTIE 2

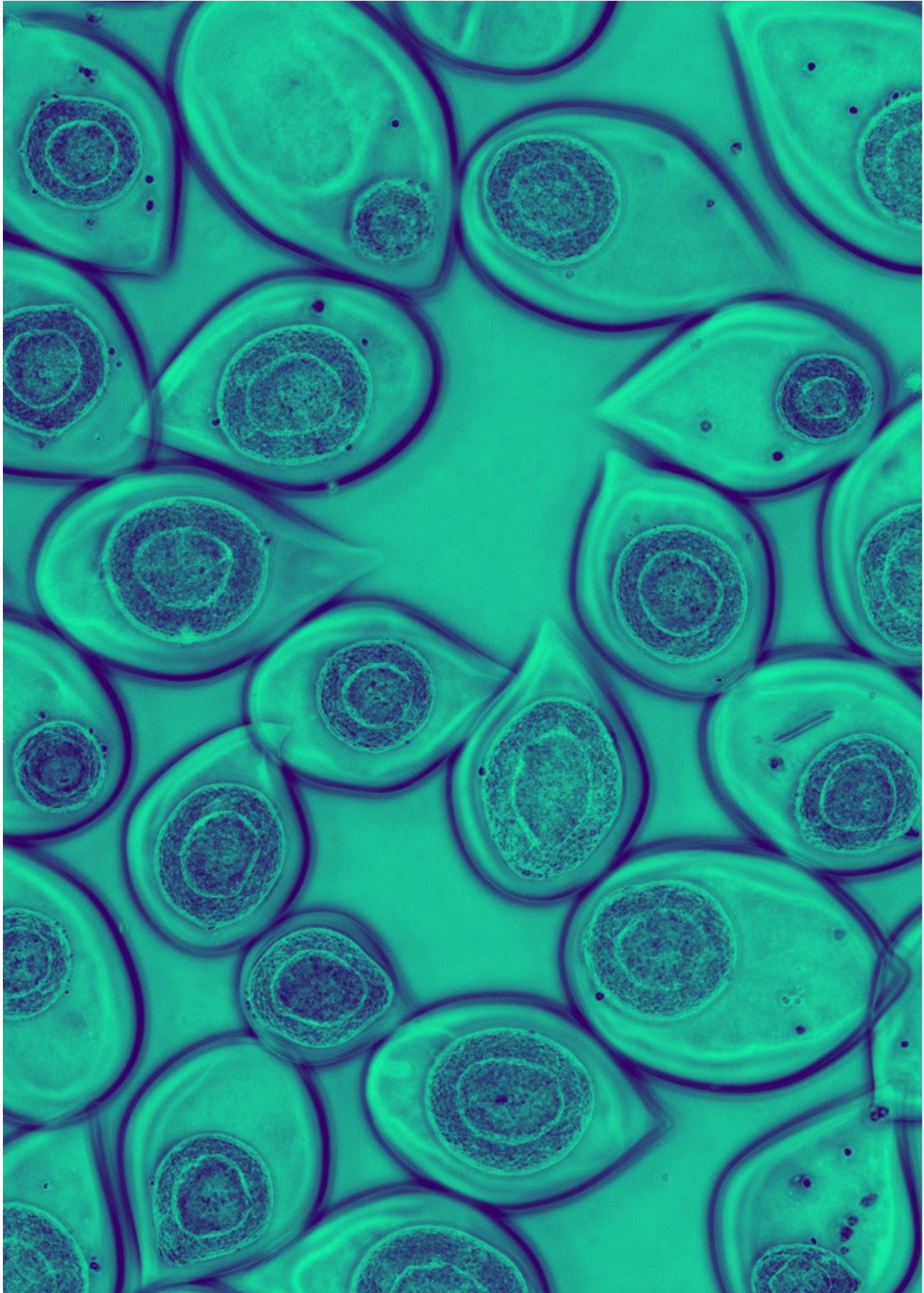
Le maintien de l'intégrité du génome est la résultante de multiples phénomènes biologiques et physiques. Les cultures conventionnelles en 2D ou en agrégats génèrent une mortalité importante et des passages fréquents qui imposent une forte pression de sélection. Nous postulons qu'en répliquant la niche des cellules pluripotentes, l'épiblaste, dans les micro-capsules, nous pourrions atteindre une homéostasie génotypique et phénotypique proche de celle observée *in vivo*.

POINTS CLÉS

PRÉSERVER L'INTÉGRITÉ GÉNÉTIQUE DES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES

- La culture de cellules souches pluripotentes sous forme d'épiblastoïdes encapsulés est stable et reproductible durant une culture prolongée en bioréacteur.
- La sélection positive de la mutation chromosomique 20q11.21 est moins forte lors d'une culture prolongée épiblastoïde que dans des cultures conventionnelles.
- La meilleure viabilité observée dans les épiblastoïdes, ainsi que le gain d'amplification et un temps en culture réduit pourraient être les principaux facteurs permettant de maîtriser la dérive génétique.
- Le profil d'expression génique des cellules souches est proche entre épiblastoïdes, culture en 2D et agrégats ; ce sont des cellules souches conventionnelles « amorcées ». L'identité précise des cellules au sein des épiblastoïdes devra être investiguée afin de préciser si elles relèvent plutôt d'une identité « formative ».
- L'architecture épithéliale polarisée est particulièrement stable et homogène *in capsulo*, par des phénomènes de fusions de cystes et de lumens secondaires.
- L'histologie des épiblastoïdes comprend des similitudes avec les épiblastes *in vivo* : épaissement pseudostratifié graduel avec majorité des noyaux au pôle basocellulaire, orientation tangente des mitoses plutôt apicales.

DISCUSSION GÉNÉRALE



1. BIOPRODUCTION QUANTITATIVE ET QUALITATIVE

Les capsules creuses en bioréacteur préservent les cellules souches pluripotentes et leurs niches lors d'une production industrielle par des machines automatisées.

Dans la première partie de cette thèse, nous avons présenté un système de culture biomimétique en 3D protégé qui permet la montée en échelle de la production de cellules souches pluripotentes. Dans la deuxième partie, nous avons détaillé les premiers résultats qui explorent l'intégrité génétique de ces colonies épiblastoïdes encapsulées.

En réunissant dans un même système de culture les avantages des organoïdes et des bioréacteurs, nous tentons de concilier les exigences quantitatives et qualitatives de bioproduction des thérapies cellulaires (cf. figure 78). Nous avons appelé cette stratégie de culture cellulaire encapsulée « C-Stem™ ».

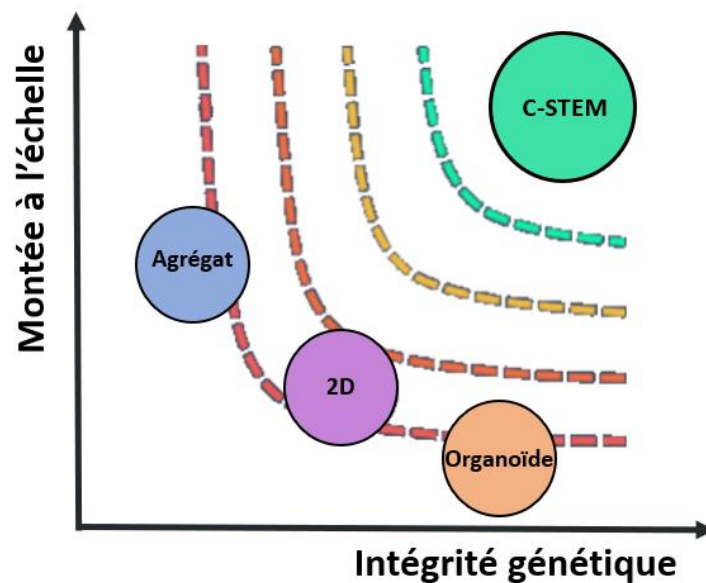


Figure 78. Courbe qualité/quantité des systèmes de culture des cellules souches pluripotentes

Isobares quanti-qualitatives illustrant l'objectif poursuivi par l'entreprise TreeFrog Therapeutics : produire en masse des cellules thérapeutiques tout en préservant leurs qualités physiologiques. Illustration adaptée de « A culture system that combines scale-up and quality » par Pierre-Emmanuel Gaultier, TreeFrog Therapeutics, 2021.

2. C-Stem™ : UN OUTIL POLYVALENT ET INTÉGRÉ

C-Stem™ est facilement ajustable. De multiples paramètres peuvent être modifiés en fonction des besoins : la taille, l'épaisseur et la composition de la capsule, les éléments de matrice ou de signalisation utilisés, le nombre de cellules encapsulées, le nombre et le type de cellules et d'éléments co-encapsulés, etc. L'avantage majeur des capsules creuses est de regrouper dans un microcompartiment géométriquement maîtrisé des cellules et des éléments de niche. Dans des conditions favorables de culture, ces cellules peuvent s'auto-organiser et reprendre alors un programme développemental physiologique. Cela en fait un outil adéquat pour la culture d'épiblastoïdes mais aussi pour la différenciation et la culture d'organoïdes (cf. figure 79).

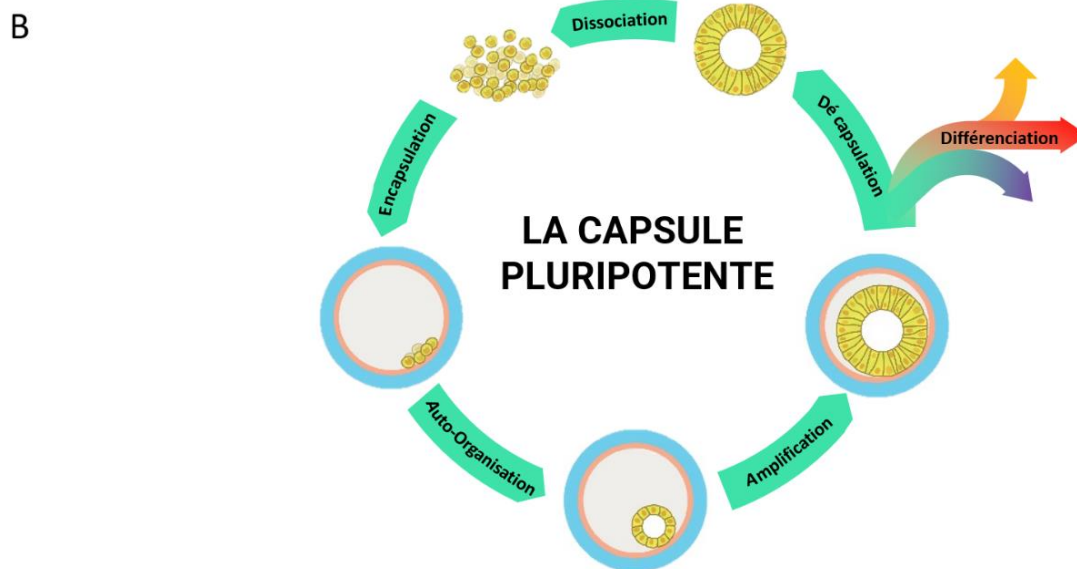
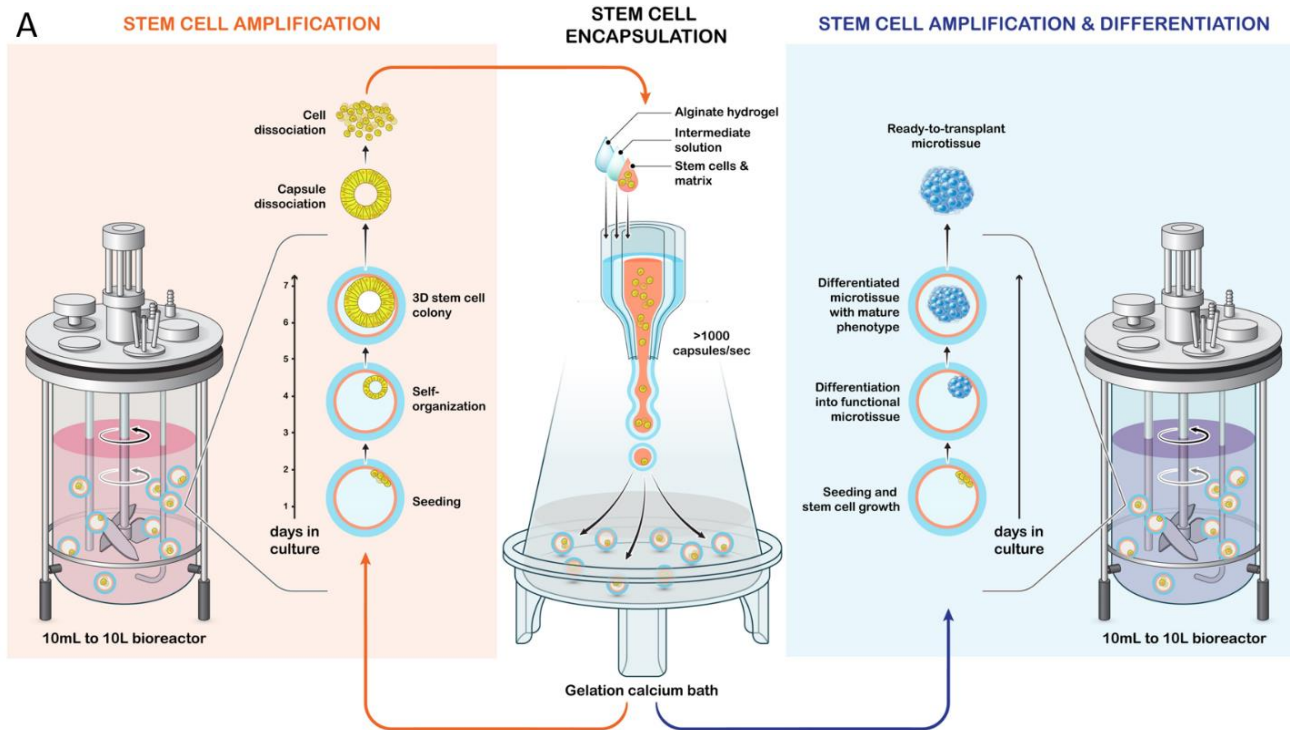
Lors des prochaines recherches menées pour maîtriser cette différenciation en capsule, un grand nombre de paramètres devront être évalués simultanément. D'une part, les paramètres biochimiques, en optimisant les protocoles déjà établis en 2D ; d'autre part, les paramètres biophysiques de la niche et de la capsule.

La temporisation de la différenciation est un autre paramètre à prendre en compte. Dans les protocoles issus de colonies en 2D, d'agrégats de cellules souches ou de corps embryonnaires, la taille des colonies, leur degré de confluence, leur identité fine et leur stade jouent un rôle important dans le succès de la différenciation (Laco *et al.*, 2018). De la même manière, on pourra évaluer quel est le meilleur stade épiblastoïde pour commencer une différenciation (Girgin *et al.*, 2021) et quelles sont les différences fonctionnelles lors de la différenciation entre un grand cyste pleinement épithélialisé (ex : 200 µm de diamètre, épithélium pseudo stratifié > 40 µm) et un petit cyste partiellement épithélialisé/polarisé (ex : 100 µm de diamètre, épithélium cuboïde < 20 µm). Il y a un grand nombre de combinaisons possible, et il sera sans doute nécessaire d'utiliser les possibilités de criblage haut débit des capsules pour accélérer ces explorations.

La protection mécanique des microcapsules est bénéfique pendant la différenciation. En effet, certaines cellules différenciées sont particulièrement fragiles. Lors de la différenciation neurale, par exemple, la structure en 3D et la capsule protègent les neurites des lésions majeures habituellement observées dans des cultures conventionnelles (Alessandri, Feyeux, Gurchenkov, Delgado, Trushko, Krause, Vignjević, Nassoy, & Roux, 2016).

Figure 79. Différenciation en 3D in capsulo (page suivante)

(A) L'encapsulation et la culture en bioréacteur peuvent être utilisées à la fois pour l'amplification des cellules souches pluripotentes, mais aussi pour la différenciation *in capsulo* (C-STEM). **(B)** Le cycle d'encapsulation et d'amplification des cellules souches constitue un passage. Ce dernier peut être suivi d'un autre passage ou d'une différenciation. Cette capacité d'autorenouvellement et de différenciation des capsules nous incite à utiliser le terme de « capsules pluripotentes ».



3. LA THÉRAPIE ORGANOÏDE : L'AVENIR DE LA THÉRAPIE CELLULAIRE ?

Notre stratégie de niche encapsulée permet une différenciation biomimétique 3D et la culture d'organoïdes. Malgré l'essor relativement récent des organoïdes et de leurs usages *in vitro* (Eisenstein, 2018), ils commencent à être utilisés à des fins thérapeutiques (Berishvili *et al.*, 2021; Hofer & Lutolf, 2021; Stevens & Murry, 2018; Xinaris, 2019).

A ce jour, les micro-tissus dérivés de cellules souches utilisés en clinique, consistent principalement en des îlots de Langerhans pour le diabète (T. Desai & Shea, 2017; Shapiro, 2000; Vertex, n.d.), des épithélium pigmentés et rétiniens en ophtalmologie (Assawachananont *et al.*, 2014; Diniz *et al.*, 2013; Shirai *et al.*, 2016; Stern *et al.*, 2018), des greffes de peau artificielles (Hirsch *et al.*, 2017) ou des patch cardiaques (Menasché *et al.*, 2015). Chez l'animal, on peut citer certaines études pionnières : greffes d'organoïdes intestinaux (Fordham *et al.*, 2013; Yui *et al.*, 2012), hépatiques (Huch *et al.*, 2013; Takebe *et al.*, 2013, 2014, 2017), neuraux (Alessandri, Feyeux, Gurchenkov, Delgado, Trushko, Krause, Vignjević, Nassoy, & Roux, 2016b; Feyeux *et al.*, 2016; M. A. Lancaster, 2018).

Ces « thérapies organoïdes » offriraient en théorie de nombreux avantages par rapport aux thérapies cellulaires issues de formats de culture conventionnels :

- **Identité et fonctions.** La différenciation biomimétique tente de reproduire le plus fidèlement possible l'émergence des fonctions micro-tissulaires. Cette échelle micro-tissulaire se rapproche des unités fonctionnelles des organes, ce qui permet d'en reproduire certaines propriétés sans avoir besoin de recréer un organe entier. L'objectif est de produire *in vitro* des cellules à l'identité moins artificielles et qui fonctionnent mieux que celles issues de cultures en 2D ou en 3D-simples. Toutefois le contrôle de la différenciation des organoïdes est un enjeu important pour obtenir des structures homogènes et reproductibles.
- **Maturation.** La culture prolongée de ces organoïdes et les interactions complexes qui s'y produisent, contribuent à une maturation plus poussée des cellules. L'identité des cellules greffées peut être d'avantage contrôlée que lors de l'injection de cellules moins matures qui doivent terminer leur différenciation *in vivo* (dans un environnement souvent inflammatoire lié à la greffe elle-même ou à la maladie sous-jacente). Ce stade post-mitotique stable aide également à minimiser la présence de cellules souches ou de progéniteurs résiduels dans les greffons, réduisant ainsi le risque de tératomes.
- **Grefe et intégration.** On peut également espérer, que ces organoïdes soient plus résistants lors d'une procédure de greffe et qu'ils s'intègrent mieux. Les thérapies cellulaires injectées sous forme de suspension cellulaire résistent très mal aux dommages mécaniques liés à l'injection ; leur intégration est souvent mauvaise avec un taux de survie cellulaire post-grefe extrêmement faible. Le format en 3D tissulaire des organoïdes et l'incorporation d'éléments vasculaires, immunitaires ou de matrice extracellulaire favorisent le maintien de l'architecture et de la fonction pendant et après la greffe (Takebe *et al.*, 2014).
- **Génétique.** Enfin, la probable meilleure stabilité génétique des organoïdes (cf. partie 2, paragraphe 3.2) pourrait contribuer à sécuriser davantage la greffe.

En suivant une logique physio-mimétique, les thérapies organoïdes ou « mini-greffes » pourraient apporter un gain d'efficacité et de sécurité (cf. figure 80). Après la transfusion, les greffes d'organes, les thérapies cellulaires, les thérapies organoïdes constitueront peut-être une quatrième étape dans le développement de la médecine régénératrice (cf. figure 9).

Ces évolutions récentes des thérapies cellulaires conventionnelles, doivent encore faire leurs preuves. Cela demandera de faire des avancées importantes dans de nombreux domaines. Des systèmes de production en masse d'organoïdes devront être développés (Brandenberg et al., 2020; Doulgkeroglou et al., 2020; Takebe et al., 2017), de nouvelles méthodes de contrôle qualité seront nécessaires et avec elles de nouveaux critères d'évaluation réglementaire.

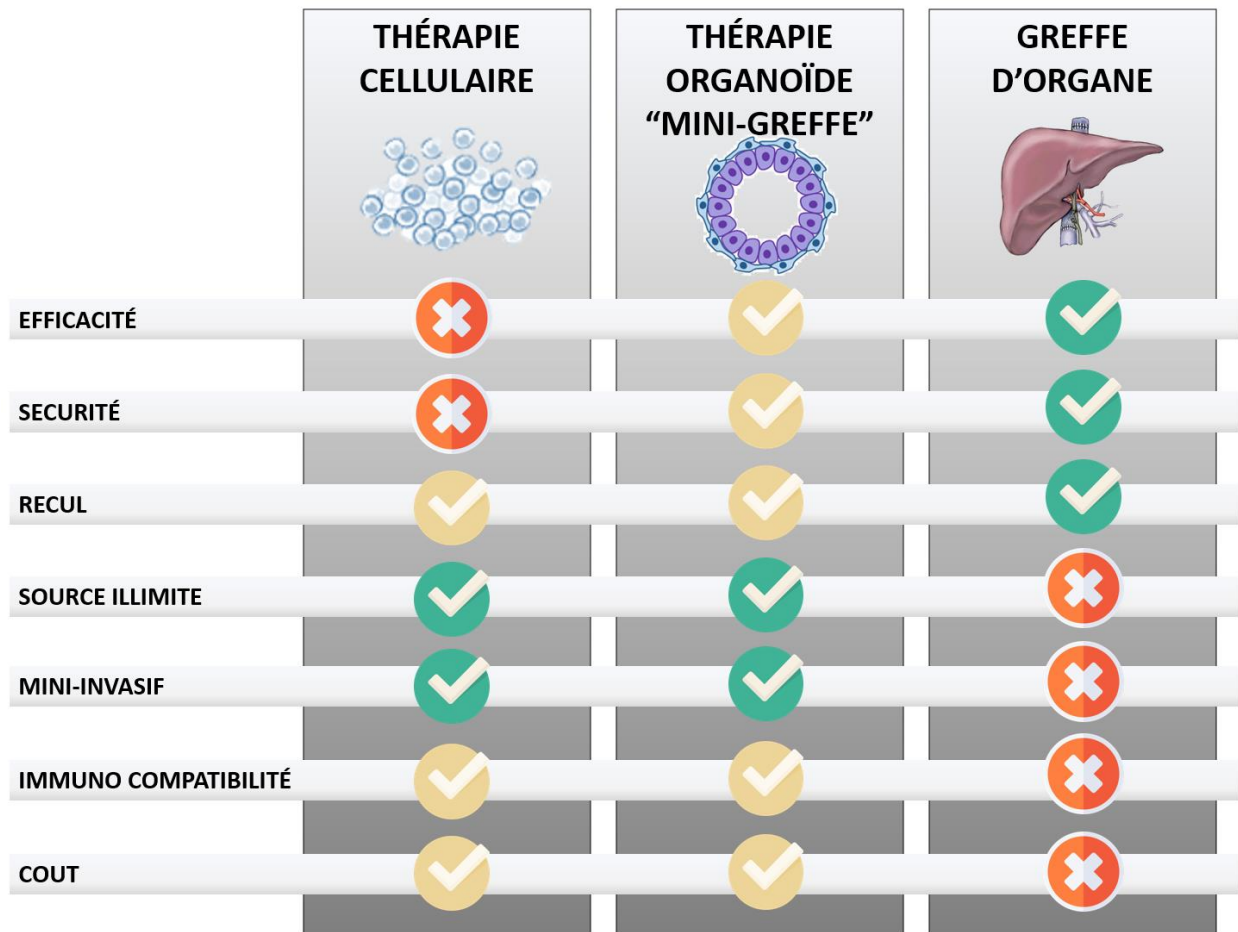


Figure 80. Thérapies organoïdes : des mini-greffes issues de cellules souches

Bien que les greffes d'organes aient démontré leur efficacité et leur sécurité sur la durée, on manque de donneurs. De plus, elles peuvent s'avérer invasives. Les thérapies cellulaires et les thérapies organoïdes, toujours en cours de développement, bénéficient d'une source cellulaire illimitée, d'une immunocompatibilité avancée par l'ingénierie génétique ou par stratégie autologue. Les thérapies organoïdes pourraient dépasser les limites des thérapies cellulaires en matière d'efficacité et de sécurité. Schéma d'organoïde issu de « Developing a multidisciplinary approach for engineering stem cell organoids » par Wechsler et al., 2020.

Ces cultures organoïdes mettent en œuvre une grande interdisciplinarité (Garreta et al., 2021; Wechsler et al., 2020). Les micro-capsules creuses sont un catalyseur pour cette synergie des sciences (cf. figure 81) (van Duinen *et al.*, 2015) ; La rencontre confinée de la biologie du développement, des sciences micro-environnementales, de l'immunologie, de l'ingénierie génétique et de la bioproduction devraient permettre de créer de nouvelles thérapies affranchies des verrous médico-scientifiques actuels.

Au-delà des sciences, Tanakori Takebe décrit très bien les besoins spécifiques de cette « médecine organoïdes » et les centres de recherche interdisciplinaires qui s'y illustrent (Takebe *et al.*, 2018) (cf. figure 81).

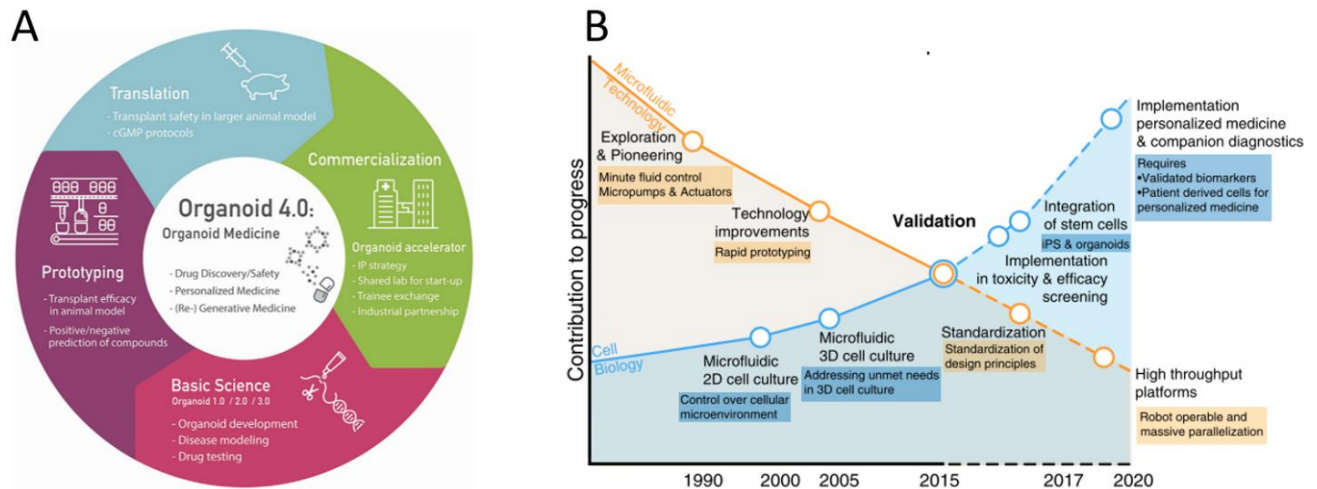


Figure 81. Médecine organoïde et victoire de la microfluidique ?

(A) Takanori Takebe évoque les principaux défis de la médecine organoïde et montre qu'une organisation en hub interdisciplinaire est nécessaire : médecine, sciences, industries, innovations, « Organoid center strategies for accelerating clinical translation » par Takebe et al., 2018. (B) La microfluidique est une science relativement récente. Van Duiden *et al.* suggèrent que sa rencontre avec la biologie cellulaire permettra de généraliser des modèles 3D et la médecine personnalisée. Schéma adapté de « Microfluidic 3D cell culture : from tools to tissue models » par van Duinen et al., 2015.

Notre technologie pourrait s'appliquer à cette nouvelle discipline ; C-STEM devenant à la fois une plateforme de production à grande échelle de cellules souches pluripotentes, de thérapies cellulaires et de thérapies organoïdes.

4. CONCLUSION PERSONNELLE

La biologie du développement est une science fascinante. Il est émouvant de constater que les livres historiques descriptifs prennent aujourd'hui une nouvelle dimension avec l'essor de l'embryologie de synthèse et des organoïdes. L'application des découvertes fondamentales dans le champ clinique et au sein de la médecine régénérative est très prometteuse. La percée des CAR-T nous encourage et nous guide. Même si cela prendra de longues années, je pense que les thérapies cellulaires et organoïdes pourront tenir leurs promesses et proposer des greffons accessibles, efficaces et sûrs.

Le système de culture présenté dans cette thèse et les questions soulevées soulignent l'intérêt d'une approche globale interdisciplinaire. Aucune science ne doit être omise lorsque l'on développe une thérapie cellulaire, si l'on veut éviter les écueils. Les apports réciproques de la biologie du développement et de la biologie de la production, le lien entre génétique et biophysique sont des sujets qui m'ont particulièrement passionnés.

L'encapsulation d'une niche de synthèse finement maîtrisée apparaît essentielle pour la culture des cellules souches et leur différenciation. Ce ne sont pas les cellules qui doivent s'adapter aux conditions de cultures à leurs dépens, mais bien les conditions de culture qui doivent s'adapter aux cellules. Cette démarche biomimétique et les systèmes de culture reproduisant *l'in vivo* commencent tout juste à émerger.

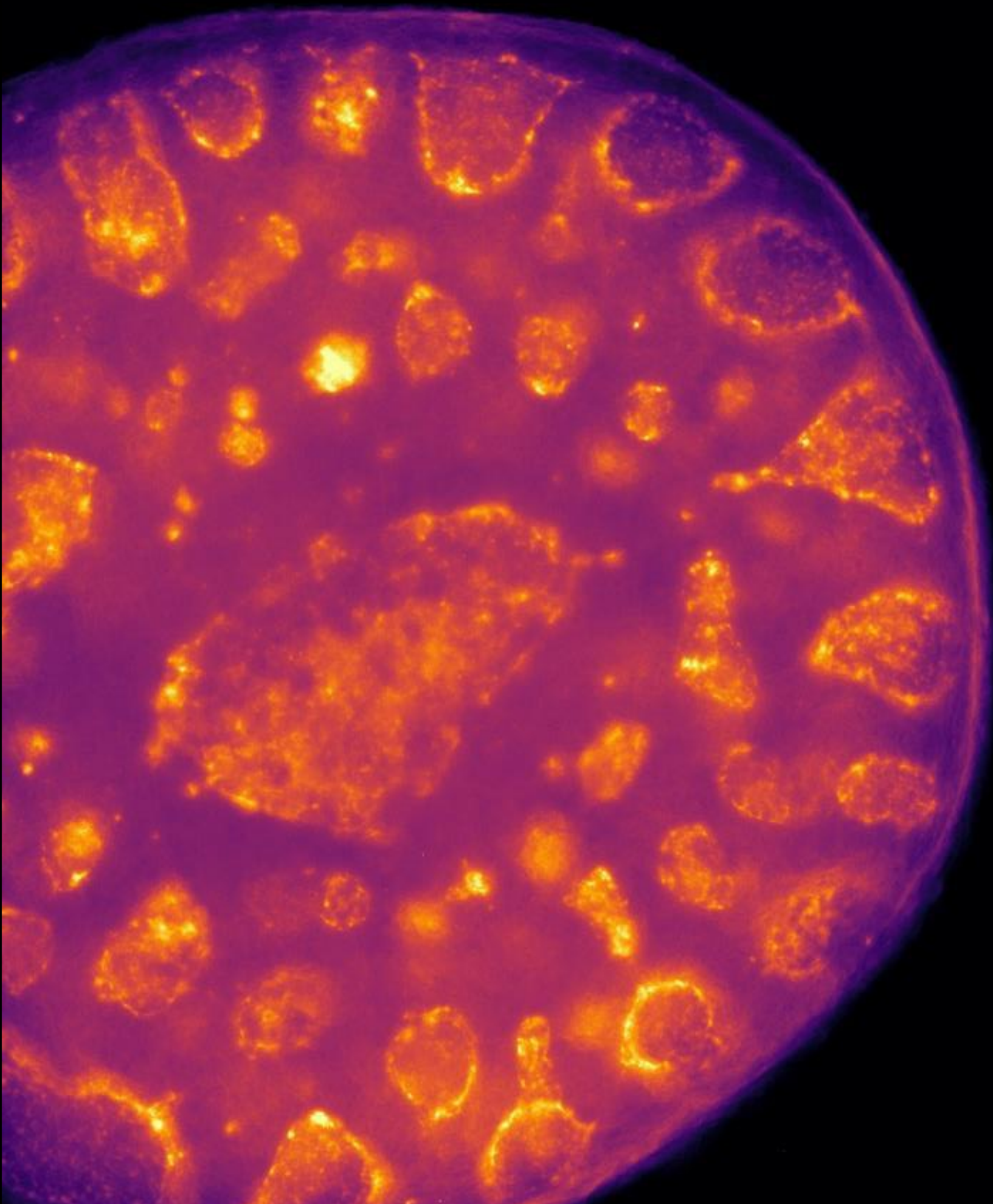
Les capsules sont un outil de recherche fondamentale très puissant. Le contrôle de la niche cellulaire, la compatibilité avec la microscopie, les possibilités haut débit en font un outil idéal pour étudier les interactions cellulaires lors des processus développementaux. Le début de la différenciation cellulaire et les interactions avec la vascularisation et l'innervation sont des questions fondamentales vastes et passionnantes.

La biologie des systèmes et la modélisation informatique sont également des disciplines cruciales, car elles permettent d'explorer et de comprendre plus rapidement le monde de paramètres. Dans cette optique, nous travaillons avec Jean-François Joanny (Collège de France) et Martine Ben Amar (École normale supérieure), en physique théorique et simulation continue. Nous collaborons également avec Dirk Drasdo et Paul Van Liedekerke de l'INRIA afin d'établir des simulations *Agent-Based Modeling*. À terme, la modélisation numérique et les « jumeaux numériques » contribueront à prédire et à comprendre de nombreux aspects des thérapies cellulaires : intégrité génétique, biophysique des cultures agitées, croissance et différenciation, intégration de la greffe.

J'ai eu la chance d'observer l'encapsulation avec des caméras rapides et les cellules souches avec une grande variété de microscopes. Ce fut une nécessité mais avant tout un plaisir.

Que les sciences sont belles !

ANNEXES



1. LEGENDES DES ILLUSTRATIONS DE COUVERTURE

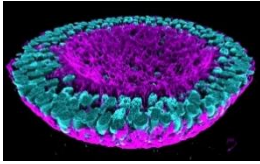


Figure 82. Couverture de l'introduction générale : *Coupola*

Épiblastoïde d'environ 200 µm de diamètre, coupe transverse, marquage de noyaux en cyan et du réseau d'actine en violet. Culture et microscopie : Philippe Cohen. Rendu 3D : Jérémie Teillon, Bordeaux Imaging Center. Logiciel AGAVE conçu par The Allen Institute for Cell Science.

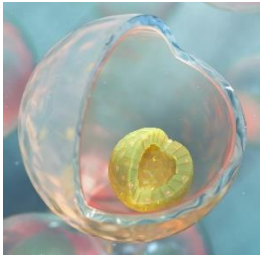


Figure 83. Couverture de la partie 1 : *Virtual capsules*

Représentation artistique d'un épiblastoïde encapsulé dans une culture en suspension.

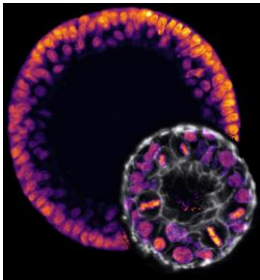


Figure 84. Couverture de la partie 2 : *Éclipse*

Microscopie confocale, coupes équatoriales d'épiblastoïdes montrant l'agencement des noyaux cellulaires. Culture et microscopie confocale : Philippe Cohen.

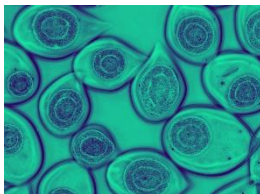


Figure 85. Couverture de la Discussion générale : *Pluripotent droplets*

Groupe de capsules en suspension contenant des colonies de cellules souches pluripotentes épiblastiques. Culture et microscopie conventionnelle : Philippe Cohen.

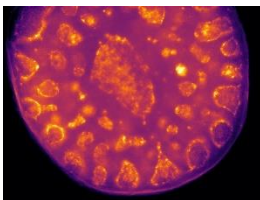


Figure 86. Couverture des Annexes : *The stem cell foam*

Épiblastoïde extraphysiologique de 800 µm présentant des lumens secondaires intraépithéliaux. Culture et microscopie confocale : Philippe Cohen.

2. ARTICLE: MORPHO-ELASTICITY OF HUMAN PLURIPOTENT STEM CELL CYSTS

Joseph Ackermann¹, Philippe J.R. Cohen^{2,3}, Kevin Alessandri³, Maxime Feyeux³, Andrea Leonard³, Pierre Nassoy^{4,5}, Jean-François Joanny^{6,7}, Martine Ben Amar^{1,8*}

¹Laboratoire de Physique de l'Ecole normale supérieure, ENS
Université PSL, CNRS, Sorbonne Université, Université de Paris, F-75005 Paris, France

²Imagine Institute, iPSC Core Facility, Université de Paris, INSERM, France

³Treefrog Therapeutics, F-33600 Pessac, France

⁴LP2N, Laboratoire Photonique Numérique et Nanosciences, Univ. Bordeaux, F-33400 Talence, France

⁵ Institut d'Optique Graduate School CNRS UMR 5298, F-33400 Talence, France

⁶Collège de France, 11 place Marcelin Berthelot 75231 Paris Cedex 05, France⁷ Physico-Chimie Curie, Institut Curie, CNRS UMR 168, PSL University, Sorbonne Université, 26 rue d'Ulm, F-75248 Cedex 05, France

⁸ Institut Universitaire de Cancérologie, Faculté de médecine, Sorbonne Université, 91 Bd de l'Hôpital, F-75013 Paris, France

*Corresponding author. Email: benamar@lps.ens.fr

Publié dans le Journal of mechanics and physics of solids, mars 2022

<https://doi.org/10.1016/j.jmps.2022.104778>

ABSTRACT

Human pluripotent stem cells (hPSCs) are a promising cellular source in cell therapies or regenerative medicine and they allow to address fundamental mechanisms in embryogenesis. However, their culture to provide large amounts of high quality stem cells remains challenging. Here, using an encapsulation microfluidic device, we observe that spherical closed monolayers of hPSCs, or cysts, are formed and we monitor their morphology, organization and growth in a pseudo-stratified epithelia before and after they get confined by the capsule wall. Then, we present a morpho-elastic model to quantitatively explain the growth dynamics. The model is based on Neo-Hookean elasticity with anisotropic growth where stresses are concentrated within the cyst. Cyst growth is shown to be quasi-exponential, hardly reduced by a compression-induced correction. We hypothesize that this peculiar morphological dynamics, which is controlled by elasticity and anisotropic growth, might provide new strategies to optimize the production of medical grade hPSCs.

INTRODUCTION

Human pluripotent stem cells (hPSCs) have emerged as the most promising cellular source for cell therapies, organ engineering or drug testing, because of the possibility to reprogram terminally differentiated cells into human induced pluripotent cells (hiPSCs) (K. Takahashi & Yamanaka, 2006), which are then capable of expanding infinitely before differentiation on demand. While differentiation protocols towards mature phenotypes have been recently improved, one of the greatest bottlenecks for biomedical applications remains upstream: the culture and expansion of hPSCs to clinically-relevant numbers.

Typically 10^6 - 10^{10} cells are required for stem cells derived therapies. The standard method for cell expansion relies on 2D tissue culture. Not only is the expansion rate limited by the surface area of the flasks, but also by laborious tasks of replating and colony selection that lead to inherent heterogeneity and lack of reproducibility. Better, less time-consuming and more cost-effective scalability can be achieved with suspension culture systems such as microcarriers or aggregates in stirred bioreactors (Borys et al., 2020). Embedded single cells, cell aggregates or cell-on-microcarriers in a gel allow for further improvements, especially to protect the cells against shear forces at play in agitated cultures (Lei & Schaffer, 2013b). In all cases, pluripotency markers are conserved and although the expansion rate depends on the method (scaffold versus suspension, nature of the scaffold), on the initial cell density, on the seeding strategy (single cell versus clusters) and on the composition of the culture medium, hiPSCs expansion results in the formation and growth of spheroids that ultimately reach a maximal size of about 300 μm , corresponding to the limit above which oxygen and nutrient diffusion restriction leads to the formation of necrotic cores.

In parallel, in a completely different context, hPSCs have been used to investigate *in vitro* the self-organization programs that are executed in the embryo *in vivo*. Several works have shown that pluripotent stem cells self-organize into cysts reminiscent of the luminal epiblast stage (Zheng et al., 2019). Starting from a two-cell assembly (Taniguchi et al., 2015a) or with a single hPSC with a perinuclear apicosome structure (Taniguchi et al., 2017), hPSCs seem to be programmed to form lumen and thus cysts upon growth.

At the onset of this work, we found puzzling that 3D cultures of pluripotent stem cells are reported to form aggregates (i.e plain spheroids, without lumen) (Borys et al., 2020; Lei & Schaffer, 2013b; Olmer et al., 2010) when tissue engineering and regenerative medicine applications are aimed, while they readily self-organize in polarized cysts in developmental biology oriented works for similar medium and engineered ECM conditions. We have recently developed a microfluidic technique that allows to grow pluripotent stem cells in permeable micro-compartments or capsules (Alessandri et al., 2013; Alessandri, Feyeux, Gurchenkov, Delgado, Trushko, Krause, Vignjević, Nassoy, & Roux, 2016a). Its high throughput capability makes the approach a priori compatible with a massive production required in regenerative medicine. However, since all micro-compartments can be handled and monitored individually, we have also investigated the morphology and monitored the growth of 3D hiPSCs cultures within individual capsules. Here, we show that 3D cell cultures of hiPSCs indeed start growing as cysts that further become pseudostratified epithelia closed around a lumen. We analyze the peculiar features of growth dynamics and propose a simple morpho-elastic model to account for the radial expansion of the cyst and the thickening of the epithelium. The model is critically tested and validated by setting elastic boundaries corresponding to the post-confluent stage of the cysts when they reach the size of the capsule and are constrained by the shell.

RESULTS

hiPSCs encapsulation

We encapsulated a suspension of hiPSCs in hollow alginate spheres, referred to as capsules, following a protocol previously reported (Alessandri, Feyeux, Gurchenkov, Delgado, Trushko, Krause, Vignjević, Nassoy, & Roux, 2016a). Briefly, we used a 3D-printed microfluidic device to generate a composite co-extrusion flow : the cell suspension is injected in the inner capillary and is surrounded by an alginate solution that flows into the outer channel. Both solutions are separated by a neutral sorbitol solution to prevent calcium diffusion from the cell suspension to the alginate solution and cause chip plugging. On exiting the nozzle, the Rayleigh-Plateau instability fragments the coaxial flow into composite droplets. In this jetting regime, the droplet radius is set by the diameter of the nozzle (around 150 μm). When the droplets fall into a 100 mM calcium bath, the alginate undergoes rapid gelation, and cells are entrapped in hollow capsules (*Fig. 1a*). Since hiPSCs are sensitive to anoikis and that native alginate is cell-repellent, we introduced Matrigel into the gel suspension. As reported previously (Alessandri, Feyeux, Gurchenkov, Delgado, Trushko, Krause, Vignjević, Nassoy, & Roux, 2016a), liquid Matrigel crosslinks in warm (37°C) calcium bath, forming a few micrometers thick layer interconnected with the alginate inner wall to which hiPSCs may adhere. We used low encapsulation densities, in the order of 4×10^5 cells/mL in the cell-Matrigel suspension so that the number of cells per capsule upon encapsulation is kept low, but sufficient to promote proliferation, typically below 10 cells. The capsules were then transferred to mTSE1 medium and placed into the incubator for one day before monitoring by video-microscopy.

Growth stages of encapsulated hiPSC cysts

Using phase contrast imaging, we observed that hiPSCs, which were encapsulated within individual capsules, readily self-organize as a cyst in 3D around a central lumen. We could then monitor their growth over a period of almost two weeks on a temperature - and atmosphere - controlled microscope stage. Representative snapshots of cyst growth are displayed in Figure 1c (see also Movie S1). Three main regimes are observed. First, as long as the cyst is smaller than the capsule, in a stage referred to as pre-confluence, the hiPSC cyst grows freely and conserves its spherical shape and gets thicker by contrast with cysts of epithelial cell lines like MDCK cells (Trushko et al., 2020). When the cyst starts to contact the capsule, it follows the shape of the capsule, which always exhibits some deviation from sphericity. Nonetheless, in the rest of this work, we will assume that the shape remains spherical and will characterize its size with an effective radius derived from the measured cross-section. The second stage corresponds to confluence, when the cyst is fully constrained by the internal wall of the shell, corresponding to the confluent stage. Finally, in the post-confluent stage, the cyst is compressed by the elastic capsule and mostly grows inwards until contrast between the lumen and the epithelium is lost, suggesting that a lumen-free aggregate is formed.

Cellular organization, pluripotency of the growing cysts

We first checked whether hiPSC cysts grow as monolayers. In the pre-confluent stage, we fixed cysts and performed nuclear and actin immunostaining. Since actin is mostly localized in the sub-membrane cortex, phalloidin staining allows to delineate cell contours. Figure 1b shows that cysts are indeed organized as a pseudo-stratified columnar epithelium, where, although the nuclei are found at different positions, all cells bridge the apical pole and the basal membrane. Then, we performed staining against two main pluripotency markers, namely SOX2 and OCT4. In the post-confluent stage, where external mechanical

forces are at play and could impact cell differentiation (Even-Ram et al., 2006), we observed that all cells remain SOX2 and OCT4 positive, indicating that pluripotency is conserved throughout cyst growth course.

Monitoring the morpho-dynamics of hiPSCs cyst growth

Figure 2a displays a typical kymograph of a cyst over a period of 7 days. The lumen, the epithelium and the alginate shell are clearly visible. In particular, 3D confluence can be detected from the deformation of the shell, which occurs simultaneously in both sides of the line scan. After confluence, the thickness of the cyst increases more drastically. We have mentioned above that in later stages (not seen here), the lumen even vanishes. However, even in the pre-confluent stages, the cyst thickens while it grows, which is consistent with the picture of a growing pseudo-stratified epithelium. In order to provide a mechanistic explanation of this growth dynamics, we quantitatively measured the external and internal radii of the cysts, r_o and r_i , from the measured cross-section after image segmentation. Figures 2b-c show representative curves of the variations of r_i , r_o and the cyst thickness h as a function of time. For the sake of clarity, we applied a time offset to all curves so that confluence corresponds to $t = 7$ days. Although the initial size of the cyst and of the capsule may slightly differ from one capsule to another, the overall dynamics followed over an extended period of time (around 2 weeks) exhibits robust similarities. Starting from an initial radius of $r_o \sim 50 \mu\text{m}$ and a thickness of $h \sim 15 \mu\text{m}$, confluence is reached for $r_o \sim 150 \mu\text{m}$ after 7 – 10 days.

At this last stage, the cyst has already reached a thickness of about $50 \mu\text{m}$, indicating that cells are significantly stretched to span both sides of the epithelium. From confluence on, cyst growth is slowed down due to elastic confinement by a hydrogel shell whose Young's modulus is $E_{alg} \sim 68 \text{ kPa}$ (Alessandri et al., 2013) and the cyst thickening drastically increases, leading potentially to a closure of the lumen. Although these observations may explain why 3D cell cultures of hiPSCs sometimes lead to cysts or to aggregates, depending on the time scale at which they are considered, we were further intrigued by this peculiar morpho-dynamical evolution.

Growth and elasticity of cysts

We propose here a theoretical description of the cyst growth inside an alginate capsule, which couples the growth to the mechanical stresses in the cyst and the capsule. This model, adapted from a previous work by one of us (ben Amar & Goriely, 2005) calculates the growth of a spherical cyst with a central lumen at discrete times with the assumption that the mechanical forces equilibrate at each step.

Growth model and morpho-elasticity of shells

We assume that during the process, only elasticity and cell proliferation regulate the dynamics of the cyst expansion. In morpho-elasticity, growth is represented by a symmetric second order tensor, with 3 eigenvalues in 3 orthogonal directions. At a given time t , in each of these directions, the eigen-value γ_i represents the deformation gradient due to growth in the direction i with respect to the reference state at time $t = 0$. If the spherical symmetry of the cyst is preserved during growth, the 3 eigen-directions are the radial direction r and the two angular directions θ and ϕ which are equivalent so that $\gamma_\theta = \gamma_\phi$. The growth induces an elastic deformation of the cyst characterized by the three elastic deformation gradients α_i . The total geometric deformation gradients in the 3 directions are then $\alpha_r \gamma_r$ and $\alpha_\theta \gamma_\theta = \alpha_\phi \gamma_\phi$. These deformations give the change in length of a small unit element, in direction i , of size dL_i in the reference state, which after a deformation during the time t has a $dl_i = \alpha_i \gamma_i dL_i$. size

In addition, incompressibility is generally assumed for living tissues (P. H. Wu et al., 2018), so that any volume increase or decrease is only due to the growth process and not to elasticity. This incompressibility condition imposes a relationship between the elastic stretches : $\alpha_r(\alpha_\theta)^2 = 1$. There-fore, the only remaining unknown is $\alpha = \alpha_\theta = \alpha_r^{-1/2}$. The volume change from an initial volume V_i to a volume V_f is then given by $J = V_f/V_i = \gamma_r\gamma_\theta^2$. We also define the growth anisotropy as $\gamma = \gamma_r/\gamma_\theta$. In principle, anisotropic growth reflects the internal structure of the tissue such as the fiber orientation of the cytoskeleton of the cells; but in the cyst, it may be due also to the arrangement of the cells and their interactions.

Growth of the cyst results from cell growth and division which is a discrete process, expected to be much longer than the cell rearrangement and the mechanical relaxation. In order to calculate the elastic deformations at each time, we divide the growth process into discrete timesteps of duration δt which covers these three stages, and is probably of the order of magnitude of the cell division time. The incremental growth deformation gradients during the n th time

step are $\gamma_r^0(n)$ and $\gamma_\theta^0(n) = \gamma_\phi^0(n)$. At a time $t = N\delta t$, the eigen-values of the growth tensor are $\gamma_i(t) = \prod_{n=1}^N \gamma_i^0(n)$. The growth rates k_i in the three directions are defined as $k_i(t) = \partial_t \log \gamma_i(t)$.

The total volume growth is defined as $J = \gamma_r\gamma_\theta^2$, so the volume growth rate is $k = k_r + 2k_\theta$ with a typical proliferation time $\tau = 1/k$, and a division time $\tau_d = \tau \ln(2)$. After a time $t = N\delta t$ the growth rates are related to the incremental growth deformation gradients by $k_i = k_0 \log(\gamma_i^0(N))$ where $k_0 = 1/\delta t$. If the incremental growth factors are constant in time and equal to γ_r^0 and γ_θ^0 , the growth rate is constant and the growth deformation eigen-values increase exponentially with time $\gamma_i(t) = \exp(k_i t)$. In this case, using the discrete time steps, after N time steps, the growth deformation gradients at a time t are $(\gamma_r, \gamma_\theta) = ((\gamma_r^0)^N, (\gamma_\theta^0)^N)$, the growth anisotropy becomes $\gamma(N) = (\gamma_r^0)^N / (\gamma_\theta^0)^N$ while the total volume growth amount is $J_N = \gamma_r\gamma_\theta^2 = (\gamma_r^0)^N (\gamma_\theta^0)^{2N}$.

Anisotropic growth generates elastic strains and stresses (ben Amar & Goriely, 2005): this constitutes a fundamental hallmark of morpho-genesis and embryo-genesis. These quantities combined to the geometry of the tissue explain most of the shapes observed in nature such as the brain cortex (Budday et al., 2015), the intestine (Amar & Jia, 2013; Hannezo et al., 2012), algae (Serikawa & Mandoli, 1998), and plants (Alim et al., 2016; F. Xu et al., 2020). Indeed, when the growth is slow enough that elasticity dominates, biological tissues deform and buckle following simple rules : their shapes minimize an elastic energy with constraints given by the boundary conditions (ben Amar & Goriely, 2005; Goriely, 2019). In our case, the boundary conditions impose the normal stress at the inner and outer boundaries of the cyst or at the boundary of the cyst and the capsule. In the following, we make the important assumption that the cyst and the alginate are perfectly porous to water so that any liquid flux due to geometrical changes equilibrates much faster than the growth process itself. Therefore, the pressure in the fluid is constant both outside the capsule, inside the capsule and in the cyst lumen, and this constant is fixed to zero. In the pre-confluence stage of the growth when the cyst is not yet in contact with the capsule (Fig. 3a-3b), the normal stress which is approximately $E_{cyst} \alpha \sim 10$ kPa (with E_{cyst} the cyst Young's modulus) must equilibrate the Laplace pressure due to the surface tension of order σ/R_i . The surface tension of an

epithelium estimated from *Xenopus* embryonic cells (Luu et al., 2011) is of order $0.5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$, and the ratio between capillarity and elasticity stresses is then of order 10^{-2} . This allows to neglect the surface tension, and therefore the boundary conditions both at the inner and outer boundaries of the cyst impose that the normal stress vanishes. We then find the elastic deformation by minimization of the total elastic energy with respect to the circumferential deformation α or equivalently by writing the stress balance in the radial direction. The total elastic energy \mathcal{E} is obtained by integration over the volume of the hyper-elastic energy density \hat{W} :

$$\mathcal{E} = 4\pi \int_{R_i}^{R_o} R^2 dR J_n \hat{W}(\alpha) \quad (1)$$

We use here a Lagrangian description and R_i and R_o are respectively the initial inner and outer radii of the cyst. In a spherical geometry, the deformation gradient is $\alpha = r/(R\gamma_\theta)$, r being the current radius of the inner sphere inside the cyst initially located at R . We choose the Neo-Hookean model for incompressible materials, which is the simplest model of hyper-elasticity both for the cyst and the alginate :

$$\hat{W}_{NH} = \frac{E}{6} (\alpha^{-4} + 2\alpha^2 - 3) \quad (2)$$

The Young modulus of the cyst E_{cyst} is smaller than the Young modulus of the alginate E_{alg} . Notice that, contrary to the cyst, the capsule does not grow so that inside the capsule $\gamma_r = \gamma_\theta = \gamma = 1$. Using the radial stress balance, we calculate the radial Cauchy stress (ben Amar & Goriely, 2005) :

$$t_r - t_i = \int_{\alpha_i}^{\alpha} \gamma \frac{\partial_\alpha \hat{W}}{\gamma - \alpha^3} d\alpha \quad (3)$$

The explicit calculation with the Neo-Hookean model gives

$$t_r = \frac{E}{3} \left[\frac{1}{2\alpha^4} + \frac{2}{\gamma\alpha} + \frac{(\gamma^2 - 1)}{3\gamma^{4/3}} \left\{ \log \left(\frac{\alpha(\alpha + \gamma^{1/3}) + \gamma^{2/3}}{(\alpha - \gamma^{1/3})^2} \right) - 2\sqrt{3} \tan^{-1} \left(\frac{2\alpha + \gamma^{1/3}}{\sqrt{3}\gamma^{1/3}} \right) \right\} \right]_{\alpha_i}^{\alpha} \quad (4)$$

where the bracket applied to any function f is defined $[f(\alpha)]_{\alpha_i}^{\alpha} = f(\alpha) - f(\alpha_i)$

The volume conservation imposes :

$$\alpha^3 = \gamma \left(1 - R_i^3/R^3 \right) + \alpha_i^3 R_i^3/R^3 \quad (5)$$

Eq. 5 provides the value of the outer radius of the cyst at each step n for a given inner deformation α_i . In the pre-confluence phase of the growth (Fig. 3a-3b), the radial Cauchy stress at the boundaries is equal to zero and during this period, the capsule is not perturbed by the growth of the cyst. After confluence (Fig. 3c), the growing cyst exerts a pressure on the capsule at $R = R_o$ and the radial stress cancels at the outer surface of the capsule and the inner surface of the cyst. At the contact cyst-capsule, the radial stress is continuous.

It is well established that a feedback exists between mechanical stresses and growth of living tissues (Humphrey, 2008; Taber & Humphrey, 2001). Growth is generally inhibited in compression and favored in tension. This coupling between growth and mechanics may explain the decrease of the volume growth of the cyst detected in the experiments, displayed in Fig. 4a after its contact with the capsule.

We introduce the coupling between growth and stress by writing that at each time the incremental growth deformation gradients γ_r^0 and γ_θ^0 , or equivalently, the growth rates k_r and k_θ are reduced by compressive stresses (Kiss et al., 2011). For the sake of simplicity, we propose a simplified theory where the incremental growth rates only depend on the stress averaged over the thickness of the cyst. Our model is now applied to the 3 experimental data sets described above.

Growth of a cyst in an alginate capsule

Our mechanical model requires the knowledge of the values of the physical and biological parameters of both the cyst and the alginate capsule: the Young moduli of the cyst and of the alginate, the radial and ortho-radial growth rates, as well as the sensibility of the growth rates to stresses. Three elastic or growth parameters are unknown, the ratio between E_{alg}/E_{cyst} , γ_r^0 and γ_θ^0 , but the 2 corrective factors for the growth dependence on stress are also required. We consider that the experiments provide the initial sizes with enough precision : external and internal radii of the cyst, radius and thickness of the capsule. Our analytical treatment provides explicit values of the stresses and stretches as functions of time and of the internal and external cyst radii as function of the unknowns. The comparison with the experimental measurements shown in Fig. 2 allows to infer the unknown elastic and biological parameters.

Figure 4 displays a comparison between the 3 data sets of the 3 different experiments and the theoretical curves obtained with the best choice of parameters. The agreement between theory and experiments is satisfactory. Different experiments for close but different sizes of the capsule allow to test the reproducibility of the experiments while getting an insight into the sensitivity of the fit. In all the cases, the capsule has a thickness : $\ell = 35 \mu\text{m}$ and confluence happens at $t \approx 210 \text{ h}$ which corresponds to an internal radius of the alginate $R_{i,alg} = 170 \pm 10 \mu\text{m}$. As observed in Fig. 4a, the growth rates change significantly after confluence between the cyst and the capsule. Since the dependence of the growth tensor is also a second order tensor, many formulations are then possible as discussed in the Supplementary Materials.

We choose the simplest correction for the dependence of the growth on stress:

$$k_\theta = k_\theta^0 + k_\theta^1 \langle t_r \rangle \quad \text{and} \quad k_r = k_r^0 + k_r^1 \langle t_r \rangle$$

(the more compressive the radial stress, the smaller the growth rate).

The growth rates are more sensitive to the radial stress t_r , than to the ortho-radial stress t_θ . This behavior can be explained by the stacking of more than one cell layer in the radial direction of the cyst.

Figure 4b displays the comparison of the theoretical results to the different sets of experimental data. We can estimate the Young moduli of the cysts in the two experiments by calibration : $E_{cyst} = 9.9 \pm 1.4 \text{ kPa}$. This value is on the same order of magnitude as previous measurements on cell monolayers of MDCK cells for which the Young's modulus was $20 \pm 6 \text{ kPa}$ (Harris & Charras, 2011).

The values obtained for k_r and k_θ are different, indicating a growth anisotropy. Nonetheless, the growth is closer to isotropic before confluence than after confluence, resulting in a relation between r_i and r_o that is

almost linear (Fig. 4d) since $\alpha = r/(R\gamma_\theta)$ and $\alpha^{-2} = (dr/dR)/\gamma_r$. The deformation gradient is also low before confluence (Fig. S2a).

Finally, another typical feature of morpho-elasticity is the surface buckling for oriented growth which occurs for large enough values of the growth elongation. Indeed, oriented growth, by boundary constraints or anisotropy, generates compressive stresses in the direction of low extension. In our case, the compressive stress is in the ortho-radial direction where $\alpha < 1$. This symmetry breaking has been first explained by Biot (Biot, 1963). It is observed in Fig. (1c, 2) at the end of the experiment for $t > 315$ h. The radial Cauchy stress t_r at the interface cyste/alginate acts as a pressure $P \sim 0.4 E_{cyst}$ applied at R_o . The growth anisotropy ratio $\gamma \sim 3$ and the inner ortho-radial elastic deformation $\alpha \sim 0.65$ point to a compressive stress on the internal surface. The surface instability, which appears on the inner cyst surface is consistent with the values of the stress found in the study of the shell bifurcation performed in (ben Amar & Goriely, 2005) in the case of thick shells and low number of oscillations.

CONCLUSION

Spontaneous PSC aggregates formed in biomedical engineering devices contrast with the self-organization of these cells reported in developmental biology. By engineering a stem cell niche within capsules loaded with very few PSCs and by imaging them over long time periods, we solve this puzzle. We find that PSCs initially form cysts that grow and thicken, become pseudo-stratified epithelia and finally fill up the whole volume of the capsule. The cyst configuration allows for the same direct access to nutrients for each cell. This is very different from what happens in cell aggregates. This leads to homogeneous growth and low elastic stresses. In general, growth inhomogeneity due to the nutrient access is a major source of stresses in volumetric growth. Since cells are not submitted to any significant mechanical constraints, they preserve their stemness and polarization. We demonstrate that stresses increase slowly during cyst evolution due to anisotropic growth effects. Late stages of growth, also associated with the contact with the capsule show larger stresses that may affect the fate of PSCs, e.g. by triggering uncontrolled differentiation or inducing mutations that will affect the overall phenotypic and genotypic quality of these stem cells for applications in regenerative medicine. We speculate that optimizing the industrial production could require to reach a precise time control of the growth and to know precisely when to end the growth of the cysts before passaging them. To this end, building a minimal mechanical model that describes accurately and quantitatively the growth dynamics of these cysts will hopefully provide a predictive approach that will help to adapt the current empirical approaches.

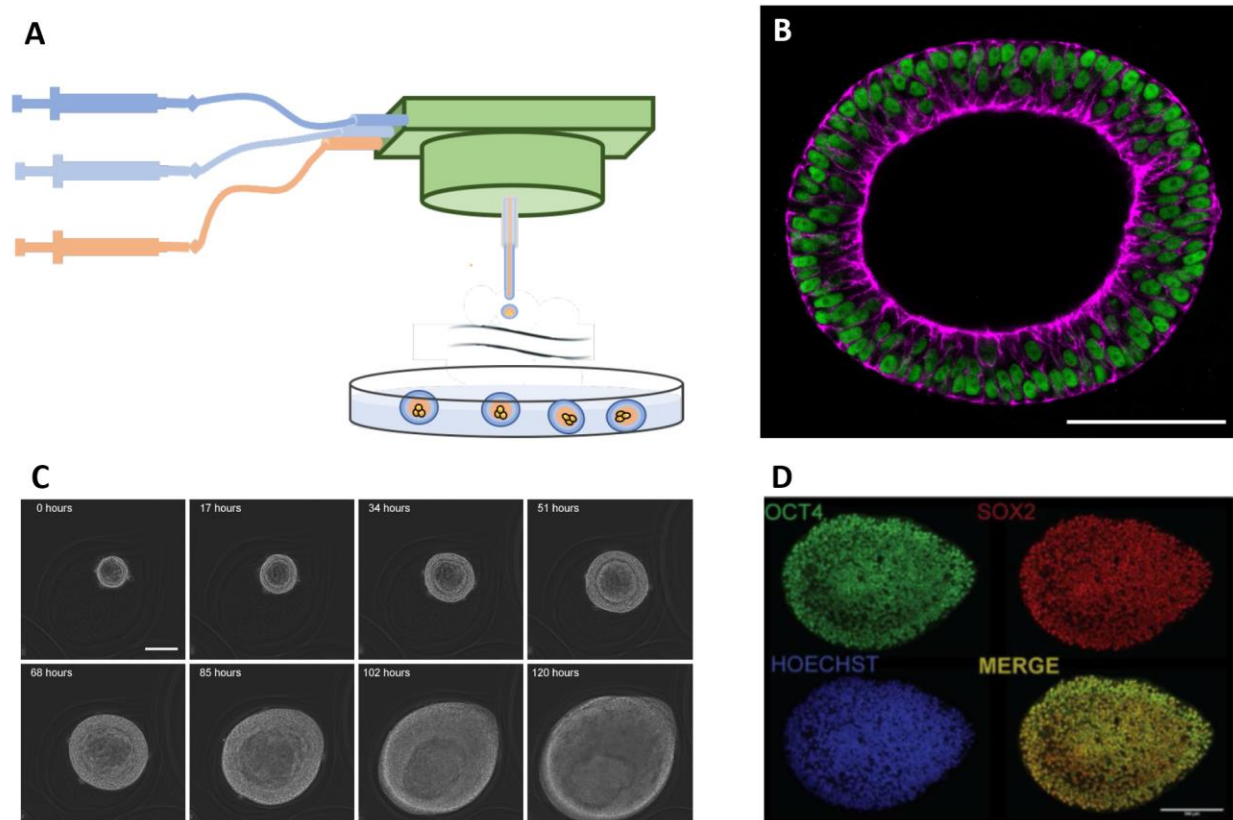


Figure 1 : Growth, morphological and stemness characterization of encapsulated hiPSC cysts

(a) : Drawing of the microfluidic encapsulation platform. The three solutions (alginate solution in dark blue, sorbitol solution in light blue, and hiPSC/Matrigel mixture in orange) are injected simultaneously by computer-controlled syringes into a 3D-printed device (in green). The composite droplets formed upon Rayleigh instability fall into a calcium bath and form the hollow capsules entrapping the cells. **(b)** : Confocal image of the equatorial plane of a cyst stained for nucleus (DAPI in green) and actin (phalloidin in magenta). scale bar is 100 μm . **(c)** : Snapshots of hiPSC cysts growing inside an alginate capsule. Time interval between images is 17 h and scale bar is equal to 100 μm . **(d)** : Confocal images of encapsulated hiPSC colonies in the late stages (10 days after encapsulation) stained for two standard stemness markers (OCT4 and SOX2) and nucleus (HOECHST).

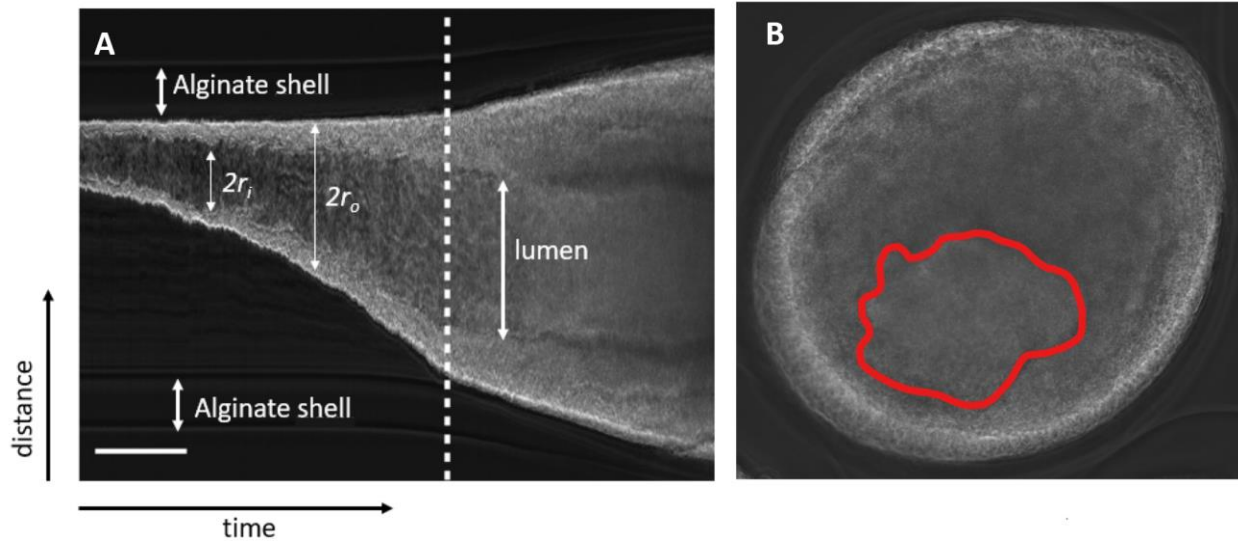


Figure 2: Morphological evolution of encapsulated growing cysts. (a) : Kymograph distance versus time through an encapsulated hiPSC cyst (notations defined in the main text). The dotted line represents the time at which confluence is reached. The scale bar corresponds to 1 day for the abscissa axis and to $100 \mu\text{m}$ for the ordinate axis. **(b) :** Image of a Biot instability at the interface between the cells and the lumen. The contour of the instability is underlined in red.

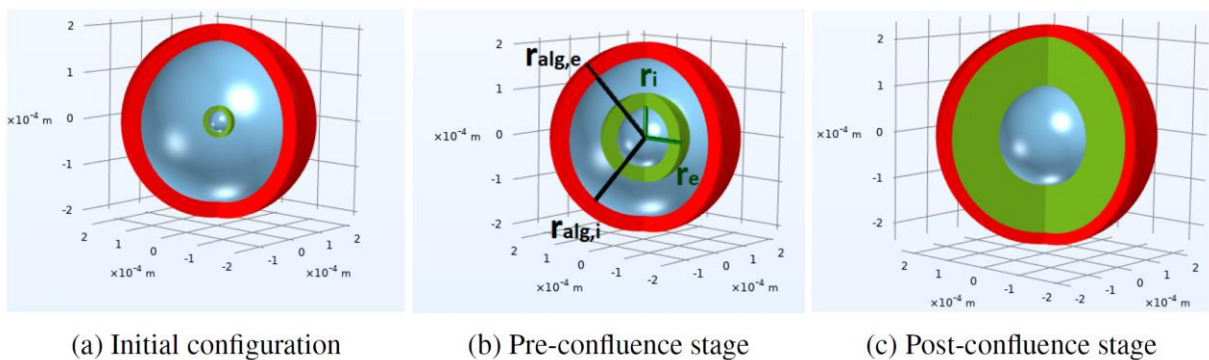


Figure 3: Sketch of the cyst-alginate system. (a) : at time $t = 0$. **(b) :** during growth in the pre-confluent stage. **(c) :** after confluence. The cyst is in green and the alginate in red, the blue represents the fluid between the cyst and the alginate and in the lumen. r_i , r_e , $r_{alg,i}$, $r_{alg,e}$ correspond respectively to the inner radius of the cyst, the outer radius of the cyst, the inner radius of the alginate capsule, and the outer radius of the alginate capsule.

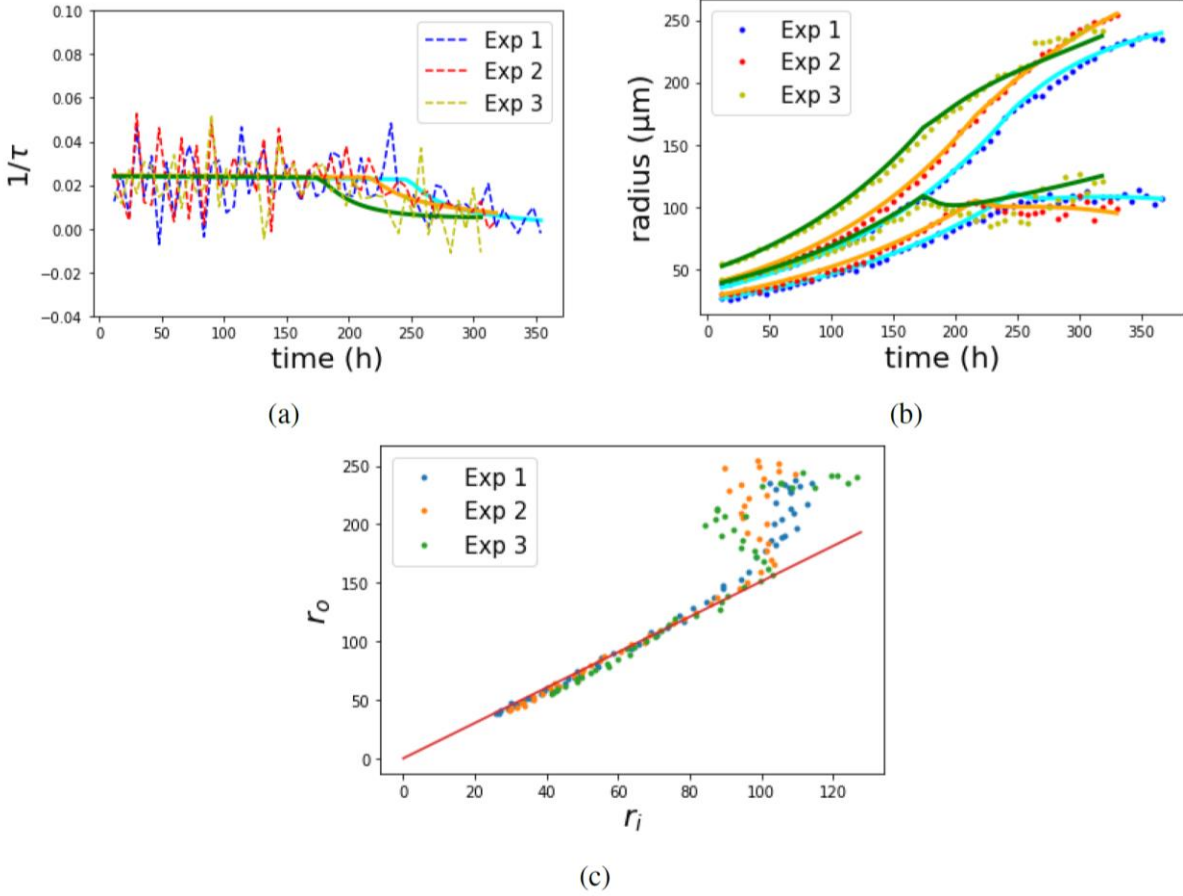


Figure 4: Calibration of the theoretical model for 3 experiments with cells of a single cell type (dots and dotted lines are the experimental data, and the continuous lines are obtained by the present model). (a) : Evolution of the volume growth rates with time. Confluence does not happen at the same time for the different experiments. The value of the volume growth rate in the absence of stress is $k_0 = 1/\tau = (2.41 \pm 0.03) \cdot 10^{-2} \text{ h}^{-1}$. This corresponds to a doubling time : $\tau_d = 28.7 \pm 0.3 \text{ h}$. (b) : Inner and outer radii from experimental data (dots) and theoretical curves (lines). The values of the different parameters obtained from the calibration of the theoretical model are shown for the three experiments in Table. 1. (c) : Outer radius versus inner radius. Before confluence, the relation between the outer and inner radii is almost linear due to the weak interplay between elasticity and growth : $r_o \approx (R_o/R_i) \times r_i \approx 1.5 \times r_i$.

Experiment	Exp 1	Exp 2	Exp 3
E_{cyst} (kPa)	11.3	11.3	8.5
k_r (10^{-3} h^{-1})	8.9	9.08	8.95
k_θ (10^{-3} h^{-1})	6.7	6.75	6.85
k_r^1 (10^{-3} h^{-1})	4	1	5
k_θ^1 (10^{-3} h^{-1})	5	4.4	3

Table 1: Table of the free parameter values obtained from the calibration of the model for the three different experiments shown in Fig. 4.

Acknowledgements

The authors acknowledge the support of ANR (Agence Nationale de la Recherche) under the contract MecaTiss (ANR-17-CE30-0007).

MATERIALS AND METHODS

Ethics statements

Generation, use and storage of human iPSCs were performed with approval from the “Comité de Protection des Personnes” (CPP) Ile de France (DC 2015-2595 and 2016-A00773-48).

Human pluripotent stem cell lines and culture conditions

We used a commercial hiPSC line (ThermoFisher: Gibco™ episomal hiPSC line (A18945)) generated using cord blood derived CD34+ progenitors with seven 7 episomally expressed factors (Oct4, Sox2, Klf4, Myc, Nanog, Lin28, and SV40 T). HiPSC cells were maintained on Matrigel (Corning, # 354234) and cultured in mTeSR1 medium (StemCell Technologies 85875). These 2D cell cultures were fed daily, passaged with an enzyme-free reagent, ReleSRTM (Stem-Cell Technologies 05873) every 3-6 days (around 80% confluency) and replated as small clusters (between 100 to -and 200 μm) at a density of about 5000 – 10000 cells/cm². Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂.

Encapsulation process

Prior to encapsulation, the 2D hiPSC colonies were detached (using ReLeaSRTM) and dissociated into a near single cell suspension using Accutase (Stem Cell Technologies 07920). HiPSCs were then mixed in a 50/50 volume ratio with Matrigel at 4°C to keep the suspension in a liquid state. The final concentration of cells in the cell/matrix solution was thus between 0.4-1.0×10⁶ viable cells/mL, referred to as the encapsulation density. The encapsulation system is similar to the one described in (10). In brief, ethylene tetrafluoroethylene tubings are connected to the three inlets of a 3D printed (using the DLP Micro Plus Hi-Res printer from Envision-TEC) microfluidic co-laminar flow device. An extruded and polished glass microcapillary tip (of diameter ~150 μm) is glued to the outlet of the nozzle for a better control of the flow. The cell/matrix suspension is loaded into the inner channel of the 3-way device, which is kept refrigerated thanks to an in-line cooling system in order to prevent premature gelation of Matrigel. A solution of sodium alginate (Novamatrix Pronova SLG100, 0,25 g #4202101 at 2% in distilled water) is injected into the outer channel. To prevent alginate gelation within the microfluidic device due to calcium release from the suspended cells, a calcium-free solution (Sorbitol 300mM, Sigma-Aldrich 85529) is used in the intermediate channel of the co-extrusion chip and serves as a barrier against calcium diffusion. Typical flow rates for the three solutions were 45mL/h, 45mL/h and 30mL/h for the alginate solution, the sorbitol solution and the cell+matrix suspension, respectively. At these rates, the composite solution forms a liquid jet that fragments into droplets (of about twice the size of the nozzle) due to the spontaneous Rayleigh-Plateau instability. To avoid subsequent coalescence of the train of droplet, an alginate charging part and a copper ring are connected to a high voltage (2000 V) generator. When the composite droplets contact the collecting calcium bath (at 100 mM), the outer alginate layer readily gels. As a consequence, the inner cell/matrix solution remains entrapped inside a closed, spherical and permeable micro-compartment. Within 1 min following encapsulation, capsules are rinsed with medium (DMEM) to reduce the basal calcium concentration. Finally, they are transferred to the suspension culture medium, mTeSR1.

Suspension culture of hiPSC capsules

Suspension cultures of encapsulated hiPSC were carried out in T-Flasks placed in a cell culture incubator at 37°C and 5% CO₂. The mTeSR1 medium was supplemented with 10 μM Y-27632 for ROCK inhibition only during the first 24 hours of culture. From culture day 3, the medium was exchanged every day as follows. The contents of the T-Flasks were transferred into Falcon Tubes. After capsules sedimentation (within a few minutes), the supernatant was removed and replenished as the capsules were transferred back into a T-Flasks. The volume of culture medium was kept constant for the first 4 days of culture (~4x the capsules volume). Then, the volume was steadily increased every day in order to maintain a cell concentration below 106 cells/mL.

Time-lapse microscopy of encapsulated hiPSC cyst growth

Time-lapse microscopy was performed using a Nikon Biostation IM microscope with a 10x objective. Capsules containing hiPSCs were transferred to a 35 mm Petri dish 24 hours after encapsulation. Approximately 20 capsules were placed in the Petri dish containing 5 mL of fresh Y-27632-free mTeSR1 medium. Cyst growth was monitored over about 2 weeks. Practically, images were taken every 6 to 10 minutes at preselected Z-focal planes to ensure acquisition at proper focus in case of undesired drift.

Immunostaining

The alginate capsule was removed prior to fixation by incubating the samples in PBS without divalent cations for at least 5 minutes with agitation at RT. 3D hiPSC colonies were fixed with 4% PFA for 30-60 minutes at RT in the dark. The samples were then washed 3x with 0.1% Tween20 in PBS. A permeabilization step was done in parallel with excess PFA quenching in a PBS solution containing 0.3% Triton X-100 and 100 mM Glycine for 30 minutes, followed by 3x washing with 0.1% Tween20 in PBS. The samples were incubated in primary and secondary antibodies in 1% BSA + 0.1% Tween20 in PBS overnight at 4° with gentle orbital agitation, including a 3x rinsing with 1% BSA + 0.1% Tween20 in PBS after each incubation. Actin and nuclear staining were performed with Phalloidin Alexa Fluor 647 (1:500 dilution, Thermo A222872015553) and Hoechst 33342 (1:1000 dilution). Pluripotency maintenance was assessed by immunofluorescence staining of SOX2 and OCT4 using OCT 3/4 mouse IgG2b (1:200, Santa Cruz Biotechnology sc-5279 E1818), SOX2 rabbit polyclonal (1:1000, Sigma Aldrich AB56033153252), secondary donkey anti-mouse IgG H+L Alexa Fluor Plus 488 (1:500, Thermo/Invitrogen A32766 TF271737A), secondary donkey anti-rabbit IgG H+L Alexa Fluor Plus 555 (1:500, Thermo/Invitrogen A32794 TH271030). Samples were imaged on either a Leica SP5 or SP8 confocal microscope (Bordeaux Imaging Center, BIC).

Image analysis

Image analysis was performed using ImageJ. The external and internal effective radii of the cysts, r_o and r_i , were measured from the equatorial corresponding cross sections S according to $r_{o,i} = (S_{o,i}/\pi)^{1/2}$ after applying appropriate bandpass filters and thresholds. The thickness h of the cyst was derived from $h = r_o - r_i$ and the volume V of the epithelium was calculated as $V = 4\pi(r_o^3 - r_i^3)/3$.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Mechanical model

To obtain the inner and outer radii of the cyst in the current state, we assume that the pressures inside the lumen and in the outer medium vanish, and we solve the equation for the stress at the outer boundary Eq. 3:

$$0 = \int_{\alpha_i}^{\alpha_o(\alpha_i)} \gamma \frac{\partial_\alpha W}{\gamma - \alpha^3} d\alpha + \int_{\alpha_{i,alg}(\alpha_i)}^{\alpha_{o,alg}(\alpha_i)} \frac{\partial_\alpha W}{1 - \alpha^3} d\alpha \quad (S1)$$

where we have separated the contributions from the cyst and the capsule and where the unknown is α_i . $W = E/6(\alpha^{-4} + 2\alpha^2 - 3)$, α is the angular elastic deformation, α_i is the value of this deformation taken at the inner surface of the cyst, α_o the deformation of the cyst at the interface between the cyst and the alginate, $\alpha_{i,alg}$ the deformation at the inner surface of the alginate, and $\alpha_{o,alg}$ the deformation at its outer surface. All these deformations can be written as functions of α_i using volume conservation (Eq. (5)). Before confluence, the deformation is $\alpha = 1$ in the alginate and the second integral cancels. Eq. (S1) provides the value of α_i . Knowing the growth deformation γ_θ , we can calculate the inner radius in the current state $r_i = \alpha_i \gamma_\theta R_i$ using the radius R_i in the reference state. Volume conservation then yields the value of the outer radius.

The total growth deformations $\gamma_\theta(t_n), \gamma_r(t_n)$ at step n which correspond to a time $t = n\delta t$ are the products of the incremental growth deformations $\gamma_\theta^0(t_i), \gamma_r^0(t_i)$ so that : $\gamma_\theta(t_n) = \prod_{i=1}^n \gamma_\theta^0(t_i), \gamma_r(t_n) = \prod_{i=1}^n \gamma_r^0(t_i)$ with $\gamma_r^0(t_i) = e^{k_r(t_i)\delta t}, \gamma_\theta^0(t_i) = e^{k_\theta(t_i)\delta t}$. The angular and radial growth rates are linear functions of the mean radial stress in the cyst : $k_\theta = k_\theta^0 + k_\theta^1 \langle t_r \rangle$ and $k_r = k_r^0 + k_r^1 \langle t_r \rangle$ where $\langle t_r \rangle = 3 \int_{r_i}^{r_o} r^2 t_r dr / (r_o^3 - r_i^3)$. The stress at radius r in the current state which corresponds to the radius R in the initial configuration in the cyst is given by the relation :

$$t_r = \int_{\alpha_i}^{\alpha(\alpha_i)} \gamma \frac{\partial_\alpha W}{\gamma - \alpha^3} d\alpha \quad (S2)$$

where α in function of R and α_i is given by volume conservation (Eq. 5).

Other models of the time evolution of the growth rates with time can be tested, but yield less satisfactory results. The first option is to consider constant growth rates : $k_\theta = k_\theta^0$, $k_r = k_r^0$.

A refined possibility is a linear dependence of the growth rates on average pressure

$k_\theta = k_\theta^0 + k_\theta^1 \langle P \rangle$, $k_r = k_r^0 + k_r^1 \langle P \rangle$. This last possibility yields a rather good description of the experiments but at long times, the total volume growth J reaches a plateau, whereas in the experiments it continues to decrease. The results are shown in Fig. S1. We therefore choose a variation of the growth rates with the radial stress that leads to a decrease of the growth rates for the whole duration of the confluence stage (Fig. S2c).

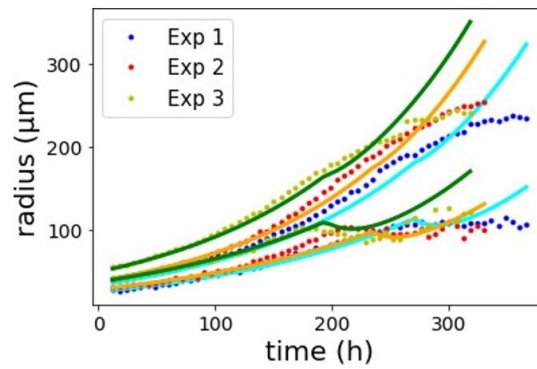
An error E to quantify the adequacy of the theoretical model to the experiments is calculated as follows :

$$\epsilon = \frac{1}{3} \sum_{j=1}^3 \frac{1}{2N_j} \sqrt{\sum_{k=1}^{N_j} \left[\left(r_{j,k}^{th,o} - r_{j,k}^{exp,o} \right)^2 + \left(r_{j,k}^{th,i} - r_{j,k}^{exp,i} \right)^2 \right]} \quad (S3)$$

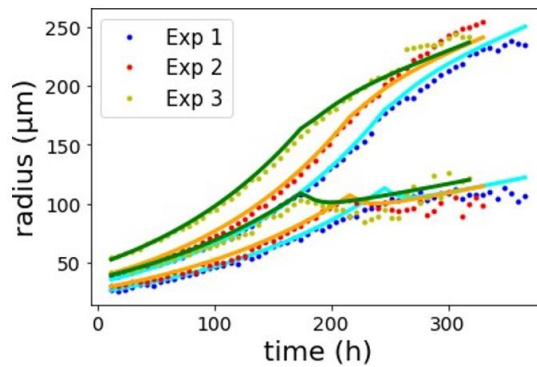
where j is the number of the experiment (Exp 1-2-3), N_j is the number of experimental points in this experiment. There are N_j experimental points indexed by j, k for the outer radius of the cyst $r_{j,k}^{exp,o}$, and N_j experimental points for the inner radius of the cyst $r_{j,k}^{exp,i}$. Those points correspond to the points $r_{j,k}^{th,o}$ and $r_{j,k}^{th,i}$ in the theoretical model.

Fig. S2c-S2d display the evolution of the global growth rates with time. A discontinuity appears at confluence, with a significant change in the growth rates. Fig. S2a-S2b show the evolution with time of the angular elastic deformation at the interface between the cyst and the lumen, the radial stress taken at the interface between the cyst and the lumen and the averaged radial stress in the cyst. These values justify the observation of the buckling instability at the end of the experiment.

A Constant growth rates.
Error : $E = 3:12$



B Pressure depending growth rates.
Error : $E = 1:13$



C Radial stress depending growth rates.
Error : $= 0:80$

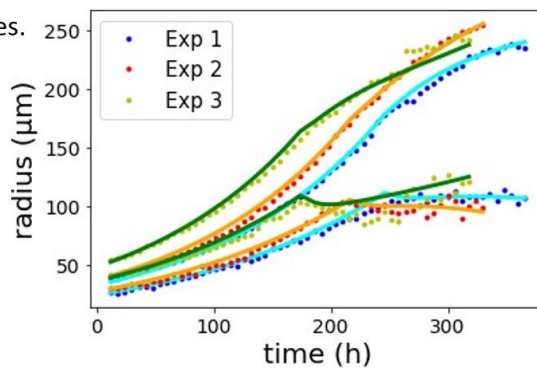


Figure S1: Cyst radii and calibration of the growth rates according to the model. (a) : The growth rates are constant in time. **(b)** : The growth rates depend on the averaged pressure in the cyst. **(c)** : The growth rates have a linear dependence on the averaged radial stress in the cyst.

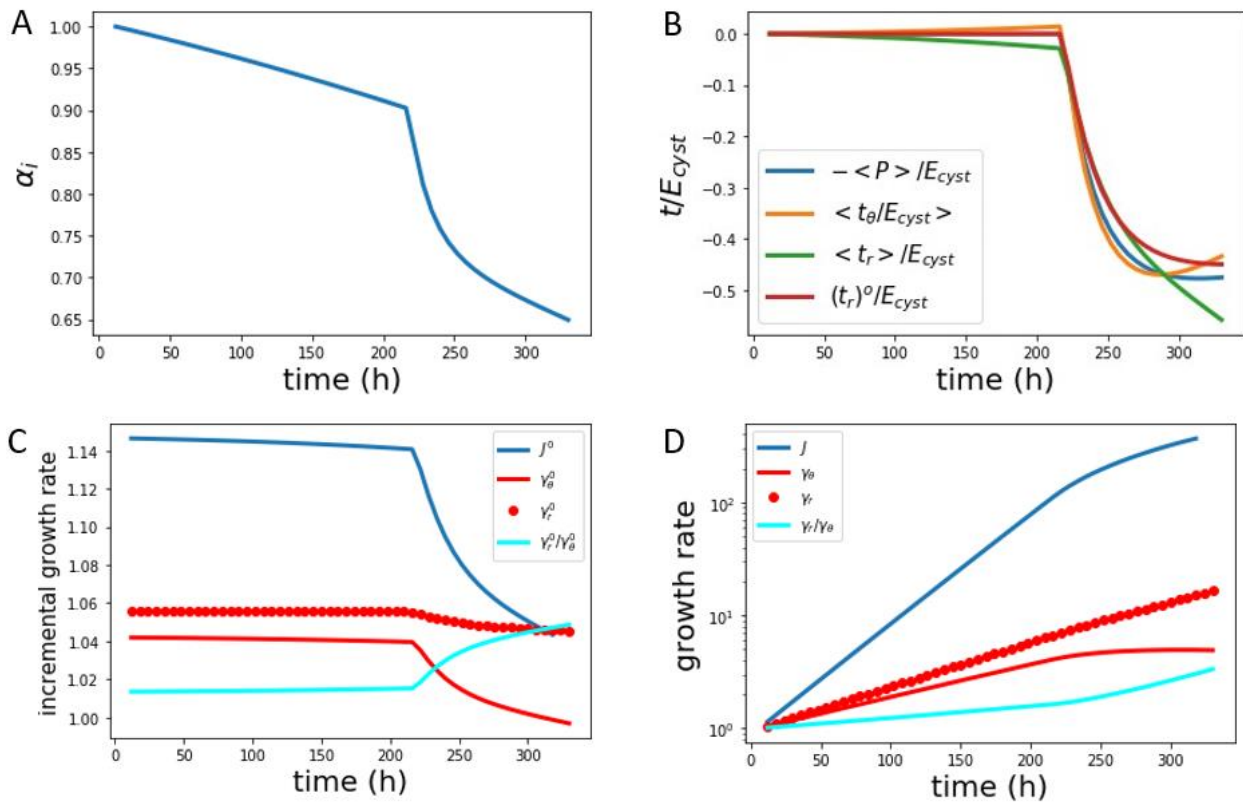
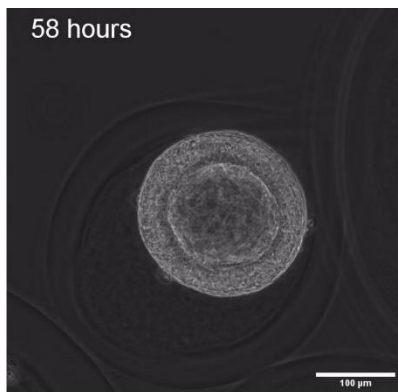


Figure S2: Time evolution of several computed quantities in Experiment 2. (a) : Evolution of the angular elastic deformation gradient at the inner surface of the cyst α_i . **(b) :** The mean radial, the ortho-radial stresses and the stress invariant $\langle t_r \rangle$, $\langle t_\theta \rangle$, $\langle P \rangle$ as well as the radial stress at the outer surface $(t_r)_o$ normalized by E_{cyst} . Those values contribute to explain the buckling instability at the end of the experiment. **(c,d) :** Evolution of the different incremental (c) and total (d) growth variables $J = \gamma^2 \gamma_r, \gamma_\theta, \gamma_r, \gamma = \gamma_r / \gamma_\theta$ with time.



Movie S1: Movie displaying the full process of the growth during the pre-confluence and the post-confluence stages. The link to access the movie is :
<https://documentcloud.adobe.com/link/track?uri=urn:aaid:scds:US:f5a2b14a-d1cc-48f0-b952-b4d40e99910b#pageNum=1>.

3. LISTE DES ABRÉVIATIONS

Cellules souches	CS
Cellules souches pluripotentes induites	iPS, iPSC
Cellules souches pluripotentes embryonnaires	ES, ESC
Cellules souches pluripotentes humaines	<i>hPSC, hiPSC, hiPS, hES, hESC</i>
Cellules souches pluripotentes murine	<i>mPSC, miPSC, miPS, mES, mESC</i>
Cellules souches mésenchymateuses	MSC

4. BIBLIOGRAPHIE

- Abecasis, B., Aguiar, T., Arnault, É., Costa, R., Gomes-Alves, P., Aspegren, A., Serra, M., & Alves, P. M. (2017). Expansion of 3D human induced pluripotent stem cell aggregates in bioreactors: Bioprocess intensification and scaling-up approaches. *Journal of Biotechnology*, 246, 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.01.004>
- Adil, M. M., & Schaffer, D. v. (2017). Expansion of human pluripotent stem cells. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 15(Cm), 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.coche.2016.11.002>
- Afanassieff, M., Aksoy, I., Beaujean, N., Bourillot, P. Y., & Savatier, P. (2018). Fifty shades of pluripotency. *Medecine/Sciences*, 34(11), 944–953. <https://doi.org/10.1051/medsci/2018240>
- Agarwal, P., Zhao, S., Bielecki, P., Rao, W., Choi, J. K., Zhao, Y., Yu, J., Zhang, W., & He, X. (2013). One-step microfluidic generation of pre-hatching embryo-like core-shell microcapsules for miniaturized 3D culture of pluripotent stem cells. *Lab on a Chip*, 13(23), 4525–4533. <https://doi.org/10.1039/c3lc50678a>
- Aguilera-Castrejon, A., Oldak, B., Shani, T., Ghanem, N., Itzkovich, C., Slomovich, S., Tarazi, S., Bayerl, J., Chugaeva, V., Ayyash, M., Ashoukhi, S., Sheban, D., Livnat, N., Lasman, L., Viukov, S., Zerbib, M., Addadi, Y., Rais, Y., Cheng, S., ... Hanna, J. H. (2021). Ex utero mouse embryogenesis from pre-gastrulation to late organogenesis. *Nature*, 593(7857), 119–124. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03416-3>
- Aijaz, A., Li, M., Smith, D., Khong, D., Leblon, C., Fenton, O. S., Olabisi, R. M., Libutti, S., Tischfield, J., Maus, M. v., Deans, R., Barcia, R. N., Anderson, D. G., Ritz, J., Preti, R., & Parekkadan, B. (2018). Biomanufacturing for clinically advanced cell therapies. *Nature Biomedical Engineering*, 2(6), 362–376. <https://doi.org/10.1038/s41551-018-0246-6>
- Aiken, C. E. M., Swoboda, P. P. L., Skepper, J. N., & Johnson, M. H. (2004). The direct measurement of embryogenic volume and nucleo-cytoplasmic ratio during mouse pre-implantation development. *Reproduction*, 128(5), 527–535. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00281>
- Aisenbrey, E. A., & Murphy, W. L. (2020). Synthetic alternatives to Matrigel. *Nature Reviews Materials*. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0199-8>
- Alessandri, K. (2013). The Cellular Capsules technology And its applications to investigate model tumor. <Http://Www.Theses.Fr>, 1–121.
- Alessandri, K., Feyeux, M., Gurchenkov, B., Delgado, C., Trushko, A., Krause, K. H., Vignjević, D., Nassoy, P., & Roux, A. (2016a). A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC). *Lab on a Chip*, 16(9), 1593–1604. <https://doi.org/10.1039/c6lc00133e>
- Alessandri, K., Feyeux, M., Gurchenkov, B., Delgado, C., Trushko, A., Krause, K. H., Vignjević, D., Nassoy, P., & Roux, A. (2016b). A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC). *Lab on a Chip*, 16(9), 1593–1604. <https://doi.org/10.1039/c6lc00133e>
- Alessandri, K., Feyeux, M., Gurchenkov, B., Delgado, C., Trushko, A., Krause, K.-H. H., Vignjević, D., Nassoy, P., Roux, A. A., Vignjevic, D., Nassoy, P., & Roux, A. A. (2016). A 3D printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human Neuronal Stem Cells (hNSC). *Lab Chip*, 16(9), 1593–1604. <https://doi.org/10.1039/C6LC00133E>
- Alessandri, K., Sarangi, B. R., Gurchenkov, V. V., Sinha, B., Kießling, T. R., Fetler, L., Rico, F., Scheuring, S., Lamaze, C., Simon, A., Geraldo, S., Vignjević, D., Doméjean, H., Rolland, L., Funfak, A., Bibette, J., Bremond, N., & Nassoy, P. (2013). Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(37), 14843–14848. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309482110>
- Algire, G. H. (1949). Recent developments in the transparent-chamber technique as adapted to the mouse. *Journal of the National Cancer Institute*, 10(2), 225–253. <https://doi.org/10.1093/jnci/10.2.225>
- Alim, K., Armon, S., Shraiman, B. I., & Boudaoud, A. (2016). Leaf growth is conformal. *Physical Biology*, 13(5). <https://doi.org/10.1088/1478-3975/13/5/05LT01>

- Amar, M. ben, & Jia, F. (2013). Anisotropic growth shapes intestinal tissues during embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(26), 10525–10530. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217391110>
- Amer, M. H., Rose, F. R. A. J., Shakesheff, K. M., Modo, M., & White, L. J. (2017). Translational considerations in injectable cell-based therapeutics for neurological applications: concepts, progress and challenges. *Npj Regenerative Medicine*, *2*(1). <https://doi.org/10.1038/s41536-017-0028-x>
- Amit, M., Laevsky, I., Miropolsky, Y., Shariki, K., Peri, M., & Itskovitz-Eldor, J. (2011). Dynamic suspension culture for scalable expansion of undifferentiated human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, *6*(5), 572–579. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.325>
- Andrews, P. W., Ben-David, U., Benvenisty, N., Coffey, P., Eggen, K., Knowles, B. B., Nagy, A., Pera, M., Reubinoff, B., Rugg-Gunn, P. J., & Stacey, G. N. (2017). Assessing the Safety of Human Pluripotent Stem Cells and Their Derivatives for Clinical Applications. *Stem Cell Reports*, *9*(1), 1–4. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.05.029>
- Andrique, L., Recher, G., Alessandri, K., Pujol, N., Feyeux, M., Bon, P., Cognet, L., Nassoy, P., & Bikfalvi, A. (2019). A model of guided cell self-organization for rapid and spontaneous formation of functional vessels. *Science Advances*, *5*(6), 1–13. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau6562>
- Araki, R., Hoki, Y., Suga, T., Obara, C., Sunayama, M., Imadome, K., Fujita, M., Kamimura, S., Nakamura, M., Wakayama, S., Nagy, A., Wakayama, T., & Abe, M. (2020). Genetic aberrations in iPSCs are introduced by a transient G1/S cell cycle checkpoint deficiency. *Nature Communications*, *11*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13830-x>
- Arck, P., Solano, M. E., Walecki, M., & Meinhardt, A. (2014). The immune privilege of testis and gravid uterus: Same difference? *Molecular and Cellular Endocrinology*, *382*(1), 509–520. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.022>
- Arenas, E., Denham, M., & Villaescusa, J. C. (2015). How to make a midbrain dopaminergic neuron. *Development (Cambridge)*, *142*(11), 1918–1936. <https://doi.org/10.1242/dev.097394>
- Ashimova, A., Yegorov, S., Negmetzhanov, B., & Hortelano, G. (2019). Cell Encapsulation Within Alginate Microcapsules: Immunological Challenges and Outlook. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *7*(December), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00380>
- Assawachananont, J., Mandai, M., Okamoto, S., Yamada, C., Eiraku, M., Yonemura, S., Sasai, Y., & Takahashi, M. (2014). Transplantation of embryonic and induced pluripotent stem cell-derived 3D retinal sheets into retinal degenerative mice. *Stem Cell Reports*, *2*(5), 662–674. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.03.011>
- Assou, S., Bouckenheimer, J., & de Vos, J. (2018). Concise Review: Assessing the Genome Integrity of Human Induced Pluripotent Stem Cells: What Quality Control Metrics? *Stem Cells*, *36*(6), 814–821. <https://doi.org/10.1002/stem.2797>
- Assou, S., Girault, N., Plinet, M., Bouckenheimer, J., Sansac, C., Combe, M., Mianné, J., Bourguignon, C., Fieldes, M., Ahmed, E., Commes, T., Boureux, A., Lemaître, J. M., & de Vos, J. (2020). Recurrent Genetic Abnormalities in Human Pluripotent Stem Cells: Definition and Routine Detection in Culture Supernatant by Targeted Droplet Digital PCR. *Stem Cell Reports*, *14*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.12.004>
- Attwood, S., & Edel, M. (2019). iPSC-Cell Technology and the Problem of Genetic Instability—Can It Ever Be Safe for Clinical Use? *Journal of Clinical Medicine*, *8*(3), 288. <https://doi.org/10.3390/jcm8030288>
- Avery, S., Hirst, A. J., Baker, D., Lim, C. Y., Alagaratnam, S., Skotheim, R. I., Lothe, R. A., Pera, M. F., Colman, A., Robson, P., Andrews, P. W., & Knowles, B. B. (2013). BCL-XL mediates the strong selective advantage of a 20q11.21 amplification commonly found in human embryonic stem cell cultures. *Stem Cell Reports*, *1*(5), 379–386. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.10.005>
- Avior, Y., Eggen, K., & Benvenisty, N. (2019). Cancer-Related Mutations Identified in Primed and Naive Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, *25*(4), 456–461. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.09.001>
- Bai, Q. (2013). Human pluripotent stem cells in In vitro conditions : differentiation and genomic instability. *Thèse de Doctorat En Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire, Physiologie et Nutrition*. <http://www.theses.fr/2013MON1T007>
- Bai, Q., Desprat, R., Klein, B., Lemaître, J.-M., & de Vos, J. (2013). Embryonic Stem Cells or Induced Pluripotent Stem Cells? A DNA Integrity Perspective. *Current Gene Therapy*, *13*(2), 93–98. <https://doi.org/10.2174/1566523211313020003>

- Bai, Q., Ramirez, J. M., Becker, F., Pantesco, V., Lavabre-Bertrand, T., Hovatta, O., Lemaître, J. M., Pellestor, F., & de Vos, J. (2015). Temporal analysis of genome alterations induced by single-cell passaging in human embryonic stem cells. *Stem Cells and Development*, *24*(5), 653–662. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0292>
- Baker, D., Harrison, N. J., Maltby, E., Smith, K., Moore, H. D., Shaw, P. J., Heath, P. R., Holden, H., & Andrews, P. W. (2007). Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nature Biotechnology*, *25*(2), 207–215. <https://doi.org/10.1038/nbt1285>
- Baker, N. E. (2020). Emerging mechanisms of cell competition. *Nature Reviews Genetics*, *21*(11), 683–697. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0262-8>
- Bañó, M. C., Cohen, S., Visscher, K. B., Allcock, H. R., & Langer, R. (1991). A novel synthetic method for hybridoma cell encapsulation. *Bio/Technology*, *9*(5), 468–471. <https://doi.org/10.1038/nbt0591-468>
- Bao, M., Xie, J., & Huck, W. T. S. (2018). Recent Advances in Engineering the Stem Cell Microniche in 3D. *Advanced Science*, *5*(8). <https://doi.org/10.1002/adv.201800448>
- Bar, S., & Benvenisty, N. (2019). Epigenetic aberrations in human pluripotent stem cells. *The EMBO Journal*, *38*(12), 1–18. <https://doi.org/10.15252/emj.2018101033>
- Barbaric, I., Biga, V., Gokhale, P. J., Jones, M., Stavish, D., Glen, A., Coca, D., & Andrews, P. W. (2014). Time-lapse analysis of human embryonic stem cells reveals multiple bottlenecks restricting colony formation and their relief upon culture adaptation. *Stem Cell Reports*, *3*(1), 142–155. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.05.006>
- Barcellos-Hoff, M. H., Aggeler, J., Ram, T. G., & Bissell, M. J. (1989). Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. *Development*, *105*(2), 223–235. <https://doi.org/10.1242/dev.105.2.223>
- Barker, R. A. (2014). Developing stem cell therapies for Parkinson’s disease: Waiting until the time is right. *Cell Stem Cell*, *15*(5), 539–542. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.09.016>
- Barker, R. A., Barrett, J., Mason, S. L., & Björklund, A. (2013). Fetal dopaminergic transplantation trials and the future of neural grafting in Parkinson’s disease. *The Lancet Neurology*, *12*(1), 84–91. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70295-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70295-8)
- Barker, R. A., Drouin-Ouellet, J., & Parmar, M. (2015). Cell-based therapies for Parkinson disease—past insights and future potential. *Nature Reviews Neurology*, *11*(9), 492–503. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2015.123>
- Barker, R. A., Parmar, M., Studer, L., & Takahashi, J. (2017). Human Trials of Stem Cell-Derived Dopamine Neurons for Parkinson’s Disease: Dawn of a New Era. *Cell Stem Cell*, *21*(5), 569–573. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.09.014>
- Baumann, K. (2017). Stem cells: Stem cell-based therapies threatened by the accumulation of p53 mutations. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *18*(7), 403. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.52>
- Beccari, L., Moris, N., Girgin, M., Turner, D. A., Baillie-Johnson, P., Cossy, A. C., Lutolf, M. P., Duboule, D., & Arias, A. M. (2018). Multi-axial self-organization properties of mouse embryonic stem cells into gastruloids. *Nature*, *562*(7726), 272–276. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0578-0>
- Bedzhov, I., & Zernicka-Goetz, M. (2014). Self-organizing properties of mouse pluripotent cells initiate morphogenesis upon implantation. In *Cell* (Vol. 156, Issue 5, pp. 1032–1044). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.023>
- ben Amar, M., & Goriely, A. (2005). Growth and instability in elastic tissues. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, *53*(10), 2284–2319. <https://doi.org/10.1016/j.jmps.2005.04.008>
- Benchetrit, H., Jaber, M., Zayat, V., Sebban, S., Pushett, A., Makedonski, K., Zakheim, Z., Radwan, A., Maoz, N., Lasry, R., Renous, N., Inbar, M., Ram, O., Kaplan, T., & Buganim, Y. (2019). Direct Induction of the Three Pre-implantation Blastocyst Cell Types from Fibroblasts. *Cell Stem Cell*, *24*(6), 983–994.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.03.018>
- Ben-David, U. (2014). Analyzing the genomic integrity of stem cells. *StemBook*, *10*(1), 27–37. <https://doi.org/10.3824/stembook.1.150.1>
- Ben-David, U., & Amon, A. (2020). Context is everything: aneuploidy in cancer. *Nature Reviews Genetics*, *21*(1), 44–62. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0171-x>

- Berishvili, E., Casiraghi, F., Amarelli, C., Scholz, H., Piemonti, L., Berney, T., & Montserrat, N. (2021). Mini-organs forum: how to advance organoid technology to organ transplant community. *Transplant International*, *34*(9), 1588–1593. <https://doi.org/10.1111/tri.13988>
- Bhutani, K., Nazor, K. L., Williams, R., Tran, H., Dai, H., Dzakula, Z., Cho, E. H., Pang, A. W. C., Rao, M., Cao, H., Schork, N. J., & Loring, J. F. (2016). Whole-genome mutational burden analysis of three pluripotency induction methods. *Nature Communications*, *7*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms10536>
- Biot, M. A. (1963). Surface instability of rubber in compression. *Applied Scientific Research, Section A*, *12*(2), 168–182. <https://doi.org/10.1007/BF03184638>
- Bisceglie, V. (1933). Über die antineoplastische Immunität. II. Mitteilung. Über die Wachstumsfähigkeit der heterologen Geshwulste in erwachsenen Tieren nach Einpflanzung in Kolloidiumsackchen. *Z. Krebsforsch*, *40*, 141.
- Bissell, M. (2012). TED talk: MINA BISSELL : des expériences qui laissent entrevoir une nouvelle façon de comprendre le cancer. *Youtube, TEDx Talks*. https://www.ted.com/talks/mina_bissell_experiments_that_point_to_a_new_understanding_of_cancer?language=en
- Bissell, M. J., & Hines, W. C. (2011). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature Medicine*, *17*(3), 320–329. <https://doi.org/10.1038/nm.2328>
- Blakeley, P., Fogarty, N. M. E., del Valle, I., Wamaita, S. E., Hu, T. X., Elder, K., Snell, P., Christie, L., Robson, P., & Niakan, K. K. (2015). Defining the Three Cell Lineages of the Human Blastocyst by Single-Cell RNA-seq. *Development (Cambridge)*, *142*(20), 3613. <https://doi.org/10.1242/dev.131235>
- Blau, H. M., & Daley, G. Q. (2019). Stem cells in the treatment of disease. *New England Journal of Medicine*, *380*(18), 1748–1760. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1716145>
- Blokszyl, F., de Ligt, J., Jager, M., Sasselli, V., Roerink, S., Sasaki, N., Huch, M., Boymans, S., Kuijk, E., Prins, P., Nijman, I. J., Martincorena, I., Mokry, M., Wiegerinck, C. L., Middendorp, S., Sato, T., Schwank, G., Nieuwenhuis, E. E. S., Verstegen, M. M. A., ... van Bostel, R. (2016). Tissue-specific mutation accumulation in human adult stem cells during life. *Nature*, *538*(7624), 260–264. <https://doi.org/10.1038/nature19768>
- Bochenek, M. A., Veisheh, O., Vegas, A. J., McGarrigle, J. J., Qi, M., Marchese, E., Omami, M., Doloff, J. C., Mendoza-Elias, J., Nourmohammadzadeh, M., Khan, A., Yeh, C. C., Xing, Y., Isa, D., Ghani, S., Li, J., Landry, C., Bader, A. R., Olejnik, K., ... Oberholzer, J. (2018). Alginate encapsulation as long-term immune protection of allogeneic pancreatic islet cells transplanted into the omental bursa of macaques. *Nature Biomedical Engineering*, *2*(11), 810–821. <https://doi.org/10.1038/s41551-018-0275-1>
- Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Boulting, G., Smith, Z. D., Ziller, M., Croft, G. F., Amoroso, M. W., Oakley, D. H., Gnirke, A., Eggan, K., & Meissner, A. (2011). Reference maps of human es and ips cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell*, *144*(3), 439–452. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.12.032>
- Bolton, H., Graham, S. J. L., van der Aa, N., Kumar, P., Theunis, K., Fernandez Gallardo, E., Voet, T., & Zernicka-Goetz, M. (2016). Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential. *Nature Communications*, *7*, 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms11165>
- Borys, B. S., Dang, T., So, T., Rohani, L., Revay, T., Walsh, T., Thompson, M., Argiropoulos, B., Rancourt, D. E., Jung, S., Hashimura, Y., Lee, B., & Kallos, M. S. (2021). Overcoming bioprocess bottlenecks in the large-scale expansion of high-quality hiPSC aggregates in vertical-wheel stirred suspension bioreactors. *Stem Cell Research and Therapy*, *12*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02109-4>
- Borys, B. S., So, T., Colter, J., Dang, T., Roberts, E. L., Revay, T., Larijani, L., Krawetz, R., Lewis, I., Argiropoulos, B., Rancourt, D. E., Jung, S., Hashimura, Y., Lee, B., & Kallos, M. S. (2020). Optimized serial expansion of human induced pluripotent stem cells using low-density inoculation to generate clinically relevant quantities in vertical-wheel bioreactors. *Stem Cells Translational Medicine*, *9*(9), 1036–1052. <https://doi.org/10.1002/sctm.19-0406>
- Bouckenheimer, J. (2016). Rôle fonctionnel des longs ARN non codants dans l'adaptation et la pluripotence des cellules souches en culture. *Thèse de Doctorat En Biologie Santé*. <http://www.theses.fr/2016MONT3505>

- Bouckenheimer, J., Assou, S., Riquier, S., Hou, C., Philippe, N., Sansac, C., Lavabre-Bertrand, T., Commes, T., Lemaître, J. M., Boureux, A., & de Vos, J. (2016). Long non-coding RNAs in human early embryonic development and their potential in ART. *Human Reproduction Update*, 23(1), 19–40. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw035>
- Bowling, S., di Gregorio, A., Sancho, M., Pozzi, S., Aarts, M., Signore, M., Schneider, M. D., Barbera, J. P. M., Gil, J., & Rodríguez, T. A. (2018). P53 and mTOR signalling determine fitness selection through cell competition during early mouse embryonic development. *Nature Communications*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04167-y>
- Bowling, S., Lawlor, K., & Rodríguez, T. A. (2019). Cell competition: The winners and losers of fitness selection. *Development (Cambridge)*, 146(13). <https://doi.org/10.1242/dev.167486>
- Braam, S. R., Zeinstra, L., Litjens, S., Ward-van Oostwaard, D., van den Brink, S., van Laake, L., Lebrin, F., Kats, P., Hochstenbach, R., Passier, R., Sonnenberg, A., & Mummery, C. L. (2008). Recombinant Vitronectin Is a Functionally Defined Substrate That Supports Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal via $\alpha V\beta 5$ Integrin. *Stem Cells*, 26(9), 2257–2265. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0291>
- Brandenberg, N., Hoehnel, S., Kuttler, F., Homicsko, K., Ceroni, C., Ringel, T., Gjorevski, N., Schwank, G., Coukos, G., Turcatti, G., & Lutolf, M. P. (2020). High-throughput automated organoid culture via stem-cell aggregation in microcavity arrays. *Nature Biomedical Engineering*. <https://doi.org/10.1038/s41551-020-0565-2>
- Brickman, J. M., & Serup, P. (2017). Properties of embryoid bodies. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 6(2). <https://doi.org/10.1002/wdev.259>
- Brimble, S. N., Zeng, X., Weiler, D. A., Luo, Y., Liu, Y., Lyons, I. G., Freed, W. J., Robins, A. J., Rao, M. S., & Schulz, T. C. (2004). Karyotypic stability, genotyping, differentiation, feeder-free maintenance, and gene expression sampling in three human embryonic stem cell lines derived prior to August 9, 2001. *Stem Cells and Development*, 13(6), 585–597. <https://doi.org/10.1089/scd.2004.13.585>
- Brogiere, N., Isenmann, L., Hirt, C., Ringel, T., Placzek, S., Cavalli, E., Ringnalda, F., Villiger, L., Züllig, R., Lehmann, R., Rogler, G., Heim, M. H., Schüler, J., Zenobi-Wong, M., & Schwank, G. (2018). Growth of Epithelial Organoids in a Defined Hydrogel. *Advanced Materials*, 30(43). <https://doi.org/10.1002/adma.201801621>
- Brons, I. G. M., Smithers, L. E., Trotter, M. W. B., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva De Sousa Lopes, S. M., Howlett, S. K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R. A., & Vallier, L. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*, 448(7150), 191–195. <https://doi.org/10.1038/nature05950>
- Bruno Moulin; Marie-Noëll Peraldi. (2018). Transplantation d'organes. *8eme COLLÈGE UNIVERSITAIRE DES ENSEIGNANTS DE NÉPHROLOGIE*, 399–422.
- Budday, S., Nay, R., de Rooij, R., Steinmann, P., Wyrobek, T., Ovaert, T. C., & Kuhl, E. (2015). Mechanical properties of gray and white matter brain tissue by indentation. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 46, 318–330. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.02.024>
- Buzzard, J. J., Gough, N. M., Crook, J. M., & Colman, A. (2004). Karyotype of human ES cells during extended culture [3] (multiple letters). *Nature Biotechnology*, 22(4), 381–382. <https://doi.org/10.1038/nbt0404-381>
- Caiazza, M., Okawa, Y., Ranga, A., Piersigilli, A., Tabata, Y., & Lutolf, M. P. (2016). Defined three-dimensional microenvironments boost induction of pluripotency. *Nature Materials*, 15(3), 344–352. <https://doi.org/10.1038/nmat4536>
- Caldwell, K. J., Gottschalk, S., & Talleur, A. C. (2021). Allogeneic CAR Cell Therapy—More Than a Pipe Dream. *Frontiers in Immunology*, 11(January), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.618427>
- Cameron, A. R., Frith, J. E., & Cooper-White, J. J. (2011). The influence of substrate creep on mesenchymal stem cell behaviour and phenotype. *Biomaterials*, 32(26), 5979–5993. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.003>
- Caplan, A. I. (2017a). Mesenchymal stem cells: Time to change the name! *Stem Cells Translational Medicine*, 6(6), 1445–1451. <https://doi.org/10.1002/sctm.17-0051>
- Caplan, A. I. (2017b). New MSC: MSCs as pericytes are Sentinels and gatekeepers. *Journal of Orthopaedic Research*, 35(6), 1151–1159. <https://doi.org/10.1002/jor.23560>
- Carta, M., Carlsson, T., Muñoz, A., Kirik, D., & Björklund, A. (2010). Role of serotonin neurons in the induction of levodopa- and graft-induced dyskinesias in Parkinson's disease. *Movement Disorders*, 25(SUPPL. 1), 174–179. <https://doi.org/10.1002/mds.22792>

- CEEBIOS. (2021). Biomimétisme. *CEEBIOS (Centre d'études et d'expertises Dédié Au Déploiement Du Biomimétisme En France)*. <https://ceebios.com/biomimetisme/>
- Cervantes, R. B., Stringer, J. R., Shao, C., Tischfield, J. A., & Stambrook, P. J. (2002). Embryonic stem cells and somatic cells differ in mutation frequency and type. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(6), 3586–3590. <https://doi.org/10.1073/pnas.062527199>
- Chabannon, C., Kubal, J., Bondanza, A., Dazzi, F., Pedrazzoli, P., Toubert, A., Ruggeri, A., Fleischhauer, K., & Bonini, C. (2018). Hematopoietic stem cell transplantation in its 60s: A platform for cellular therapies. *Science Translational Medicine*, *10*(436), 1–11. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aap9630>
- Chacón-Martínez, C. A., Koester, J., & Wickström, S. A. (2018). Signaling in the stem cell niche: regulating cell fate, function and plasticity. *Development*, *145*(15), dev165399. <https://doi.org/10.1242/dev.165399>
- Chakradhar, S. (2016). An eye to the future: Researchers debate best path for stem cell-derived therapies. *Nature Medicine*, *22*(2), 116–119. <https://doi.org/10.1038/nm0216-116>
- Chan, E. S., Lim, T. K., Voo, W. P., Pogaku, R., Tey, B. T., & Zhang, Z. (2011). Effect of formulation of alginate beads on their mechanical behavior and stiffness. *Particuology*, *9*(3), 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2010.12.002>
- Chan, H. F., Zhang, Y., Ho, Y. P., Chiu, Y. L., Jung, Y., & Leong, K. W. (2013). Rapid formation of multicellular spheroids in double-emulsion droplets with controllable microenvironment. *Scientific Reports*, *3*, 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep03462>
- Chang, T. M. S. (1964). Semipermeable microcapsules. *Science*, *146*(3643), 524–525. <https://doi.org/10.1126/science.146.3643.524>
- Chaudhuri, O., Gu, L., Klumpers, D., Darnell, M., Bencherif, S. A., Weaver, J. C., Huebsch, N., Lee, H. P., Lippens, E., Duda, G. N., & Mooney, D. J. (2016). Hydrogels with tunable stress relaxation regulate stem cell fate and activity. *Nature Materials*, *15*(3), 326–334. <https://doi.org/10.1038/nmat4489>
- Chen. (2008). Mechanical control of stem cell differentiation. *StemBook*, 1–19. <https://doi.org/10.3824/stembook.1.26.1>
- Chen, A. K. L., Chen, X., Choo, A. B. H., Reuveny, S., & Oh, S. K. W. (2011). Critical microcarrier properties affecting the expansion of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cell Research*, *7*(2), 97–111. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2011.04.007>
- Chen, G., Gulbranson, D. R., Hou, Z., Bolin, J. M., Ruotti, V., Probasco, M. D., Smuga-Otto, K., Howden, S. E., Diol, N. R., Propson, N. E., Wagner, R., Lee, G. O., Antosiewicz-Bourget, J., Teng, J. M. C., & Thomson, J. A. (2011). Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nature Methods*, *8*(5), 424–429. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1593>
- Chen, K. G., Mallon, B. S., McKay, R. D. G., & Robey, P. G. (2014). Human pluripotent stem cell culture: Considerations for maintenance, expansion, and therapeutics. *Cell Stem Cell*, *14*(1), 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.12.005>
- Chen, L., Kasai, T., Li, Y., Sugii, Y., Jin, G., Okada, M., Vaidyanath, A., Mizutani, A., Satoh, A., Kudoh, T., Hendrix, M. J. C., Salomon, D. S., Fu, L., & Seno, M. (2012). A model of cancer stem cells derived from mouse induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE*, *7*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033544>
- Ching, S. H., Bansal, N., & Bhandari, B. (2017). Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *57*(6), 1133–1152. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.965773>
- Chua, C. W., Shibata, M., Lei, M., Toivanen, R., Barlow, L. J., Bergren, S. K., Badani, K. K., McKiernan, J. M., Benson, M. C., Hibshoosh, H., & Shen, M. M. (2014). Single luminal epithelial progenitors can generate prostate organoids in culture. *Nature Cell Biology*, *16*(10), 951–961. <https://doi.org/10.1038/ncb3047>
- Clark, A. T., Brivanlou, A., Fu, J., Kato, K., Mathews, D., Niakan, K. K., Rivron, N., Saitou, M., Surani, A., Tang, F., & Rossant, J. (2021). Human embryo research, stem cell-derived embryo models and in vitro gametogenesis: Considerations leading to the revised ISSCR guidelines. *Stem Cell Reports*, *16*(6), 1416–1424. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.05.008>
- Clavería, C., Giovinazzo, G., Sierra, R., & Torres, M. (2013). Myc-driven endogenous cell competition in the early mammalian embryo. *Nature*, *500*(7460), 39–44. <https://doi.org/10.1038/nature12389>

- Clavería, C., & Torres, M. (2016). Cell Competition: Mechanisms and Physiological Roles. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 32(1), 411–439. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125142>
- Clevers, H. (2016). Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*, 165(7), 1586–1597. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.082>
- Cohen, P. J. R., Luquet, E., Pletenka, J., Leonard, A., Warter, E., Gurchenkov, B., Carrere, J., Rieu, C., Hardouin, J., Moncaubeig, F., Lanero, M., Quelennec, E., Wurtz, H., Jamet, E., Demarco, M., Banal, C., Liedekerke, P. van, Nassoy, P., Feyeux, M., ... Alessandri, K. (2021). C-Stem: Engineering Niche-Like Micro-Compartments for Optimal and Scale-Independent Expansion of Human Pluripotent Stem Cells in Bioreactors. *BioRxiv*, 2021.07.05.451086. <https://doi.org/10.1101/2021.07.05.451086>
- Coloff, J. L., & Brugge, J. S. (2017). Metabolic changes promote rejection of oncogenic cells. *Nature Cell Biology*, 19(5), 414–415. <https://doi.org/10.1038/ncb3521>
- Conrad Waddington. (1957). *The Strategy of the Genes*.
- Cooper, D. J., Chen, I. C., Hernandez, C., Wang, Y., Walter, C. A., & McCarrey, J. R. (2017). Pluripotent cells display enhanced resistance to mutagenesis. *Stem Cell Research*, 19, 113–117. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2016.12.029>
- Cordero-Espinoza, L., Dowbaj, A. M., Kohler, T. N., Strauss, B., Sarlidou, O., Belenguer, G., Pacini, C., Martins, N. P., Dobie, R., Wilson-Kanamori, J. R., Butler, R., Prior, N., Serup, P., Jug, F., Henderson, N. C., Hollfelder, F., & Huch, M. (2021). Dynamic cell contacts between periportal mesenchyme and ductal epithelium act as a rheostat for liver cell proliferation. *Cell Stem Cell*, 28(11), 1907–1921.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.07.002>
- Cornacchia, D., Zhang, C., Zimmer, B., Chung, S. Y., Fan, Y., Soliman, M. A., Tchieu, J., Chambers, S. M., Shah, H., Paull, D., Konrad, C., Vincendeau, M., Noggle, S. A., Manfredi, G., Finley, L. W. S., Cross, J. R., Betel, D., & Studer, L. (2019). Lipid Deprivation Induces a Stable, Naive-to-Primed Intermediate State of Pluripotency in Human PSCs. *Cell Stem Cell*, 25(1), 120–136.e10. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.05.001>
- Corrò, C., Novellademunt, L., & Li, V. S. W. (2020). A brief history of organoids. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 319(1), C151–C165. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00120.2020>
- Cortés-Selva, D., Dasgupta, B., Singh, S., & Grewal, I. S. (2021). Innate and Innate-Like Cells: The Future of Chimeric Antigen Receptor (CAR) Cell Therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 42(1), 45–59. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.11.004>
- Croughan, M. S., Giroux, D., Fang, D., & Lee, B. (2016). Novel Single-Use Bioreactors for Scale-Up of Anchorage-Dependent Cell Manufacturing for Cell Therapies. In *Stem Cell Manufacturing*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63265-4.00005-4>
- Croughan, M. S., Hamel, J. P., & Wang, D. I. C. (1988). Effects of microcarrier concentration in animal cell culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 32(8), 975–982. <https://doi.org/10.1002/bit.260320805>
- Cyranoski, D. (2018). The cells that sparked a revolution. *Nature*, 555(7697), 429–430. <https://doi.org/10.1038/d41586-018-03268-4>
- Daley, G. Q., Hyun, I., Apperley, J. F., Barker, R. A., Benvenisty, N., Bredenoord, A. L., Breuer, C. K., Caulfield, T., Cedars, M. I., Frey-Vasconcelis, J., Heslop, H. E., Jin, Y., Lee, R. T., McCabe, C., Munsie, M., Murry, C. E., Piantadosi, S., Rao, M., Rooke, H. M., ... Kimmelman, J. (2016). Setting global standards for stem cell research and clinical translation: The 2016 ISSCR guidelines. *Stem Cell Reports*, 6(6), 787–797. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.05.001>
- D’Aniello, C., Habibi, E., Cermola, F., Paris, D., Russo, F., Fiorenzano, A., di Napoli, G., Melck, D. J., Cobellis, G., Angelini, C., Fico, A., Belloch, R., Motta, A., Stunnenberg, H. G., de Cesare, D., Patriarca, E. J., & Minchiotti, G. (2017). Vitamin C and L-Proline Antagonistic Effects Capture Alternative States in the Pluripotency Continuum. *Stem Cell Reports*, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.11.011>
- D’Antonio, M., Benaglio, P., Jakubosky, D., Greenwald, W., Matsui, H., Donovan, M., Li, H., Smith, E., D’Antonio-Chronowska, A., & Frazer, K. (2018). Insights into the mutational burden of human induced pluripotent stem cells using an integrative omics approach. *BioRxiv*, 858, 334870. <https://doi.org/10.1101/334870>
- D’Antonio, M., Woodruff, G., Nathanson, J. L., D’Antonio-Chronowska, A., Arias, A., Matsui, H., Williams, R., Herrera, C., Reyna, S. M., Yeo, G. W., Goldstein, L. S. B., Panopoulos, A. D., & Frazer, K. A. (2017). High-Throughput and Cost-Effective Characterization of Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 8(4), 1101–1111. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.03.011>

- Das, R. K., Gocheva, V., Hammink, R., Zouani, O. F., & Rowan, A. E. (2016). Stress-stiffening-mediated stem-cell commitment switch in soft responsive hydrogels. *Nature Materials*, *15*(3), 318–325. <https://doi.org/10.1038/nmat4483>
- de Robertis, E. M., Larraín, J., Oelgeschläger, M., & Wessely, O. (2000). The establishment of Spemann's organizer and patterning of the vertebrate embryo. *Nature Reviews Genetics*, *1*(3), 171–181. <https://doi.org/10.1038/35042039>
- Dean, S. K., Yulyana, Y., Williams, G., Sidhu, K. S., & Tuch, B. E. (2006). Differentiation of encapsulated embryonic stem cells after transplantation. *Transplantation*, *82*(9), 1175–1184. <https://doi.org/10.1097/01.tp.0000239518.23354.64>
- Deglincerti, A., Croft, G. F., Pietila, L. N., Zernicka-Goetz, M., Siggia, E. D., & Brivanlou, A. H. (2016a). Self-organization of the in vitro attached human embryo. *Nature*, *533*(7602), 251–254. <https://doi.org/10.1038/nature17948>
- Deglincerti, A., Croft, G. F., Pietila, L. N., Zernicka-Goetz, M., Siggia, E. D., & Brivanlou, A. H. (2016b). Self-organization of the in vitro attached human embryo. *Nature*, *533*(7602), 251–254. <https://doi.org/10.1038/nature17948>
- Deglincerti, A., Croft, G. F., Pietila, L. N., Zernicka-Goetz, M., Siggia, E. D., & Brivanlou, A. H. (2016c). Self-organization of the in vitro attached human embryo. *Nature*, *533*(7602), 251–254. <https://doi.org/10.1038/nature17948>
- Deinsberger, J., Reisinger, D., & Weber, B. (2020). Global trends in clinical trials involving pluripotent stem cells: a systematic multi-database analysis. *Npj Regenerative Medicine*, *5*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41536-020-00100-4>
- Depil, S., Duchateau, P., Grupp, S. A., Mufti, G., & Poirot, L. (2020). 'Off-the-shelf' allogeneic CAR T cells: development and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, *19*(3), 185–199. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0051-2>
- Desai, N., Rambhia, P., & Gisho, A. (2015). Human embryonic stem cell cultivation: Historical perspective and evolution of xeno-free culture systems. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *13*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0005-4>
- Desai, T., & Shea, L. D. (2017). Advances in islet encapsulation technologies. *Nature Reviews Drug Discovery*, *16*(5), 338–350. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.232>
- Deuse, T., Hu, X., Agbor-Enoh, S., Koch, M., Spitzer, M. H., Gravina, A., Alawi, M., Marishta, A., Peters, B., Kosaloglu-Yalcin, Z., Yang, Y., Rajalingam, R., Wang, D., Nashan, B., Kiefmann, R., Reichenspurner, H., Valantine, H., Weissman, I. L., & Schrepfer, S. (2019). De novo mutations in mitochondrial DNA of iPSCs produce immunogenic neoepitopes in mice and humans. *Nature Biotechnology*, *37*(10), 1137–1144. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0227-7>
- di Stasi, A., Tey, S.-K., Dotti, G., Fujita, Y., Kennedy-Nasser, A., Martinez, C., Straathof, K., Liu, E., Durett, A. G., Grilley, B., Liu, H., Cruz, C. R., Savoldo, B., Gee, A. P., Schindler, J., Krance, R. A., Heslop, H. E., Spencer, D. M., Rooney, C. M., & Brenner, M. K. (2011). Inducible Apoptosis as a Safety Switch for Adoptive Cell Therapy. *New England Journal of Medicine*, *365*(18), 1673–1683. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1106152>
- Dias Gomes, M., Letzian, S., Saynisch, M., & Iden, S. (2019). Polarity signaling ensures epidermal homeostasis by coupling cellular mechanics and genomic integrity. *Nature Communications*, *10*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11325-3>
- Díaz-Díaz, C., Fernandez de Manuel, L., Jimenez-Carretero, D., Montoya, M. C., Clavería, C., & Torres, M. (2017). Pluripotency Surveillance by Myc-Driven Competitive Elimination of Differentiating Cells. *Developmental Cell*, *42*(6), 585–599.e4. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.08.011>
- Diniz, B., Thomas, P., Thomas, B., Ribeiro, R., Hu, Y., Brant, R., Ahuja, A., Zhu, D., Liu, L., Koss, M., Maia, M., Chader, G., Hinton, D. R., & Humayun, M. S. (2013). Subretinal Implantation of Retinal Pigment Epithelial Cells Derived From Human Embryonic Stem Cells: Improved Survival When Implanted as a Monolayer. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *54*(7), 5087–5096. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-11239>
- Doi, D., Magotani, H., Kikuchi, T., Ikeda, M., Hiramatsu, S., Yoshida, K., Amano, N., Nomura, M., Umekage, M., Morizane, A., & Takahashi, J. (2020). Pre-clinical study of induced pluripotent stem cell-derived dopaminergic progenitor cells for Parkinson's disease. *Nature Communications*, *2020*. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17165-w>
- Dolgin, E. (2016). Encapsulating the problem. *Nature*, *540*(8 Dec), S60–62.

- Doméjean, H., de La Motte Saint Pierre, M., Funfak, A., Atrux-Tallau, N., Alessandri, K., Nassoy, P., Bibette, J., & Bremond, N. (2017). Controlled production of sub-millimeter liquid core hydrogel capsules for parallelized 3D cell culture. *Lab on a Chip*, 17(1), 110–119. <https://doi.org/10.1039/c6lc00848h>
- Doulgeroglou, M. N., di Nubila, A., Niessing, B., König, N., Schmitt, R. H., Damen, J., Szilvassy, S. J., Chang, W., Csontos, L., Louis, S., Kugelmeier, P., Ronfard, V., Bayon, Y., & Zeugolis, D. I. (2020). Automation, Monitoring, and Standardization of Cell Product Manufacturing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(July), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00811>
- Draper, J. S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H. D., Maltby, E., Johnson, J., Meisner, L., Zwaka, T. P., Thomson, J. A., & Andrews, P. W. (2004). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 22(1), 53–54. <https://doi.org/10.1038/nbt922>
- Du, P., Pirouz, M., Choi, J., Huebner, A. J., Clement, K., Meissner, A., Hochedlinger, K., & Gregory, R. I. (2018). An Intermediate Pluripotent State Controlled by MicroRNAs Is Required for the Naive-to-Primed Stem Cell Transition. *Cell Stem Cell*, 22(6), 851–864.e5. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.021>
- Dubrot, J., Portero, A., Orive, G., Hernández, R. M., Palazón, A., Rouzaut, A., Perez-Gracia, J. L., Hervás-Stubbs, S., Pedraz, J. L., & Melero, I. (2010). Delivery of immunostimulatory monoclonal antibodies by encapsulated hybridoma cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 59(11), 1621–1631. <https://doi.org/10.1007/s00262-010-0888-z>
- Dumitru, R., Gama, V., Fagan, B. M., Bower, J. J., Swahari, V., Pevny, L. H., & Deshmukh, M. (2012). Human Embryonic Stem Cells Have Constitutively Active Bax at the Golgi and Are Primed to Undergo Rapid Apoptosis. *Molecular Cell*, 46(5), 573–583. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.04.002>
- Dundes, C. E., & Loh, K. M. (2020). Bridging naïve and primed pluripotency. *Nature Cell Biology*, 22(5), 513–515. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0509-9>
- Duvivier-Kali, V. F., Omer, A., Parent, R. J., O’Neil, J. J., & Weir, G. C. (2001). Complete Protection of Islets Against Allotransplantation and Autoimmunity by a Simple Barium-Alginate Membrane. *Diabetes*, 50(8), 1698–1705. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.8.1698>
- Eaker, S., Abraham, E., Allickson, J., Brieva, T. A., Baksh, D., Heathman, T. R. J., Mistry, B., & Zhang, N. (2017). Bioreactors for cell therapies: Current status and future advances. *Cytotherapy*, 19(1), 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.09.011>
- Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., Sekiguchi, K., Adachi, T., & Sasai, Y. (2011). Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*, 472(7341), 51–58. <https://doi.org/10.1038/nature09941>
- Eisenstein, M. (2018). Organoids: the body builders. *Nature Publishing Group*, 15(1), 19–22. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4538>
- Elisseeff, J., Badylak, S. F., & Boeke, J. D. (2021). Immune and Genome Engineering as the Future of Transplantable Tissue. *New England Journal of Medicine*, 385(26), 2451–2462. <https://doi.org/10.1056/nejmra1913421>
- El-Nachef, D., Shi, K., Beussman, K. M., Martinez, R., Regier, M. C., Everett, G. W., Murry, C. E., Stevens, K. R., Young, J. E., Sniadecki, N. J., & Davis, J. (2020). A Rainbow Reporter Tracks Single Cells and Reveals Heterogeneous Cellular Dynamics among Pluripotent Stem Cells and Their Differentiated Derivatives. *Stem Cell Reports*, 15(1), 226–241. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.06.005>
- Embryologie humaine*. (n.d.). <http://www.embryology.ch/francais/ipperiodembry/carnegie02.html>
- Evans, M. (2011). Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(10), 680–686. <https://doi.org/10.1038/nrm3190>
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. In *Nature* (Vol. 292, Issue 5819, pp. 154–156). <https://doi.org/10.1038/292154a0>
- Even-Ram, S., Artym, V., & Yamada, K. M. (2006). Matrix Control of Stem Cell Fate. *Cell*, 126(4), 645–647. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.08.008>
- Évolution du traitement immunosuppresseur en transplantation rénale*. (2004). 86021.
- Eyckmans, J., Boudou, T., Yu, X., & Chen, C. S. (2011). A Hitchhiker’s Guide to Mechanobiology. *Developmental Cell*, 21(1), 35–47. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.06.015>

- Ezashi, T., Das, P., & Roberts, R. M. (2005). Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of HES cells. *Nature Methods*, 2(5), 325. <https://doi.org/10.1038/nmeth0505-325>
- Fadul, J., & Rosenblatt, J. (2018). The forces and fates of extruding cells. *Current Opinion in Cell Biology*, 54, 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2018.04.007>
- Fan, R., Kim, Y. S., Wu, J., Chen, R., Zeuschner, D., Mildner, K., Adachi, K., Wu, G., Galatidou, S., Li, J., Schöler, H. R., Leidel, S. A., & Bedzhov, I. (2020). Wnt/Beta-catenin/Esrrb signalling controls the tissue-scale reorganization and maintenance of the pluripotent lineage during murine embryonic diapause. *Nature Communications*, 11(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19353-0>
- Fatehullah, A., Tan, S. H., & Barker, N. (2016). Organoids as an in vitro model of human development and disease. *Nature Cell Biology*, 18(3), 246–254. <https://doi.org/10.1038/ncb3312>
- Fathi, E., Charoudeh, H. N., Sanaat, Z., & Farahzadi, R. (2019). Telomere shortening as a hallmark of stem cell senescence. *Stem Cell Investigation*, 6(March). <https://doi.org/10.21037/sci.2019.02.04>
- Fattahi, P., Rahimian, A., Slama, M. Q., Gwon, K., Gonzalez-Suarez, A. M., Wolf, J., Baskaran, H., Duffy, C. D., Stybayeva, G., Peterson, Q. P., & Revzin, A. (2021). Core–shell hydrogel microcapsules enable formation of human pluripotent stem cell spheroids and their cultivation in a stirred bioreactor. *Scientific Reports*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85786-2>
- Feinberg, A. P., Koldobskiy, M. A., & Göndör, A. (2016). Epigenetic modulators, modifiers and mediators in cancer aetiology and progression. *Nature Reviews Genetics*, 17(5), 284–299. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.13>
- Feng, Y., Liu, X., & Pauklin, S. (2021). 3D chromatin architecture and epigenetic regulation in cancer stem cells. *Protein and Cell*, 12(6), 440–454. <https://doi.org/10.1007/s13238-020-00819-2>
- Ferreira, L. S., Gerecht, S., Fuller, J., Shieh, H. F., Vunjak-Novakovic, G., & Langer, R. (2007). Bioactive hydrogel scaffolds for controllable vascular differentiation of human embryonic stem cells. *Biomaterials*, 28(17), 2706–2717. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.01.021>
- Feyeux, M. (2011). *Utilisation des cellules souches embryonnaires humaines porteuses de la mutation causale de la maladie de Huntington en tant que nouveau modèle pathologique.*
- Feyeux, M., Alessandri, K., Cognet, L., Bezar, E., ben Azzouz, H., & Nassoy, P. (2016). *Unité de tissu neural et utilisation d'une telle unité pour l'implantation dans le système nerveux d'un mammifère.* FR3058892B1
- Fordham, R. P., Yui, S., Hannan, N. R. F., Soendergaard, C., Madgwick, A., Schweiger, P. J., Nielsen, O. H., Vallier, L., Pedersen, R. A., Nakamura, T., Watanabe, M., & Jensen, K. B. (2013). Transplantation of expanded fetal intestinal progenitors contributes to colon regeneration after injury. *Cell Stem Cell*, 13(6), 734–744. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.09.015>
- Freedman, B. S., Brooks, C. R., Lam, A. Q., Fu, H., Morizane, R., Agrawal, V., Saad, A. F., Li, M. K., Hughes, M. R., Werff, R. vander, Peters, D. T., Lu, J., Baccei, A., Siedlecki, A. M., Valerius, M. T., Musunuru, K., McNagny, K. M., Steinman, T. I., Zhou, J., ... Bonventre, J. v. (2015a). Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nature Communications*, 6(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms9715>
- Freedman, B. S., Brooks, C. R., Lam, A. Q., Fu, H., Morizane, R., Agrawal, V., Saad, A. F., Li, M. K., Hughes, M. R., Werff, R. vander, Peters, D. T., Lu, J., Baccei, A., Siedlecki, A. M., Valerius, M. T., Musunuru, K., McNagny, K. M., Steinman, T. I., Zhou, J., ... Bonventre, J. v. (2015b). Modelling kidney disease with CRISPR-mutant kidney organoids derived from human pluripotent epiblast spheroids. *Nature Communications*, 6:8715(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms9715>
- Freyei, J. P., & Sutherland, R. M. (1986). Regulation of Growth Saturation and Development of Necrosis in EMT6/R0 Multicellular Spheroids by the Glucose and Oxygen Supply. *Cancer Research*, 46(7), 3504–3512.
- Fu, J., Warmflash, A., & Lutolf, M. P. (2021). Stem-cell-based embryo models for fundamental research and translation. *Nature Materials*, 20(2), 132–144. <https://doi.org/10.1038/s41563-020-00829-9>
- Futaki, S., Nakano, I., Kawasaki, M., Sanzen, N., & Sekiguchi, K. (2019). Molecular profiling of the basement membrane of pluripotent epiblast cells in post-implantation stage mouse embryos. *Regenerative Therapy*, 12, 55–65. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2019.04.010>

- Gahmberg, C. G., & Hakomori, S. I. (1973). Altered growth behavior of malignant cells associated with changes in externally labeled glycoprotein and glycolipid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(12 (I)), 3329–3333. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3329>
- Galipeau, J., & Sensébé, L. (2018). Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell*, 22(6), 824–833. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.004>
- Garber, K. (2015). RIKEN suspends first clinical trial involving induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 33(9), 890–891. <https://doi.org/10.1038/nbt0915-890>
- Garitaonandia, I., Amir, H., Boscolo, F. S., Wambua, G. K., Schultheisz, H. L., Sabatini, K., Morey, R., Waltz, S., Wang, Y. C., Tran, H., Leonardo, T. R., Nazor, K., Slavin, I., Lynch, C., Li, Y., Coleman, R., Romero, I. G., Altun, G., Reynolds, D., ... Laurent, L. C. (2015). Increased risk of genetic and epigenetic instability in human embryonic stem cells associated with specific culture conditions. *PLoS ONE*, 10(2), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118307>
- Garreta, E., Kamm, R. D., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Lancaster, M. A., Weiss, R., Trepatt, X., Hyun, I., & Montserrat, N. (2021). Rethinking organoid technology through bioengineering. *Nature Materials*, 20(2), 145–155. <https://doi.org/10.1038/s41563-020-00804-4>
- Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Meshorer, E., & Ramalho-Santos, M. (2011). Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 12(1), 36–47. <https://doi.org/10.1038/nrm3036>
- Georgakopoulos, N., Prior, N., Angres, B., Mastrogiovanni, G., Cagan, A., Harrison, D., Hindley, C. J., Arnes-Benito, R., Liao, S. S., Curd, A., Ivory, N., Simons, B. D., Martincorena, I., Wurst, H., Saeb-Parsy, K., & Huch, M. (2020). Long-term expansion, genomic stability and in vivo safety of adult human pancreas organoids. *BMC Developmental Biology*, 20(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12861-020-0209-5>
- Girgin, M. U., Broguiere, N., Hoehnel, S., Brandenburg, N., Mercier, B., Arias, A. M., & Lutolf, M. P. (2021). Bioengineered embryoids mimic post-implantation development in vitro. *Nature Communications*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-25237-8>
- Gjorevski, N., Nikolaev, M., Brown, T. E., Mitrofanova, O., Brandenburg, N., DelRio, F. W., Yavitt, F. M., Liberali, P., Anseth, K. S., & Lutolf, M. P. (2022). Tissue geometry drives deterministic organoid patterning. *Science*, 375(6576). <https://doi.org/10.1126/science.aaw9021>
- Goriely, A. (2019). *The Mathematics and Mechanics of Biological Growth*. Springer.
- Gudipaty, S. A., Lindblom, J., Loftus, P. D., Redd, M. J., Edes, K., Davey, C. F., Krishnegowda, V., & Rosenblatt, J. (2017). Mechanical stretch triggers rapid epithelial cell division through Piezo1. *Nature*, 543(7643), 118–121. <https://doi.org/10.1038/nature21407>
- Gupta, M., Sarangi, B. R., Deschamps, J., Nematbakhsh, Y., Callan-Jones, A., Margadant, F., Mège, R. M., Lim, C. T., Voituriez, R., & Ladoux, B. (2015). Adaptive rheology and ordering of cell cytoskeleton govern matrix rigidity sensing. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms8525>
- Gurdon, J. B. (1962). Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Developmental Biology*, 4(2), 256–273. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(62\)90043-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(62)90043-X)
- H Lin, Q Du, Q Li, O Wang, Y. L. (2018). A Scalable and Efficient Bioprocess for Manufacturing Human Pluripotent Stem Cells-Derived Endothelial Cells. *Stem Cell Reports*, 11, Accept. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.07.001>
- Haas, S., Trumpp, A., & Milsom, M. D. (2018). Causes and Consequences of Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity. *Cell Stem Cell*, 22(5), 627–638. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.003>
- Halliwell, J. A., Baker, D., Judge, K., Quail, M. A., Oliver, K., Betteridge, E., Skelton, J., Andrews, P. W., & Barbaric, I. (2021). Nanopore Sequencing Indicates That Tandem Amplification of Chromosome 20q11.21 in Human Pluripotent Stem Cells Is Driven by Break-Induced Replication. *Stem Cells and Development*, 30(11), 578–586. <https://doi.org/10.1089/scd.2021.0013>
- Halliwell, J. A., Frith, T. J. R., Laing, O., Price, C. J., Bower, O. J., Stavish, D., Gokhale, P. J., Hewitt, Z., El-Khamisy, S. F., Barbaric, I., & Andrews, P. W. (2020). Nucleosides Rescue Replication-Mediated Genome Instability of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 14, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.04.004>
- Halliwell, J., Barbaric, I., & Andrews, P. W. (2020). Acquired genetic changes in human pluripotent stem cells: origins and consequences. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(12), 715–728. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00292-z>

- Hamidi, S., Nakaya, Y., Nagai, H., Alev, C., Kasukawa, T., Chhabra, S., Lee, R., Niwa, H., Warmflash, A., Shibata, T., & Sheng, G. (2020a). Mesenchymal-epithelial transition regulates initiation of pluripotency exit before gastrulation. *Development (Cambridge, England)*, *147*(3). <https://doi.org/10.1242/dev.184960>
- Hamidi, S., Nakaya, Y., Nagai, H., Alev, C., Kasukawa, T., Chhabra, S., Lee, R., Niwa, H., Warmflash, A., Shibata, T., & Sheng, G. (2020b). Mesenchymal-epithelial transition regulates initiation of pluripotency exit before gastrulation. *Development (Cambridge, England)*, *147*(3). <https://doi.org/10.1242/dev.184960>
- Hamidi, S., Nakaya, Y., Nagai, H., Alev, C., Kasukawa, T., Chhabra, S., Lee, R., Niwa, H., Warmflash, A., Shibata, T., & Sheng, G. (2020c). Mesenchymal-epithelial transition regulates initiation of pluripotency exit before gastrulation. *Development (Cambridge)*, *147*(3). <https://doi.org/10.1242/dev.184960>
- Hamidi, S., Nakaya, Y., Nagai, H., Alev, C., Kasukawa, T., Chhabra, S., Lee, R., Niwa, H., Warmflash, A., Shibata, T., & Sheng, G. (2020d). Mesenchymal-epithelial transition regulates initiation of pluripotency exit before gastrulation. *Development (Cambridge)*, *147*(3). <https://doi.org/10.1242/dev.184960>
- Hannezo, E., & Heisenberg, C. P. (2019). Mechanochemical Feedback Loops in Development and Disease. *Cell*, *178*(1), 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.052>
- Hannezo, E., Prost, J., & Joanny, J. F. (2012). Mechanical instabilities of biological tubes. *Physical Review Letters*, *109*(1). <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.109.018101>
- Harland, B. R. M. (2018). *A new view of embryo development and regeneration*. *360*(6392), 967–969.
- Harris, A. R., & Charras, G. T. (2011). Experimental validation of atomic force microscopy-based cell elasticity measurements. *Nanotechnology*, *22*(34). <https://doi.org/10.1088/0957-4484/22/34/345102>
- Harrison, R. G. (1907). Observations on the living developing nerve fiber. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, *4*(1), 140–143. <https://doi.org/10.3181/00379727-4-98>
- Hashimoto, M., & Sasaki, H. (2019). Epiblast Formation by TEAD-YAP-Dependent Expression of Pluripotency Factors and Competitive Elimination of Unspecified Cells. *Developmental Cell*, *50*(2), 139-154.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.05.024>
- Hass, R., Kasper, C., Böhm, S., & Jacobs, R. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling*, *9*. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-9-12>
- Hayward, M.-K., Muncie, J. M., & Weaver, V. M. (2021). Tissue mechanics in stem cell fate, development, and cancer. *Developmental Cell*, *56*(13), 1833–1847. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.05.011>
- Hering, B. J., Wijkstrom, M., Graham, M. L., Hårdstedt, M., Aasheim, T. C., Jie, T., Ansite, J. D., Nakano, M., Cheng, J., Li, W., Moran, K., Christians, U., Finnegan, C., Mills, C. D., Sutherland, D. E., Bansal-Pakala, P., Murtaugh, M. P., Kirchoff, N., & Schuurman, H. J. (2006). Prolonged diabetes reversal after intraportal xenotransplantation of wild-type porcine islets in immunosuppressed nonhuman primates. *Nature Medicine*, *12*(3), 301–303. <https://doi.org/10.1038/nm1369>
- Herttg, A. T., Rock, J. O. H. N., Adams, E. C., Hertig, A. T., Rock, J. O. H. N., & Adams, E. C. (1956). A DESCRIPTION OF 34 HUMAN OVA WITHIN THE FIRST 17 DAYS OF DEVELOPMENT. *American Journal of Anatomy*, *98*(3), 435–493. <https://doi.org/10.1002/aja.1000980306>
- Hewitt, C. J., Lee, K., Nienow, A. W., Thomas, R. J., Smith, M., & Thomas, C. R. (2011). Expansion of human mesenchymal stem cells on microcarriers. *Biotechnology Letters*, *33*(11), 2325–2335. <https://doi.org/10.1007/s10529-011-0695-4>
- Hirsch, T., Rothoef, T., Teig, N., Bauer, J. W., Pellegrini, G., de Rosa, L., Scaglione, D., Reichelt, J., Klausegger, A., Kneisz, D., Romano, O., Seconetti, A. S., Contin, R., Enzo, E., Jurman, I., Carulli, S., Jacobsen, F., Luecke, T., Lehnhardt, M., ... de Luca, M. (2017). Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells. *Nature*, *551*(7680), 327–332. <https://doi.org/10.1038/nature24487>
- Hofer, M., & Lutolf, M. P. (2021). Engineering organoids. *Nature Reviews Materials*, *6*(5), 402–420. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00279-y>
- Hogan, C., Dupré-Crochet, S., Norman, M., Kajita, M., Zimmermann, C., Pelling, A. E., Piddini, E., Baena-López, L. A., Vincent, J. P., Itoh, Y., Hosoya, H., Pichaud, F., & Fujita, Y. (2009). Characterization of the interface between normal and transformed epithelial cells. *Nature Cell Biology*, *11*(4), 460–467. <https://doi.org/10.1038/ncb1853>

- Hong, S., & van Kaer, L. (1999). Immune privilege: Keeping an eye on natural killer T cells. *Journal of Experimental Medicine*, 190(9), 1197–1200. <https://doi.org/10.1084/jem.190.9.1197>
- Horiguchi, I., & Sakai, Y. (2015). Alginate Encapsulation of Pluripotent Stem Cells Using a Co-axial Nozzle. *Journal of Visualized Experiments*, 101, 1–7. <https://doi.org/10.3791/52835>
- Hough, S. R., Laslett, A. L., Grimmond, S. B., Kolle, G., & Pera, M. F. (2009). A continuum of cell states spans pluripotency and lineage commitment in human embryonic stem cells. *PLoS ONE*, 4(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007708>
- Hourd, P., Chandra, A., Medcalf, N., & Williams, D. J. (2008). Regulatory challenges for the manufacture and scale-out of autologous cell therapies. *StemBook*, 1–13. <https://doi.org/10.3824/stembook.1.96.1.1>
- Huang, G., Li, F., Zhao, X., Ma, Y., Li, Y., Lin, M., Jin, G., Lu, T. J., Genin, G. M., & Xu, F. (2017). Functional and Biomimetic Materials for Engineering of the Three-Dimensional Cell Microenvironment. *Chemical Reviews*, 117(20), 12764–12850. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00094>
- Huang, S., Razvi, A., Anderson-Jenkins, Z., Sirskyj, D., Gong, M., Lavoie, A.-M., & Pigeau, G. (2020). Process development and scale-up of pluripotent stem cell manufacturing. *Cell and Gene Therapy Insights*, 6(9), 1277–1298. <https://doi.org/10.18609/cgti.2020.141>
- Huch, M., Boj, S. F., & Clevers, H. (2013). Lgr5+ liver stem cells, hepatic organoids and regenerative medicine. *Regenerative Medicine*, 8(4), 385–387. <https://doi.org/10.2217/rme.13.39>
- Huch, M., Gehart, H., van Boxtel, R., Hamer, K., Blokzijl, F., Verstegen, M. M. A., Ellis, E., van Wenum, M., Fuchs, S. A., de Ligt, J., van de Wetering, M., Sasaki, N., Boers, S. J., Kemperman, H., de Jonge, J., Ijzermans, J. N. M., Nieuwenhuis, E. E. S., Hoekstra, R., Strom, S., ... Clevers, H. (2015). Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell*, 160(1–2), 299–312. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.050>
- Humphrey, J. D. (2008). Vascular adaptation and mechanical homeostasis at tissue, cellular, and sub-cellular levels. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 50(2), 53–78. <https://doi.org/10.1007/s12013-007-9002-3>
- Hussein, S. M., Batada, N. N., Vuoristo, S., Ching, R. W., Autio, R., Narvå, E., Ng, S., Sourour, M., Hämälä, R., Olsson, C., Lundin, K., Mikkola, M., Trokovic, R., Peitz, M., Brüstle, O., Bazett-Jones, D. P., Alitalo, K., Lahesmaa, R., Nagy, A., & Otonkoski, T. (2011). Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature*, 471(7336), 58–62. <https://doi.org/10.1038/nature09871>
- Hussein, S. M. I., Elbaz, J., & Nagy, A. A. (2013). Genome damage in induced pluripotent stem cells: Assessing the mechanisms and their consequences. *BioEssays*, 35(3), 152–162. <https://doi.org/10.1002/bies.201200114>
- Hynes, R. O. (1973). Alteration of cell surface proteins by viral transformation and by proteolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(11), 3170–3174. <https://doi.org/10.1073/pnas.70.11.3170>
- Ikeda, K., Nagata, S., Okitsu, T., & Takeuchi, S. (2017). Cell fiber-based three-dimensional culture system for highly efficient expansion of human induced pluripotent stem cells. *Scientific Reports*, 7(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03246-2>
- Indana, D., Agarwal, P., Bhutani, N., & Chaudhuri, O. (2021). Viscoelasticity and Adhesion Signaling in Biomaterials Control Human Pluripotent Stem Cell Morphogenesis in 3D Culture. *Advanced Materials*, 33(43), 1–16. <https://doi.org/10.1002/adma.202101966>
- Ingber, D. E., Mow, V. C., Butler, D., Niklason, L., Huard, J., Mao, J., Yannas, I., Kaplan, D., & Vunjak-Novakovic, G. (2006). Tissue engineering and developmental biology: Going biomimetic. *Tissue Engineering*, 12(12), 3265–3283. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.3265>
- Isabelle Goujon. (2004). Les Alginate : excipients d'origine marine utilisés dans l'industrie pharmaceutique Application à la synthèse d'un gel chimique. *Thèse de Pharmacie*.
- ISSCR. (2021). *ISSCR Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation*.
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H., & Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 6(2), 88–95. <https://doi.org/10.1007/bf03401776>
- Iwasawa, K., & Takebe, T. (2021). Organogenesis in vitro. *Current Opinion in Cell Biology*, 73, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2021.06.007>

- Ji, J., Ng, S., Sharma, V., Neculai, D., Hussein, S., Sam, M., Trinh, Q., Church, G. M., McPherson, J. D., Nagy, A., & Batada, N. N. (2012). Elevated coding mutation rate during the reprogramming of human somatic cells into induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, *30*(3), 435–440. <https://doi.org/10.1002/stem.1011>
- Ji, Z., Chuen, J., Kiparaki, M., & Baker, N. (2021). Cell competition removes segmental aneuploid cells from drosophila imaginal disc-derived tissues based on ribosomal protein gene dose. *ELife*, *10*, 1–33. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.61172>
- Jo, H. Y., Han, H. W., Jung, I., Ju, J. H., Park, S. J., Moon, S., Geum, D., Kim, H., Park, H. J., Kim, S., Stacey, G. N., Koo, S. K., Park, M. H., & Kim, J. H. (2020). Development of genetic quality tests for good manufacturing practice-compliant induced pluripotent stem cells and their derivatives. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60466-9>
- Jo, H. Y., Lee, Y., Ahn, H., Han, H. J., Kwon, A., Kim, B. Y., Ha, H. Y., Kim, S. C., Kim, J. H., Kim, Y. O., Kim, S., Koo, S. K., & Park, M. H. (2020). Functional in vivo and in vitro effects of 20q11.21 genetic aberrations on hPSC differentiation. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75657-7>
- Josep Carreras Foundation. (2020). *A total of 1 million stem cell transplants have been performed worldwide*. https://www.fcarreras.org/en/a-total-of-1-million-stem-cell-transplants-have-been-performed-worldwide_147898
- Joseph E. Tyler. (1990). *Microencapsulation of Mammalian Cells*. <https://www.taylorfrancis.com/chapters/edit/10.1201/9780203749166-12/microencapsulation-mammalian-cells-joseph-tyler>
- Kagawa, H., Javali, A., Khoei, H. H., Sommer, T. M., Sestini, G., Novatchkova, M., Scholte op Reimer, Y., Castel, G., Bruneau, A., Maenhoudt, N., Lammers, J., Loubersac, S., Freour, T., Vankelecom, H., David, L., & Rivron, N. (2021). Human blastoids model blastocyst development and implantation. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04267-8>
- Kahn, A. (2002). Cellules souches et médecine régénératrice. *Médecine/Sciences*, *18*(4), 503–509. <https://doi.org/10.1051/medsci/2002184503>
- Kajita, M., & Fujita, Y. (2015). EDAC: Epithelial defence against cancer - Cell competition between normal and transformed epithelial cells in mammals. *Journal of Biochemistry*, *158*(1), 15–23. <https://doi.org/10.1093/jb/mvv050>
- Kajita, M., Sugimura, K., Ohoka, A., Burden, J., Suganuma, H., Ikegawa, M., Shimada, T., Kitamura, T., Shindoh, M., Ishikawa, S., Yamamoto, S., Saitoh, S., Yako, Y., Takahashi, R., Okajima, T., Kikuta, J., Maijima, Y., Ishii, M., Tada, M., & Fujita, Y. (2014). Filamin acts as a key regulator in epithelial defence against transformed cells. *Nature Communications*, *5*, 1–13. <https://doi.org/10.1038/ncomms5428>
- Kalkan, T., Olova, N., Roode, M., Mulas, C., Lee, H. J., Nett, I., Marks, H., Walker, R., Stunnenberg, H. G., Lilley, K. S., Nichols, J., Reik, W., Bertone, P., & Smith, A. (2017). Tracking the embryonic stem cell transition from ground state pluripotency. *Development (Cambridge)*, *144*(7), 1221–1234. <https://doi.org/10.1242/dev.142711>
- Kanchan, K., Iyer, K., Yanek, L. R., Carcamo-Orive, I., Taub, M. A., Malley, C., Baldwin, K., Becker, L. C., Broeckel, U., Cheng, L., Cowan, C., D'Antonio, M., Frazer, K. A., Quertermous, T., Mostoslavsky, G., Murphy, G., Rabinovitch, M., Rader, D. J., Steinberg, M. H., ... Mathias, R. A. (2020). Genomic integrity of human induced pluripotent stem cells across nine studies in the NHLBI NextGen program. *Stem Cell Research*, *46*(September 2019), 101803. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101803>
- Kapinas, K., Grandy, R., Ghule, P., Medina, R., Becker, K., Pardee, A., Zaidi, S. K., Lian, J., Stein, J., van Wijnen, A., & Stein, G. (2013). The abbreviated pluripotent cell cycle. *Journal of Cellular Physiology*, *228*(1), 9–20. <https://doi.org/10.1002/jcp.24104>
- Karagiannis, P., Takahashi, K., Saito, M., Yoshida, Y., Okita, K., Watanabe, A., Inoue, H., Yamashita, J. K., Todani, M., Nakagawa, M., Osawa, M., Yashiro, Y., Yamanaka, S., & Osafune, K. (2019). Induced pluripotent stem cells and their use in human models of disease and development. *Physiological Reviews*, *99*(1), 79–114. <https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2017>
- Karthus, W. R., Iaquinta, P. J., Drost, J., Gracanin, A., van Boxtel, R., Wongvipat, J., Dowling, C. M., Gao, D., Begthel, H., Sachs, N., Vries, R. G. J., Cuppen, E., Chen, Y., Sawyers, C. L., & Clevers, H. C. (2014). Identification of multipotent

- luminal progenitor cells in human prostate organoid cultures. *Cell*, *159*(1), 163–175.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.017>
- Karzbrun, E., Khankhel, A. H., Megale, H. C., Glasauer, S. M. K., Wyle, Y., Britton, G., Warmflash, A., Kosik, K. S., Siggia, E. D., Shraiman, B. I., & Streichan, S. J. (2021). Self-organized morphogenesis of a human neural tube in vitro by geometric constraints. *BioRxiv*, 2021.07.24.453659.
<https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.07.24.453659v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.07.24.453659v1.abstract>
- Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S. I., & Sasai, Y. (2000). Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*, *28*(1), 31–40. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00083-0](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00083-0)
- Kefalopoulou, Z., Politis, M., Piccini, P., Mencacci, N., Bhatia, K., Jahanshahi, M., Widner, H., Rehncrona, S., Brundin, P., Björklund, A., Lindvall, O., Limousin, P., Quinn, N., & Foltynie, T. (2014). Long-term clinical outcome of fetal cell transplantation for parkinson disease: Two case reports. *JAMA Neurology*, *71*(1), 83–87.
<https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.4749>
- Kehoe, D. E., Jing, D., Lock, L. T., Tzanakakis, E. S., & Ph, D. (2010). Scalable Stirred-Suspension Bioreactor Culture. *Tissue Engineering: Part A*, *16*(2), 405–421.
- Kester, L., & van Oudenaarden, A. (2018). Single-Cell Transcriptomics Meets Lineage Tracing. *Cell Stem Cell*, *23*(2), 166–179. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.014>
- Kibbey, M. C. (1994). Maintenance of the EHS sarcoma and Matrigel preparation. *Journal of Tissue Culture Methods*, *16*(3–4), 227–230. <https://doi.org/10.1007/BF01540656>
- Kim, J. H., Auerbach, J. M., Rodríguez-Gómez, J. A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S. H., Nguyen, J., Sánchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K., & McKay, R. (2002). Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*, *418*(6893), 50–56. <https://doi.org/10.1038/nature00900>
- Kim, M., Rhee, J. K., Choi, H., Kwon, A., Kim, J., Lee, G. D., Jekarl, D. W., Lee, S., Kim, Y., & Kim, T. M. (2017). Passage-dependent accumulation of somatic mutations in mesenchymal stromal cells during in vitro culture revealed by whole genome sequencing. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15155-5>
- Kim, Y., Jang, H., Seo, K., Kim, J. H., Lee, B., Cho, H. M., Kim, H. J., Yang, E., Kim, H., Gim, J.-A., Park, Y., Ryu, J. R., & Sun, W. (2021). Cell position within human pluripotent stem cell colonies determines apical specialization via an actin cytoskeleton-based mechanism. *Stem Cell Reports*, *17*(2021), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.11.005>
- Kimbrel, E. A., & Lanza, R. (2020). Next-generation stem cells — ushering in a new era of cell-based therapies. *Nature Reviews Drug Discovery*. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0064-x>
- King, N. M. P., & Perrin, J. (2014). Ethical issues in stem cell research and therapy. *Stem Cell Research and Therapy*, *5*(4), 2–7. <https://doi.org/10.1186/scrt474>
- Kinney, M. A., Sargent, C. Y., & McDevitt, T. C. (2011a). The multiparametric effects of hydrodynamic environments on stem cell culture. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, *17*(4), 249–262. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0040>
- Kinney, M. A., Sargent, C. Y., & McDevitt, T. C. (2011b). The multiparametric effects of hydrodynamic environments on stem cell culture. *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, *17*(4), 249–262. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2011.0040>
- Kinoshita, M., Barber, M., Mansfield, W., Cui, Y., Spindlow, D., Stirparo, G. G., Dietmann, S., Nichols, J., & Smith, A. (2021). Capture of Mouse and Human Stem Cells with Features of Formative Pluripotency. *Cell Stem Cell*, *28*(3), 453–471.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.11.005>
- Kinoshita, M., & Smith, A. (2018). Pluripotency Deconstructed. *Development Growth and Differentiation*, *60*(1), 44–52. <https://doi.org/10.1111/dgd.12419>
- Kirkeby, A., Nolbrant, S., Tiklova, K., Heuer, A., Kee, N., Cardoso, T., Ottosson, D. R., Lelos, M. J., Rifés, P., Dunnett, S. B., Grealish, S., Perlmann, T., & Parmar, M. (2017). Predictive Markers Guide Differentiation to Improve Graft Outcome in Clinical Translation of hESC-Based Therapy for Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell*, *20*(1), 135–148. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.09.004>
- Kirkeby, A., Parmar, M., & Barker, R. A. (2017). Strategies for bringing stem cell-derived dopamine neurons to the clinic: A European approach (STEM-PD). In *Progress in Brain Research* (1st ed., Vol. 230). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2016.11.011>

- Kiss, R., Bock, H., Pells, S., Canetta, E., Adya, A. K., Moore, A. J., de Sousa, P., & Willoughby, N. A. (2011). Elasticity of human embryonic stem cells as determined by atomic force microscopy. *Journal of Biomechanical Engineering*, *133*(10). <https://doi.org/10.1115/1.4005286>
- Kleinman, H. K., & Martin, G. R. (2005). Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Seminars in Cancer Biology*, *15*(5 SPEC. ISS.), 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.05.004>
- Kleinsmith, J., & Pierce, J. H. (1964). Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Research*. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/24/9/1544.article-info>
- Knouse, K. A., Lopez, K. E., Bachofner, M., & Amon, A. (2018). Chromosome Segregation Fidelity in Epithelia Requires Tissue Architecture. *Cell*, *175*(1), 200–211.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.042>
- Kosanke, M., Davenport, C., Szepes, M., Wiehlmann, L., Kohn, T., Dorda, M., Gruber, J., Menge, K., Sievert, M., Melchert, A., Gruh, I., Göhring, G., & Martin, U. (2021). iPSC culture expansion selects against putatively actionable mutations in the mitochondrial genome. *Stem Cell Reports*, *16*(10), 2488–2502. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.08.016>
- Koto, H. (2021). AMNION-SPECIFIC MARKERS DEMARCATe THE REALM OF VARIOUS HUMAN PLURIPOTENT STATES. *ISSCR, Ehime Univ.*
- Kratochvil, M. J., Seymour, A. J., Li, T. L., Paşca, S. P., Kuo, C. J., & Heilshorn, S. C. (2019). Engineered materials for organoid systems. *Nature Reviews Materials*, *4*(9), 606–622. <https://doi.org/10.1038/s41578-019-0129-9>
- Kropp, C., Massai, D., & Zweigerdt, R. (2017). Progress and challenges in large-scale expansion of human pluripotent stem cells. *Process Biochemistry*, *59*, 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.09.032>
- Kuijk, E., Jager, M., Roest, B. van der, Locati, M., Hoeck, A. van, Korzelius, J., Janssen, R., Besselink, N., Boymans, S., Boxtel, R. van, & Cuppen, E. (2018). Mutational impact of culturing human pluripotent and adult stem cells. *Nature Communications*, *2020*, 430165. <https://doi.org/10.1101/430165>
- Kyprianou, C., Christodoulou, N., Hamilton, R. S., Nahaboo, W., Boomgaard, D. S., Amadei, G., Migeotte, I., & Zernicka-Goetz, M. (2020). Basement membrane remodelling regulates mouse embryogenesis. *Nature*, *March 2019*. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2264-2>
- Labanieh, L., Majzner, R. G., & Mackall, C. L. (2018). Programming CAR-T cells to kill cancer. *Nature Biomedical Engineering*, *2*(June). <https://doi.org/10.1038/s41551-018-0235-9>
- Laco, F., Woo, T. L., Zhong, Q., Szmyd, R., Ting, S., Khan, F. J., Chai, C. L. L., Reuveny, S., Chen, A., & Oh, S. (2018). Unraveling the Inconsistencies of Cardiac Differentiation Efficiency Induced by the GSK3 β Inhibitor CHIR99021 in Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, *10*(6), 1851–1866. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.03.023>
- Lancaster, M. A. (2018). Brain organoids get vascularized. *Nature Biotechnology*, *36*(5), 407–408. <https://doi.org/10.1038/nbt.4133>
- Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014). Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science*, *345*(6194). <https://doi.org/10.1126/science.1247125>
- Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C., Wenzel, D., Bicknell, S., Hurler, M. E., Homfray, T., Penninger, J. M., & Andrew, P. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, *501*(7467), 373–379. <https://doi.org/10.1038/nature12517>
- Lane, S. W., Williams, D. A., & Watt, F. M. (2014). Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nature Biotechnology*, *32*(8), 795–803. <https://doi.org/10.1038/nbt.2978>
- Lau, K. X., Mason, E. A., Kie, J., de Souza, D. P., Kloehn, J., Tull, D., McConville, M. J., Keniry, A., Beck, T., Blewitt, M. E., Ritchie, M. E., Naik, S. H., Zalcenstein, D., Korn, O., Su, S., Romero, I. G., Spruce, C., Baker, C. L., McGarr, T. C., ... Pera, M. F. (2020). Unique properties of a subset of human pluripotent stem cells with high capacity for self-renewal. *Nature Communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16214-8>
- Laurent, J., Blin, G., Chatelain, F., Vanneaux, V., Fuchs, A., Larghero, J., & Théry, M. (2017). Convergence of microengineering and cellular self-organization towards functional tissue manufacturing. *Nature Biomedical Engineering*, *1*(12), 939–956. <https://doi.org/10.1038/s41551-017-0166-x>
- Laurent, L. C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., Lynch, C., Harness, J. v., Lee, S., Barrero, M. J., Ku, S., Martynova, M., Semechkin, R., Galat, V., Gottesfeld, J., Belmonte, J. C. I., Murry, C., Keirstead, H. S., Park, H. S., ... Loring, J. F. (2011). Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human

- ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell*, 8(1), 106–118. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.12.003>
- Lawson, T., Kehoe, D. E., Schnitzler, A. C., Rapiejko, P. J., Der, K. A., Philbrick, K., Punreddy, S., Rigby, S., Smith, R., Feng, Q., Murrell, J. R., & Rook, M. S. (2017). Process development for expansion of human mesenchymal stromal cells in a 50 L single-use stirred tank bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 120, 49–62. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.11.020>
- Lazarus, H. M., Haynesworth, S. E., Gerson, S. L., Rosenthal, N. S., & Caplan, A. I. (1995). Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): Implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplantation*, 16(4), 557–564.
- Lee, B., Giroux, D., Hashimura, Y., & Wesselschmidt, R. (2015). Scale-down model screening study of key process parameters for anchorage-dependent stem cells using vertical-wheel bioreactors. *Cytotherapy*, 17(6), S30. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.03.625>
- Lee, S., Huh, J. Y., Turner, D. M., Lee, S., Robinson, J., Stein, J. E., Shim, S. H., Hong, C. P., Kang, M. S., Nakagawa, M., Kaneko, S., Nakanishi, M., Rao, M. S., Kurtz, A., Stacey, G. N., Marsh, S. G. E., Turner, M. L., & Song, J. (2018). Repurposing the Cord Blood Bank for Haplobanking of HLA-Homozygous iPSCs and Their Usefulness to Multiple Populations. *Stem Cells*, 36(10), 1552–1566. <https://doi.org/10.1002/stem.2865>
- Lefort, N. (2015). Instabilité génomique des cellules souches pluripotentes humaines et de leurs dérivés. *HDR; Habilitation à Diriger Les Recherches*.
- Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Féraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., & Perrier, A. L. (2008). Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nature Biotechnology*, 26(12), 1364–1366. <https://doi.org/10.1038/nbt.1509>
- Lei, Y., & Schaffer, D. v. (2013a). A fully defined and scalable 3D culture system for human pluripotent stem cell expansion and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(52), E5039–E5048. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309408110>
- Lei, Y., & Schaffer, D. v. (2013b). A fully defined and scalable 3D culture system for human pluripotent stem cell expansion and differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(52), E5039–E5048. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309408110>
- Lensink, M. A., Boers, S. N., Jongsma, K. R., Carter, S. E., van der Ent, C. K., & Bredenoord, A. L. (2021). Organoids for personalized treatment of Cystic Fibrosis: Professional perspectives on the ethics and governance of organoid biobanking. *Journal of Cystic Fibrosis*, 20(3), 443–451. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2020.11.015>
- Leung, C. T., & Brugge, J. S. (2012). Outgrowth of single oncogene-expressing cells from suppressive epithelial environments. *Nature*, 482(7385), 410–413. <https://doi.org/10.1038/nature10826>
- Levayer, R., Dupont, C., & Moreno, E. (2016). Tissue Crowding Induces Caspase-Dependent Competition for Space. *Current Biology*, 26(5), 670–677. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.12.072>
- Li, F., Ge, Y., Liu, D., & Songyang, Z. (2020). The role of telomere-binding modulators in pluripotent stem cells. *Protein and Cell*, 11(1), 60–70. <https://doi.org/10.1007/s13238-019-0651-y>
- Li, J. S. Z., & Denchi, E. L. (2018). How stem cells keep telomeres in check. *Differentiation*, 100(January), 21–25. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2018.01.004>
- Li, M., & Belmonte, J. C. I. (2016). Looking to the future following 10 years of induced pluripotent stem cell technologies. *Nature Protocols*, 11(9), 1579–1585. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.108>
- Li, M., & Belmonte, J. C. I. (2017). Ground rules of the pluripotency gene regulatory network. *Nature Reviews Genetics*, 18(3), 180–191. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.156>
- Li, Q., Lin, H., Du, Q., Liu, K., Wang, O., Evans, C., Christian, H., Zhang, C., & Lei, Y. (2018). Scalable and physiologically relevant microenvironments for human pluripotent stem cell expansion and differentiation. *Biofabrication*, 10(2). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aaa6b5>
- Li, S., Qi, Y., McKee, K., Liu, J., Hsu, J., & Yurchenco, P. D. (2017). Integrin and dystroglycan compensate each other to mediate laminin-dependent basement membrane assembly and epiblast polarization. *Matrix Biology*, 57–58, 272–284. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.07.005>

- Li, W., Englund, E., Widner, H., Mattsson, B., van Westen, D., Lätt, J., Rehncrona, S., Brundin, P., Björklund, A., Lindvall, O., & Li, J.-Y. Y. (2016). Extensive graft-derived dopaminergic innervation is maintained 24 years after transplantation in the degenerating parkinsonian brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(23), 6544–6549. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605245113>
- Li, Y., Hermanson, D. L., Moriarity, B. S., & Kaufman, D. S. (2018). Human iPSC-Derived Natural Killer Cells Engineered with Chimeric Antigen Receptors Enhance Anti-tumor Activity. *Cell Stem Cell*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.06.002>
- Liedtke, S., Korschgen, L., Korn, J., Duppers, A., & Kogler, G. (2021). GMP-grade CD34+ selection from HLA-homozygous licensed cord blood units and short-term expansion under European ATMP regulations. *Vox Sanguinis*, *116*(1), 123–135. <https://doi.org/10.1111/vox.12978>
- Lim, F., & Sun, A. M. (1980). Microencapsulated islets as bioartificial endocrine pancreas. *Science*, *210*(4472), 908–910. <https://doi.org/10.1126/science.6776628>
- Lima, A., Lubatti, G., Burgstaller, J., Hu, D., Green, A. P., di Gregorio, A., Zawadzki, T., Pernaute, B., Mahammadov, E., Perez-Montero, S., Dore, M., Sanchez, J. M., Bowling, S., Sancho, M., Kolbe, T., Karimi, M. M., Carling, D., Jones, N., Srinivas, S., ... Rodriguez, T. A. (2021). Cell competition acts as a purifying selection to eliminate cells with mitochondrial defects during early mouse development. *Nature Metabolism*, *3*(8), 1091–1108. <https://doi.org/10.1038/s42255-021-00422-7>
- Lindvall, O., Rehncrona, S., Brundin, P., Gustavii, B., Åstedt, B., Widner, H., Lindholm, T., Björklund, A., Leenders, K. L., Rothwell, J. C., Frackowiak, R., Marsden, C. D., Johnels, B., Steg, G., Freedman, R., Hoffer, B. J., Seiger, A., Bygdeman, M., Strömberg, I., & Olson, L. (1989). Human fetal dopamine neurons grafted into the striatum in two patients with severe parkinson's disease: A detailed account of methodology and a 6-month follow-up. *Archives of Neurology*, *46*(6), 615–631. <https://doi.org/10.1001/archneur.1989.00520420033021>
- Liu, B., Chen, S., Xu, Y., Lyu, Y., Wang, J., Du, Y., Sun, Y., Liu, H., Zhou, H., Lai, W., Xue, A., Yin, M., Li, C., Bai, Y., Xu, J., & Deng, H. (2021). Chemically defined and xeno-free culture condition for human extended pluripotent stem cells. *Nature Communications*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23320-8>
- Liu, L., Michowski, W., Kolodziejczyk, A., & Siciński, P. (2019). The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. *Nature Cell Biology*, *21*(9), 1060–1067. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0384-4>
- Liu, W., Deng, C., Godoy-Parejo, C., Zhang, Y., & Chen, G. (2019). Developments in cell culture systems for human pluripotent stem cells. *World Journal of Stem Cells*, *11*(11), 968–981. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i11.968>
- Liu, X., Tan, J. P., Schröder, J., Aberkane, A., Ouyang, J. F., Mohenska, M., Lim, S. M., Sun, Y. B. Y., Chen, J., Sun, G., Zhou, Y., Poppe, D., Lister, R., Clark, A. T., Rackham, O. J. L., Zenker, J., & Polo, J. M. (2021). Modelling human blastocysts by reprogramming fibroblasts into iBlastoids. *Nature*, August 2020. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03372-y>
- Liu, Y., Song, Z., Zhao, Y., Qin, H., Cai, J., Zhang, H., Yu, T., Jiang, S., Wang, G., Ding, M., & Deng, H. (2006). A novel chemical-defined medium with bFGF and N2B27 supplements supports undifferentiated growth in human embryonic stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *346*(1), 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.086>
- Lopes, yolanda chang; arend overeem; susana C. de S. (2021). chromosome X inactivation in 2D and 3D stem cell cultures. *Unpublished ISSCR2021*.
- Loring, J. (2016). Genomics-based quality control for stem cell therapy: Parkinson's Disease - Jeanne Loring - RB2016. *Youtube*. <https://www.youtube.com/watch?app=desktop&v=HDj9LvCRBws>
- Loring, J. F. (2018). Autologous induced pluripotent stem cell-derived neurons to treat Parkinson's disease. *Stem Cells and Development*, *27*(14), 958–959. <https://doi.org/10.1089/scd.2018.0107>
- Loubière, C. (2019). *Characterization and impact of the hydrodynamics on the performance of umbilical-cord derived stem cells culture in stirred tank bioreactors*. 209.
- Lovell-Badge, R., Anthony, E., Barker, R. A., Bubela, T., Brivanlou, A. H., Carpenter, M., Charo, R. A., Clark, A., Clayton, E., Cong, Y., Daley, G. Q., Fu, J., Fujita, M., Greenfield, A., Goldman, S. A., Hill, L., Hyun, I., Isasi, R., Kahn, J., ... Zhai, X. (2021). ISSCR Guidelines for Stem Cell Research and Clinical Translation: The 2021 update. In *Stem Cell Reports* (Vol. 16, Issue 6, pp. 1398–1408). <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.05.012>

- Luckett, W. P. (1975). The development of primordial and definitive amniotic cavities in early rhesus monkey and human embryos. *American Journal of Anatomy*, *144*(2), 149–167. <https://doi.org/10.1002/aja.1001440204>
- Ludwig, T. E., Levenstein, M. E., Jones, J. M., Berggren, W. T., Mitchen, E. R., Frane, J. L., Crandall, L. J., Daigh, C. A., Conard, K. R., Piekarczyk, M. S., Llanas, R. A., & Thomson, J. A. (2006). Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nature Biotechnology*, *24*(2), 185–187. <https://doi.org/10.1038/nbt1177>
- Luu, O., David, R., Ninomiya, H., & Winklbauer, R. (2011). Large-scale mechanical properties of *Xenopus* embryonic epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(10), 4000–4005. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010331108>
- Ma, M., Chiu, A., Sahay, G., Doloff, J. C., Dholakia, N., Thakrar, R., Cohen, J., Vegas, A., Chen, D., Bratlie, K. M., Dang, T., York, R. L., Hollister-Lock, J., Weir, G. C., & Anderson, D. G. (2013). Core-Shell Hydrogel Microcapsules for Improved Islets Encapsulation. *Advanced Healthcare Materials*, *2*(5), 667–672. <https://doi.org/10.1002/adhm.201200341>
- MacKay, M., Afshinnekoo, E., Rub, J., Hassan, C., Khunte, M., Baskaran, N., Owens, B., Liu, L., Roboz, G. J., Guzman, M. L., Melnick, A. M., Wu, S., & Mason, C. E. (2020). The therapeutic landscape for cells engineered with chimeric antigen receptors. *Nature Biotechnology*, *38*(2), 233–244. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0329-2>
- Madl, C. M., & Heilshorn, S. C. (2018). Engineering Hydrogel Microenvironments to Recapitulate the Stem Cell Niche. *Annual Review of Biomedical Engineering*, *20*(November 2017), 21–47. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-062117-120954>
- Madl, C. M., Heilshorn, S. C., & Blau, H. M. (2018). Bioengineering strategies to accelerate stem cell therapeutics. *Nature*, *557*(7705), 335–342. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0089-z>
- Magyar, J. P., Nemir, M., Ehler, E., Suter, N., Perriard, J. C., & Eppenberger, H. M. (2001). Mass production of embryoid bodies in microbeads. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *944*, 135–143. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03828.x>
- Maitra, A., Arking, D. E., Shivapurkar, N., Ikeda, M., Stastny, V., Kassauei, K., Sui, G., Cutler, D. J., Liu, Y., Brimble, S. N., Noaksson, K., Hyllner, J., Schulz, T. C., Zeng, X., Freed, W. J., Crook, J., Abraham, S., Colman, A., Sartipy, P., ... Chakravarti, A. (2005). Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nature Genetics*, *37*(10), 1099–1103. <https://doi.org/10.1038/ng1631>
- Majedi, F. S., Hasani-Sadrabadi, M. M., Thauland, T. J., Li, S., Bouchard, L. S., & Butte, M. J. (2020). T-cell activation is modulated by the 3D mechanical microenvironment. *Biomaterials*, *252*(September 2019), 120058. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120058>
- Malpique, R., Brito, C., Jensen, J., Serra, M., Correia, C., Malpique, R., Brito, C., Jensen, J., Bjoquist, P., Carrondo, M. J. T., & Alves, P. M. (2011). Microencapsulation technology: A powerful tool for integrating expansion and cryopreservation of human embryonic stem cells. *PLoS ONE*, *6*(8), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023212>
- Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hirami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., Terada, M., Nomiya, Y., Tanishima, S., Nakamura, M., Kamao, H., Sugita, S., Onishi, A., Ito, T., Fujita, K., ... Takahashi, M. (2017). Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *New England Journal of Medicine*, *376*(11), 1038–1046. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1608368>
- Mani, C., Reddy, P. H., & Palle, K. (2020). DNA repair fidelity in stem cell maintenance, health, and disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1866*(4), 165444. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2019.03.017>
- Mansour, A. A., Gonçalves, J. T., Bloyd, C. W., Li, H., Fernandes, S., Quang, D., Johnston, S., Parylak, S. L., Jin, X., & Gage, F. H. (2018). An in vivo model of functional and vascularized human brain organoids. *Nature Biotechnology*, *36*(5), 432–441. <https://doi.org/10.1038/nbt.4127>
- Manstein, F., Ullmann, K., Kropp, C., Halloin, C., Triebert, W., Franke, A., Farr, C. M., Sahabian, A., Haase, A., Breitkreuz, Y., Peitz, M., Brüstle, O., Kalies, S., Martin, U., Olmer, R., & Zweigerdt, R. (2021). High density bioprocessing of human pluripotent stem cells by metabolic control and in silico modeling. *Stem Cells Translational Medicine*, 1–18. <https://doi.org/10.1002/sctm.20-0453>
- Marion, R. M., Strati, K., Li, H., Tejera, A., Schoeftner, S., Ortega, S., Serrano, M., & Blasco, M. A. (2009). Telomeres Acquire Embryonic Stem Cell Characteristics in Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, *4*(2), 141–154. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.12.010>

- Marofi, F., Motavalli, R., Safonov, V. A., Thangavelu, L., Yumashev, A. V., Alexander, M., Shomali, N., Chartrand, M. S., Pathak, Y., Jarahian, M., Izadi, S., Hassanzadeh, A., Shirafkan, N., Tahmasebi, S., & Khiavi, F. M. (2021). CAR T cells in solid tumors: challenges and opportunities. *Stem Cell Research and Therapy*, *12*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02128-1>
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *78*(12 II), 7634–7638. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>
- McClements, D. J., & Decker, E. A. (2000). Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science*, *65*(8), 1270–1282. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10596.x>
- McGuigan, A. P., & Sefton, M. v. (2006). Vascularized organoid engineered by modular assembly enables blood perfusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(31), 11461–11466. <https://doi.org/10.1073/pnas.0602740103>
- McIntire, E., Taapken, S., Leonhard, K., & Larson, A. L. (2020). Genomic Stability Testing of Pluripotent Stem Cells. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, *52*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1002/cpsc.107>
- McKee, C., & Chaudhry, G. R. (2017). Advances and challenges in stem cell culture. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *159*, 62–77. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.07.051>
- McKinley, K. L., Stuurman, N., Royer, L. A., Schartner, C., Castillo-Azofeifa, D., Delling, M., Klein, O. D., & Vale, R. D. (2018). Cellular aspect ratio and cell division mechanics underlie the patterning of cell progeny in diverse mammalian epithelia. *ELife*, *7*, 1–20. <https://doi.org/10.7554/eLife.36739>
- Mebarki, M., Bennaceur, A., & Bonhomme-Faivre, L. (2018). Human-cell-derived organoids as a new ex vivo model for drug assays in oncology. *Drug Discovery Today*, *00*(00). <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.02.003>
- Meistermann, D., Bruneau, A., Loubersac, S., Reignier, A., Firmin, J., François-Campion, V., Kilens, S., Lelièvre, Y., Lammers, J., Feyeux, M., Hulin, P., Nedellec, S., Bretin, B., Castel, G., Allègre, N., Covin, S., Bihouée, A., Soumillon, M., Mikkelsen, T., ... David, L. (2021). Integrated pseudotime analysis of human pre-implantation embryo single-cell transcriptomes reveals the dynamics of lineage specification. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.04.027>
- Menasché, P., Hagège, A. A., Scorsin, M., Pouzet, B., Desnos, M., Duboc, D., Schwartz, K., Vilquin, J. T., & Marolleau, J. P. (2001). Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet*, *357*(9252), 279–280. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)03617-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)03617-5)
- Menasché, P., Vanneaux, V., Hagège, A., Bel, A., Cholley, B., Cacciapuoti, I., Parouchev, A., Benhamouda, N., Tachdjian, G., Tosca, L., Trouvin, J. H., Fabreguettes, J. R., Bellamy, V., Guillemain, R., Suberbielle Boissel, C., Tartour, E., Desnos, M., & Larghero, J. (2015). Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: First clinical case report. *European Heart Journal*, *36*(30), 2011–2017. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv189>
- Merkle, F. T., Ghosh, S., Genovese, G., Handsaker, R. E., Kashin, S., Karczewski, K., O'dushlaine, C., Pato, C., Pato, M., Macarthur, D. G., Mccarroll, S. A., & Eggan, K. (2020). Biological insights from the whole genome analysis of human embryonic stem cells GRAPHICAL ABSTRACT IN BRIEF. *BioRxiv*, 2020.10.26.337352. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.018>
- Merkle, F. T., Ghosh, S., Kamitaki, N., Mitchell, J., Avior, Y., Mello, C., Kashin, S., Mekhoubad, S., Ilic, D., Charlton, M., Saphier, G., Handsaker, R. E., Genovese, G., Bar, S., Benvenisty, N., McCarroll, S. A., & Eggan, K. (2017). Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations. *Nature*, *545*(7653), 229–233. <https://doi.org/10.1038/nature22312>
- Merleau-Ponty, N. (2019). Corps embryoides : biologie moléculaire et cellules vivantes. *Ateliers d'anthropologie*, *46*. <https://doi.org/10.4000/ateliers.11031>
- Mesa, K. R., Rompolas, P., & Greco, V. (2015). The Dynamic Duo: Niche/Stem Cell Interdependency. *Stem Cell Reports*, *4*(6), 961–966. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.05.001>
- Meshorer, E., & Misteli, T. (2006). Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *7*(7), 540–546. <https://doi.org/10.1038/nrm1938>

- Metzger, J. J., Simunovic, M., & Brivanlou, A. H. (2018). Synthetic embryology: controlling geometry to model early mammalian development. *Current Opinion in Genetics and Development*, *52*, 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2018.06.006>
- Minutolo, N. G., Hollander, E. E., & Powell, D. J. J. (2019). The emergence of universal immune receptor t cell therapy for cancer. *Frontiers in Oncology*, *9*(MAR). <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00176>
- Mitrousis, N., Fokina, A., & Shoichet, M. S. (2018). Biomaterials for cell transplantation. *Nature Reviews Materials*, *3*(11), 441–456. <https://doi.org/10.1038/s41578-018-0057-0>
- Mitwasi, N., Feldmann, A., Arndt, C., Koristka, S., Berndt, N., Jureczek, J., Loureiro, L. R., Bergmann, R., Máthé, D., Hegedüs, N., Kovács, T., Zhang, C., Oberoi, P., Jäger, E., Seliger, B., Rössig, C., Temme, A., Eitler, J., Tonn, T., ... Bachmann, M. (2020). “UniCAR”-modified off-the-shelf NK-92 cells for targeting of GD2-expressing tumour cells. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59082-4>
- Molè, M. A., Weberling, A., Fässler, R., Campbell, A., Fishel, S., & Zernicka-Goetz, M. (2021). Integrin $\beta 1$ coordinates survival and morphogenesis of the embryonic lineage upon implantation and pluripotency transition. *Cell Reports*, *34*(10). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108834>
- Molè, M. A., Weberling, A., & Zernicka-Goetz, M. (2020). Comparative analysis of human and mouse development: From zygote to pre-gastrulation. *Current Topics in Developmental Biology*, *136*, 113–138. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2019.10.002>
- Mollaki, V. (2021). Ethical challenges in organoid use. *BioTech*, *10*(3). <https://doi.org/10.3390/biotech10030012>
- Mölzer, C., Heissigerova, J., Wilson, H. M., Kuffova, L., & Forrester, J. v. (2020). Immune Privilege: The Microbiome and Uveitis. *Frontiers in Immunology*, *11*, 608377. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.608377>
- Morandi, F., Yazdanifar, M., Cocco, C., Bertaina, A., & Airoidi, I. (2020). Engineering the Bridge between Innate and Adaptive Immunity for Cancer Immunotherapy: Focus on $\gamma\delta$ T and NK Cells. *Cells*, *9*(8). <https://doi.org/10.3390/cells9081757>
- Morata, G., & Ripoll, P. (1975). Minutes: Mutants of *Drosophila* autonomously affecting cell division rate. *Developmental Biology*, *42*(2), 211–221. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(75\)90330-9](https://doi.org/10.1016/0012-1606(75)90330-9)
- Moreno-Cortes, E., Forero-Forero, J. V., Lengerke-Diaz, P. A., & Castro, J. E. (2021). Chimeric antigen receptor T cell therapy in oncology – Pipeline at a glance: Analysis of the ClinicalTrials.gov database. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, *159*(January), 103239. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2021.103239>
- Morgani, S., Nichols, J., & Hadjantonakis, A. K. (2017). The many faces of Pluripotency: In vitro adaptations of a continuum of in vivo states. *BMC Developmental Biology*, *17*(1), 10–12. <https://doi.org/10.1186/s12861-017-0150-4>
- Morizane, A., Doi, D., Kikuchi, T., Okita, K., Hotta, A., Kawasaki, T., Hayashi, T., Onoe, H., Shiina, T., Yamanaka, S., & Takahashi, J. (2013). Direct comparison of autologous and allogeneic transplantation of iPSC-derived neural cells in the brain of a nonhuman primate. *Stem Cell Reports*, *1*(4), 283–292. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.08.007>
- Morrison, S. J., & Spradling, A. C. (2008). Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell Maintenance throughout Life. *Cell*, *132*(4), 598–611. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.038>
- Moscona. (1952). The dissociation and aggregation of cells from organ rudiments of the early chick embryo. *Journal of Anatomy*, *86*(3), 287–301.
- Muncie, J. M., & Weaver, V. M. (2018). The Physical and Biochemical Properties of the Extracellular Matrix Regulate Cell Fate. In *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 130). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2018.02.002>
- Murry, C. E., & MacLellan, W. R. (2020). Stem cells and the heart - The road ahead. *Science*, *367*(6480), 854–855. <https://doi.org/10.1126/science.aaz3650>
- Murua, A., Portero, A., Orive, G., Hernández, R. M., de Castro, M., & Pedraz, J. L. (2008). Cell microencapsulation technology: Towards clinical application. *Journal of Controlled Release*, *132*(2), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.08.010>
- Nakano, T., Ando, S., Takata, N., Kawada, M., Muguruma, K., Sekiguchi, K., Saito, K., Yonemura, S., Eiraku, M., & Sasai, Y. (2012). Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell*, *10*(6), 771–785. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.009>

- Nakaya, Y., Sukowati, E. W., & Sheng, G. (2013). Epiblast integrity requires CLASP and Dystroglycan-mediated microtubule anchoring to the basal cortex. *Journal of Cell Biology*, *202*(4), 637–651. <https://doi.org/10.1083/jcb.201302075>
- Narsinh, K. H., Plews, J., & Wu, J. C. (2011). Comparison of human induced pluripotent and embryonic stem cells: Fraternal or identical twins? *Molecular Therapy*, *19*(4), 635–638. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.41>
- Natalwala, A., & Kunath, T. (2017). Preparation, characterization, and banking of clinical-grade cells for neural transplantation: Scale up, fingerprinting, and genomic stability of stem cell lines. In *Progress in Brain Research* (1st ed., Vol. 230, Issue iii). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2017.02.007>
- Nava, M. M., Raimondi, M. T., Credi, C., de Marco, C., Turri, S., Cerullo, G., & Osellame, R. (2015). Interactions between structural and chemical biomimeticism in synthetic stem cell niches. *Biomedical Materials (Bristol)*, *10*(1), 15012. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/10/1/015012>
- Nazor, K. L., Altun, G., Lynch, C., Tran, H., Harness, J. v., Slavin, I., Garitaonandia, I., Müller, F. J., Wang, Y. C., Boscolo, F. S., Fakunle, E., Dumevska, B., Lee, S., Park, H. S., Olee, T., D’Lima, D. D., Semechkin, R., Parast, M. M., Galat, V., ... Laurent, L. C. (2012). Recurrent variations in DNA methylation in human pluripotent stem cells and their differentiated derivatives. *Cell Stem Cell*, *10*(5), 620–634. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.02.013>
- Neagu, A., van Genderen, E., Escudero, I., Verwegen, L., Kurek, D., Lehmann, J., Stel, J., Dirks, R. A. M., van Mierlo, G., Maas, A., Eleveld, C., Ge, Y., den Dekker, A. T., Brouwer, R. W. W., van IJcken, W. F. J., Modic, M., Drukker, M., Jansen, J. H., Rivron, N. C., ... ten Berge, D. (2020). In vitro capture and characterization of embryonic rosette-stage pluripotency between naive and primed states. *Nature Cell Biology*, *22*(5), 534–545. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0508-x>
- Neahring, L., & Dumont, S. (2018). Chromosome Segregation Fidelity Integrates Information across Scales. *Developmental Cell*, *47*(5), 525–526. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.11.027>
- Ng, N. N., & Thakor, A. S. (2020). Locoregional delivery of stem cell-based therapies. *Science Translational Medicine*, *12*(547), 1–18. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aba4564>
- Niakan, K. K., Han, J., Pedersen, R. A., Simon, C., & Pera, R. A. R. (2012). Human pre-implantation embryo development. *Development*, *139*(5), 829–841. <https://doi.org/10.1242/dev.060426>
- Nie, Y., Bergendahl, V., Hei, D. J., Jones, J. M., & Palecek, S. P. (2009). Scalable culture and cryopreservation of human embryonic stem cells on microcarriers. *Biotechnology Progress*, *25*(1), 20–31. <https://doi.org/10.1002/btpr.110>
- Nikolaev, M., Mitrofanova, O., Broguiere, N., Geraldo, S., Dutta, D., Tabata, Y., Elci, B., Brandenburg, N., Kolotuev, I., Gjorevski, N., Clevers, H., & Lutolf, M. P. (2020). Homeostatic mini-intestines through scaffold-guided organoid morphogenesis. *Nature*, *585*(7826), 574–578. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2724-8>
- Nishiguchi, A., Matsusaki, M., Kano, M. R., Nishihara, H., Okano, D., Asano, Y., Shimoda, H., Kishimoto, S., Iwai, S., & Akashi, M. (2018). In vitro 3D blood/lymph-vascularized human stromal tissues for preclinical assays of cancer metastasis. In *Biomaterials* (Vol. 179). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.06.019>
- Nogueira, D. E. S., Cabral, J. M. S., & Rodrigues, C. A. V. (2021). Single-use bioreactors for human pluripotent and adult stem cells: Towards regenerative medicine applications. *Bioengineering*, *8*(5), 1–24. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING8050068>
- Nogueira, D. E. S., Rodrigues, C. A. V., Carvalho, M. S., Miranda, C. C., Hashimura, Y., Jung, S., Lee, B., & Cabral, J. M. S. (2019). Strategies for the expansion of human induced pluripotent stem cells as aggregates in single-use Vertical-Wheel™ bioreactors. *Journal of Biological Engineering*, *13*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13036-019-0204-1>
- Nolbrant, S., Heuer, A., Parmar, M., & Kirkeby, A. (2017). Generation of high-purity human ventral midbrain dopaminergic progenitors for in vitro maturation and intracerebral transplantation. *Nature Protocols*, *12*(9), 1962–1979. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.078>
- Novak, R., Ingram, M., Marquez, S., Das, D., Delahanty, A., Herland, A., Maoz, B. M., Jeanty, S. S. F., Somayaji, M. R., Burt, M., Calamari, E., Chalkiadaki, A., Cho, A., Choe, Y., Chou, D. B., Cnonce, M., Dauth, S., Divic, T., Fernandez-Alcon, J., ... Ingber, D. E. (2020). Robotic fluidic coupling and interrogation of multiple vascularized organ chips. *Nature Biomedical Engineering*, *4*(4), 407–420. <https://doi.org/10.1038/s41551-019-0497-x>
- Obeso, J. A., Stamelou, M., Goetz, C. G., Poewe, W., Lang, A. E., Weintraub, D., Burn, D., Halliday, G. M., Bezard, E., Przedborski, S., Lehericy, S., Brooks, D. J., Rothwell, J. C., Hallett, M., DeLong, M. R., Marras, C., Tanner, C. M., Ross,

- G. W., Langston, J. W., ... Stoessl, A. J. (2017). Past, present, and future of Parkinson's disease: A special essay on the 200th Anniversary of the Shaking Palsy. *Movement Disorders*, 32(9), 1264–1310. <https://doi.org/10.1002/mds.27115>
- O'Carbhaill, E. D., Ng, K. S., & Karp, J. M. (2014). Emerging medical devices for minimally invasive cell therapy. *Mayo Clinic Proceedings*, 89(2), 259–273. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2013.10.020>
- Ohgushi, M., & Sasai, Y. (2011). Lonely death dance of human pluripotent stem cells: ROCKing between metastable cell states. *Trends in Cell Biology*, 21(5), 274–282. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.02.004>
- Okazaki, K., & Maltepe, E. (2006). Oxygen, epigenetics and stem cell fate. *Regenerative Medicine*, 1(1), 71–83. <https://doi.org/10.2217/17460751.1.1.71>
- O'Leary, T., Heindryckx, B., Lierman, S., van Bruggen, D., Goeman, J. J., Vandewoestyne, M., Deforce, D., de Sousa Lopes, S. M. C., & de Sutter, P. (2012). Tracking the progression of the human inner cell mass during embryonic stem cell derivation. *Nature Biotechnology*, 30(3), 278–282. <https://doi.org/10.1038/nbt.2135>
- Olmer, R., Haase, A., Merkert, S., Cui, W., Paleček, J., Ran, C., Kirschning, A., Scheper, T., Glage, S., Miller, K., Curnow, E. C., Hayes, E. S., & Martin, U. (2010). Long term expansion of undifferentiated human iPS and ES cells in suspension culture using a defined medium. *Stem Cell Research*, 5(1), 51–64. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2010.03.005>
- Onoe, H., Okitsu, T., Itou, A., Kato-Negishi, M., Gojo, R., Kiriya, D., Sato, K., Miura, S., Iwanaga, S., Kuribayashi-Shigetomi, K., Matsunaga, Y. T., Shimoyama, Y., & Takeuchi, S. (2013). Metre-long cell-laden microfibres exhibit tissue morphologies and functions. *Nature Materials*, 12(6), 584–590. <https://doi.org/10.1038/nmat3606>
- Orford, K. W., & Scadden, D. T. (2008). Deconstructing stem cell self-renewal: Genetic insights into cell-cycle regulation. *Nature Reviews Genetics*, 9(2), 115–128. <https://doi.org/10.1038/nrg2269>
- Orkin, R. W., Gehron, P., McGoodwin, E. B., Martin, G. R., Valentine, T., & Swarm, R. (1977). A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *Journal of Experimental Medicine*, 145(1), 204–220. <https://doi.org/10.1084/jem.145.1.204>
- Osborn, T., & Hallett, P. J. (2017). Seq-ing Markers of Midbrain Dopamine Neurons. *Cell Stem Cell*, 20(1), 11–12. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.12.014>
- Otsuji, T. G., Bin, J., Yoshimura, A., Tomura, M., Tateyama, D., Minami, I., Yoshikawa, Y., Aiba, K., Heuser, J. E., Nishino, T., Hasegawa, K., & Nakatsuji, N. (2014). A 3D sphere culture system containing functional polymers for large-scale human pluripotent stem cell production. *Stem Cell Reports*, 2(5), 734–745. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.03.012>
- P. Brundin, O.G. Nilsson, R.E. Strecker, O. Lindvall, B. Astedt, A. B. (1986). Behavioural effects of human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Experimental Brain Research*, 235–240. <https://doi.org/10.1007/BF00243848>
- Padgett, J., & Santos, S. D. (2020). From clocks to dominoes: lessons on cell cycle remodelling from embryonic stem cells. *FEBS Letters*, 594, 2031–2045. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13862>
- Palfi, S., Gurruchaga, J. M., Scott Ralph, G., Lepetit, H., Lavis, S., Buttery, P. C., Watts, C., Miskin, J., Kelleher, M., Deeley, S., Iwamuro, H., Lefaucheur, J. P., Thiriez, C., Fenelon, G., Lucas, C., Brugières, P., Gabriel, I., Abhay, K., Drouot, X., ... Mitrophanous, K. A. (2014). Long-term safety and tolerability of ProSavin, a lentiviral vector-based gene therapy for Parkinson's disease: A dose escalation, open-label, phase 1/2 trial. *The Lancet*, 383(9923), 1138–1146. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)61939-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)61939-X)
- Pandey, P. R., Tomney, A., Woon, M. T., Uth, N., Shafiqi, F., Ngabo, I., Vallabhaneni, H., Levinson, Y., Abraham, E., & Ben-Nun, I. F. (2020). End-to-end platform for human pluripotent stem cell manufacturing. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1). <https://doi.org/10.3390/ijms21010089>
- Panopoulos, A. D., D'Antonio, M., Benaglio, P., Williams, R., Hashem, S. I., Schuldt, B. M., DeBoever, C., Arias, A. D., Garcia, M., Nelson, B. C., Harismendy, O., Jakubosky, D. A., Donovan, M. K. R., Greenwald, W. W., Farnam, K. J., Cook, M., Borja, V., Miller, C. A., Grinstein, J. D., ... Frazer, K. A. (2017). iPSCORE: A Resource of 222 iPSC Lines Enabling Functional Characterization of Genetic Variation across a Variety of Cell Types. *Stem Cell Reports*, 8(4), 1086–1100. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.03.012>
- Park, C. H., Minn, Y. K., Lee, J. Y., Choi, D. H., Chang, M. Y., Shim, J. W., Ko, J. Y., Koh, H. C., Kang, M. J., Kang, J. S., Rhie, D. J., Lee, Y. S., Son, H., Moon, S. Y., Kim, K. S., & Lee, S. H. (2005). In vitro and in vivo analyses of human embryonic

- stem cell-derived dopamine neurons. *Journal of Neurochemistry*, 92(5), 1265–1276.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.03006.x>
- Parmar, M., Grealish, S., & Henschcliffe, C. (2020). The future of stem cell therapies for Parkinson disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(2), 103–115. <https://doi.org/10.1038/s41583-019-0257-7>
- Pas, S. P. (2018). The rise of three-dimensional human brain cultures. *Nature*, 553(7689), 437–445.
<https://doi.org/10.1038/nature25032>
- Paşca, S. P. (2018). The rise of three-dimensional human brain cultures. *Nature* 2018 553:7689, 553(7689), 437.
<https://doi.org/10.1038/nature25032>
- Pathak, S. (2019). Biomimicry: (Innovation Inspired by Nature). *International Journal of New Technology and Research*, 5(6). <https://doi.org/10.31871/ijntr.5.6.17>
- Peerani, R., Rao, B. M., Bauwens, C., Yin, T., Wood, G. A., Nagy, A., Kumacheva, E., & Zandstra, P. W. (2007). Niche-mediated control of human embryonic stem cell self-renewal and differentiation. *EMBO Journal*, 26(22), 4744–4755. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601896>
- Pennisi, E. (2018a). Breakthrough of the Year 2018 (sciencemag.org). *Science*.
<https://vis.sciencemag.org/breakthrough2018/finalists/#cell-development>
- Pennisi, E. (2018b). Chronicling embryos, cell by cell, gene by gene single-cell sequencing tracks cells' gene activity during zebrafish and frog embryogenesis. *Science*, 360(6387), 367. <https://doi.org/10.1126/science.360.6387.367>
- Pera, M. F., de Wert, G., Dondorp, W., Lovell-Badge, R., Mummery, C. L., Munsie, M., & Tam, P. P. (2015). What if stem cells turn into embryos in a dish? *Nature Methods*, 12(10), 917–919. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3586>
- Persa, O. D., & Niessen, C. M. (2019). Epithelial polarity limits EMT. *Nature Cell Biology*, 21(3), 299–300.
<https://doi.org/10.1038/s41556-019-0284-7>
- Peter Paul Rubens, F. S. (1618). Prometheus Bound. *Philadelphia Museum of Art*.
<https://philamuseum.org/calendar/exhibition/collection-highlight-prometheus-bound>
- Petersen, O. W., Ronnov-Jessen, L., Howlett, A. R., & Bissell, M. J. (1992). Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(19), 9064–9068.
<https://doi.org/10.1073/pnas.89.19.9064>
- Peterson, S. E., & Loring, J. F. (2014). Genomic instability in pluripotent stem cells: Implications for clinical applications. *Journal of Biological Chemistry*, 289(8), 4578–4584. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.516419>
- Pfeffer, P. L. (2018). Building Principles for Constructing a Mammalian Blastocyst Embryo. *Biology*, 7(3), 41.
<https://doi.org/10.3390/biology7030041>
- Pham, M. T., Pollock, K. M., Rose, M. D., Cary, W. A., Stewart, H. R., Zhou, P., Nolte, J. A., & Waldau, B. (2018). Generation of human vascularized brain organoids. *NeuroReport*, 1.
<https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000001014>
- Picanco-Castro, V., Gonçalves Pereira, C., Swiech, K., Ribeiro Malmegrim, K. C., Tadeu Covas, D., & Silveira Porto, G. (2020). Emerging CAR T cell therapies: clinical landscape and patent technological routes. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 16(6), 1424–1433. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1689744>
- Pickup, M. W., Mouw, J. K., & Weaver, V. M. (2014). The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. *EMBO Reports*, 15(12), 1243–1253. <https://doi.org/10.15252/embr.201439246>
- Pierce, G. B., Stevens, L. C., & Nakane, P. K. (1967). Ultrastructural analysis of the early development of teratocarcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 39(4), 755–773. <https://doi.org/10.1093/jnci/39.4.755>
- Pijuan-Galitó, S., Tamm, C., Schuster, J., Sobol, M., Forsberg, L., Merry, C. L. R., & Annerén, C. (2016). Human serum-derived protein removes the need for coating in defined human pluripotent stem cell culture. *Nature Communications*, 7(May 2015). <https://doi.org/10.1038/ncomms12170>
- Pijuan-Sala, B., Guibentif, C., & Göttgens, B. (2018). Single-cell transcriptional profiling: A window into embryonic cell-type specification. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(6), 399–412. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0002-5>

- Pires, A. O., Teixeira, F. G., Mendes-Pinheiro, B., Serra, S. C., Sousa, N., & Salgado, A. J. (2017). Old and new challenges in Parkinson's disease therapeutics. *Progress in Neurobiology*, *156*, 69–89. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.04.006>
- Platt, A. (2014). Generation of animals. *The Complete Works of Aristotle*, *1*, 1111–1218. <https://doi.org/10.2307/j.ctt5vjv4w.30>
- Polanco, A., Kuang, B., & Yoon, S. (2020). Bioprocess Technologies that Preserve the Quality of iPSCs. *Trends in Biotechnology*, *xx(xx)*, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.03.006>
- Ponnuru, K., Wu, J., Ashok, P., Tzanakakis, E. S., & Furlani, E. P. (2014). Analysis of stem cell culture performance in a microcarrier bioreactor system. *Technical Proceedings of the 2014 NSTI Nanotechnology Conference and Expo, NSTI-Nanotech 2014*, *2*, 132–135.
- Popovic, M., Azpiroz, F., & Chuva de Sousa Lopes, S. M. (2021). Engineered models of the human embryo. *Nature Biotechnology*, *14*–16. <https://doi.org/10.1038/s41587-021-01004-4>
- Popp, B., Krumbiegel, M., Grosch, J., Sommer, A., Uebe, S., Kohl, Z., Plötz, S., Farrell, M., Trautmann, U., Kraus, C., Ekici, A. B., Asadollahi, R., Regensburger, M., Günther, K., Rauch, A., Edenhofer, F., Winkler, J., Winner, B., & Reis, A. (2018). Need for high-resolution Genetic Analysis in iPSC: Results and Lessons from the ForIPSC Consortium. *Scientific Reports*, *8(1)*, 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35506-0>
- Power, C., & Rasko, J. E. J. (2008). Whither Prometheus' liver? Greek myth and the science of regeneration. *Annals of Internal Medicine*, *149(6)*, 421–426. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-149-6-200809160-00009>
- Price, C. J., Stavish, D., Gokhale, P. J., Stevenson, B. A., Sargeant, S., Lacey, J., Rodriguez, T. A., & Barbaric, I. (2021). Genetically variant human pluripotent stem cells selectively eliminate wild-type counterparts through YAP-mediated cell competition. *Developmental Cell*, *56(17)*, 2455–2470.e10. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.07.019>
- Quelennec, E., Banal, C., Hamlin, M., Clémantine, D., Michael, M., Lefort, N., Quelennec, E., Banal, C., Hamlin, M., Clémantine, D., Michael, M., & Lefort, N. (2020). Generation of two induced pluripotent stem cell lines IMAGINi004-A and IMAGINi005-A from healthy donors. *Stem Cell Research*, *101959*. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101959>
- Quinn, C., Young, C., Thomas, J., & Trusheim, M. (2019). Estimating the Clinical Pipeline of Cell and Gene Therapies and Their Potential Economic Impact on the US Healthcare System. *Value in Health*, *22(6)*, 621–626. <https://doi.org/10.1016/j.jval.2019.03.014>
- Raffin, C., Vo, L. T., & Bluestone, J. A. (2020). Treg cell-based therapies: challenges and perspectives. *Nature Reviews Immunology*, *20(3)*, 158–172. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0232-6>
- Rafiq, S., Hackett, C. S., & Brentjens, R. J. (2020). Engineering strategies to overcome the current roadblocks in CAR T cell therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *17(3)*, 147–167. <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0297-y>
- Ravindran, S. (2021). Embryo-like models shed fresh light on early human development. *Nature*, *600(7890)*, 767–769. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-03711-z>
- Resto Irizarry, A. M., Nasr Esfahani, S., & Fu, J. (2020). Bioengineered pluripotent stem cell models: new approaches to explore early human embryo development. *Current Opinion in Biotechnology*, *66*, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.06.005>
- Rico-Varela, J., Ho, D., & Wan, L. Q. (2018). In Vitro Microscale Models for Embryogenesis. *Advanced Biosystems*, *2(6)*, 1700235. <https://doi.org/10.1002/adbi.201700235>
- Rivera, T., Haggblom, C., Cosconati, S., & Karlseder, J. (2017). A balance between elongation and trimming regulates telomere stability in stem cells. *Nature Structural and Molecular Biology*, *24(1)*, 30–39. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3335>
- Rivron, N. C., Frias-Aldeguer, J., Vrij, E. J., Boisset, J. C., Korving, J., Vivié, J., Truckenmüller, R. K., van Oudenaarden, A., van Blitterswijk, C. A., & Geijsen, N. (2018). Blastocyst-like structures generated solely from stem cells. *Nature*, *557(7703)*, 106–111. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0051-0>
- Rivron, N., & Pera, M. (2018). *Debate ethics of embryo models from stem cells d41586-018-07663-9*. 6–8.

- Rodin, S., Domogatskaya, A., Ström, S., Hansson, E. M., Chien, K. R., Inzunza, J., Hovatta, O., & Tryggvason, K. (2010). Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on human recombinant laminin-511. *Nature Biotechnology*, *28*(6), 611–615. <https://doi.org/10.1038/nbt.1620>
- Rodrigues, A. L., Rodrigues, C. A. V., Gomes, A. R., Vieira, S. F., Badenes, S. M., Diogo, M. M., & Cabral, J. M. S. (2019). Dissolvable Microcarriers Allow Scalable Expansion And Harvesting Of Human Induced Pluripotent Stem Cells Under Xeno-Free Conditions. *Biotechnology Journal*, *14*(4). <https://doi.org/10.1002/biot.201800461>
- Rodríguez-Fuentes, D. E., Fernández-Garza, L. E., Samia-Meza, J. A., Barrera-Barrera, S. A., Caplan, A. I., & Barrera-Saldaña, H. A. (2021). Mesenchymal Stem Cells Current Clinical Applications: A Systematic Review. *Archives of Medical Research*, *52*(1), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.08.006>
- Rohani, L., Johnson, A. A., Arnold, A., & Stolzing, A. (2014). The aging signature: A hallmark of induced pluripotent stem cells? *Aging Cell*, *13*(1), 2–7. <https://doi.org/10.1111/acer.12182>
- Rohani, L., Johnson, A. A., Naghsh, P., Rancourt, D. E., Ulrich, H., & Holland, H. (2018). Concise Review: Molecular Cytogenetics and Quality Control: Clinical Guardians for Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine*, *7*(12), 867–875. <https://doi.org/10.1002/sctm.18-0087>
- Rossi, G., Manfrin, A., & Lutolf, M. P. (2018). Progress and potential in organoid research. *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0051-9>
- Rouhani, F. J., Nik-Zainal, S., Wuster, A., Li, Y., Conte, N., Koike-Yusa, H., Kumasaka, N., Vallier, L., Yusa, K., & Bradley, A. (2016). Mutational History of a Human Cell Lineage from Somatic to Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS Genetics*, *12*(4), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005932>
- Rowe, R. G., & Daley, G. Q. (2019). Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nature Reviews Genetics*, *20*(7), 377–388. <https://doi.org/10.1038/s41576-019-0100-z>
- Ruoslahti, E., Vaheri, A., Kuusela, P., & Linder, E. (1973). Fibroblast surface antigen: A new serum protein. *BBA - Protein Structure*, *322*(2), 352–358. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(73\)90310-3](https://doi.org/10.1016/0005-2795(73)90310-3)
- Sah, H. (1999). Protein behavior at the water/methylene chloride interface. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *88*(12), 1320–1325. <https://doi.org/10.1021/js9900654>
- Saha, K., Winickoff, D. E., & Graff, G. D. (2010). Opening stem cell research and development: A policy proposal for the management of data, intellectual property, and ethics. *AIChE Annual Meeting, Conference Proceedings*, 52–127.
- Sahillioglu, A. C., & Schumacher, T. N. (2021). Safety switches for adoptive cell therapy. *Current Opinion in Immunology, Dli*. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2021.07.002>
- Salo, T., Sutinen, M., Hoque Apu, E., Sundquist, E., Cervigne, N. K., de Oliveira, C. E., Akram, S. U., Ohlmeier, S., Suomi, F., Eklund, L., Juusela, P., Åström, P., Bitu, C. C., Santala, M., Savolainen, K., Korvala, J., Paes Leme, A. F., & Coletta, R. D. (2015). A novel human leiomyoma tissue derived matrix for cell culture studies. *BMC Cancer*, *15*(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1944-z>
- SamsungBioLogics. (2018). *Samsung BioLogics: The story of the world's largest biologics manufacturing facility*. <https://www.biopharma-reporter.com/Headlines/Promotional-Features/Samsung-BioLogics-The-story-of-the-world-s-largest-biologics-manufacturing-facility>
- Sánchez, P., Hernández, R. M., Pedraz, J. L., & Orive, G. (2013). Encapsulation of cells in alginate gels. *Methods in Molecular Biology*, *1051*(6), 313–325. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-550-7_21
- Sancho, M., Di-Gregorio, A., George, N., Pozzi, S., Sánchez, J. M., Pernaute, B., & Rodríguez, T. A. (2013). Competitive interactions eliminate unfit embryonic stem cells at the onset of differentiation. *Developmental Cell*, *26*(1), 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.06.012>
- Sanders, E. J. (1984). Labelling of basement membrane constituents in the living chick embryo during gastrulation. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, *VOL. 79*, 113–123. <https://doi.org/10.1242/dev.79.1.113>
- Sart, S., Bejoy, J., & Li, Y. (2017). Characterization of 3D pluripotent stem cell aggregates and the impact of their properties on bioprocessing. *Process Biochemistry*, *59*, 276–288. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.05.024>
- Sathananthan, A. H., & Nottola, S. A. (2007). Digital imaging of stem cells by electron microscopy. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *407*(5), 21–41. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-536-7_3
- Sato, T., & Clevers, H. (2013). Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: Mechanism and applications. *Science*, *340*(6137), 1190–1194. <https://doi.org/10.1126/science.1234852>

- Sato, T., Vries, R. G., Snippert, H. J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D. E., van Es, J. H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P. J., & Clevers, H. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, *459*(7244), 262–265. <https://doi.org/10.1038/nature07935>
- Saunders, P. (2013). The Chemical Basis of Morphogenesis. *Alan Turing: His Work and Impact, August*, 683–764. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386980-7.50026-5>
- Sawai, T., Minakawa, T., Pugh, J., Akatsuka, K., Yamashita, J. K., & Fujita, M. (2020). The moral status of human embryo-like structures: potentiality matters? *EMBO Reports*, *21*(8), 1–6. <https://doi.org/10.15252/embr.202050984>
- Schindler, M., Siriwardena, D., Kohler, T. N., Ellermann, A. L., Slatery, E., Munger, C., Hollfelder, F., & Boroviak, T. E. (2021). Agarose microgel culture delineates lumenogenesis in naive and primed human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, *16*(5), 1347–1362. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.04.009>
- Schmitt, O. (1984). Biomimetic Designs for the Advancements of Chronobiological Science and Technology. *International Workshop on Chronobiological Technologies, Côme, Ital.*
- Schnitzler, A. C., Verma, A., Kehoe, D. E., Jing, D., Murrell, J. R., Der, K. A., Aysola, M., Rapiejko, P. J., Punreddy, S., & Rook, M. S. (2016). Bioprocessing of human mesenchymal stem/stromal cells for therapeutic use: Current technologies and challenges. *Biochemical Engineering Journal*, *108*, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2015.08.014>
- Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. A hypothesis. *Blood Cells*, *4*(1–2), 7–25.
- Selimoglu, S. M., & Elibol, M. (2010). Alginate as an immobilization material for MAb production via encapsulated hybridoma cells. *Critical Reviews in Biotechnology*, *30*(2), 145–159. <https://doi.org/10.3109/07388550903451652>
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biology*, *14*(8), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Serikawa, K. A., & Mandoli, D. F. (1998). An analysis of morphogenesis of the reproductive whorl of *Acetabularia acetabulum*. *Planta*, *207*(1), 96–104. <https://doi.org/10.1007/s004250050460>
- Serra, M., Correia, C., Malpique, R., Brito, C., Jensen, J., Bjorquist, P., Carrondo, M. J. T., Alves, P. M., Serra, M., Correia, C., Malpique, R., Brito, C., Jensen, J., Bjorquist, P., Carrondo, M. J. T., & Alves, P. M. (2011). Microencapsulation technology: A powerful tool for integrating expansion and cryopreservation of human embryonic stem cells. *PLoS ONE*, *6*(8), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023212>
- Shah, R. K., Kim, J. W., Agresti, J. J., Weitz, D. A., & Chu, L. Y. (2008). Fabrication of monodisperse thermosensitive microgels and gel capsules in microfluidic devices. *Soft Matter*, *4*(12), 2303–2309. <https://doi.org/10.1039/b808653m>
- Shahbazi, M. N. (2020a). *Mechanisms of human embryo development : from cell fate to tissue shape and back*. <https://doi.org/10.1242/dev.190629>
- Shahbazi, M. N. (2020b). Mechanisms of human embryo development: from cell fate to tissue shape and back. *Development (Cambridge)*, *147*. <https://doi.org/10.1242/dev.190629>
- Shahbazi, M. N. (2020c). Mechanisms of human embryo development: From cell fate to tissue shape and back. In *Development (Cambridge)* (Vol. 147, Issue 14). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/dev.190629>
- Shahbazi, M. N., Jedrusik, A., Vuoristo, S., Recher, G., Hupalowska, A., Bolton, V., Fogarty, N. M. E., Campbell, A., Devito, L. G., Ilic, D., Khalaf, Y., Niakan, K. K., Fishel, S., & Zernicka-Goetz, M. (2016a). Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. *Nature Cell Biology*, *18*(6), 700–708. <https://doi.org/10.1038/ncb3347>
- Shahbazi, M. N., Jedrusik, A., Vuoristo, S., Recher, G., Hupalowska, A., Bolton, V., Fogarty, N. M. E., Campbell, A., Devito, L. G., Ilic, D., Khalaf, Y., Niakan, K. K., Fishel, S., & Zernicka-Goetz, M. (2016b). Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. *Nature Cell Biology*, *18*(6), 700–708. <https://doi.org/10.1038/ncb3347>
- Shahbazi, M. N., Scialdone, A., Skorupska, N., Weberling, A., Recher, G., Zhu, M., Jedrusik, A., Devito, L. G., Noli, L., MacAulay, I. C., Buecker, C., Khalaf, Y., Ilic, D., Voet, T., Marioni, J. C., & Zernicka-Goetz, M. (2017). Pluripotent state transitions coordinate morphogenesis in mouse and human embryos. *Nature*, *552*(7684), 239–243. <https://doi.org/10.1038/nature24675>
- Shahbazi, M. N., Siggia, E. D., & Zernicka-Goetz, M. (2019). Self-organization of stem cells into embryos: A window on early mammalian development. *Science*, *364*(6444), 948–951. <https://doi.org/10.1126/science.aax0164>

- Shahbazi, M. N., & Zernicka-Goetz, M. (2018a). Deconstructing and reconstructing the mouse and human early embryo. *Nature Cell Biology*, 20(8), 878–887. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0144-x>
- Shahbazi, M. N., & Zernicka-Goetz, M. (2018b). Deconstructing and reconstructing the mouse and human early embryo. *Nature Cell Biology*, 20(8), 878–887. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0144-x>
- Marta Shahbazi. (2022). What are the benefits of culturing pluripotent stem cells in 3D epiblast conformation ? *In the Stem Cell Jungle*. <https://www.youtube.com/watch?v=vPlmFyf2W9w>
- Shamir, E. R., & Ewald, A. J. (2014). Three-dimensional organotypic culture: Experimental models of mammalian biology and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(10), 647–664. <https://doi.org/10.1038/nrm3873>
- Shao, Y., Sang, J., & Fu, J. (2015). On human pluripotent stem cell control: The rise of 3D bioengineering and mechanobiology. *Biomaterials*, 52(1), 26–43. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.078>
- Shao, Y., Taniguchi, K., Gurdziel, K., Townshend, R. F., Xue, X., Yong, K. M. A., Sang, J., Spence, J. R., Gumucio, D. L., & Fu, J. (2017a). Self-organized amniogenesis by human pluripotent stem cells in a biomimetic implantation-like niche. *Nature Materials*, 16(4), 419–427. <https://doi.org/10.1038/NMAT4829>
- Shao, Y., Taniguchi, K., Gurdziel, K., Townshend, R. F., Xue, X., Yong, K. M. A., Sang, J., Spence, J. R., Gumucio, D. L., & Fu, J. (2017b). Self-organized amniogenesis by human pluripotent stem cells in a biomimetic implantation-like niche. *Nature Materials*, 16(4), 419–427. <https://doi.org/10.1038/NMAT4829>
- Shao, Y., Taniguchi, K., Townshend, R. F., Miki, T., Gumucio, D. L., & Fu, J. (2017). A pluripotent stem cell-based model for post-implantation human amniotic sac development. *Nature Communications*, 8(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00236-w>
- Shapiro. (2000). Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *NEJM*.
- Shapiro, A. M. J., Thompson, D., Donner, T. W., Kroon, E. J., Amour, K. A. D., Foyt, H. L., Shapiro, A. M. J., Thompson, D., Donner, T. W., Bellin, M. D., Hsueh, W., & Pettus, J. (2021). Article Insulin expression and C-peptide in type 1 diabetes subjects implanted with stem cell-derived pancreatic endoderm cells in an encapsulation device Insulin expression and C-peptide in type 1 diabetes subjects implanted with stem cell-derived pancre. *Cell Reports Medicine*, 100466. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2021.100466>
- Sheng, G. (2015). Epiblast morphogenesis before gastrulation. *Developmental Biology*, 401(1), 17–24. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.10.003>
- Sheridan, C. (2021). Off-the-shelf, gene-edited CAR-T cells forge ahead, despite safety scare. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/d41587-021-00027-1>
- Sheridan, S. D., Surampudi, V., & Rao, R. R. (2012). Analysis of embryoid bodies derived from human induced pluripotent stem cells as a means to assess pluripotency. *Stem Cells International*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/738910>
- Shevde, N. K., & Mael, A. A. (2013). Techniques in embryoid body formation from human pluripotent stem cells. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 946, pp. 535–546). https://doi.org/10.1007/978-1-62703-128-8_33
- Shi, Z. D., Tchao, J., Wu, L., & Carman, A. J. (2020). Precision installation of a highly efficient suicide gene safety switch in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Translational Medicine*, 9(11), 1378–1388. <https://doi.org/10.1002/sctm.20-0007>
- Shirai, H., Mandai, M., Matsushita, K., Kuwahara, A., Yonemura, S., Nakano, T., Assawachananont, J., Kimura, T., Saito, K., Terasaki, H., Eirakug, M., Sasai, Y., & Takahashi, M. (2016). Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal tissue in two primate models of retinal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(1), E81–E90. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512590113>
- Simaria, A. S., Hassan, S., Varadaraju, H., Rowley, J., Warren, K., Vanek, P., & Farid, S. S. (2014). Allogeneic cell therapy bioprocess economics and optimization: Single-use cell expansion technologies. *Biotechnology and Bioengineering*, 111(1), 69–83. <https://doi.org/10.1002/bit.25008>
- Simian, M., & Bissell, M. J. (2017). Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *Journal of Cell Biology*, 216(1), 31–40. <https://doi.org/10.1083/jcb.201610056>
- Simon, M. C., & Keith, B. (2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(4), 285–296. <https://doi.org/10.1038/nrm2354>

- Simunovic, M., & Brivanlou, A. H. (2017). Embryoids, organoids and gastruloids: New approaches to understanding embryogenesis. *Development (Cambridge)*, *144*(6), 976–985. <https://doi.org/10.1242/dev.143529>
- Simunovic, M., Metzger, J. J., Etoc, F., Yoney, A., Ruzo, A., Martyn, I., Croft, G., You, D. S., Brivanlou, A. H., & Siggia, E. D. (2019). A 3D model of a human epiblast reveals BMP4-driven symmetry breaking. *Nature Cell Biology*, *21*(7), 900–910. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0349-7>
- Singla, S., Iwamoto-Stohl, L. K., Zhu, M., & Zernicka-Goetz, M. (2020). Autophagy-mediated apoptosis eliminates aneuploid cells in a mouse model of chromosome mosaicism. *Nature Communications*, *11*(1), 2958. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16796-3>
- Sipp, D., Munsie, M., & Sugarman, J. (2018). Emerging stem cell ethics. *Science*, *360*(6395), 1275–1275. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAU4720>
- Siren, E. M. J., Luo, H. D., Tam, F., Montgomery, A., Enns, W., Moon, H., Sim, L., Rey, K., Guan, Q., Wang, J. J., Wardell, C. M., Monajemi, M., Mojibian, M., Levings, M. K., Zhang, Z. J., Du, C., Withers, S. G., Choy, J. C., & Kizhakkedathu, J. N. (2021). Prevention of vascular-allograft rejection by protecting the endothelial glycocalyx with immunosuppressive polymers. *Nature Biomedical Engineering*, *5*(10), 1202–1216. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00777-y>
- Siti-Ismail, N., Bishop, A. E., Polak, J. M., & Mantalaris, A. (2008). The benefit of human embryonic stem cell encapsulation for prolonged feeder-free maintenance. *Biomaterials*, *29*(29), 3946–3952. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.027>
- Sloan, S. A., Andersen, J., Paşca, A. M., Birey, F., & Paşca, S. P. (2018). Generation and assembly of human brain region-specific three-dimensional cultures. *Nature Protocols*, *13*(9), 2062–2085. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0032-7>
- Smith, A. (2017). Formative pluripotency: The executive phase in a developmental continuum. *Development (Cambridge)*, *144*(3), 365–373. <https://doi.org/10.1242/dev.142679>
- Sneddon, J. B., Tang, Q., Stock, P., Bluestone, J. A., Roy, S., Desai, T., & Hebrok, M. (2018). Stem Cell Therapies for Treating Diabetes: Progress and Remaining Challenges. *Cell Stem Cell*, *22*(6), 810–823. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.016>
- Sortwell, C. E., Pitzer, M. R., & Collier, T. J. (2000). Time course of apoptotic cell death within mesencephalic cell suspension grafts: Implications for improving grafted dopamine neuron survival. *Experimental Neurology*, *165*(2), 268–277. <https://doi.org/10.1006/exnr.2000.7476>
- Sozen, B., Amadei, G., Cox, A., Wang, R., Na, E., Czukiewska, S., Chappell, L., Voet, T., Michel, G., Jing, N., Glover, D. M., & Zernicka-Goetz, M. (2018). Self-assembly of embryonic and two extra-embryonic stem cell types into gastrulating embryo-like structures. *Nature Cell Biology*, *20*(8), 979–989. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0147-7>
- Spadoni, I., Fornasa, G., & Rescigno, M. (2017). Organ-specific protection mediated by cooperation between vascular and epithelial barriers. *Nature Reviews Immunology*, *17*(12), 761–773. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.100>
- Stades carnegies*. (n.d.). https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Carnegie_stage_5
- Steeg, R., Mueller, S. C., Mah, N., Holst, B., Cabrera-Socorro, A., Stacey, G. N., de Sousa, P. A., Courtney, A., & Zimmermann, H. (2021). EBISC best practice: How to ensure optimal generation, qualification, and distribution of iPSC lines. *Stem Cell Reports*, *16*(8), 1853–1867. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.07.009>
- Steichen, C., Hannoun, Z., Luce, E., Hauet, T., & Dubart-Kupperschmitt, A. (2019). Genomic integrity of human induced pluripotent stem cells: Reprogramming, differentiation and applications. *World Journal of Stem Cells*, *11*(10), 729–747. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i10.729>
- Steiner, D., Khaner, H., Cohen, M., Even-Ram, S., Gil, Y., Itsykson, P., Turetsky, T., Idelson, M., Aizenman, E., Ram, R., Berman-Zaken, Y., & Reubinoff, B. (2010). Derivation, propagation and controlled differentiation of human embryonic stem cells in suspension. *Nature Biotechnology*, *28*(4), 361–364. <https://doi.org/10.1038/nbt.1616>
- Stern, J. H., Tian, Y., Funderburgh, J., Pellegrini, G., Zhang, K., Goldberg, J. L., Ali, R. R., Young, M., Xie, Y., & Temple, S. (2018). Regenerating Eye Tissues to Preserve and Restore Vision. *Cell Stem Cell*, *22*(6), 834–849. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.013>
- Stevens, K. R., & Murry, C. E. (2018). Human Pluripotent Stem Cell-Derived Engineered Tissues: Clinical Considerations. *Cell Stem Cell*, *22*(3), 294–297. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.01.015>

- Studer, L. (2017). Strategies for bringing stem cell-derived dopamine neurons to the clinic—The NYSTEM trial. In *Progress in Brain Research* (1st ed., Vol. 230). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2017.02.008>
- Su, J., Zhu, D., Huo, Z., Gingold, J. A., Ang, Y. S., Tu, J., Zhou, R., Lin, Y., Luo, H., Yang, H., Zhao, R., Schaniel, C., Moore, K. A., Lemischka, I. R., & Lee, D. F. (2019). Genomic Integrity Safeguards Self-Renewal in Embryonic Stem Cells. *Cell Reports*, 28(6), 1400–1409.e4. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.011>
- Sullivan, S., Stacey, G. N., Akazawa, C., Aoyama, N., Baptista, R., Bedford, P., Bennaceur Griscelli, A., Chandra, A., Elwood, N., Girard, M., Kawamata, S., Hanatani, T., Latsis, T., Lin, S., Ludwig, T. E., Malygina, T., Mack, A., Mountford, J. C., Noggle, S., ... Song, J. (2018). Quality control guidelines for clinical-grade human induced pluripotent stem cell lines. *Regenerative Medicine*, 13(7), 859–866. <https://doi.org/10.2217/rme-2018-0095>
- Sutherland, R. M., McCredie, J. A., & Inch, W. R. (1971). Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 46(1), 113–120. <https://doi.org/10.1093/jnci/46.1.113>
- Sverdlov, E. D., & Mineev, K. (2013). Mutation rate in stem cells: An underestimated barrier on the way to therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 19(5), 273–280. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.01.004>
- Swarm, R. L. (1963). Transplantation of a murine chondrosarcoma in mice of different inbred strains. *Journal of the National Cancer Institute*, 31(4), 953–975. <https://doi.org/10.1093/jnci/31.4.953>
- Swioklo, S., Ding, P., Pacek, A. W., & Connon, C. J. (2017). Process parameters for the high-scale production of alginate-encapsulated stem cells for storage and distribution throughout the cell therapy supply chain. *Process Biochemistry*, 59, 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.06.005>
- Taber, L. A., & Humphrey, J. D. (2001). Stress-modulated growth, residual stress, and vascular heterogeneity. *Journal of Biomechanical Engineering*, 123(6), 528–535. <https://doi.org/10.1115/1.1412451>
- Takahashi, J. (2017). Strategies for bringing stem cell-derived dopamine neurons to the clinic: The Kyoto trial. *Progress in Brain Research*, 230, 213–226. <https://doi.org/10.1016/bs.pbr.2016.11.004>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., Zhang, R. R., Ueno, Y., Zheng, Y. W., Koike, N., Aoyama, S., Adachi, Y., & Taniguchi, H. (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, 499(7459), 481–484. <https://doi.org/10.1038/nature12271>
- Takebe, T., Sekine, K., Kimura, M., Yoshizawa, E., Ayano, S., Koido, M., Funayama, S., Nakanishi, N., Hisai, T., Kobayashi, T., Kasai, T., Kitada, R., Mori, A., Ayabe, H., Ejiri, Y., Amimoto, N., Yamazaki, Y., Ogawa, S., Ishikawa, M., ... Taniguchi, H. (2017). Massive and Reproducible Production of Liver Buds Entirely from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Reports*, 21(10), 2661–2670. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.005>
- Takebe, T., & Wells, J. M. (2019). Organoids by design. *Science*, 364(6444), 956–959. <https://doi.org/10.1126/science.aaw7567>
- Takebe, T., Wells, J. M., Helmrath, M. A., & Zorn, A. M. (2018). Organoid Center Strategies for Accelerating Clinical Translation. *Cell Stem Cell*, 22(6), 806–809. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.05.008>
- Takebe, T., Zhang, R. R., Koike, H., Kimura, M., Yoshizawa, E., Enomura, M., Koike, N., Sekine, K., & Taniguchi, H. (2014). Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature Protocols*, 9(2), 396–409. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.020>
- Tan, W. H., & Takeuchi, S. (2007). Monodisperse alginate hydrogel microbeads for cell encapsulation. *Advanced Materials*, 19(18), 2696–2701. <https://doi.org/10.1002/adma.200700433>
- Tan, X., Letendre, J. H., Collins, J. J., & Wong, W. W. (2021). Synthetic biology in the clinic: engineering vaccines, diagnostics, and therapeutics. *Cell*, 184(4), 881–898. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.017>
- Taniguchi, K., Heemskerk, I., & Gumucio, D. L. (2019a). Opening the black box: Stem cell-based modeling of human post-implantation development. *Journal of Cell Biology*, 218(2), 410–421. <https://doi.org/10.1083/jcb.201810084>

- Taniguchi, K., Heemskerk, I., & Gumucio, D. L. (2019b). Opening the black box: Stem cell-based modeling of human post-implantation development. *Journal of Cell Biology*, 218(2), 410–421. <https://doi.org/10.1083/jcb.201810084>
- Taniguchi, K., Shao, Y., Townshend, R. F., Cortez, C. L., Harris, C. E., Meshinchi, S., Kalantry, S., Fu, J., O’Shea, K. S., & Gumucio, D. L. (2017a). An apicosome initiates self-organizing morphogenesis of human pluripotent stem cells. *Journal of Cell Biology*, 216(12), 3981–3990. <https://doi.org/10.1083/jcb.201704085>
- Taniguchi, K., Shao, Y., Townshend, R. F., Cortez, C. L., Harris, C. E., Meshinchi, S., Kalantry, S., Fu, J., O’Shea, K. S., & Gumucio, D. L. (2017b). An apicosome initiates self-organizing morphogenesis of human pluripotent stem cells. *Journal of Cell Biology*, 216(12), 3981–3990. <https://doi.org/10.1083/jcb.201704085>
- Taniguchi, K., Shao, Y., Townshend, R. F., Tsai, Y. H., Delong, C. J., Lopez, S. A., Gayen, S., Freddo, A. M., Chue, D. J., Thomas, D. J., Spence, J. R., Margolis, B., Kalantry, S., Fu, J., O’Shea, K. S., & Gumucio, D. L. (2015a). Lumen Formation Is an Intrinsic Property of Isolated Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 5(6), 954–962. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.10.015>
- Taniguchi, K., Shao, Y., Townshend, R. F., Tsai, Y. H., Delong, C. J., Lopez, S. A., Gayen, S., Freddo, A. M., Chue, D. J., Thomas, D. J., Spence, J. R., Margolis, B., Kalantry, S., Fu, J., O’Shea, K. S., & Gumucio, D. L. (2015b). Lumen Formation Is an Intrinsic Property of Isolated Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 5(6), 954–962. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.10.015>
- Tanimura, N., & Fujita, Y. (2020). Epithelial defense against cancer (EDAC). *Seminars in Cancer Biology*, 63(February), 44–48. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.05.011>
- Taylor, C. J., Bolton, E. M., Pocock, S., Sharples, L. D., Pedersen, R. A., & Bradley, J. A. (2005). Banking on human embryonic stem cells: Estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching. *Lancet*, 366(9502), 2019–2025. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67813-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67813-0)
- ten Berge, D., Koole, W., Fuerer, C., Fish, M., Eroglu, E., & Nusse, R. (2008). Wnt Signaling Mediates Self-Organization and Axis Formation in Embryoid Bodies. *Cell Stem Cell*, 3(5), 508–518. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.09.013>
- Tesar, P. J., Chenoweth, J. G., Brook, F. A., Davies, T. J., Evans, E. P., Mack, D. L., Gardner, R. L., & McKay, R. D. G. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*, 448(7150), 196–199. <https://doi.org/10.1038/nature05972>
- Thanuthanakhun, N., Kino-oka, M., Borwornpinyo, S., Ito, Y., & Kim, M. H. (2021). The impact of culture dimensionality on behavioral epigenetic memory contributing to pluripotent state of iPS cells. *Journal of Cellular Physiology*, 236(7), 4985–4996. <https://doi.org/10.1002/jcp.30211>
- The Emergence of Order in Developing Systems: The Twenty-Seventh Symposium The Society for Developmental Biology. (1968). *The Emergence of Order in Developing Systems*, ii. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-395711-5.50001-3>
- The virtual human embryo. (2022). *Carnegie Collection*. <https://www.ehd.org/virtual-human-embryo/slide.php?stage=7>
- Thompson, O., von Meyenn, F., Hewitt, Z., Alexander, J., Wood, A., Weightman, R., Gregory, S., Krueger, F., Andrews, S., Barbaric, I., Gokhale, P. J., Moore, H. D., Reik, W., Milo, M., Nik-Zainal, S., Yusa, K., & Andrews, P. W. (2020). Low rates of mutation in clinical grade human pluripotent stem cells under different culture conditions. *Nature Communications*, 11(1), 1528. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15271-3>
- Thomson, J. A. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Tichy, E. D. (2011). Mechanisms maintaining genomic integrity in embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Experimental Biology and Medicine*, 236(9), 987–996. <https://doi.org/10.1258/ebm.2011.011107>
- Tiklová, K., Nolbrant, S., Fiorenzano, A., Björklund, Å. K., Sharma, Y., Heuer, A., Gillberg, L., Hoban, D. B., Cardoso, T., Adler, A. F., Birtele, M., Lundén-Miguel, H., Volakakis, N., Kirkeby, A., Perlmann, T., & Parmar, M. (2020). Single cell transcriptomics identifies stem cell-derived graft composition in a model of Parkinson’s disease. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16225-5>
- Timpl. (1979). *Laminin-A Glycoprotein from Basement Membranes*. 254(19). [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)83607-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)83607-4)
- Tiniakos, D. G., Kandilis, A., & Geller, S. A. (2010). Tityus: A forgotten myth of liver regeneration. *Journal of Hepatology*, 53(2), 357–361. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2010.02.032>

- Tohyama, S., Fujita, J., Fujita, C., Yamaguchi, M., Kanaami, S., Ohno, R., Sakamoto, K., Kodama, M., Kurokawa, J., Kanazawa, H., Seki, T., Kishino, Y., Okada, M., Nakajima, K., Tanosaki, S., Someya, S., Hirano, A., Kawaguchi, S., Kobayashi, E., & Fukuda, K. (2017). Efficient Large-Scale 2D Culture System for Human Induced Pluripotent Stem Cells and Differentiated Cardiomyocytes. *Stem Cell Reports*, *9*(5), 1406–1414. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.08.025>
- Tomotika, S. (1935). On the instability of a cylindrical thread of a viscous liquid surrounded by another viscous fluid. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A - Mathematical and Physical Sciences*, *150*(870), 322–337. <https://doi.org/10.1098/rspa.1935.0104>
- Tonge, P. D., Corso, A. J., Monetti, C., Hussein, S. M. I., Puri, M. C., Michael, I. P., Li, M., Lee, D. S., Mar, J. C., Cloonan, N., Wood, D. L., Gauthier, M. E., Korn, O., Clancy, J. L., Preiss, T., Grimmond, S. M., Shin, J. Y., Seo, J. S., Wells, C. A., ... Nagy, A. (2014). Divergent reprogramming routes lead to alternative stem-cell states. *Nature*, *516*(7530), 192–197. <https://doi.org/10.1038/nature14047>
- Torizal, F. G., Horiguchi, I., & Sakai, Y. (2019). Physiological Microenvironmental Conditions in Different Scalable Culture Systems for Pluripotent Stem Cell Expansion and Differentiation. *The Open Biomedical Engineering Journal*, *13*(1), 41–54. <https://doi.org/10.2174/1874120701913010041>
- Towns, C. R. (2017). The science and ethics of cell-based therapies for Parkinson's disease. *Parkinsonism and Related Disorders*, *34*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2016.10.012>
- Trushko, A., di Meglio, I., Merzouki, A., Blanch-Mercader, C., Abuhattum, S., Guck, J., Alessandri, K., Nasso, P., Kruse, K., Chopard, B., & Roux, A. (2020). Buckling of an Epithelium Growing under Spherical Confinement. *Developmental Cell*, *54*(5), 655–668.e6. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2020.07.019>
- Tsankov, A. M., Akopian, V., Pop, R., Chetty, S., Gifford, C. A., Daheron, L., Tsankova, N. M., & Meissner, A. (2015). A qPCR ScoreCard quantifies the differentiation potential of human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, *33*(11), 1182–1192. <https://doi.org/10.1038/nbt.3387>
- Turinetto, V., Orlando, L., & Giachino, C. (2017). Induced pluripotent stem cells: Advances in the quest for genetic stability during reprogramming process. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(9). <https://doi.org/10.3390/ijms18091952>
- Turner, M., Leslie, S., Martin, N. G., Peschanski, M., Rao, M., Taylor, C. J., Trounson, A., Turner, D., Yamanaka, S., & Wilmot, I. (2013). Toward the development of a global induced pluripotent stem cell library. *Cell Stem Cell*, *13*(4), 382–384. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.08.003>
- Tyser, R. C. v, Mahammadov, E., Nakanoh, S., Vallier, L., Scialdone, A., & Srinivas, S. (2020). A spatially resolved single cell atlas of human gastrulation. *BioRxiv*, 2020.07.21.213512. <https://doi.org/10.1101/2020.07.21.213512>
- Upadhaya, S., Yu, J. X., Shah, M., Correa, D., Partridge, T., & Campbell, J. (2021). The clinical pipeline for cancer cell therapies. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *20*(7), 503–504. <https://doi.org/10.1038/d41573-021-00100-z>
- Vallier, L., Alexander, M., & Pedersen, R. A. (2005). Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *Journal of Cell Science*, *118*(19), 4495–4509. <https://doi.org/10.1242/jcs.02553>
- Valton, J., Guyot, V., Boldajipour, B., Sommer, C., Pertel, T., Juillerat, A., Duclert, A., Sasu, B. J., Duchateau, P., & Poirot, L. (2018). A Versatile Safeguard for Chimeric Antigen Receptor T-Cell Immunotherapies. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27264-w>
- van den Brink, S. C., Alemany, A., van Batenburg, V., Moris, N., Blotenburg, M., Vivié, J., Baillie-Johnson, P., Nichols, J., Sonnen, K. F., Martinez Arias, A., & van Oudenaarden, A. (2020). Single-cell and spatial transcriptomics reveal somitogenesis in gastruloids. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2024-3>
- van Duinen, V., Trietsch, S. J., Joore, J., Vulto, P., & Hankemeier, T. (2015). Microfluidic 3D cell culture: From tools to tissue models. *Current Opinion in Biotechnology*, *35*, 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.05.002>
- van Winkle, A. P., Gates, I. D., & Kallos, M. S. (2012). Mass transfer limitations in embryoid bodies during human embryonic stem cell differentiation. *Cells Tissues Organs*, *196*(1), 34–47. <https://doi.org/10.1159/000330691>
- Varela, C., Denis, J. A., Polentes, J., Feyeux, M., Aubert, S., Champon, B., Piétu, G., Peschanski, M., & Lefort, N. (2012). Recurrent genomic instability of chromosome 1q in neural derivatives of human embryonic stem cells. *Journal of Clinical Investigation*, *122*(2), 569–574. <https://doi.org/10.1172/JCI46268>

- Vegas, A. J., Veiseh, O., Gürtler, M., Millman, J. R., Pagliuca, F. W., Bader, A. R., Doloff, J. C., Li, J., Chen, M., Olejnik, K., Tam, H. H., Jhunjhunwala, S., Langan, E., Aresta-Dasilva, S., Gandham, S., McGarrigle, J. J., Bochenek, M. A., Hollister-Lock, J., Oberholzer, J., ... Anderson, D. G. (2016). Long-term glycemic control using polymer-encapsulated human stem cell-derived beta cells in immune-competent mice. *Nature Medicine*, 22(3), 306–311. <https://doi.org/10.1038/nm.4030>
- Velasco, V., Shariati, S. A., & Esfandyarpour, R. (2020). Microtechnology-based methods for organoid models. *Microsystems and Nanoengineering*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/s41378-020-00185-3>
- Velten, L., Haas, S. F., Raffel, S., Blaszkiewicz, S., Islam, S., Hennig, B. P., Hirche, C., Lutz, C., Buss, E. C., Nowak, D., Boch, T., Hofmann, W. K., Ho, A. D., Huber, W., Trumpp, A., Essers, M. A. G., & Steinmetz, L. M. (2017). Human haematopoietic stem cell lineage commitment is a continuous process. *Nature Cell Biology*, 19(4), 271–281. <https://doi.org/10.1038/ncb3493>
- Verfaillie, C., Terryn, J., Tricot, T., & Gajjar, M. (2018). Recent advances in lineage differentiation from stem cells: Hurdles and opportunities? *F1000Research*, 7, 1–12. <https://doi.org/10.12688/f1000research.12596.1>
- Vertex. (n.d.). stem cell derived allogeneic islet clinical trial for diabetes. 2021. <https://investors.vrtx.com/news-releases/news-release-details/vertex-announces-positive-day-90-data-first-patient-phase-12>
- Vianello, S., & Lutolf, M. P. (2019). Understanding the Mechanobiology of Early Mammalian Development through Bioengineered Models. *Developmental Cell*, 48(6), 751–763. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.02.024>
- Vincent, J. F. V. (2009). Biomimetics - A review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, 223(8), 919–939. <https://doi.org/10.1243/09544119JEM561>
- Vining, K. H., & Mooney, D. J. (2017). Mechanical forces direct stem cell behaviour in development and regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(12), 728–742. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.108>
- Vishwakarma, M., & Piddini, E. (2020). Outcompeting cancer. *Nature Reviews Cancer*, 20(3), 187–198. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0231-8>
- von Zglinicki, T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(7), 339–344. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02110-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02110-2)
- Vrij, E. J., Scholte, Y. S., Aldeguer, J. F., Guerreiro, I. M., Rivron, N. C., Vrij, E. J., Reimer, Y. S. S. op, Aldeguer, J. F., Guerreiro, I. M., Kind, J., Koo, B.-K., Blitterswijk, C. A. van, Rivron, N. C., Scholte, Y. S., Aldeguer, J. F., Guerreiro, I. M., Rivron, N. C., & Vrij, E. J. (2019). Chemically-defined induction of a primitive endoderm and epiblast-like niche supports post-implantation progression from blastoids. *BioRxiv*, 510396. <https://doi.org/10.1101/510396>
- Wahlberg, B., Ghuman, H., Liu, J. R., & Modo, M. (2018). Ex vivo biomechanical characterization of syringe-needle ejections for intracerebral cell delivery. *Scientific Reports*, 8(1), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27568-x>
- Wakao, S., Kitada, M., Kuroda, Y., Ogura, F., Murakami, T., Niwa, A., & Dezawa, M. (2012). Morphologic and Gene Expression Criteria for Identifying Human Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048677>
- Wakui, T. (2017). Method for evaluation of human induced pluripotent stem cell quality using image analysis based on the biological morphology of cells. *Journal of Medical Imaging*, 4(04), 1. <https://doi.org/10.1117/1.jmi.4.4.044003>
- Wamaitha, S. E., & Niakan, K. K. (2018). Human Pre-gastrulation Development. In *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 128). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.11.004>
- Wang, K., Guzman, A. K., Yan, Z., Zhang, S., Hu, M. Y., Hamaneh, M. B., Yu, Y. K., Tolu, S., Zhang, J., Kanavy, H. E., Ye, K., Bartholdy, B., & Bouhassira, E. E. (2019). Ultra-High-Frequency Reprogramming of Individual Long-Term Hematopoietic Stem Cells Yields Low Somatic Variant Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Reports*, 26(10), 2580–2592.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.021>
- Wang, X., Wang, W., Ma, J., Guo, X., Yu, X., & Ma, X. (2006). Proliferation and differentiation of mouse embryonic stem cells in APA microcapsule: A model for studying the interaction between stem cells and their niche. *Biotechnology Progress*, 22(3), 791–800. <https://doi.org/10.1021/bp050386n>
- Wang, X., Xiang, Y., Yu, Y., Wang, R., Zhang, Y., Xu, Q., Sun, H., Zhao, Z. A., Jiang, X., Wang, X., Lu, X., Qin, D., Quan, Y., Zhang, J., Shyh-Chang, N., Wang, H., Jing, N., Xie, W., & Li, L. (2021). Formative pluripotent stem cells show features of epiblast cells poised for gastrulation. *Cell Research*, 31(5), 526–541. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00477-x>

- Warmflash, A., Sorre, B., Etoc, F., Siggia, E. D., & Brivanlou, A. H. (2014). A method to recapitulate early embryonic spatial patterning in human embryonic stem cells. *Nature Methods*, *11*(8), 847–854. <https://doi.org/10.1038/nMeth.3016>
- Warnock, M. (1985). The warnock report. *British Medical Journal*, *291*(6489), 187–190. <https://doi.org/10.1136/bmj.289.6450.1006>
- Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J. B., Nishikawa, S., Nishikawa, S. I., Muguruma, K., & Sasai, Y. (2007). A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, *25*(6), 681–686. <https://doi.org/10.1038/nbt1310>
- Watts, J., Lokken, A., Moauro, A., & Ralston, A. (2018). Capturing and Interconverting Embryonic Cell Fates in a Dish. In *Current Topics in Developmental Biology* (1st ed., Vol. 128). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.11.008>
- Weber, E. W., Maus, M. v., & Mackall, C. L. (2020). The Emerging Landscape of Immune Cell Therapies. *Cell*, *181*(1), 46–62. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.001>
- Wechsler, M. E., Shevchuk, M., & Peppas, N. A. (2020). Developing a Multidisciplinary Approach for Engineering Stem Cell Organoids. *Annals of Biomedical Engineering*, *48*(7), 1895–1904. <https://doi.org/10.1007/s10439-019-02391-1>
- Weissbein, U., Benvenisty, N., & Ben-David, U. (2014). Genome maintenance in pluripotent stem cells. *Journal of Cell Biology*, *204*(2), 153–163. <https://doi.org/10.1083/jcb.201310135>
- Werbowski-Ogilvie, T. E., Bossé, M., Stewart, M., Schnerch, A., Ramos-Mejia, V., Rouleau, A., Wynder, T., Smith, M. J., Dingwall, S., Carter, T., Williams, C., Harris, C., Dolling, J., Wynder, C., Boreham, D., & Bhatia, M. (2009). Characterization of human embryonic stem cells with features of neoplastic progression. *Nature Biotechnology*, *27*(1), 91–97. <https://doi.org/10.1038/nbt.1516>
- Wesselschmidt, R. L. (2011). The teratoma assay: An in vivo assessment of pluripotency. *Methods in Molecular Biology*, *767*, 231–241. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-201-4_17
- Whelehan, M., & Marison, I. W. (2011). Microencapsulation using vibrating technology. *Journal of Microencapsulation*, *28*(8), 669–688. <https://doi.org/10.3109/02652048.2011.586068>
- White, J., & Dalton, S. (2005). Cell cycle control of embryonic stem cells. *Stem Cell Reviews*, *1*(2), 131–138. <https://doi.org/10.1385/SCR:1:2:131>
- Wikipédia. (n.d.). Biomimétisme. 2021. <https://fr.wikipedia.org/wiki/Biomimétisme>
- Wilmot, I., Leslie, S., Martin, N. G., Peschanski, M., Rao, M., Trounson, A., Turner, D., Turner, M. L., Yamanaka, S., & Taylor, C. J. (2015). Development of a global network of induced pluripotent stem cell haplobanks. *Regenerative Medicine*, *10*(3), 235–238. <https://doi.org/10.2217/rme.15.1>
- Wong, S. P., Rowley, J. E., Redpath, A. N., Tilman, J. D., Fellous, T. G., & Johnson, J. R. (2015). Pericytes, mesenchymal stem cells and their contributions to tissue repair. *Pharmacology and Therapeutics*, *151*, 107–120. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.03.006>
- Wu, J., Fan, Y., & Tzanakakis, E. S. (2015). Increased Culture Density Is Linked to Decelerated Proliferation, Prolonged G1 Phase, and Enhanced Propensity for Differentiation of Self-Renewing Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells and Development*, *24*(7), 892–903. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0384>
- Wu, J., Okamura, D., Li, M., Suzuki, K., Luo, C., Ma, L., He, Y., Li, Z., Benner, C., Tamura, I., Krause, M. N., Nery, J. R., Du, T., Zhang, Z., Hishida, T., Takahashi, Y., Aizawa, E., Kim, N. Y., Lajara, J., ... Belmonte, J. C. I. (2015). An alternative pluripotent state confers interspecies chimaeric competency. *Nature*, *521*(7552), 316–321. <https://doi.org/10.1038/nature14413>
- Wu, P. H., Aroush, D. R. ben, Asnacios, A., Chen, W. C., Dokukin, M. E., Doss, B. L., Durand-Smet, P., Ekpenyong, A., Guck, J., Guz, N. v., Janmey, P. A., Lee, J. S. H., Moore, N. M., Ott, A., Poh, Y. C., Ros, R., Sander, M., Sokolov, I., Staunton, J. R., ... Wirtz, D. (2018). A comparison of methods to assess cell mechanical properties. *Nature Methods*, *15*(7), 491–498. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0015-1>
- WuXi. (2021). *First GMP Production at 24,000L Line of MFG5 Facility Successfully Completed at WuXi Biologics*. <https://www.prnewswire.com/news-releases/first-gmp-production-at-24-000l-line-of-mfg5-facility-successfully-completed-at-wuxi-biologics-301430423.html>

- Xiang, L., Yin, Y., Zheng, Y., Ma, Y., Li, Y., Zhao, Z., Guo, J., Ai, Z., Niu, Y., Duan, K., He, J., Ren, S., Wu, D., Bai, Y., Shang, Z., Dai, X., Ji, W., & Li, T. (2020). A developmental landscape of 3D-cultured human pre-gastrulation embryos. *Nature*, *577*(7791), 537–542. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1875-y>
- Xinaris, C. (2019). Organoids for replacement therapy: Expectations, limitations and reality. *Current Opinion in Organ Transplantation*, *24*(5), 555–561. <https://doi.org/10.1097/MOT.0000000000000680>
- Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J. D., & Carpenter, M. K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, *19*(10), 971–974. <https://doi.org/10.1038/nbt1001-971>
- Xu, F., Fu, C., & Yang, Y. (2020). Water Affects Morphogenesis of Growing Aquatic Plant Leaves. *Physical Review Letters*, *124*(3). <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.124.038003>
- Xu, H., Jiao, Y., Qin, S., Zhao, W., Chu, Q., & Wu, K. (2018). Organoid technology in disease modelling, drug development, personalized treatment and regeneration medicine. *Experimental Hematology and Oncology*, *7*(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s40164-018-0122-9>
- Xu, J., Shamul, J. G., Staten, N. A., White, A. M., Jiang, B., & He, X. (2021). *Bioinspired 3D Culture in Nanoliter Hyaluronic Acid- Rich Core-Shell Hydrogel Microcapsules Isolates Highly Pluripotent Human iPSCs*. 2102219, 1–12. <https://doi.org/10.1002/sml.202102219>
- Yamanaka, S. (2020). Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges. *Cell Stem Cell*, *27*(4), 523–531. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.014>
- Yang, K., O’Cearbhaill, E. D., Liu, S. S., Zhou, A., Chitnis, G. D., Hamilos, A. E., Xu, J., Verma, M. K. S., Giraldo, J. A., Kudo, Y., Lee, E. A., Lee, Y., Pop, R., Langer, R., Melton, D. A., Greiner, D. L., & Karp, J. M. (2021). A therapeutic convection-enhanced macroencapsulation device for enhancing β cell viability and insulin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(37), 1DUMMUY. <https://doi.org/10.1073/pnas.2101258118>
- Yiangou, L., Grandy, R. A., Morell, C. M., Tomaz, R. A., Osnato, A., Kadiwala, J., Muraro, D., Garcia-Bernardo, J., Nakanoh, S., Bernard, W. G., Ortmann, D., McCarthy, D. J., Simonic, I., Sinha, S., & Vallier, L. (2019). Method to Synchronize Cell Cycle of Human Pluripotent Stem Cells without Affecting Their Fundamental Characteristics. *Stem Cell Reports*, *12*(1), 165–179. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.11.020>
- Yilmaz, A., & Benvenisty, N. (2019). Defining Human Pluripotency. *Cell Stem Cell*, *25*(1), 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.06.010>
- Yoshino, T., Suzuki, T., Nagamatsu, G., Yabukami, H., Ikegaya, M., Kishima, M., Kita, H., Imamura, T., Nakashima, K., Nishinakamura, R., Tachibana, M., Inoue, M., Shima, Y., Morohashi, K. I., & Hayashi, K. (2021). Generation of ovarian follicles from mouse pluripotent stem cells. *Science*, *373*(6552). <https://doi.org/10.1126/science.abe0237>
- Yu, J. X., Upadhaya, S., Tataka, R., Barkalow, F., & Hubbard-Lucey, V. M. (2020). Cancer cell therapies: the clinical trial landscape. *Nature Reviews. Drug Discovery*, *19*(9), 583–584. <https://doi.org/10.1038/d41573-020-00099-9>
- Yu, L., Wei, Y., Duan, J., Schmitz, D. A., Sakurai, M., Wang, L., Wang, K., Zhao, S., Hon, G. C., & Wu, J. (2021). Blastocyst-like structures generated from human pluripotent stem cells. In *Nature* (Issue May 2020). Springer US. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03356-y>
- Yu, L., Wei, Y., Sun, H. X., Mahdi, A. K., Pinzon Arteaga, C. A., Sakurai, M., Schmitz, D. A., Zheng, C., Ballard, E. D., Li, J., Tanaka, N., Kohara, A., Okamura, D., Mutto, A. A., Gu, Y., Ross, P. J., & Wu, J. (2021). Derivation of Intermediate Pluripotent Stem Cells Amenable to Primordial Germ Cell Specification. *Cell Stem Cell*, *28*(3), 550-567.e12. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.11.003>
- Yui, S., Nakamura, T., Sato, T., Nemoto, Y., Mizutani, T., Zheng, X., Ichinose, S., Nagaishi, T., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Clevers, H., & Watanabe, M. (2012). Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5 + stem cell. *Nature Medicine*, *18*(4), 618–623. <https://doi.org/10.1038/nm.2695>
- Zeevaert, K., Elsafi Mabrouk, M. H., Wagner, W., & Goetzke, R. (2020). Cell Mechanics in Embryoid Bodies. *Cells*, *9*(10), 1–20. <https://doi.org/10.3390/cells9102270>
- Zeng, X. (2004). Dopaminergic Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, *22*(6), 925–940. <https://doi.org/10.1634/stemcells.22-6-925>

- Zhai, J., Xiao, Z., Wang, Y., & Wang, H. (2021). Human embryonic development: from peri-implantation to gastrulation. *Trends in Cell Biology*, xx(xx), 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.07.008>
- Zhang, G., Xie, Y., Zhou, Y., Xiang, C., Chen, L., Zhang, C., Hou, X., Chen, J., Zong, H., & Liu, G. (2017). P53 pathway is involved in cell competition during mouse embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(3), 498–503. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617414114>
- Zhang, H., Tumarkin, E., Peerani, R., Nie, Z., Sullan, R. M. A., Walker, G. C., & Kumacheva, E. (2006). Microfluidic production of biopolymer microcapsules with controlled morphology. *Journal of the American Chemical Society*, 128(37), 12205–12210. <https://doi.org/10.1021/ja0635682>
- Zhang, W., Zhao, S., Rao, W., Snyder, J., Choi, J. K., Wang, J., Khan, I. A., Saleh, N. B., Mohler, P. J., Yu, J., Hund, T. J., Tang, C., & He, X. (2013). A novel core-shell microcapsule for encapsulation and 3D culture of embryonic stem cells. *Journal of Materials Chemistry B*, 1(7), 1002–1009. <https://doi.org/10.1039/c2tb00058j>
- Zhang, Z., Zwick, S., Loew, E., Grimley, J. S., & Ramanathan, S. (2019). Mouse embryo geometry drives formation of robust signaling gradients through receptor localization. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12533-7>
- Zhao, S., Agarwal, P., Rao, W., Huang, H., Zhang, R., Liu, Z., Yu, J., Weisleder, N., Zhang, W., & He, X. (2014). Coaxial electrospray of liquid core-hydrogel shell microcapsules for encapsulation and miniaturized 3D culture of pluripotent stem cells. *Integrative Biology (United Kingdom)*, 6(9), 874–884. <https://doi.org/10.1039/c4ib00100a>
- Zheng, Y., Xue, X., Shao, Y., Wang, S., Esfahani, S. N., Li, Z., Muncie, J. M., Lakins, J. N., Weaver, V. M., Gumucio, D. L., & Fu, J. (2019). Controlled modelling of human epiblast and amnion development using stem cells. *Nature*, 573(7774), 421–425. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1535-2>
- Zhu, K., Yu, Y., Cheng, Y., Tian, C., Zhao, G., & Zhao, Y. (2019). All-Aqueous-Phase Microfluidics for Cell Encapsulation. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 11(5), 4826–4832. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b19234>
- Zhu, Y., Wang, H., Yin, F., Guo, Y., Li, F., Gao, D., & Qin, J. (2020). Amnion-on-a-chip: modeling human amniotic development in mid-gestation from pluripotent stem cells. *Lab on a Chip*, 20, 3258–3268. <https://doi.org/10.1039/d0lc00268b>
- Zimmerlin, L., Park, T. S., & Zambidis, E. T. (2017). Capturing Human Naïve Pluripotency in the Embryo and in the Dish. *Stem Cells and Development*, 26(16), 1141–1161. <https://doi.org/10.1089/scd.2017.0055>

