



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE (UL)
École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (**ENSAIA**)
École doctorale Ressources Procédés Produits Environnement (**RP2E**)
Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (**LRGP**)

THÈSE

Présentée à l'Université de Lorraine par

Caroline FERRARI

Ingénieur de l'École Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg (ESBS)

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

ÉTUDES CINÉTIQUES DE PROCÉDÉS D'EXPANSION DE CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES CULTIVÉES SUR MICROPORTEURS EN SYSTÈMES AGITÉS

Soutenue publiquement le 9 novembre 2012 devant la commission d'examen

Membres du jury

Rapporteurs	Cécile LEGALLAIS	Directeur de Recherche CNRS, UTC de Compiègne
	Hervé PETITE	Directeur de Recherche INSERM, Université Paris Diderot
Examineurs	Emmanuel GUEDON	Chargé de Recherche CNRS, LRGP, UL, Nancy
	Dominique LAURENT-MAQUIN	Professeur, Université de Reims
	Annie MARC	Directrice de Recherche CNRS, LRGP, UL, Nancy
	Éric OLMOS	Maître de Conférence, LRGP, UL, Nancy
Invités	Isabelle CHEVALOT	Professeur, LRGP, UL, Nancy
	Xiong WANG	Professeur, PPIA, UL, Nancy

Remerciements

Les travaux de cette thèse ont été réalisés au Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP) de l'Université de Lorraine, au sein du groupe Bioprocédés-Biomolécules (BioProMo), je tiens ainsi à remercier Gabriel Wild de m'y avoir accueillie. Je souhaite également exprimer ma reconnaissance à Mme Annie Marc, M. Emmanuel Guedon, M. Eric Olmos et Mme Isabelle Chevalot pour leur encadrement et leurs conseils scientifiques, mais aussi pour la confiance qu'ils m'ont accordé tout au long de cette thèse. Je remercie en parallèle les personnes du projet TELiTeR pour nos nombreux échanges : M. Rachid Rahouadj, M. Xiong Wang, M. Tran Nguyen, et M. Jean-Luc Six.

J'adresse mes sincères remerciements à Mme Cécile Legallais et M. Hervé Petite de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ces travaux de thèse. Je remercie également Mme. Dominique Laurent-Maquin d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Mon séjour au laboratoire LRGP a été très agréable, je remercie donc tous mes collègues, en particulier Fabrice Blanchard, Amal El-Wajgali, Arnaud Aymes, Frédérique Balandras, Mickael Cregut, Abdoul-Karim Kabore, Laial Haj Husein, Pierrick Leblanc, Budour Ajib, Nadia Oueslati, Noura Halima, Laetitia Canabady-Rochelle et Anthony Dufour.

Je tiens enfin à remercier les personnes qui m'ont entourée durant ses quatre années à Nancy : Salima Bouti, Pien Ngo, Youssef Tazouti, Enzo Amorozo, Amir Moradi, Nabila Belhaj, Nidal Madad et Ladislav Gbetoho, avec qui j'ai partagé des moments mémorables; Ali Kooshanfar, qui m'a encouragée et coachée sans relâche; Béatrice Tanésy, une amie/voisine/humaniste hors pair; Claudia Nioi, qui m'a toujours soutenue et motivée, même en pleine tempête de neige; Kenza Boulaya-Brimouche, qui a rassuré mes doutes et servi de modèle tout au long de la thèse; et enfin Astrid Robert, soutien infailible depuis la 6^e Edelweiss.

Je remercie également ma famille, Martin Ferrari, Thérèse Dubron, Denise et Jean-Claude Rivet, et Pascal et Framboise Ferrari pour leur présence même à distance. Et en bouquet final, je remercie mes parents, Françoise et Henri Ferrari, qui m'ont toujours donné le meilleur.

SOMMAIRE

Nomenclature.....	7
Introduction générale.....	9
Chapitre 1. Étude bibliographique.....	13
Introduction de l'étude bibliographique.....	15
1.1. Intérêts thérapeutiques des cellules souches mésenchymateuses	18
1.2. Influence des paramètres environnementaux sur la réponse des CSM.....	26
1.3. Procédés d'expansion des CSM	45
Objectifs de thèse.....	69
Chapitre 2. Matériel et méthodes	71
2.1. Prélèvement et banque cellulaire	73
2.2. Milieux de culture	74
2.3. Culture des CSM en mode statique.....	75
2.4. Culture de CSM en mode agité	76
2.5. Analyse morphologique des CSM	79
2.6. Analyse quantitative des cellules.....	79
2.7. Analyse des propriétés de différenciation des CSM	84
2.8. Étude du métabolisme cellulaire	85
2.9. Calculs des paramètres cinétiques et des contraintes de cisaillement.....	86
Chapitre 3. Influence des paramètres de culture sur la réponse des CSM porcines	91
3.1. Étude préliminaire des paramètres d'ensemencement.....	94
3.2. Influence des composés du milieu de culture	104
Conclusion du chapitre 3.....	119
Chapitre 4. Influence du mode d'expansion sur la réponse des CSM porcines et évaluation des méthodes de comptage.....	121
4.1. Influence des modes d'expansion en conditions agitées sur la réponse des CSM porcines	124
4.2. Étude des méthodes de comptage des CSM cultivées sur Cytodex 1	133
Conclusion du Chapitre 4	137
Chapitre 5. Influence des conditions opératoires sur la réponse des CSM porcines cultivées sur microporteurs.....	139
5.1. Influence de la fréquence d'agitation et de l'ajout de microporteurs sur la croissance, l'agrégation et la multipotence des CSM porcines	142
5.2. Influence de l'agitation sur la mort et le métabolisme des CSM porcines.....	153
Conclusion du chapitre 5.....	160
Conclusion générale	163
Perspectives.....	171
Références Bibliographiques	177

Nomenclature

ADN : Acide désoxyribonucléique
αMEM: Alpha minimal essential medium
Amm : Ions ammonium
AMP : Adénosine mono-phosphate
ANR : Agence nationale de la recherche
ARNm : Acide ribonucléique messenger
ATP : Adénosine triphosphate
BHK : Baby hamster kidney cell
BMP-2 : Bone morphogenetic protein 2
CFU-F : Colony forming unit-fibroblast
CHO : Chinese hamster ovary cell
CREB : Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein
CSE : Cellule souche embryonnaire
CSH : Cellule souche hématopoïétique
CSM : Cellule souche mésenchymateuse
CMP : Cellule mésenchymateuse progénitrice
CXCR-4 : Chemokine receptor type 4
DEAE : Diéthylaminoéthyle
DMEM : Dulbecco's modified eagle medium
DP : Doublement de population
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
EGF : Epidermal growth factor
ERK-1/2 : Extracellular signal-regulated kinase-1 and -2
FDA : Food and drug administration
FGF2 : Fibroblastic growth factor 2
GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate Déshydrogénase
GLP-1 : Glucagon-like Peptide 1
Gluc : Glucose
Glut : Glutamine
GMP : Good manufacturing practice
GTPase : Guanosine tri-phosphatase
HEK : Human embryonic kidney cell
HIF : Hypoxia inducible factor
HGF : Hepatocyte growth factor
IMDM : Iscove's modified dulbecco's medium
JNK : c-Jun N-terminal kinase
Lac : Lactate
LCA : Ligament croisé antérieur
LCPM : Laboratoire de chimie physique macromoléculaire
LDH : Lactate déshydrogénase
LEMTA : Laboratoire d'énergétique mécanique théorique et appliquée
LIF : Leukemia inhibitory factor
LRGP : Laboratoire réactions et génie des procédés
MAPC : Multipotent adult progenitor cells
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MDCK : Madin darby canine kidney cell
MTT : Diméthyle-thiozol-2-yl-2,5-diphényl-tétrazolium bromide
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide
NFκB : Nuclear factor kappa B
PAM : Pharmacologically active microcarrier

PAT : Process analytical technology
pO₂ : Pression partielle d'oxygène
PBS : Phosphate buffer saline
PDGF : Platelet derived growth factor
PM1 et 2 : Photomultiplicateur 1 et 2
PPAR γ : Peroxisome proliferator activated receptor gamma
ROS : Reactive oxygen species
RTK : Récepteurs à tyrosines kinases
SOD : Superoxyde dismutase
SVF : Sérum de veau fœtal
TELiTeR : Tissue engineering for ligament and tendon regeneration
TGF- β : Transforming growth factor beta
TNF- α : Tumor necrosis factor alpha

Introduction générale

La médecine régénératrice a pour but d'aider un organisme vivant à restaurer ou à établir une de ses fonctions normales, en remplaçant ou en régénérant des cellules, des tissus ou des organes (Mason et Dunnill, 2008). Cette voie de traitement de maladies est très prometteuse et connaît actuellement un essor particulier. Parmi les techniques utilisées, celles mettant en œuvre des cellules souches focalisent tout particulièrement l'attention des chercheurs, des médecins, mais aussi de la société dans son ensemble. Ainsi, cellules souches et "bioéthique" sont des termes que l'on retrouve souvent associés pour des raisons scientifiques, philosophiques et religieuses. Par ailleurs, des évolutions cancéreuses post-implantation des cellules souches restent fortement soupçonnées, entraînant un principe de précaution a priori justifié. L'ensemble de ces éléments fait que l'utilisation de cellules souches et, en particulier, des cellules souches embryonnaires, est strictement règlementée, même si les législations en vigueur demeurent spécifiques à chaque pays. Ainsi, tandis que des pays tendent à promouvoir leur étude (Etats-Unis, Chine, Canada, etc), d'autres restent prudents (France, Italie, etc). Au sein même de l'Union Européenne, aucun consensus ne se dégage pour l'instant pour la rédaction d'une législation européenne commune.

Actuellement, deux stratégies de médecine régénératrice mettant en œuvre des cellules souches se développent :

- **La thérapie cellulaire.** Les cellules utilisées pour les thérapies cellulaires sont prélevées sur le patient ou sur un donneur. Ces cellules peuvent ensuite être amplifiées ou modifiées génétiquement avant d'être transplantées. La thérapie cellulaire est utilisée, par exemple, contre les maladies neuro-dégénératives, par injection de cellules souches dans des endroits spécifiques du cerveau (Joyce et al., 2010).

- **L'ingénierie tissulaire.** L'ingénierie tissulaire est une implantation de substituts biologiques construits *in vitro*. Les cellules souches les plus utilisées sont les cellules souches mésenchymateuses (CSM) issues de tissus adultes. Son but est de reconstituer des systèmes pluricellulaires complexes *ex vivo*. Pour cela, des cellules du patient ou de donneurs sont prélevées etensemencées sur des supports d'adhérence. Ceux-ci peuvent ensuite être placés au sein de bioréacteurs pour contrôler l'environnement mécanique, biochimique et physico-chimique nécessaire à la différenciation des cellules. L'ingénierie tissulaire a initialement été développée pour contrer les problèmes liés aux prothèses, tels que la dégradation,

l'inflammation ou la coagulation sanguine. Les tissus reconstitués *ex vivo* sont, par exemple, la peau, les os ou les vaisseaux sanguins (Grayson et al., 2009).

Ce travail de thèse s'inscrit dans un projet de recherche pluridisciplinaire ayant pour visée une application des CSM en ingénierie tissulaire et, en particulier dans la reconstruction de tissus ligamentaires. Le ligament le plus fréquemment rompu est le ligament croisé antérieur (LCA) qui assure la stabilité du genou. Parmi les techniques actuelles de chirurgie réparatrice du LCA, on notera la greffe autologue, principalement du tendon rotulien ou semi-tendineux, mais une morbidité de site est fréquemment observée. On pourra également utiliser des xélogreffes, des allogreffes et des prothèses de ligament, mais celles-ci peuvent présenter l'inconvénient de provoquer la dégradation de l'implant, un rejet immunitaire ou des inflammations. Ainsi, pour pallier les effets secondaires de la réparation du ligament, une approche par ingénierie tissulaire semble tout à fait pertinente.

La mise en œuvre de ce travail de thèse a été réalisée au cours du projet **TELiTeR** (Tissue Engineering for Ligament and Tendon Regeneration), ou « Ingénierie tissulaire pour la régénération de ligaments et de tendons », financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) entre 2007 et 2011. Ce projet s'est ainsi focalisé sur la régénération de ligament, et plus précisément sur la fabrication d'un implant généré à partir de CSM porcines différenciées dans un bioréacteur, destiné à reconstruire un ligament *in vivo* (Figure 1). Le fait d'utiliser des cellules de porc permet, par la suite, de tester l'implant ligamentaire sur ce modèle animal de grande taille, avant la transposition chez l'homme.

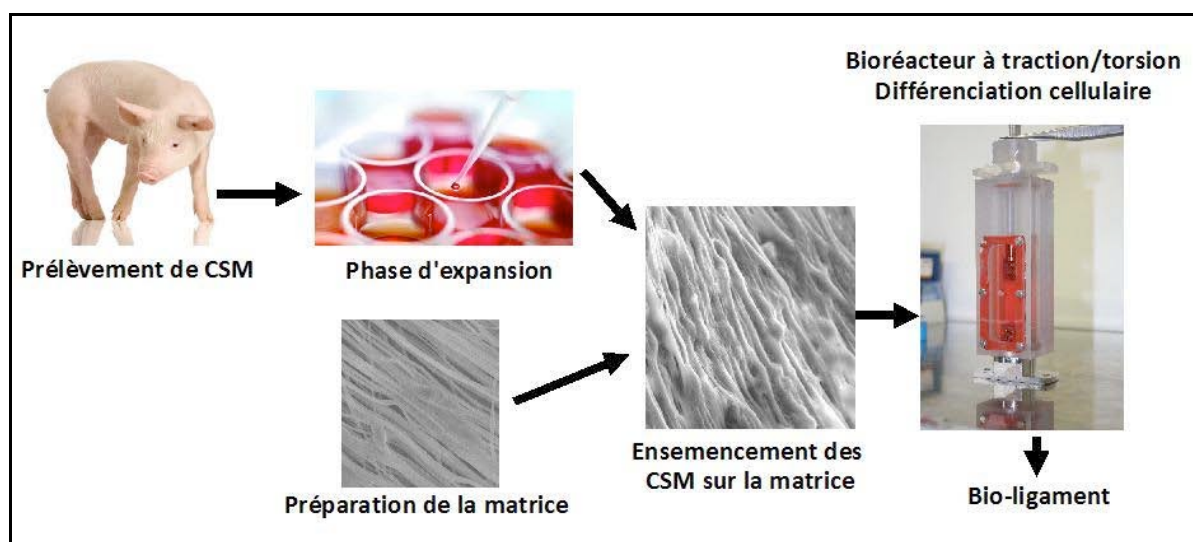


Figure 1. Le projet TELiTeR (Tissue Engineering for Ligament and Tendon Regeneration). Les CSM sont prélevées sur des porcs, amplifiées puis différenciées dans un bioréacteur. Le bio-tissu peut ensuite être réimplanté chez l'animal.

La réalisation du projet TELiTeR nécessite de disposer conjointement d'une source de cellules souches, de systèmes de culture instrumentés et dédiés pour la culture et la différenciation des cellules, et de surfaces d'adhérence biocompatibles pour les cellules et permettant un développement cellulaire optimal. La pluridisciplinarité et la complémentarité des équipes parties prenantes de cette étude globale sont des conditions nécessaires à l'obtention finale d'un bio-ligament implantable chez l'homme. Ainsi, ce projet regroupe quatre équipes :

- L'**École de Chirurgie de Nancy**, sous la direction de N. Tran, fournit les CSM porcines issues de prélèvements de moelle osseuse;
- Le **Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire** (LCPM, UMR 7568), sous la direction de J.-L. Six, effectue la formulation, la conception et la fabrication de la matrice de support;
- Le **Laboratoire d'Energétique et de Mécanique Théorique et Appliquée** (LEMTA, UMR 7563), sous la direction de R. Rahouadj et en association avec X. Wang, coordinateur du projet TELiTeR, met au point un bioréacteur avec stimulation de différenciation, et étudie les propriétés mécaniques de l'implant;
- Le **Laboratoire Réactions et Génie des Procédés** (LRGP, UPR 3349), sous la responsabilité de A. Marc, effectue l'étude fine du procédé d'expansion des CSM. Ces travaux du LRGP font l'objet de la thèse présentée dans ce manuscrit et seront donc à présent décrits plus en détail.

Le cahier des charges du procédé d'expansion des CSM est contraignant, car il doit permettre une multiplication rapide des cellules en minimisant le temps de culture nécessaire, afin de maintenir leur potentiel initial de différenciation. Pour répondre à cette problématique, l'approche et les outils sous-jacents du Génie des Bioprocédés sont tout à fait adaptés, ayant déjà largement fait leur preuve pour la culture à grande échelle de lignées continues de cellules animales.

L'étude du développement de procédés d'expansion pour CSM porcines a été divisée en plusieurs chapitres rassemblés dans ce manuscrit. Tout d'abord, une étude bibliographique (Chapitre 1) est présentée afin de prendre connaissance des travaux rapportés dans la littérature sur les CSM et d'identifier les moyens de les amplifier. A partir de cette analyse bibliographique, les objectifs de la thèse sont définis pour tenter de répondre aux questions encore non résolues, et le matériel et méthodes des travaux sont détaillés (Chapitre 2). Puis, un ensemble de trois chapitres de résultats (Chapitres 3, 4 et 5) présentent les travaux expérimentaux réalisés pour faire progresser nos connaissances et améliorer les performances d'un procédé d'expansion adapté aux CSM porcines.

Chapitre 1. Étude bibliographique

Introduction de l'étude bibliographique	15
1.1. Intérêts thérapeutiques des cellules souches mésenchymateuses.....	18
1.1.1. Propriétés des CSM	18
1.1.1.1. Caractéristiques des CSM <i>in vivo</i>	18
1.1.1.2. Propriétés thérapeutiques des CSM	20
1.1.2. Applications cliniques des CSM.....	21
1.1.2.1. Essais cliniques sur l'homme	22
1.1.2.2. Intérêts des modèles animaux.....	22
1.1.3. Limites à l'utilisation des CSM	23
1.1.3.1. Perte du potentiel thérapeutique.....	23
1.1.3.2. Mort des CSM	23
1.1.3.3. Cancérisation des CSM	24
1.2. Influence des paramètres environnementaux sur la réponse des CSM	26
1.2.1. Influence des paramètres biochimiques	26
1.2.1.1. Le glucose	26
1.2.1.2. Les acides aminés	28
1.2.1.3. Les molécules antioxydantes.....	30
1.2.1.4. Les facteurs de croissance	32
1.2.1.5. Les molécules inductrices de la différenciation.....	34
1.2.1.6. Les milieux de culture	34
1.2.2. Influence des paramètres physico-chimiques	37
1.2.2.1. Le taux d'oxygène dissous	37
1.2.2.2. La température, le pH et l'osmolarité.....	38
1.2.2.3. Les surfaces d'adhérence.....	39
1.2.2.4. Les forces mécaniques.....	42
1.3. Procédés d'expansion des CSM	45
1.3.1. Expansion sur supports statiques	45
1.3.1.1. Cultures sur supports statiques en mode de perfusion séquentielle	45
1.3.1.2. Culture sur supports statiques en mode de perfusion continue	47
1.3.2. Culture de CSM sur microporteurs en mode agité.....	48
1.3.2.1. Choix des microporteurs.....	49
1.3.2.2. Ensemencement des CSM sur les microporteurs	50
1.3.2.3. Expansion des CSM sur microporteurs	54
1.3.2.4. Suivi et contrôle des paramètres physico-chimiques des cultures de CSM sur microporteurs.....	59
1.3.2.5. Performances de croissance des CSM sur microporteurs	60
1.3.2.6. Organisation cellulaire des CSM sur microporteurs	62
1.3.3. Culture de CSM sans support d'adhérence en mode agité	63
1.3.3.1. Culture de CSM en suspension unicellulaire.....	63
1.3.3.2. Culture de CSM sous forme d'agrégats	66

Introduction de l'étude bibliographique

Il est désormais bien établi que les cellules souches, possédant la capacité de se multiplier et de se différencier en cellules spécialisées, présentent un fort potentiel d'applications thérapeutiques. Il existe principalement deux types de cellules souches: les cellules souches embryonnaires, provenant d'un embryon de quelques jours, et les cellules souches adultes, résidant dans les tissus d'un organisme post-natal. Le potentiel de multiplication et de différenciation des cellules souches est cependant limité, celui-ci diminuant au fur et à mesure du développement de l'organisme. Ainsi, si l'œuf fécondé est totipotent, et donc capable de générer un organisme complet, les cellules souches embryonnaires sont dites pluripotentes, c'est-à-dire capables de se différencier en tous types cellulaires. Les cellules souches adultes, quant à elles, sont également différenciables mais en un nombre limité de types cellulaires ; elles sont dites multipotentes (Figure 2).

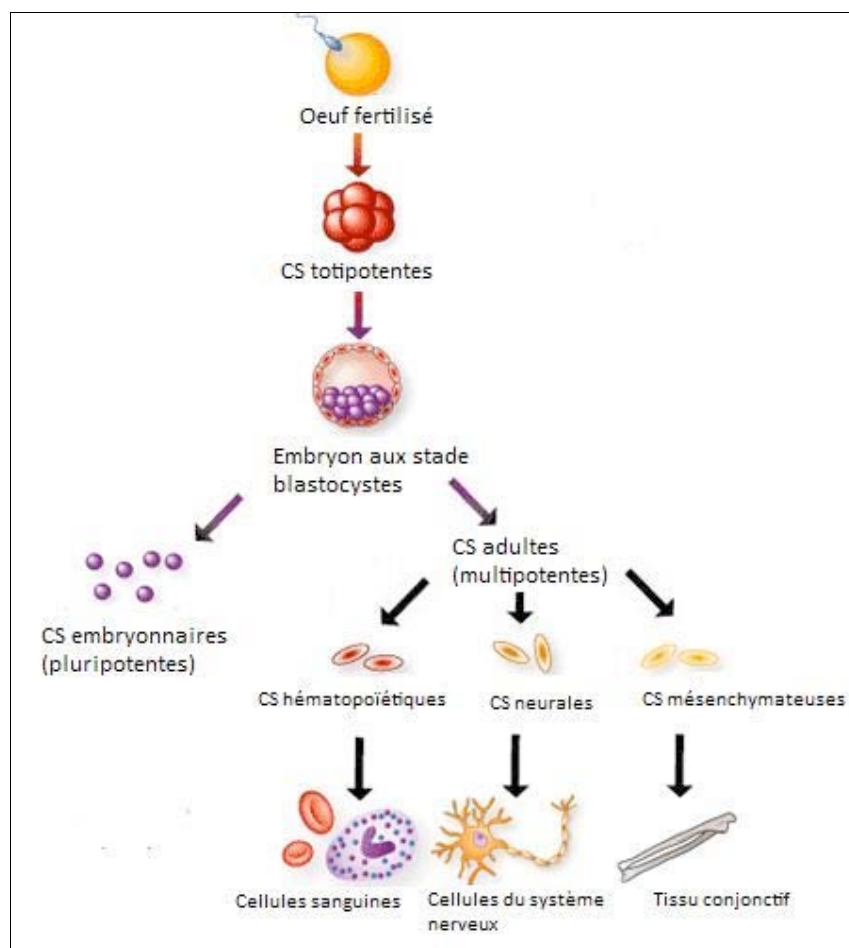


Figure 2. De l'œuf fécondé aux cellules souches adultes: de la totipotentialité à la multipotentialité (adapté de www.purstem.eu), CS: cellules souches

Les cellules souches adultes se trouvent *in vivo* dans des microenvironnements appelés niches. Découvertes dans les années 1960 par Friedenstein et al. (1968), les plus abondantes dans l'organisme sont les cellules souches mésenchymateuses (CSM), présentes principalement dans la moelle osseuse (Figure 3), les tissus adipeux, ou le sang de cordon ombilical de nouveau-nés.

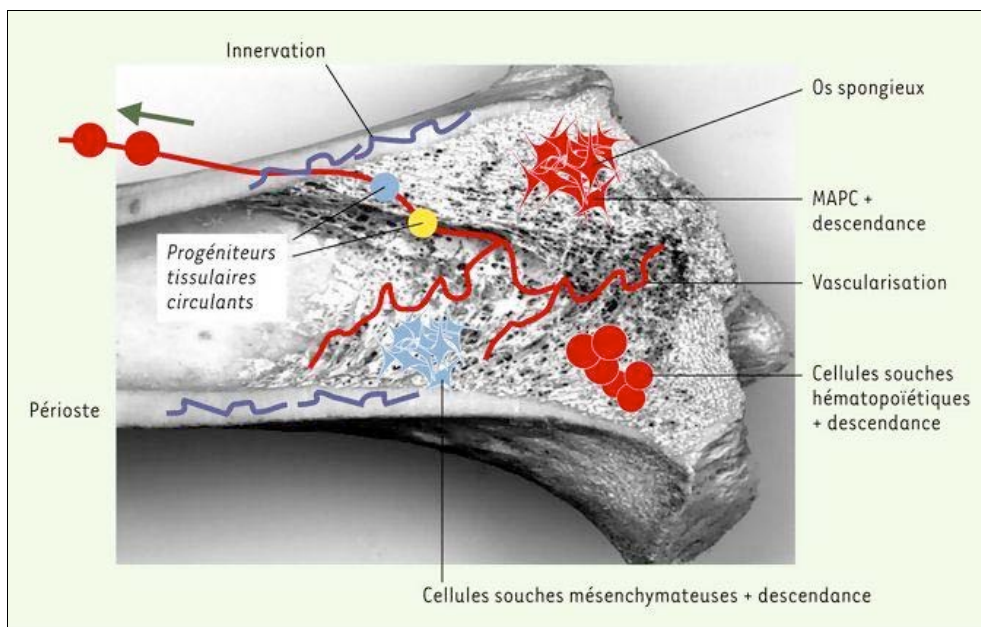


Figure 3. Coupe d'os illustrant la localisation des cellules souches mésenchymateuses au sein du tissu de la moelle osseuse (Coulombel et al., 2003)

In vivo, les CSM de la moelle osseuse ont un rôle de soutien pour les cellules souches hématopoïétiques, et participent à la régénération de tissus lésés au sein de l'organisme. Les CSM peuvent être extraites, cultivées *in vitro* et utilisées en médecine régénératrice. Par rapport aux cellules souches embryonnaires, également utilisées en thérapie cellulaire et en ingénierie tissulaire, l'utilisation des CSM est beaucoup moins soumise aux contraintes éthiques et réglementaires. En effet, elles peuvent facilement être obtenues à partir de prélèvements de tissus adultes, et donc sans sacrifice d'embryons. Néanmoins, elles sont présentes en nombre limité au sein de l'organisme et leur usage à des fins thérapeutiques nécessite une phase d'amplification préliminaire (Caplan et al., 2007).

L'amplification de cellules de mammifère, dont font partie les CSM, est une méthode déjà largement utilisée en industrie. En effet, des cultures de cellules animales immortalisées (appelées lignées continues) ont été développées en grand nombre ces vingt dernières années pour la production de vaccins ou de protéines recombinantes. Ainsi, des bioréacteurs de volume supérieur à 10 m³ sont classiquement rencontrés de nos jours dans les industries biotechnologiques pour la culture de ces lignées continues. La mise en œuvre de tels procédés industriels pourrait ainsi être transposée à l'amplification de CSM. En effet, certaines similitudes concernant la vitesse de croissance et le métabolisme existent entre les lignées

continues adhérentes et les CSM. De plus, la croissance des CSM et des lignées cellulaires est influencée par les mêmes paramètres de culture, tels que le pH, l'oxygène dissous, les contraintes de cisaillement, les limitations en nutriments, et l'accumulation de produits métaboliques (Friedl et al., 2007; Lakhota et Papoutsakis, 1991; Schop et al., 2009; Doverskog et al., 1997).

Les principales différences entre les CSM et les lignées continues concernent l'origine des cellules : les CSM proviennent de prélèvements *in vivo* à chaque utilisation, nécessitant une phase de purification avant l'expansion. De plus, les CSM sont des cellules primaires, ce qui implique que leur durée de vie est limitée, le nombre de passages et de cultures réalisables avec un lot de cellules donné étant défini. En revanche, les lignées continues sont des cellules immortalisées, pouvant être théoriquement cultivées à l'infini.

En ce qui concerne la réponse cellulaire en bioréacteur, la transposition directe des techniques de culture des lignées continues aux CSM est délicate. Ainsi, les besoins nutritionnels des CSM et les conditions optimales de leur culture peuvent être sensiblement différents de ceux des lignées continues. Par exemple, les CSM montrent des capacités de croissance meilleures en conditions hypoxiques (Fehrer et al., 2007). Enfin, étant donné que la CSM constitue en soi le produit du procédé de culture, il est nécessaire de rester vigilant quant au maintien des capacités de différenciation de la cellule, pendant toute la phase d'amplification. Ces principales similitudes et différences entre les deux types cellulaires sont résumées dans le Tableau 1. Ainsi, il apparaît que l'étude de l'expansion de CSM en bioréacteur peut se baser avantageusement sur l'expérience acquise par la communauté scientifique sur l'expansion de lignées continues.

Tableau 1. Principales similitudes et différences entre les CSM et les lignées continues (cellules Vero par exemple)

Caractéristiques	Cellules souches mésenchymateuses (CSM)	Cellules Vero (Lignée continue)
Origine	Prélèvements sur organismes adultes à chaque utilisation	Lignée établie en 1962 à partir de cellules de rein de singe vert
Durée de vie	Sénescence répliquative après plusieurs dizaines de doublements de population	Théoriquement infinie
Vitesse spécifique maximale de croissance	0,02 h ⁻¹ (Schop et al., 2010; Rourou et al., 2007)	
Métabolisme	Forte production de lactate en présence de concentrations élevées de glucose	
Oxygène	Meilleure croissance sous hypoxie	Besoin de conditions normoxiques
Frein à la croissance cellulaire	Contraintes de cisaillement, limitation en nutriments, accumulation de produits métaboliques	
Intérêt thérapeutique	Cellules souches multipotentes utilisées en médecine régénératrice	Cellules infectées par des virus pour la fabrication de vaccins

Sur la base des constatations réalisées précédemment, l'étude bibliographique proposée ci-après va tout d'abord souligner l'intérêt thérapeutique des CSM en présentant leurs principales propriétés (caractéristiques *in vivo* et propriétés thérapeutiques), leurs applications cliniques, ainsi que les contraintes à prendre en compte dans leur utilisation (perte de potentiel thérapeutique, mortalité, cancérisation). Puis, les études faisant état de l'influence des paramètres environnementaux sur le comportement des CSM seront présentées. L'influence de paramètres biochimiques (nutriments, molécules bioactives) et physico-chimiques (oxygène, température, pH, osmolarité, surfaces d'adhérence, forces mécaniques) sur l'adhérence, la croissance et la différenciation des CSM sera décrite. Enfin, les méthodes d'expansion de CSM rapportées dans la littérature seront présentées, et les différents paramètres de culture étudiés. Ces différentes méthodes d'expansion intègrent la culture statique, la culture sur microporteurs, la culture en suspension unicellulaire et sous forme d'agrégats. Cette étude bibliographique nous permettra de proposer les stratégies les plus adaptées à l'amplification de CSM, et de soulever des questions scientifiques encore inexplorées.

1.1. Intérêts thérapeutiques des cellules souches mésenchymateuses

Les CSM, cellules indifférenciées provenant d'un organisme post-natal, présentent un potentiel de différenciation multipotent. L'intérêt thérapeutique des CSM provient essentiellement de leurs caractéristiques exprimées *in vivo*. Ainsi, leur rôle dans l'hématopoïèse et la réparation de tissus peut être utilisé *in vitro* à des fins thérapeutiques. Les applications concernent les domaines de l'ingénierie tissulaire et de la thérapie cellulaire, permettant le traitement de maladies aussi diverses que le diabète ou les maladies neurodégénératives. Il existe toutefois des limites à l'utilisation des CSM, en raison, notamment, de la réponse cellulaire qui peut être modifiée lors de la phase d'expansion.

1.1.1. Propriétés des CSM

1.1.1.1. Caractéristiques des CSM *in vivo*

Les CSM sont présentes principalement dans la moelle osseuse, mais également dans d'autres tissus, tels que le tissu adipeux ou le sang de cordon ombilical de nouveau-nés (da Silva Meirelles et al., 2006). Présentes en faible quantité au sein de ces tissus (une CSM pour 10 000 cellules), ce rapport diminue d'autant plus avec l'âge (Caplan et al., 2009). Au sein de la moelle osseuse, les CSM résident dans des niches, qui sont des microenvironnements permettant de contrôler le devenir des cellules (Figure 4). Ces

niches contrôlent la prolifération et la différenciation des CSM, par contact avec des cellules spécialisées (Docheva et al., 2007; Sarugaser et al., 2009). La division des CSM au sein de la niche est régulée de façon à ce que le génome des cellules présente le moins de mutations possible. Pour cela, il existe une division asymétrique des CSM lors de la mitose, pour laquelle la cellule mère garde la copie du génome non dupliquée (Sherley et al., 2002). Cependant, cette division asymétrique peut induire une cancérisation des cellules si elle n'est pas correctement régulée (Dingli et al., 2007). Une fois différenciées, les CSM présentent une capacité de prolifération plus faible (Filipak et al., 1989; Hong et al., 2006).

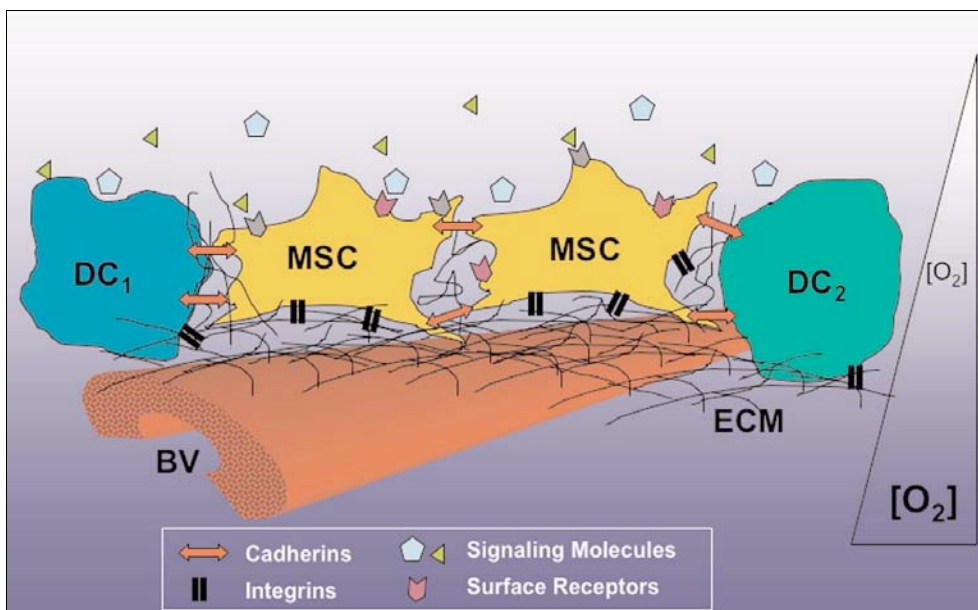


Figure 4. Niche des CSM (MSC, Mesenchymal stem cell) au sein de la moelle osseuse, autour d'un vaisseau sanguin (BV, blood vessel). Les CSM interagissent avec des cellules différenciées (DC, differentiated cells), avec la matrice extracellulaire (ECM, extracellular matrix) et avec des molécules signalétiques (Kolf et al., 2007).

In vivo, les CSM ont un rôle de support à l'hématopoïèse (Dazzi et al., 2006) et de réparation de tissus lésés éloignés de la niche (Kan et al., 2005). Pour atteindre ces tissus lésés, les CSM empruntent la circulation sanguine (Roufosse et al., 2004). Une fois sur le site lésé, elles aident à la réparation du tissu en remplaçant les cellules détruites suite à leur différenciation, ou en stimulant les cellules présentes par sécrétion de cytokines (Kinnaird et al., 2004). Une autre propriété des CSM est leur caractère immunorégulateur, en modulant la réponse immunitaire de l'organisme par des contacts cellule-cellule ou par des sécrétions de molécules régulatrices, telles que les interleukines. Les CSM peuvent ainsi, entre autres, inhiber la prolifération des lymphocytes B et T, et la différenciation des monocytes en cellules dendritiques. Cette propriété d'immunorégulation permet aux CSM de s'implanter au sein des tissus lésés sans déclencher de réactions immunitaires (Caplan et al., 2007; Iyer et al., 2008).

Certains doutes demeurent cependant à propos des CSM. Tout d'abord, il semblerait qu'elles représentent en réalité une population hétérogène de cellules (Ratajczak et al., 2004; Jones et McGonagle, 2008). De plus, elles seraient très proches d'autres types cellulaires, tels que les fibroblastes (Haniffa et al., 2009) et les péricytes (Short et al., 2003; da Silva Meirelles et al., 2007). En 2006, des critères de base ont été définis pour caractériser les CSM (Dominici et al., 2006). Ces critères comprennent l'adhérence au matériau (matière plastique, verre, etc.), un phénotype constitué par des marqueurs positifs à plus de 95 % (CD105, CD73, CD90) et des marqueurs négatifs à moins de 2 % (CD45, CD34, CD14, CD19, HLA-DR), ainsi qu'une différenciation *in vitro* en ostéoblastes, adipoblastes et chondroblastes, démontrée par des colorations spécifiques. D'autres critères deviennent incontournables dans le cadre d'essais cliniques, tels que la stabilité génomique (Bernardo et al., 2011).

1.1.1.2. Propriétés thérapeutiques des CSM

De par leurs propriétés de prolifération, de différenciation, de sécrétion de cytokines et d'immunorégulation, les CSM sont devenues des outils précieux en médecine régénératrice (Caplan and Bruder, 2001). Mais leur utilisation doit toujours être précédée d'une phase d'expansion cellulaire, afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules à partir des prélèvements de tissus (Caplan, 2007).

Deux usages des CSM en médecine régénératrice sont possibles: la thérapie cellulaire et l'ingénierie tissulaire. D'un côté, la thérapie cellulaire repose sur la capacité des CSM à se différencier et à stimuler *in vivo* d'autres types de cellules (Caplan and Dennis, 2006). Les CSM non différenciées sont ainsi injectées chez le patient soit directement, soit après modification du génome en thérapie génique (Apel et al., 2009). Une fois transplantées, elles migrent dans la moelle osseuse, ou au niveau des sites d'inflammation (Yen et al., 2008).

D'un autre côté, l'ingénierie tissulaire a pour but de reconstituer des tissus ou des organes. Pour ce faire, il est nécessaire de diriger la différenciation des cellules vers un type de cellule spécialisée. Ainsi, les cellules peuvent êtreensemencées sur divers biomatériaux, et soumises à des forces mécaniques, électromagnétiques ou hydrodynamiques, ou encore exposées à des messages chimiques (Rosenbaum et al., 2008). Le potentiel de différenciation des CSM est constamment élargi au fur et à mesure que des nouveaux protocoles de différenciation sont mis en place. A ce titre, les voies de signalisation conduisant à la différenciation cellulaire commencent à être bien documentées (Figure 5). Les CSM sont capables, entre autres, de se différencier *in vitro* en tissu conjonctif (os, cartilage, muscle, tendon, ligament) (Hui et al., 2005; Friedl et al., 2007) et en neuroderme (neurones, astrocytes) (Phinney et al., 2007; Kan et al., 2007). Une fois les cellules différenciées, elles deviennent unipotentes et perdent leur caractère de

renouvellement. Récemment, des propriétés thérapeutiques ont également été rapportées chez les CSM cultivées sous forme d'agrégats (Potapova et al., 2008; Bartosh et al., 2010). La structure tridimensionnelle des agrégats semble conférer aux cellules un microenvironnement plus favorable à leur survie.

Les CSM, de par leurs caractéristiques *in vivo*, représentent donc un outil intéressant pour l'ingénierie tissulaire et la thérapie cellulaire. Les applications thérapeutiques sont nombreuses, et certaines ont déjà été transférées en essais cliniques.

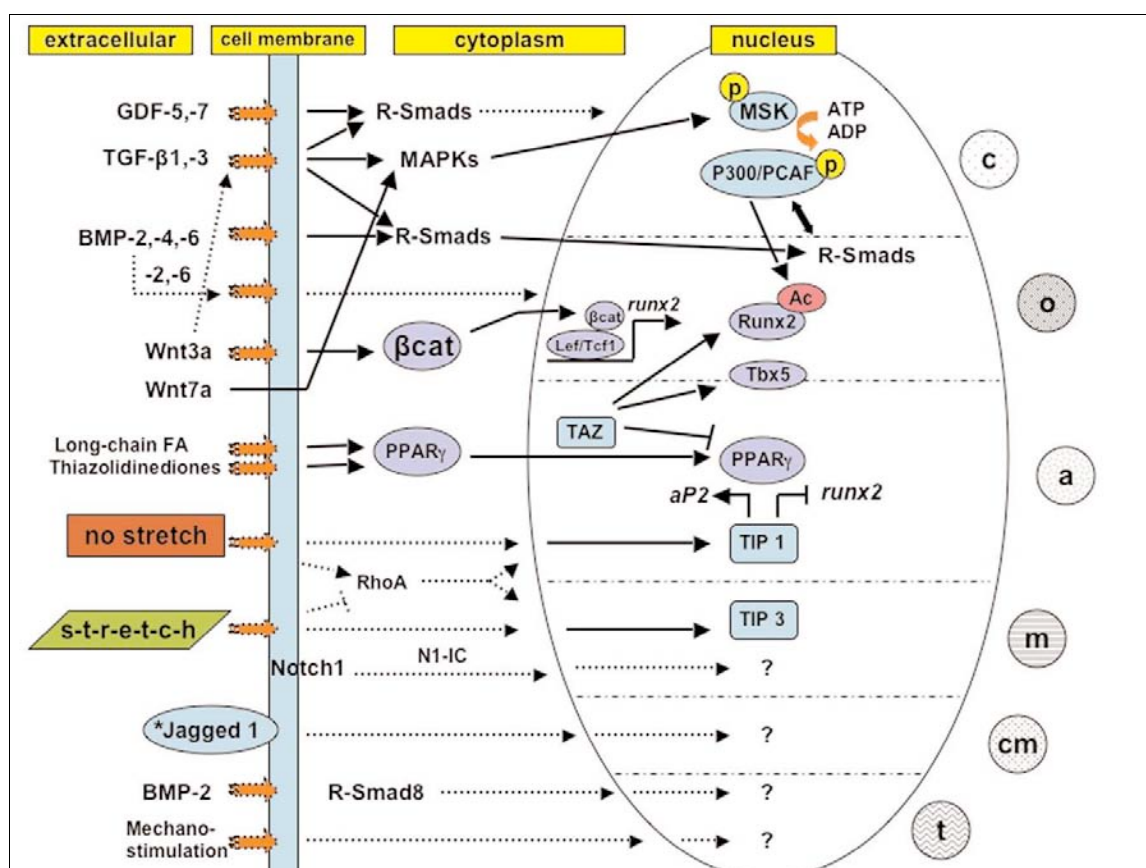


Figure 5. Régulation moléculaire de la différenciation des CSM en chondroblastes (c), ostéoblastes (o), adipoblastes (a), myoblastes (m), cardiomyoblastes (cm) et ténoblastes (t), (Kolf et al., 2007).

1.1.2. Applications cliniques des CSM

Le potentiel thérapeutique des CSM est utilisé dans de nombreuses études en médecine régénératrice. Bien que certaines de ces études soient avancées au stade de l'essai clinique chez l'homme, les études prospectives utilisant les animaux sont encore nécessaires.

1.1.2.1. Essais cliniques sur l'homme

Le potentiel thérapeutique des CSM est exploité dans de nombreuses applications cliniques. Actuellement, plus d'une centaine d'essais cliniques sont en cours (Figure 6) pour le traitement de maladies telles que le cancer, le diabète, les maladies neurodégénératives, autoimmunes et cardiaques (Trounson et al., 2011). La majorité des essais sont en phase I (étude de sécurité chez les volontaires sains) et phase II (preuve d'efficacité chez les patients). Seuls 5 essais sont en phase III (preuve d'intérêt clinique chez les patients). Un exemple de résultats d'essais cliniques est donné dans l'étude de Garcia-Olmo et al. (2005), pour la réparation de fistules provenant de la maladie de Crohn. Les fistules de plusieurs patients ont été inoculées avec des CSM autologues provenant de leurs tissus adipeux. Sur les huit fistules traitées, six ont été guéries en deux mois. Aucun effet secondaire n'a été observé jusqu'à 30 mois après l'opération.

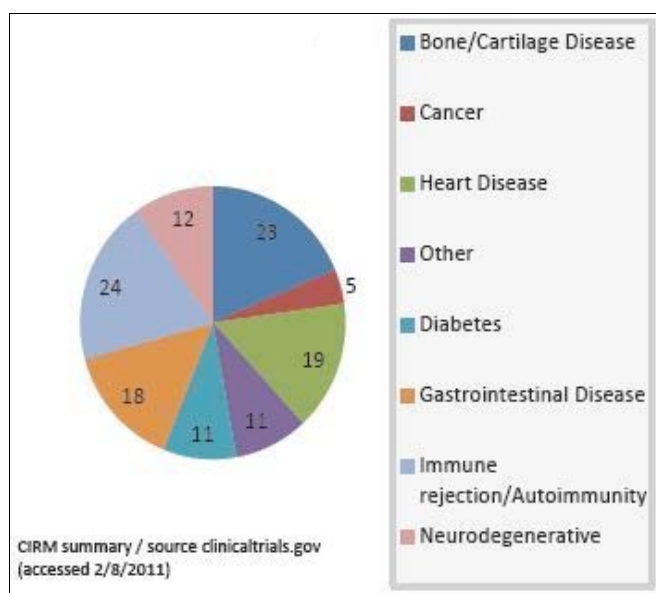


Figure 6. Essais cliniques chez l'homme utilisant des CSM pour le traitement de maladies (n = nombre d'essais), (adapté de Trounson et al., 2011).

1.1.2.2. Intérêts des modèles animaux

L'ingénierie tissulaire et la thérapie cellulaire sont des disciplines récentes, et des études précliniques sur les animaux sont nécessaires pour développer des protocoles thérapeutiques sans danger pour l'homme. Plusieurs modèles animaux sont déjà utilisés dans des travaux rapportés dans la littérature, tels que le rat (Yang et al., 2007; Schop et al., 2009), la chèvre (Schop et al., 2008 et 2009), le cheval (Colleoni et al., 2009), le lapin (Boo et al., 2011), le singe (Kim et al., 2008) et le porc (Frauenschuh et al., 2007; Vacanti et al., 2005; Ringe et al., 2002; Bosch et al., 2006). L'utilisation de grands animaux présente de nombreux avantages

(Gandolfi et al., 2011), tels qu'une proximité morphologique et physiologique avec l'homme, notamment pour le porc. Le porc présente également l'avantage de vivre facilement en élevage. Il est d'ailleurs de plus en plus recommandé par les autorités sanitaires d'effectuer des tests précliniques sur les porcs, au détriment des rongeurs.

1.1.3. Limites à l'utilisation des CSM

Même si de nombreuses études ont déjà été réalisées sur l'homme et l'animal, des limites à l'utilisation des CSM sont à prendre en compte. En effet, lors de la phase d'expansion et d'injection au patient, les cellules sont soumises à un environnement qui peut influencer de façon négative leur physiologie. Parmi ces changements physiologiques, une perte du potentiel thérapeutique, une mortalité cellulaire, ou encore une cancérisation des CSM peuvent être observées.

1.1.3.1. Perte du potentiel thérapeutique

Une première limitation à l'utilisation des CSM est la perte de leur potentiel thérapeutique *in vitro*. En effet, *in vivo*, les caractéristiques des CSM sont conservées grâce au microenvironnement de leur niche. Une fois sorties de cet environnement, elles peuvent se différencier et perdre leurs propriétés d'auto-renouvellement et de multipotence (Kim et al., 2008). La multipotentialité des cellules doit donc être régulièrement testée au cours de l'amplification cellulaire, et avant l'injection chez le patient dans le cadre de la thérapie cellulaire.

1.1.3.2. Mort des CSM

Un second frein à l'utilisation des CSM est le maintien de leur viabilité, les CSM ayant une durée de vie limitée *in vitro* (Izadpanah et al., 2008). Même si les CSM subissent naturellement un vieillissement *in vivo*, mis en évidence notamment sur des CSM issues de personnes âgées, la viabilité des cellules *in vitro* est menacée par les conditions de culture (taux d'oxygène, agitation, milieu de culture) et lors de l'injection chez le patient (Chen et al., 2008). Cette baisse de la viabilité cellulaire peut être due à la nécrose, ou à des phénomènes programmés génétiquement tels que la sénescence répllicative ou l'apoptose.

La sénescence répliquative est un processus connu chez les cellules eucaryotes. D'après les études de Hayflick et al. (1961) dédiées à la culture de fibroblastes, il existe une limite de prolifération qui, une fois dépassée, place les cellules en sénescence répliquative. Les cellules en sénescence sont bloquées entre la phase G1 et la phase S du cycle cellulaire. Ces cellules peuvent cependant conserver un métabolisme actif (Goldstein, 1990). Il existe également une sénescence répliquative chez les cellules souches (Liu et al., 2011), qui serait un moyen d'échapper à leur cancérisation (Sharpless et al., 2004). La sénescence répliquative des CSM, phénomène continu et organisé (Wagner et al., 2008), suit le modèle de Hayflick (Bonab et al., 2006), avec un raccourcissement des télomères (Kim et al., 2008). La sénescence entraînerait une diminution des défenses antioxydantes, ainsi qu'une baisse du renouvellement du cytosquelette d'actine (Kasper et al., 2009). Cette sénescence peut être ralentie en cultivant les cellules en hypoxie (Fehrer et al., 2007). Il existe cependant des lignées de CSM immortalisées par l'ajout du gène de la télomérase (Weber et al., 2010 ; Ebert et al., 2006; Justice et al., 2010; Li et al., 2007). Ce gène, appelé TERT (Telomerase Reverse Transcriptase), produit une protéine qui ajoute des répétitions télomériques aux extrémités des chromosomes, prévenant ainsi leur raccourcissement (Hiyama et al., 2007). De faibles concentrations de télomérase sont généralement trouvées chez les CSM non transformées (Sethe et al., 2006).

Contrairement à la sénescence répliquative, l'apoptose est un phénomène de mort cellulaire déclenché par un événement environnemental. C'est un processus contrôlé nécessaire au développement tissulaire (Zahir et al., 2004). Selon les travaux de Zhu et al. (2006) et Chen et al. (2008), une apoptose des CSM peut être induite par l'hypoxie ou la privation de sérum. Néanmoins, elle peut être réduite par ajout d'acide lysophosphatidique. L'apoptose des CSM peut également être induite par un stress mécanique (Kearney et al., 2008) ou par un manque d'adhérence (anoïkis) (Benoit et al., 2007; Feng et al., 2007).

Il est intéressant de noter que les CSM cultivées sous forme d'agrégats sont moins sensibles à la mortalité induite lors de leur injection chez le patient (Lee et al., 2009). Encore une fois, la structure tridimensionnelle des agrégats semble protéger les cellules des stress environnementaux.

1.1.3.3. Cancérisation des CSM

Une troisième limitation à l'utilisation des CSM est le risque de cancérisation, soit par leur interaction avec des cellules cancéreuses, soit en devenant cancéreuses elles-mêmes. Tout d'abord, plusieurs études ont montré que les CSM transplantées migraient spontanément vers les tumeurs (Yen et al., 2008). Cette propriété a été utilisée en thérapie pour cibler les cellules cancéreuses. Cependant, cela souligne que les CSM peuvent interagir avec les cellules cancéreuses. De plus, il a été montré que les CSM favorisent la

croissance des cellules cancéreuses quand les deux types de cellules sont co-transplantées dans des souris (Djouad et al., 2003). Les cellules cancéreuses utiliseraient l'immunosuppression des CSM (inhibition de la prolifération des cellules de l'immunité) pour échapper au système immunitaire, et utiliseraient les enzymes de dégradation sécrétées par les CSM lors de leur migration à travers les tissus pour le développement de métastases (Yen et al., 2008). Paradoxalement, certaines études montrent que les CSM peuvent, dans certains cas, diminuer la croissance des tumeurs (Chao et al., 2011).

En plus de leur possible interaction avec des cellules cancéreuses, les CSM peuvent elles-mêmes le devenir (Rubio et al., 2008). Cette cancérisation provient de mutations génétiques accumulées lors des nombreuses réplifications subies par les cellules lors de la phase d'expansion.

L'utilisation thérapeutique des CSM doit donc tenir compte de certaines limitations, liées à la phase d'expansion cellulaire et à l'injection chez le patient. Davantage de connaissances sur la façon dont la niche régule le devenir des CSM seraient donc nécessaires pour réussir à maintenir les cellules viables et multipotentes.

De par leur rareté au sein des tissus vivants et de leur nombre qui diminue avec l'âge du patient, les CSM doivent subir des phases d'amplification avant leur utilisation thérapeutique. Cette expansion cellulaire est basée sur les propriétés d'auto-renouvellement des CSM, mais comporte certains risques. En effet, les cellules peuvent perdre leur potentiel d'auto-renouvellement et de multipotence, ou subir une mortalité précoce. Afin de limiter ces risques, la phase d'expansion doit être courte, tout en maintenant les caractéristiques des CSM. Pour cela, il est nécessaire de connaître l'influence des facteurs environnementaux sur la réponse cellulaire.

La deuxième partie de cette étude bibliographique explore ainsi l'influence des paramètres environnementaux sur la réponse des CSM de la moelle osseuse. L'importance de chaque paramètre est d'abord étudiée dans son environnement *in vivo*. Puis, les effets de ce même paramètre sont analysés *in vitro*. Ces informations permettent de mettre en évidence les paramètres clés pour déterminer des conditions de culture adaptées à l'expansion rapide de CSM thérapeutiques.

1.2. Influence des paramètres environnementaux sur la réponse des CSM

Les CSM interagissent constamment avec leur environnement *in vivo*. C'est d'ailleurs le microenvironnement biochimique et physico-chimique de leur niche qui conditionne la prolifération ou la différenciation des CSM. Une fois leur niche quittée, les CSM migrent vers les tissus lésés via la circulation sanguine, et se différencient au contact des tissus atteints. Les paramètres biochimiques connus pour avoir un effet sur la réponse des CSM vont tout d'abord être présentés. Ils comprennent les principaux nutriments ainsi que des molécules bioactives. Enfin, les milieux de culture développés pour la culture *in vitro* de CSM sont analysés. Ce sont ensuite les paramètres physico-chimiques et leur influence sur les CSM, tels que la concentration en oxygène dissous, la température, le pH et l'osmolarité, ou des paramètres plus complexes, tels que les surfaces d'adhérence et les forces mécaniques, qui sont présentés.

1.2.1. Influence des paramètres biochimiques

Le comportement des CSM est influencée par de nombreux paramètres biochimiques. *In vivo*, l'environnement biochimique contient des nutriments apportés par la circulation sanguine et des molécules bioactives secrétées par les cellules de la niche. *In vitro* en revanche, l'environnement biochimique dépend de la composition du milieu de culture.

1.2.1.1. Le glucose

Le D-glucose est la principale source d'énergie des cellules, et sa concentration fluctue autour de 5 mM dans le sang (Grenier, 1998). Mylotte et al. (2008) ont cultivé des CSM en absence de glucose, et ont observé une mort rapide des cellules. L'effet du glucose sur la croissance des CSM est cependant controversé. Certaines études indiquent que des concentrations élevées en glucose (25 mM) ont des effets négatifs sur les CSM humaines et murines (Sotiropoulou et al., 2006; Stolzing et al., 2006), alors que d'autres études affirment qu'elles n'ont pas d'impact sur la croissance de CSM humaines (Li et al., 2007), ou qu'elles ont un effet positif sur la croissance de CSM humaines et murines (Jung et al., 2010; Deorosan et Nauman, 2011).

En ce qui concerne le métabolisme du glucose chez les CSM, il est unanimement établi qu'une fois métabolisé par la voie glycolytique, peu de pyruvate entre dans la voie de la phosphorylation oxydative (Schop et al., 2009 et 2010; Dos Santos et al., 2010; Chen et al., 2010) (Figure 7). Ainsi, les CSM survivent lorsque la respiration mitochondriale est inhibée pendant 72 h avec du 2,4-dinitrophénol (Mylotte et al., 2008). Le métabolisme du glucose conduit donc à un niveau élevé de lactate (Chen et al., 2010), qui peut être toxique à haute concentration (Chen et al., 2008; Schop et al., 2009) (Figure 8).

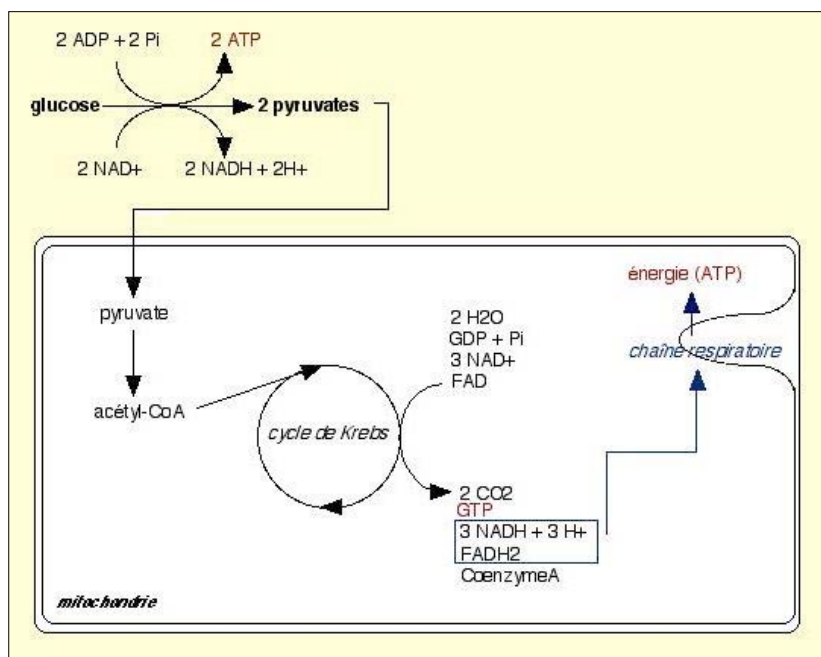


Figure 7. Voie métabolique du glucose par les voies de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative

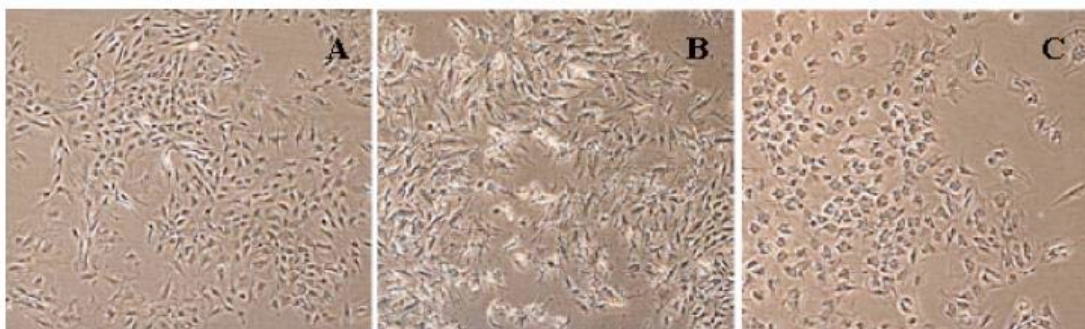


Figure 8. Observation de CSM murines après 7 jours de culture: A) dans du milieu sans ajout de lactate ou d'ammonium, B) dans du milieu avec ajout de 30 mM de lactate, et C) dans du milieu avec ajout de 4 mM d'ions ammonium, x 40 (Schop, 2010)

De plus, il existe un lien direct entre le métabolisme du glucose et la différenciation des CSM. En effet, lors d'une induction ostéogénique de CSM, une augmentation du nombre de copies de l'ADN mitochondriale, des activités des enzymes respiratoires, et de la consommation d'oxygène serait observée, indiquant un métabolisme oxydatif plus actif. Chez les CSM indifférenciées, des niveaux plus élevés d'enzymes

glycolytiques et une production plus importante de lactate suggèrent qu'elles dépendent plus de la glycolyse que les CSM différenciées. Il y aurait ainsi une transition de la glycolyse vers la phosphorylation oxydative lors de l'induction ostéogénique (Chen et al., 2008). Les enzymes de la glycolyse sont également régulées par le facteur HIF (Hypoxia Inducible Factor), actif en conditions d'hypoxie (Chen et al., 2010).

Plusieurs travaux rapportent des consommations de glucose par des CSM indifférenciées comprises entre 5 et 14 pmol/cellule/jour (Eibes et al., 2010; Dos Santos et al., 2010), et des productions de lactate comprises entre 10 et 37 pmol/cellule/jour (Eibes et al., 2010; Dos Santos et al., 2010). Le rendement lactate/glucose est donc souvent proche ou supérieur à 2, suggérant une production de lactate à partir d'autres sources de carbone, comme par exemple la glutamine (Schop et al., 2008; Eibes et al., 2010). D'autres sucres peuvent être métabolisés par les cellules eucaryotes, tels que le fructose ou le galactose. Cependant, aucune étude n'a encore testé ces composants sur la croissance des CSM. Le glucose est donc pour l'instant la source principale d'énergie pour les CSM cultivées *in vitro*.

1.2.1.2. Les acides aminés

Il existe 20 acides aminés, et parmi eux, 10 sont essentiels pour l'homme (arginine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, méthionine, phénylalanine, thréonine, tryptophane, valine), les autres pouvant être synthétisés par les cellules de l'organisme (alanine, asparagine, acide aspartique, cystéine, acide glutamique, glutamine, glycine, proline, sérine, tyrosine). Les acides aminés possèdent plusieurs fonctions dans le métabolisme cellulaire, servant d'intermédiaires du cycle TCA ou de précurseurs de nucléotides, ou convertis en pyruvate.

Parmi les acides aminés libres, la L-glutamine est le plus abondant dans le sang (Roth, 2008). Bien qu'il s'agisse d'un acide aminé non essentiel, une étude montre que la glutamine est l'acide aminé le plus consommé par les cellules animales cultivées *in vitro* (Eagle, 1959). En plus de son rôle nutritif, la glutamine est un précurseur de purines et de pyrimidines, et peut activer des MAP kinases (Mitogen-activated protein kinase) impliquées dans la prolifération cellulaire (Roth, 2008). La glutamine est également impliquée dans les défenses antioxydantes des cellules, notamment comme précurseur de la biosynthèse du glutathion (Roth, 2008), l'antioxydant cellulaire le plus actif comparativement aux autres molécules antioxydantes présentes dans la cellule (Meister et Anderson, 1983).

Quelques études ont analysé la consommation de glutamine par les CSM (Schop et al., 2009; Dos Santos et al., 2010; Eibes et al., 2010). Schop et al. (2009) rapportent que la consommation de glutamine par des CSM humaines, ovines et murines, en tenant compte de la décomposition spontanée de la glutamine à 37 ° C

(environ 10 % par jour), est pratiquement nulle. Eibes et al. (2010) observent une consommation faible de glutamine (0,9 pmol/cellule/jour) par des CSM humaines. En revanche, Dos Santos et al. (2010) indiquent une consommation de glutamine de 30 pmol/cellule/jour qui décroît avec le temps pour des CSM humaines. Eibes et al. (2010) et Dos Santos et al. (2010) ne précisent pas si leurs valeurs intègrent la décomposition spontanée de la glutamine. La consommation de glutamine est accompagnée d'une production d'ions ammonium. Une concentration élevée en ions ammonium est néfaste pour la croissance des CSM (Schop et al., 2009), et le rendement ammonium/glutamine est généralement compris entre 1,2 et 1,6 (Eibes et al., 2010; Schop et al., 2009). Ainsi, la concentration de la glutamine ne doit pas être trop élevée dans les milieux de culture afin de ne pas induire de concentrations inhibitrices en ions ammonium. De plus, la glutamine se dégrade rapidement à 37 °C pour former du 5-pyrrolidone-2-carboxylate et des ions ammonium dans les milieux de culture (Arii et al., 1999). L'utilisation de dipeptides comme substitut de la glutamine, tels que la L-alanyl-L-glutamine (Glutamax®) permet de ralentir ce phénomène. Une meilleure croissance des CSM en présence de Glutamax® que de glutamine a ainsi été observé (Sotiropoulou et al., 2006).

Concernant les autres acides aminés, la seule étude analysant leur influence sur les CSM est celle de Schop en 2010 (Figure 9). Des CSM humaines sont cultivées dans un milieu α MEM supplémenté avec 15 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 2 mM de glutamine. Un suivi cinétique, au cours d'une culture de 6 jours en bioréacteur discontinu contrôlé, a permis de montrer que les acides aminés n'étaient pas limitant pour la croissance des CSM. En fin de culture, la diminution de la concentration en acides aminés ne dépassait pas 40 % de leurs concentrations initiales. Les acides aminés consommés étaient l'arginine, la leucine, l'isoleucine, la valine et l'aspartate. En revanche, certains acides aminés étaient produits, tels que l'alanine à 0,45 pmol/cellule/jour et la glycine à 0,15 pmol/cellule/jour. Les acides aminés ne semblent donc pas être un facteur limitant dans la culture *in vitro* de CSM.

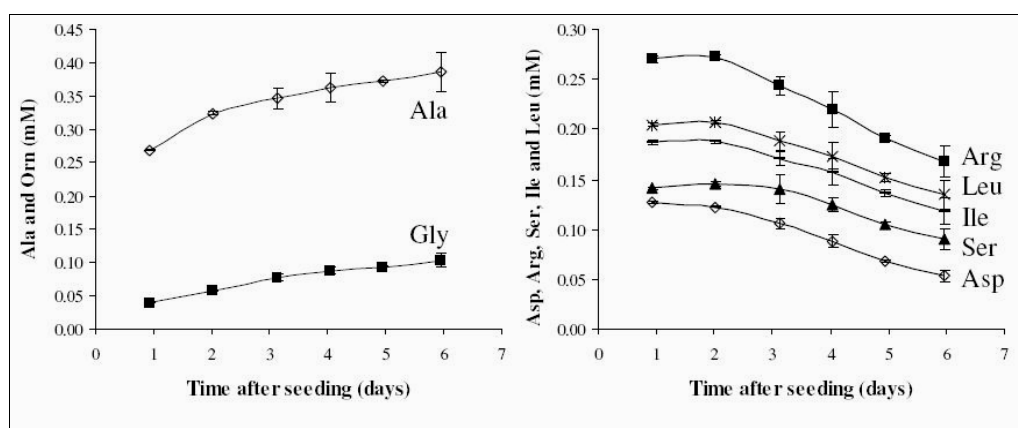


Figure 9. Cinétique de consommation et production d'acides aminés par des CSM humaines (Schop, 2010)

1.2.1.3. Les molécules antioxydantes

Les molécules antioxydantes présentes *in vivo* protègent les cellules des espèces réactives de l'oxygène (ROS, Reactive Oxygen Specie). La formation des ROS débute lors de la respiration mitochondriale, au cours de laquelle un faible pourcentage d'oxygène est partiellement réduit et forme des anions superoxydes (Figure 10). L'interaction des ROS avec les constituants des cellules est souvent néfaste. Les lipides membranaires peuvent subir une peroxydation, les enzymes peuvent perdre leur activité, et l'ADN peut subir des lésions conduisant à des mutations. En parallèle, les ROS ont également un rôle de messenger au sein des cellules. Elles peuvent en effet moduler l'activité de protéines contenant des groupements thiols, telles que les phosphatases, les MAP kinases, certains facteurs de transcription, et les protéines impliquées dans la modification des histones (acétylation, deacétylation, méthylation) (Sundar et al., 2010). Les ROS sont aussi impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires (Bisbal et al., 2010), telles que l'adhérence (Song et al., 2010) ou la différenciation (Kanda et al., 2011) (Figure 11).

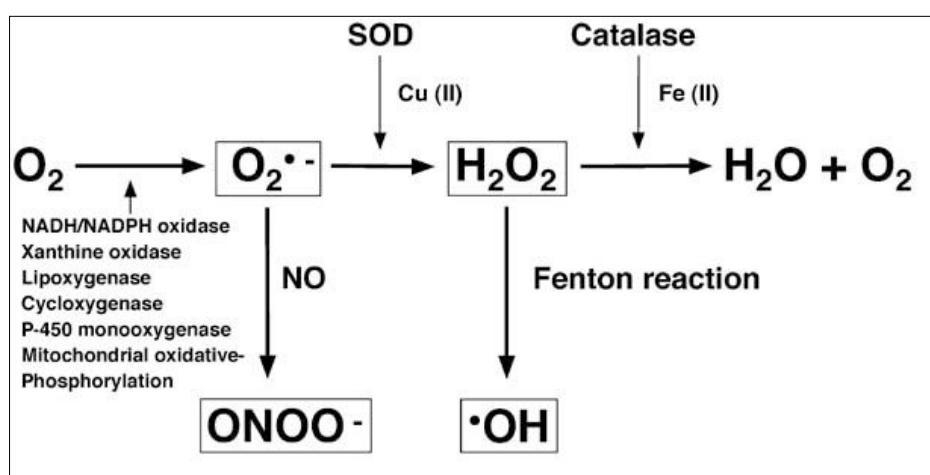


Figure 10. Les différentes espèces de ROS (Reactif Oxygen Species) et les mécanismes de détoxification (Kyaw et al., 2004)

Les défenses antioxydantes des cellules peuvent être assurées par des enzymes intracellulaires, telles que la superoxyde dismutase (SOD) et les peroxydases, ou par de petites molécules antioxydantes intra et extracellulaires. Ainsi, les principaux antioxydants présents dans le sang sont l'acide ascorbique, présent à une concentration de 50 à 60 μM (Khaw et Woodhouse, 1995) synthétisé par la plupart des espèces sauf l'homme ; le glutathion, présent à une concentration de 4 μM (Morrison et al., 1999) et synthétisé à partir de glutamine ; ou encore l'acide lipoïque, présent à une concentration de 0,1 à 0,7 μM (Teichert et al., 1999) et synthétisé à partir d'acide octanoïque. Il apparaît, par ailleurs, que l'acide lipoïque augmente la synthèse de glutathion (Suh et al., 2004). Enfin, l'acide urique synthétisé à partir de purines a également des propriétés antioxydantes et est présent à une concentration de 200 à 400 μM dans le sang (Glantzounis et

al., 2005). *In vivo*, les stress oxydatifs seraient limités dans la niche des CSM, du fait d'un faible taux d'oxygène et de l'activité réduite des mitochondries chez les CSM indifférenciées, produisant ainsi peu de ROS (Chen et al., 2010). En revanche, une fois que les CSM quittent leur niche et se différencient, les mitochondries s'activent. Afin de protéger la cellule des ROS nouvellement formées, la production d'enzymes antioxydantes, telles que la SOD et la catalase, est augmentée (Chen et al., 2008).

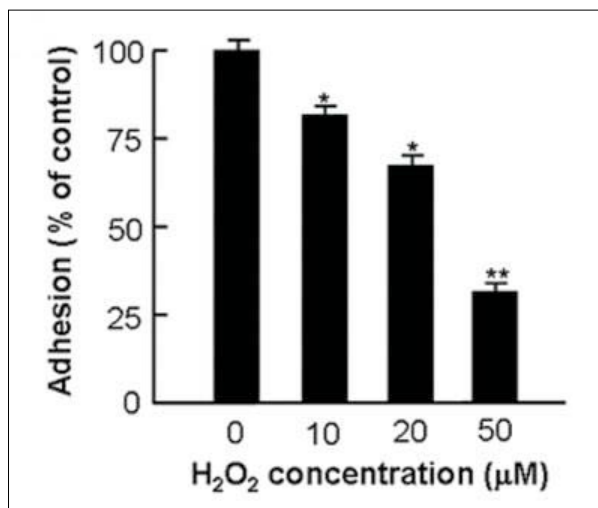


Figure 11. Effet des ROS sur l'adhérence des CSM murines après une heure d'ensemencement (Song et al., 2010)

Les CSM sont classiquement cultivées *in vitro* à un taux d'oxygène atmosphérique (enrichi avec 5 % de CO₂), et sont donc potentiellement soumises à des stress oxydatifs plus importants qu'au sein de leur niche. Une étude de Valle-Prieto et Conget (2010) a montré que les CSM pouvaient résister à des stress oxydatifs appliqués artificiellement en culture par ajout de H₂O₂ grâce à des mécanismes enzymatiques (SOD et catalase, entre autres) et non-enzymatiques (glutathion). La présence de glutathion serait d'ailleurs indispensable pour que la cellule se protège des ROS.

L'ajout d'antioxydants dans les milieux de culture des CSM a été réalisé afin d'améliorer leur croissance. Dans un cas, l'ajout de 0,25 mM d'acide ascorbique permet d'obtenir deux fois plus de CSM humaines après 9 jours de culture par rapport à une culture sans ajout (Choi et al., 2008) (Figure 12), alors qu'un ajout d'acide ascorbique, jusqu'à 28 mM, n'a aucun effet sur la croissance de CSM porcines (Bosch et al., 2006) (Figure 13). Cela pourrait venir du fait que les cellules humaines ne synthétisent pas l'acide ascorbique, contrairement aux cellules porcines. Enfin, l'ajout de 0,1 μM de sélénium augmenterait les capacités antioxydantes des CSM humaines (Ebert et al., 2006). Il semble donc possible de renforcer les défenses antioxydantes des CSM en supplémentant leur milieu de culture avec certaines molécules antioxydantes.

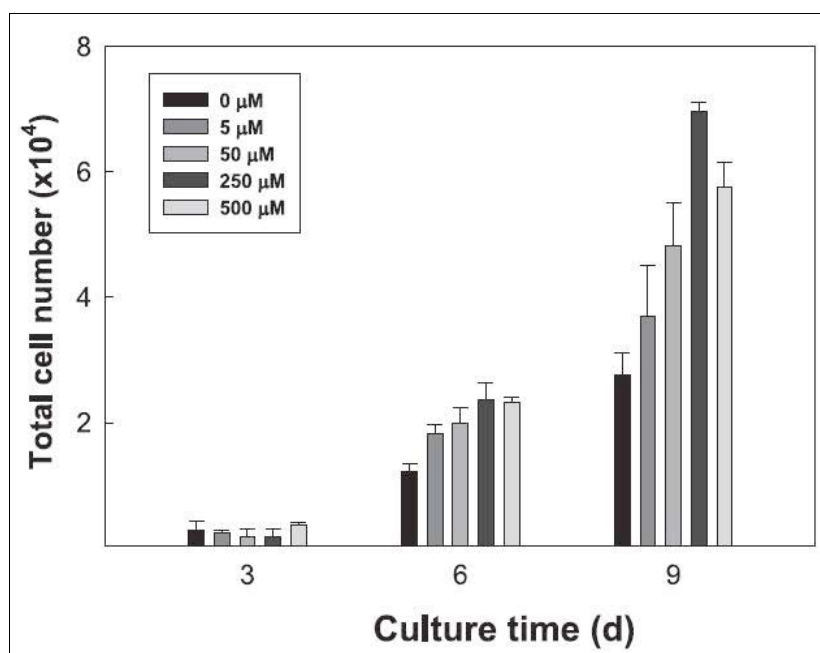


Figure 12. Effet de l'acide ascorbique sur les CSM humaines. Comptage par le MTT au 3^{ème}, 6^{ème} et 9^{ème} jour de culture (Choi et al., 2008)

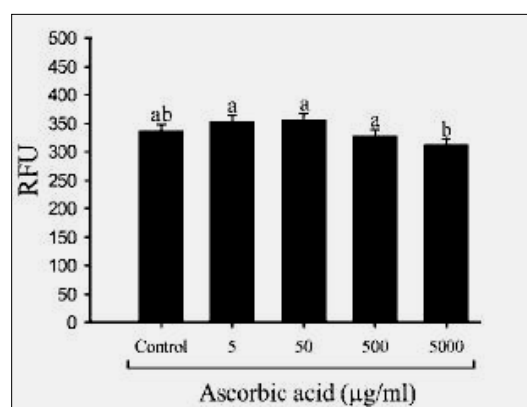


Figure 13. Effet de l'acide ascorbique sur les CSM porcines. Quantification du nombre de cellules par marquage avec des sondes fluorescentes s'intercalant dans l'ADN. RFU= relative fluorescent units (Bosch et al., 2006)

1.2.1.4. Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des messagers chimiques sécrétés par les cellules. Ce sont de petites protéines qui interagissent avec leurs récepteurs membranaires, dont la plupart ont un domaine d'activité tyrosine kinase dans leur région cytoplasmique. Les facteurs de croissance peuvent induire la prolifération ou la différenciation des cellules (Figure 14).

Au sein de leur niche, la maintenance de la multipotence des CSM est principalement régulée par leur propre sécrétion de facteurs de croissance (effet paracrine), notamment les facteurs LIF (Leukemia Inhibitory Factor), et FGF2 (Fibroblastic Growth Factor 2). Les mécanismes d'action de ces facteurs sur la

Le multipotentialisme des CSM ne sont pas encore complètement élucidés. La différenciation des CSM est également régulée par des facteurs de croissance. Ainsi, la chondrogenèse est induite par les facteurs TGF- β (Transforming Growth factor β) et BMP (Bone Morphologic Protein) activant la voie des R-smads et des MAP kinases, tandis que l'ostéogénèse est induite par le facteur BMP-2, qui active Runx2, le gène majeur de l'ostéogénèse (Kolf et al., 2007).

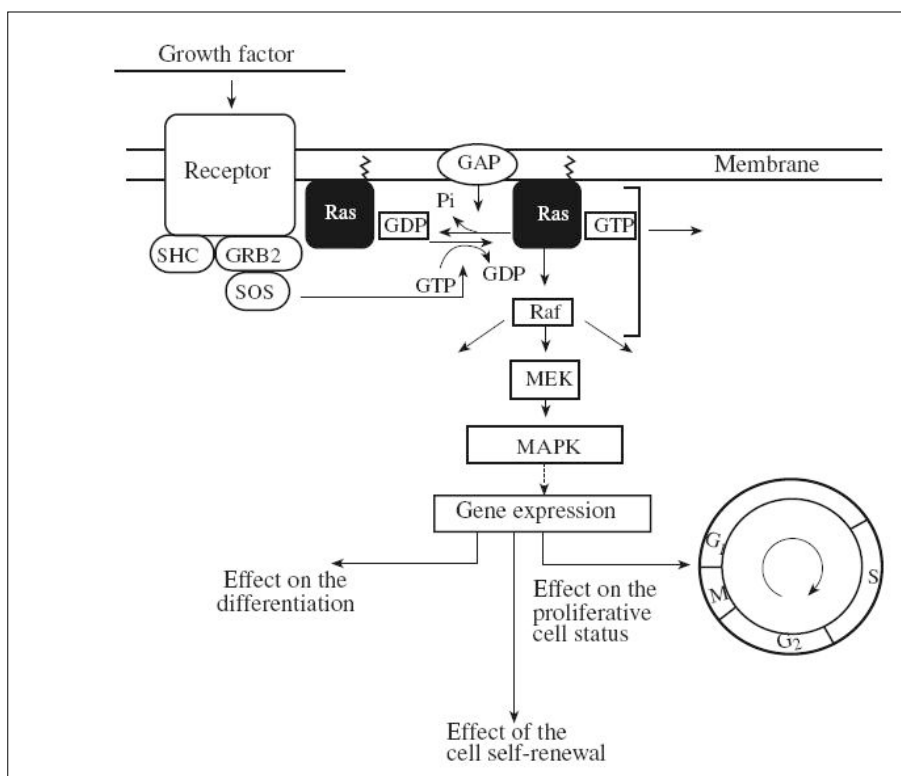


Figure 14. Transmission du signal d'un facteur de croissance à la cellule (Molchanova et al., 2008)

Les facteurs de croissance sont donc classiquement ajoutés dans les milieux de culture afin d'agir sur la réponse des CSM. Les principaux facteurs sont l'EGF (Epidermal Growth factor) (Tamama et al., 2006), le PDGF (Platelet derived Growth Factor) (Lucarelli et al., 2003), le FGF2, FGF4 et FGF8, le TNF- α (Tumor necrosis Factor alpha), le BMP-2 (Akino et al., 2003) et BMP-4, le TGF- β , et le HGF (Hepatocyte Growth Factor) (Molchanova et al., 2008). Le facteur de croissance FGF2 est connu pour augmenter le potentiel de prolifération des CSM tout en conservant leurs propriétés de multipotentialisme (Tsutsumi et al., 2001; Bianchi et al., 2003; Solchaga et al., 2005; Sotiropoulou et al., 2006; Song et al., 2008; Molchanova et al., 2008; Ahn et al., 2009). Cependant, plusieurs études ont montré que la réponse cellulaire dépendait de la concentration en FGF2. En effet, alors que de faibles concentrations de FGF2 améliorent la croissance cellulaire, une concentration plus élevée (30-40 ng/mL) peut promouvoir une différenciation cellulaire et inhiber la croissance (Tsutsumi et al., 2001; Song et al., 2008). Le facteur de croissance HGF est aussi connu

pour promouvoir la croissance des CSM et avoir des effets antiapoptotiques (Molchanova et al., 2008; Deuse et al., 2009). Le HGF serait d'ailleurs produit par le myocarde lors d'une ischémie aiguë pour recruter et amplifier les CSM (Deuse et al., 2009). Cependant, Forte et al. (2006) ont observé que l'HGF à une concentration de 20 ng/mL inhibait la croissance cellulaire des CSM. Les facteurs de croissance sont donc des composés pouvant induire des messages spécifiques aux CSM, selon leur concentration.

1.2.1.5. Les molécules inductrices de la différenciation

Des composés autres que le glucose, les acides aminés, les antioxydants et les facteurs de croissance peuvent également avoir une influence sur les CSM. Ces composés peuvent être des molécules synthétisées *in vivo* ou artificiellement. Ainsi, la sphingosylphosphorylcholine, un type de phospholipide, induirait une différenciation des CSM humaines en muscles lisses, en activant la voie signalétique de TGF- β (Jeon et al., 2006). Le nicotinamide permettrait une différenciation des CSM murines en cellules pancréatiques (Chen et al., 2004). Le glucagon-like peptide 1 (GLP-1) pourrait promouvoir la prolifération des CSM humaines et inhiber la différenciation adipogénique en activant la voie ERK-1/2 (Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2) (Sanz et al., 2010). De plus, une différenciation adipogénique serait induite par des composés se liant ou activant le facteur de transcription PPAR γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ), tels que les thiazolidinediones (Kolf et al., 2007), l'indométacine (Styner et al., 2010) et le dihydroxy-cholecalciférol (Mahajan et Stahl, 2009). Une différenciation cardiomyogénique peut être induite par la présence de phorbol myristate acétate ou de 5-azacytidine (Song et al., 2012).

1.2.1.6. Les milieux de culture

Depuis les premières cultures de CSM dans les années 1970, de nombreux milieux de culture ont été développés et utilisés. Ces milieux, dits «de base», sont composés d'éléments nutritifs et de molécules bioactives pour maintenir la survie des cellules. Les trois milieux de bases les plus utilisés dans les études cultivant des CSM sont l' α MEM (Alpha minimal essential medium) (Bosch et al., 2006; Schop et al., 2008, 2009 et 2010), le DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) (Bruder et al., 1997; Frauenschuh et al., 2007; Sart et al., 2009 et 2010; Deorosan et Nauman, 2011) et l'IMDM (Iscoe's modified dulbecco's medium) (Zhu et al., 2006; Liu et al., 2007). Chaque milieu possède des compositions différentes en sels, minéraux, glucose, acides aminés, vitamines, antioxydants et autres molécules. Il est souvent difficile de comparer les travaux d'expansion de CSM rapportés dans la littérature, en particulier parce que les compositions exactes des milieux ne sont pas systématiquement précisées. Des résultats semblent indiquer que l' α MEM permettrait d'obtenir une meilleure croissance des CSM que le DMEM (Javazon et al., 2001; Sotiropoulou et

al., 2006) (Figure 15). L'IMDM, quant à lui, permettrait la croissance de CSM murines mais pas celle de CSM humaines (Sotiropoulou et al., 2006).

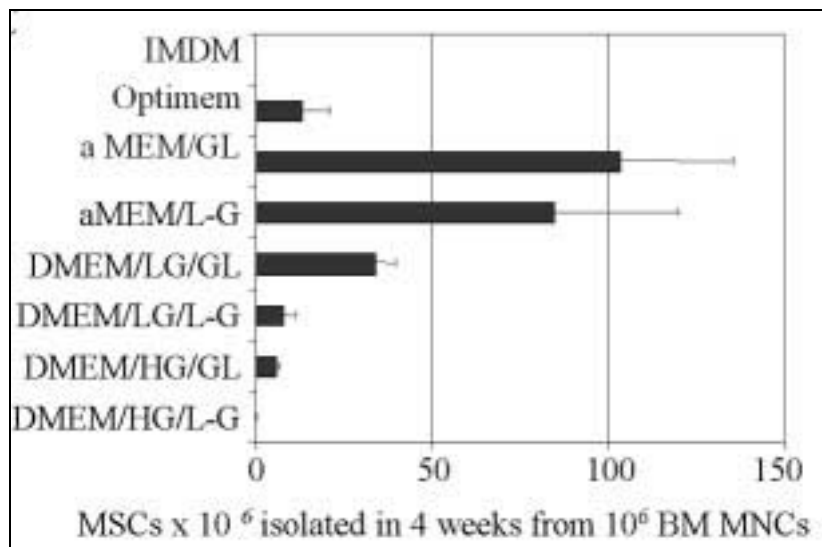


Figure 15. Nombre de CSM humaines (BM MNC : Bone Marrow Mononuclear Cells) obtenues après 4 semaines de culture dans différents milieux de culture de base, IMDM, Optimem, α MEM et DMEM, composés de L-glutamine (L-G) ou de Glutamax® (GL), d'une concentration faible en glucose (LG, low glucose) ou élevé (HG= high glucose). Tous les milieux sont supplémentés avec 10 % de sérum (Sotiropoulou et al., 2006)

Les milieux de culture de base ne contiennent cependant pas tous les composés nécessaires à la croissance des CSM, et sont ainsi classiquement supplémentés par du sérum de veau fœtal (SVF). Les protéines principalement présentes dans le sérum sont l'albumine et les immunoglobulines. Le SVF contient également des facteurs de croissance et des hormones mitogènes (insuline, PDGF, FGF, EGF), des lipides, des protéines de transport et des agents détoxifiants (albumine, transferrine), des facteurs d'attachement (collagène, fibronectine, vitronectine), des inhibiteurs de protéases (inhibiteur de trypsine), des agents protecteurs du cisaillement (albumine et protéines de grande taille), des éléments nutritifs (glucose), des purines et pyrimidines, des vitamines (group B, C, E), ainsi que des éléments traces et des composés inorganiques (cuivre, magnésium, zinc, sélénium) (Keenan et al., 2006). L'absence de SVF dans le milieu de culture de base provoque après quelques jours l'apoptose des CSM (Zhu et al., 2006), mais permet à court terme de sélectionner en début de culture une sous-population de CSM plus proliférative (Pochampally et al., 2004).

Les milieux de culture de base destinés aux CSM sont donc classiquement supplémentés par 5 à 20 % de SVF. Cependant, les régulations sanitaires restreignent de plus en plus la présence de substances animales dans les milieux de culture de CSM à usage thérapeutique. Le SVF doit donc être remplacé par des molécules d'origine non-animale ou humaine. Des milieux de culture sans SVF ont déjà été développés pour les lignées continues depuis les années 1980. L'utilisation de CSM à des fins thérapeutiques étant

émergente, le développement de milieu de culture sans SVF pour ces cellules est assez récent. Dans un premier temps, des milieux de culture spécifiques pour CSM ont été développés pour réduire les besoins en SVF, tels que le milieu MesenPro® (Life Technologies). L'utilisation de MesenPro® supplémenté de 2 % de SVF a permis d'obtenir de meilleures croissances cellulaires qu'avec du milieu DMEM supplémenté par 10 % de SVF (Eibes et al., 2010) (Figure 16).

Parallèlement, des substituts de SVF ont été testés avec succès, tels que le lysat de plaquettes (Doucet et al., 2005; Bernardo et al., 2006; Lange et al., 2007) et le sérum humain (Shahdadfar et al., 2005; Kocaoemer et al., 2007). Grâce à un plan d'expériences réalisé en microplaques, un milieu de culture sans sérum a été mis au point pour des CSM humaines (Liu et al., 2007). Ce milieu est composé du milieu de base IMDM, supplémenté par du FGF2 (17,91 ng/mL), de l'albumine humaine (2,80 mg/mL), de l'hydrocortisone (27,65 μ M), et un cocktail de molécules appelé SITE (1,18 %), contenant du sélénite de sodium (0,5 g/mL), de l'insuline bovine (1 mg/mL), de la transferrine humaine (0,55 mg/mL) et de l'éthanolamine (0,2 mg/mL). Ce milieu de culture permet de multiplier le nombre de CSM de cordon ombilical humain par 1000 en 1 mois. L'utilisation de molécules recombinantes humaines pour la culture de CSM à usage thérapeutique est à favoriser par rapport aux molécules purifiées de tissus humains, les risques de transmission de facteurs pathogènes étant les mêmes que pour le SVF. Plusieurs milieux de culture commerciaux sans sérum sont également disponibles, mais leur composition reste confidentielle. Par exemple, le milieu MyeloCult® (StemCell Technologies Inc.) a permis la culture de CSM en suspension, alors qu'elle est impossible dans du DMEM supplémenté par 10 % de SVF (Chen et al., 2006). L'utilisation d'hydrolysats ou de peptones d'origine végétale ou de levures comme substitut de SVF n'a pas encore été testé en culture de CSM.

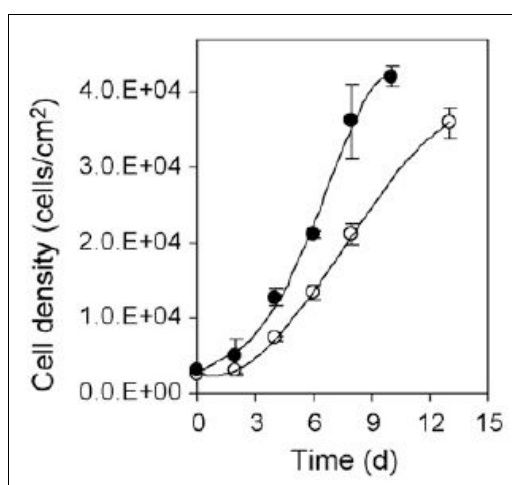


Figure 16. Comparaison entre deux milieux de culture pour CSM humaines. ●: MesenPro® supplémenté de 2 % de SVF, ○: DMEM supplémenté de 10 % de SVF. Ensemencement cellulaire de 3000 cellules/cm² et changement de milieu tous les 4 jours (Eibes et al., 2010)

1.2.2. Influence des paramètres physico-chimiques

Tout comme son environnement biochimique, la moelle osseuse assure également un environnement physico-chimique particulier. Ainsi, au sein de la moelle osseuse, le taux d'oxygène s'affaiblit au fur et à mesure que l'on s'éloigne des capillaires sanguins. De plus, la température classique d'un organisme humain étant de 37°C, cette température peut varier dans la moelle osseuse. Le pH est régulé autour de 7,4 dans le sang et permet d'éviter une augmentation ou une diminution du pH néfaste pour les cellules. L'osmolarité est également régulée dans le sang autour de 290 mOsm, et permet de maintenir la pression osmotique des cellules, une hypotonie pouvant provoquer la lyse cellulaire. Les CSM adhèrent à une matrice extracellulaire et à d'autres types cellulaires présents dans la moelle osseuse. Ces contacts ont également un effet sur le comportement des CSM. Des caractéristiques telles que le matériau, la porosité, la charge, ou l'élasticité peuvent influencer *in vitro* les fonctions d'adhérence, de prolifération, de sécrétion de matrice extracellulaire, d'apoptose et de différenciation des CSM. L'environnement physico-chimique des CSM contribue donc à réguler leur viabilité, leur croissance, et leur différenciation, via des cascades d'informations transmises par des protéines intracellulaires ou des récepteurs membranaires.

1.2.2.1. Le taux d'oxygène dissous

La niche des CSM au sein de la moelle osseuse présente une faible concentration d'oxygène dissous, entre 4 et 7 % (Schop, 2010). Le niveau d'oxygène dissous en équilibre avec l'air, classiquement utilisé dans la culture de CSM, pourrait induire des stress oxydatifs et des instabilités génomiques (Estrada et al., 2011). Dans une étude de Rochefort et al. (2006), des rats placés en conditions de faible concentration en oxygène voient leur nombre de CSM dans le sang périphérique augmenter de 15 fois par rapport à des rats placés en conditions atmosphériques. Une faible concentration d'oxygène attirerait donc les CSM hors de leur niche. Une étude de Mylotte et al. (2008) décrit la culture de CSM en présence d'un inhibiteur de la respiration mitochondriale (2,4-dinitrophénol) pendant 72 heures. Les cellules ont survécu en utilisant la voie de la glycolyse. La respiration mitochondriale, et donc l'oxygène, ne seraient pas indispensables à la survie des CSM.

Les CSM sont aussi connues pour proliférer plus rapidement à de faibles concentrations en oxygène (Rochefort et al., 2006; Grayson et al., 2007; Fehrer et al., 2007; Ohnishi et al., 2007). Dans une étude de Grayson et al. (2007), le facteur de multiplication de CSM cultivées à de faibles concentrations d'oxygène pendant 6 semaines était 30 fois supérieur à celui observé en conditions de culture classique. Fehrer et al. (2007) ont observé 10 doublements de population supplémentaires avant la sénescence répliquative de CSM

humaines à 3 % de pression partielle d'oxygène (pO_2) par rapport à 20 %. De plus, ils ont observé que les CSM ne pouvaient pas se différencier en adipocytes ni en ostéocytes à 3 % de pO_2 , mais que leur capacité de différenciation était restaurée à 20 % de pO_2 . Enfin, Dos Santos et al. (2010) ont montré qu'un facteur de multiplication des CSM de 40 était obtenu à 2 % de pO_2 comparé à un facteur de 30 à 2 % de pO_2 . La mesure et la régulation de la pO_2 peuvent toutefois être critiquées dans les travaux de Fehrer et Dos Santos, ces paramètres n'étant pas détaillés.

Dos Santos et al. (2010) ont également observé une évolution du métabolisme des CSM en fonction de la concentration en oxygène, avec une plus grande vitesse spécifique de consommation de glucose et de glutamine et une plus faible vitesse spécifique de production de lactate et d'ions ammonium à 2 % de pO_2 qu'en normoxie. Un exemple de la vitesse spécifique de consommation de glucose des CSM selon le taux d'oxygène est rapporté dans la Figure 17. L'influence de la pO_2 sur le comportement cellulaire serait modulée par le facteur HIF, facteur de transcription activé par l'absence d'oxygène, et qui stimulerait la prolifération cellulaire tout en inhibant la différenciation et en activant les enzymes de la glycolyse (Chen et al., 2010).

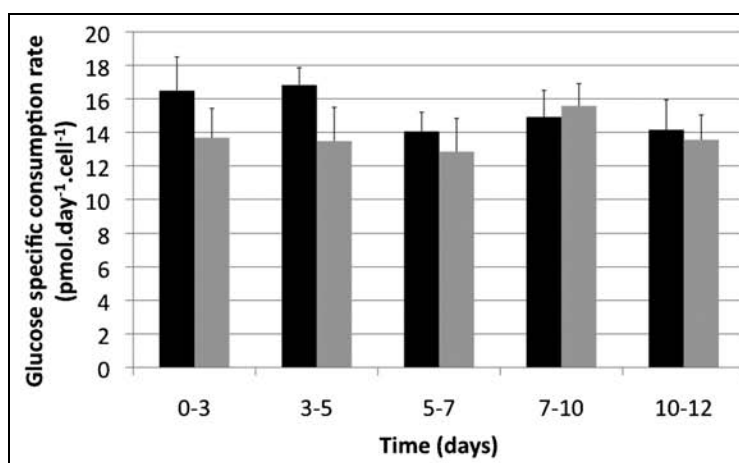


Figure 17. Vitesses spécifiques de consommation de glucose de CSM humaines en microplaques. ● : 2 % de pO_2 ; ● : 20 % de pO_2 (Dos Santos et al., 2010)

1.2.2.2. La température, le pH et l'osmolarité

La température de la moelle osseuse est de 1,6 à 4,8°C inférieure à la température moyenne de l'organisme des mammifères (Gurkan et Akkus, 2008). Une seule étude rapporte cependant les effets de la température sur les CSM (Stolzing et al., 2006). Par rapport à la température classiquement utilisée de 37°C pour la culture des CSM, une température de 32°C ne diminue pas leur viabilité, mais au contraire réduit l'apoptose. De plus, une augmentation des défenses antioxydantes des CSM est observée lors de cultures

réalisées à 32°C par rapport à 37°C. La croissance cellulaire est cependant diminuée, avec un total de 14 doublements de population (DP) à 32°C par rapport à 16,2 DP à 37°C.

Concernant le pH, celui-ci est régulé au sein de la moelle osseuse comme dans le reste de l'organisme, grâce à l'équilibre acide carbonique/bicarbonate. Quelques études traitent de l'effet du pH sur les CSM. Alors que Kohn et al. (2002) démontrent qu'une baisse de pH de 7,5 à 6,6 diminue la différenciation ostéogénique des CSM, Chen et al. (2008) analysent l'effet négatif du lactate sur la croissance des CSM, et démontrent que cela est dû à une baisse du pH. Puis, Wuertz et al. (2009) montrent que l'environnement acide des disques intervertébraux réduit la viabilité et la prolifération des CSM. Enfin, Schop (2010) cultive des CSM sur microporteurs en bioréacteur contrôlé à pH 7,3. Le contrôle du pH permet de prolonger la phase de croissance des CSM par rapport à une culture à pH non contrôlé.

Concernant l'osmolarité, elle est également régulée dans l'organisme, par augmentation ou diminution de la réabsorption de l'eau au niveau des reins, et est comprise entre 275 et 299 mOsm. Une étude récente montre que l'osmolarité n'avait pas d'effet sur la croissance de CSM en culture lorsqu'elle était comprise entre 301 et 334 mOsm (Chen et al., 2008).

1.2.2.3. Les surfaces d'adhérence

Les surfaces d'adhérence des CSM représentent un autre paramètre particulier à la moelle osseuse, les CSM étant en contact avec une matrice extracellulaire et d'autres cellules (Kolf et al., 2007). L'adhérence affecte la plupart des fonctions de la cellule, de la prolifération à la différenciation (Berrier et Yamada, 2007) (Figure 18). Le mécanisme d'adhérence des cellules animales comporte plusieurs étapes. Le premier élément de la cellule à interagir avec une surface est son enveloppe d'acide hyaluronique. Puis, l'adhérence devient spécifique au fur et à mesure des interactions avec les intégrines (Cohen et al., 2004), récepteurs membranaires qui modulent l'adhérence des cellules. Chaque récepteur est composé de deux glycoprotéines transmembranaires avec un large domaine extracellulaire et une courte partie cytoplasmique. Les intégrines se lient à des ligands de surface cellulaire, de matrice extracellulaire (fibronectine, laminine, collagènes, ténectine, vitronectine, etc.), ou de protéines solubles (Docheva et al., 2007). Le motif commun reconnu par les intégrines est composé du triplet d'acides aminés arginine-glycine-acide aspartique (RGD) (Lai et al., 2010). Ce motif peut être greffé sur une surface pour la rendre plus apte à l'adhérence cellulaire (Durrieu, 2005).

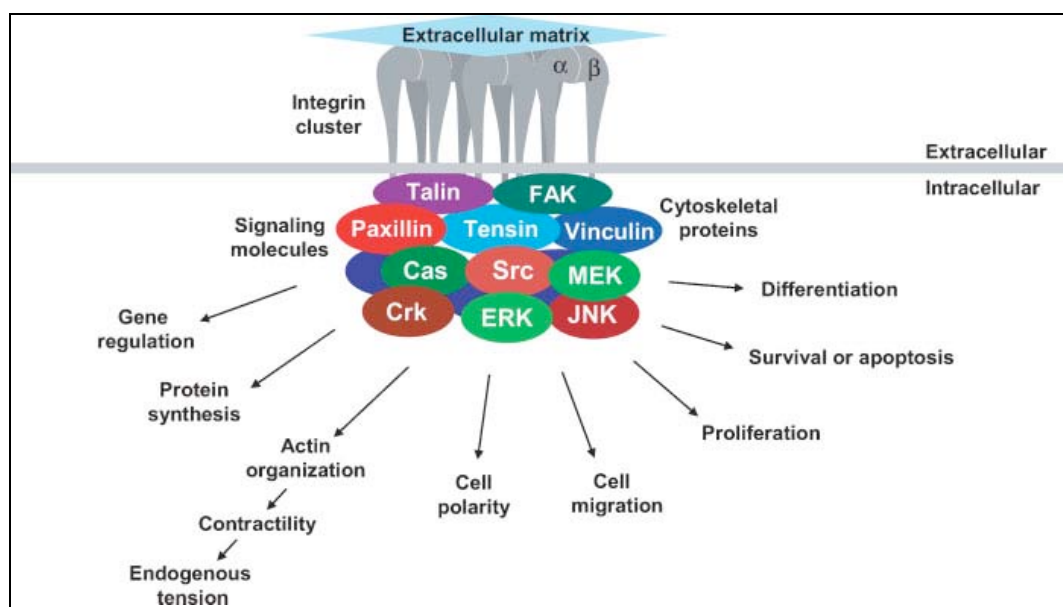


Figure 18. Influence de l'adhérence sur les fonctions d'une cellule animale (Berrier et Yamada, 2007)

Le rôle des intégrines est de transmettre des informations de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule, et inversement. Une fois les intégrines liées aux ligands, elles se regroupent et forment des sites d'adhérence focale. Ces sites établissent la polarité de la cellule, et maintiennent sa viabilité et sa prolifération. En effet, les intégrines peuvent interagir avec certaines cyclines, et réguler ainsi la progression du cycle cellulaire. Les intégrines interagissent également avec la famille des Rho Guanosine triphosphatases (GTPases), qui sont des régulateurs clé du cytosquelette d'actine, de la transcription génique et de l'adhérence (Docheva et al., 2007). Une étude de McBeath et al. (2004) souligne l'implication de Rho A dans la différenciation des CSM en fonction de l'adhérence. Si la cellule peut adhérer et s'étaler sur une surface, RhoA sera activé et une différenciation ostéogénique sera engagée. En revanche, si la cellule ne peut adhérer que faiblement en restant dans une morphologie ronde, RhoA ne sera pas activé et une différenciation adipogénique sera alors engagée. Il existe donc un lien indirect entre l'adhérence des CSM et leur multipotence, modulée par les intégrines et les Rho GTPases. Certaines molécules ont été démontrées comme étant capables d'induire une différenciation ostéogénique des CSM après avoir adhéré dessus, tels que l'héparine (Benoit et al., 2007) et le collagène I (Batorsky et al., 2005; Song et al., 2008).

Curran et al. (2006) ont effectué une étude plus approfondie en cultivant des CSM sur des surfaces de silane modifiées avec différents groupes de molécules. Les surfaces modifiées avec un groupe méthyle ($-CH_3$) maintenaient le phénotype indifférencié des CSM, alors que les surfaces modifiées avec un groupe amino ($-NH_2$) ou un groupe silane ($-SH$) induisaient seulement une différenciation ostéogénique, et les surfaces modifiées avec un groupe hydroxyle ($-OH$) ou un groupe carboxyle ($-COOH$) induisaient seulement

une différenciation chondrogénique. Cela démontre à quel point le système d'adhérence des CSM est sensible et peut moduler la réponse de la cellule en fonction du support.

Engler et al. (2006) démontrent que le degré d'élasticité de la surface d'adhérence peut également influencer la différenciation des CSM. En effet, la cellule est capable d'estimer l'élasticité de son support. Un support avec une élasticité proche de celle du cerveau (0,1-1 kPa) favorise la différenciation neuronale, une élasticité proche de celle des muscles (8-17 kPa) favorise une différenciation myogénique, et une élasticité proche des ostéoïdes (25-40 kPa) favorise une différenciation ostéogénique (Figure 19). Notons que l'élasticité des flacons de culture en polystyrène est de l'ordre de 10^6 kPa, correspondant à celle d'os rigides. Cela pourrait expliquer la diminution du potentiel de multipotence des CSM lors de leur phase d'expansion en flacon de culture (Kim et al., 2008).

La rigidité d'une surface influencerait également le profil sécrétoire des CSM (Seib et al., 2009). Par exemple, la concentration d'interleukine IL-8 sécrétée par les CSM en 2 jours est 90 fois plus élevée quand les cellules sont cultivées sur une surface dure par rapport à une surface molle. Par ailleurs, il semblerait que les CSM au sein de leur niche forment un réseau tridimensionnel avec les autres cellules présentes, telles que des adipocytes et des cellules souches hématopoïétiques, sans être complètement adhérentes à une matrice extracellulaire. Pour l'instant, aucun support de culture favorisant l'état indifférencié des CSM n'a été identifié (Kolf et al., 2007). L'expansion de CSM serait donc probablement plus appropriée sur des gels d'élasticité intermédiaire que sur les traditionnels flacons de culture à surface dure.

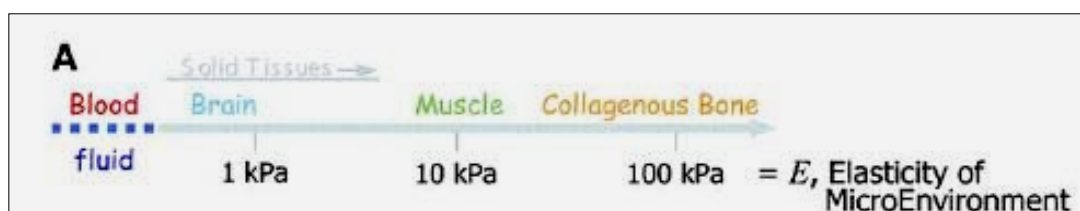


Figure 19. Élasticité des microenvironnements (Engler et al., 2006)

Les propriétés d'hydrophobie et de charge électrique d'un support jouent également un rôle important pour l'adhérence des CSM. Le polystyrène des flacons de culture est initialement non chargé et hydrophobe, réduisant ainsi l'adhérence des cellules. Après traitement, le plastique est chargé négativement et hydrophile, permettant une bonne adhérence des cellules. Une surface dite « Ultra-Low Attachment® » de Corning, développée pour empêcher toute adhérence, est neutre et hydrophile. Notons que les CSM n'adhèrent pas non plus sur l'agarose (Debruyne et al., 2009) ni sur le PEG (polyéthylène glycol) (Benoit et al., 2007).

1.2.2.4. Les forces mécaniques

Les CSM peuvent subir de nombreuses forces mécaniques, qui influencent leur réponse cellulaire, notamment leur différenciation. Au sein de leur niche, la pression dans la moelle osseuse est quatre fois plus faible que la pression sanguine moyenne, et le milieu est considéré comme visqueux (de 37,5 à 400 mPa/s) (Gurkan et Akkus, 2008). Dans ces conditions, les contraintes hydrodynamiques subies par les CSM sont probablement faibles. Lors de l'expansion cellulaire *in vitro*, les CSM sont exposées à de nombreux stimuli mécaniques, tels que la tension, la compression, et le cisaillement (Chiquet et al., 2009).

Les cellules perçoivent et intègrent les stimuli mécaniques par mécanotransduction, principalement aux sites d'adhérence (Chiquet et al., 2009) (Figure 20). La mécanotransduction est un mécanisme par lequel une stimulation physique est convertie intracellulairement en différents signaux électriques ou chimiques. Les contraintes mécaniques à la surface de la cellule seraient traduites en signaux chimiques par l'ouverture de canaux cationiques activés par l'étirement. Une autre hypothèse serait que ce sont les protéines d'adhérence qui feraient office de récepteurs aux contraintes mécaniques. Les cascades signalétiques activées immédiatement après un stress mécanique sont un influx de calcium et une activation des signaux calcium-dépendants, une génération de ROS et une activation de NFκB (nuclear factor kappa-B) (Ammar et al., 2005), une stimulation des GTPases de la famille Ras et des MAP kinases, et enfin un changement d'activité des GTPases de la famille Rho et de la dynamique du cytosquelette. Les forces mécaniques ont également un effet sur la production de la matrice extracellulaire, induite plus tardivement : une production de fibronectine par les CSM n'apparaissant que 24 h après une stimulation mécanique (Chiquet et al., 2009).

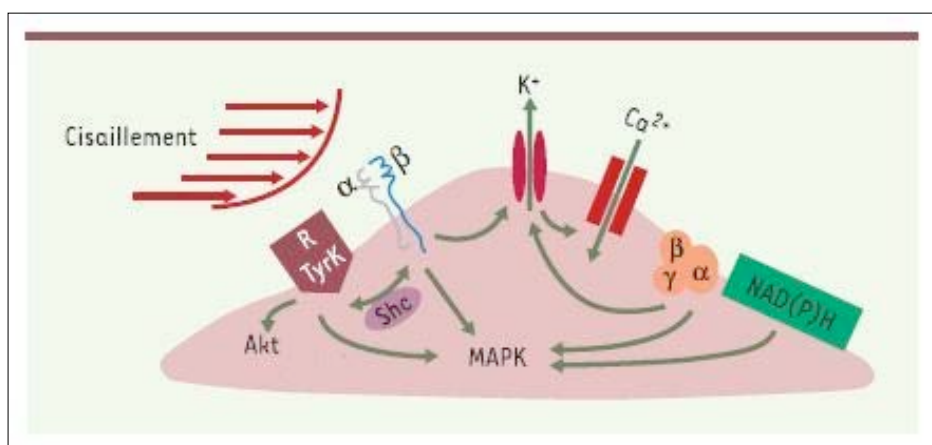


Figure 20. Mécanisme de mécanotransduction des contraintes de cisaillement sur la cellule. Des récepteurs spécifiques à la mécanotransduction, tels que les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTyrk), les intégrines (hétérodimères α et β), les canaux potassiques, les protéines G hétérotrimériques ($\alpha\beta\gamma$), et la NAD(P)H oxydase. L'activation d'un ou de plusieurs de ces récepteurs peut conduire à l'entrée de calcium ou à l'activation de différentes cascades biochimiques. Shc: protéine adaptatrice; MAPK: voie des MAP-kinases (mitogen activated protein kinases), (Lehoux et Tedgui, 2004)

Les CSM sont donc équipées pour percevoir les contraintes mécaniques. Ces forces mécaniques agissent comme des messagers, indiquant aux cellules la voie de différenciation à suivre. Ainsi, une force de tension indiquera une différenciation en os, en tendon ou en muscle, une force de compression indiquera une différenciation en cartilage, et une contrainte de cisaillement induira une différenciation en cellules endothéliales (Chiquet et al., 2009). Par ailleurs, pour obtenir une différenciation de CSM en muscles vasculaires lisses, une étude de Park et al. (2004) a mimé l'environnement des parois de vaisseaux sanguins en appliquant une force mécanique uniaxiale (Figure 21). Après 24 h, l'expression génique des marqueurs de muscles lisses (alpha-actine, SM-22-alpha, collagène I) avait augmenté. Cette augmentation était cependant transitoire et disparaissait après 48 h. Il est intéressant de noter que l'application d'une force mécanique équiaxiale, comparée à une force uniaxiale, n'avait pas d'effets significatifs sur l'expression des marqueurs de muscles lisses. Les CSM sont donc capables de différencier une force uniaxiale d'une force équiaxiale.

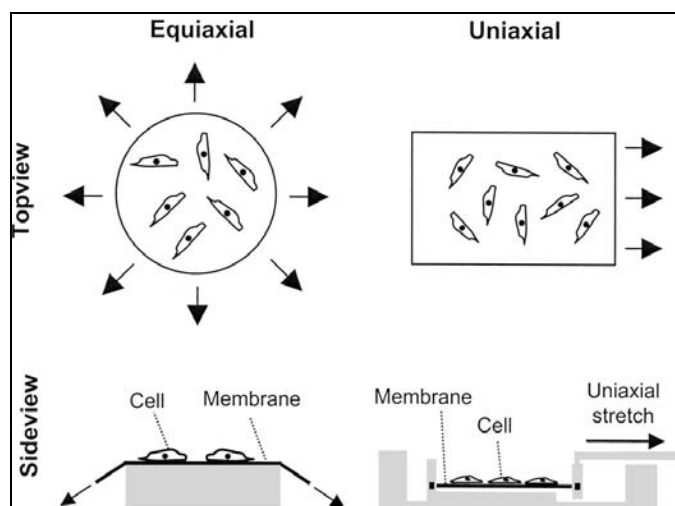


Figure 21. CSM soumises à deux types de contrainte mécanique: contrainte équiaxiale (système Flexcell®) et uniaxiale (Park et al., 2004)

D'un autre côté, les forces de compression peuvent induire une différenciation chondrocytaire. Des CSM soumises à des pressions hydrauliques exhibent une augmentation de marqueurs chondrocytaires après quelques jours, tels que les protéoglycanes et le collagène II (Huang et al., 2010).

Enfin, les forces de cisaillement peuvent induire une différenciation endothéliale. Une étude de Wang et al. (2008) montre qu'une force de cisaillement de 1,5 Pa imposée sur des CSM embryonnaires pendant 24 h induirait une différenciation endothéliale en inhibant la voie signalétique de TGF- β 1. Des études plus approfondies ont montré qu'une contrainte de cisaillement modifiait l'expression protéique et génique des CSM. Ainsi, une force de 0,3 Pa appliquée pendant 6 h à des CSM humaines a augmenté l'expression de 10 types de protéines, en particulier l'annexine A2 et la GAPDH (Yi et al., 2010). De plus, une force de 0,1 à 1

Pa appliquée pendant 1 h à des CSM humaines a modifié l'expression de plus de 400 gènes (Glossop et al., 2008). Une autre étude démontre qu'une contrainte de cisaillement oscillatoire de 2 Pa pendant 1 h induirait une meilleure prolifération des CSM en augmentant la concentration intracellulaire en calcium et en activant ERK-1/2 et la calcineurine (Riddle et al., 2006).

Outre la différenciation, les forces mécaniques ont également un effet sur la viabilité des cellules. Dans l'étude rapportée par Kearney et al. (2008), une force cyclique uniaxiale a été appliquée pendant 3 jours à des CSM ensemencées sur une membrane de silicone. Une déformation de plus de 7,5 % induisait l'apoptose des cellules par l'ouverture de canaux à calcium voltage-dépendant, déclenchant ainsi l'activation de la calpaïne et de JNK (c-Jun N-terminal kinase) (Kearney et al., 2008).

La phase d'expansion des CSM doit donc être réalisée avec le moins de forces mécaniques possible, ceci afin d'éviter toutes inductions de différenciation ou parfois d'apoptose.

Cette deuxième partie de l'étude bibliographique a permis de présenter l'influence de nombreux paramètres biochimiques et physico-chimiques sur le comportement des CSM. Il est à souligner que chaque paramètre possède un rôle bien précis dans le fonctionnement des CSM au sein de leur niche *in vivo*, et donc lors de l'expansion en culture *in vitro*. Selon leur nature, ces paramètres indiquent à la cellule de proliférer, de se différencier ou d'entrer en apoptose. Les conditions de culture des CSM doivent donc être contrôlées avec soin, afin de favoriser la prolifération et d'éviter toute différenciation ou apoptose. Dans ce sens, l'utilisation de bioréacteurs contrôlés peut présenter un intérêt, car elle permet de suivre en ligne les paramètres de culture et de les réguler si besoin. Jusqu'à maintenant, plusieurs procédés d'expansion des CSM ont été proposés, de la microplaque aux bioréacteurs contrôlés. La troisième partie de l'étude bibliographique se propose de les présenter.

1.3. Procédés d'expansion des CSM

Les procédés d'expansion de CSM rapportés dans la littérature sont encore récents et peu nombreux. Même si la culture en masse de cellules animales a commencé il y a plusieurs dizaines d'années par la culture de lignées continues, ces procédés sont en continuel développement, afin d'améliorer la croissance des cellules, d'augmenter la quantité de protéines sécrétées, et de réduire les coûts (Yokomizo et al., 2004). Les connaissances acquises avec ces procédés peuvent être transposées aux CSM, même si de nombreuses différences existent entre les CSM et les lignées continues (Placzek et al., 2009; Papoutsakis, 2009). Les différents procédés d'expansion proposés pour les CSM seront présentés en fonction du support utilisé. Les premiers supports statiques, tels que les flacons ou les matrices, sont mis en œuvre avec différents modes d'alimentation du milieu de culture. Puis, afin de pouvoir transférer les cultures de CSM en bioréacteur contrôlé, l'expansion sur supports agités est réalisée avec des microporteurs. Enfin, la nécessité de produire des cellules de meilleure qualité thérapeutique, sans trypsination des cellules et sans pollution par des fines, oriente vers la culture sans support, telle que la culture en suspension de cellules dissociées ou sous forme agrégée.

1.3.1. Expansion sur supports statiques

Les premiers procédés d'expansion de CSM ont été réalisés sur des supports statiques, sans agitation du milieu de culture (Friedenstein et al., 1968). Ces systèmes sont placés dans des incubateurs régulés en température et en CO₂ (37°C, 5 % de CO₂). Après plusieurs jours de culture, la production de lactate acidifie le milieu. Ainsi, classiquement, le milieu de culture est changé complètement tous les 2 à 3 jours. On parle alors de culture sous perfusion séquentielle. Comme le changement brutal du milieu de culture peut provoquer un stress pour les cellules, une perfusion continue du milieu peut être mise en place : le milieu de culture est introduit dans le réacteur, et soutiré en continu à l'aide d'une pompe. Les cultures sur supports statiques peuvent donc être classées en fonction de l'alimentation du milieu de culture, soit en mode de perfusion séquentielle, soit en mode de perfusion continue.

1.3.1.1. Cultures sur supports statiques en mode de perfusion séquentielle

Chronologiquement, les CSM ont d'abord été cultivées en boîtes de Pétri ou en flacons de verre. Puis, les flacons traditionnels ont été remplacés par des flacons en polystyrène. Non traité, le polystyrène est une

surface hydrophobe non chargée sur laquelle les cellules n'adhèrent que faiblement. Afin d'augmenter l'adhérence des cellules, le polystyrène est rendu hydrophile et chargé négativement par traitement électrique à haute tension. Dans une étude d'expansion de CSM humaines, Sotiropoulou et al. (2006) ont comparé des flacons de 75 cm² de différents fabricants. Parmi les différents fournisseurs (Falcon®, Costar®, Nunc® et Greiner®), la meilleure croissance est obtenue après 4 semaines dans les flacons produits par Falcon®. Les auteurs émettent l'hypothèse que le traitement du polystyrène en chambre fermée, spécifique à ce fabricant, diminuerait la quantité d'impuretés dans le plastique.

Les CSM présentent une inhibition de contact et prolifèrent en monocouche, ce qui nécessite l'utilisation de grandes surfaces pour leur amplification (Bourin et Gadelorge, 2007). De plus, des concentrations d'ensemencement faibles semblent bénéfiques, ce qui augmente encore les surfaces de culture nécessaires (Javazon et al., 2001; Sekiya et al., 2002; Sotiropoulou et al., 2006; Neuhuber et al., 2008). En effet, Javazon et al. (2001) obtiennent un facteur de multiplication des cellules de 4500 en 14 jours avec un ensemencement de 2 cellules/cm². De même, Sekiya et al. (2002) obtiennent en 12 jours des facteurs de multiplication de 500 et 30 pour des ensemencements de 10 et 1000 cellules/cm², respectivement. Enfin, Sotiropoulou et al. (2006) ensemencent des CSM humaines à 100 cellules/cm² et obtiennent un facteur de multiplication de 865 en 7 jours. Toutes ces études sont effectuées à petite échelle, dans des flacons de 75 cm² ou moins. Bartmann et al. (2007) ont étudié l'expansion de CSM humaines à plus grande échelle dans un système de culture de type CellFactory® (Nunc®) et à faible ensemencement. En 4 semaines, 1,5 x 10⁸ cellules sont obtenues sur une surface de 25 000 cm². Cependant, même si le facteur de multiplication est plus élevé à une faible concentration d'ensemencement, la quantité de cellules finales est supérieure à plus fortes concentrations d'ensemencement (Figure 22).

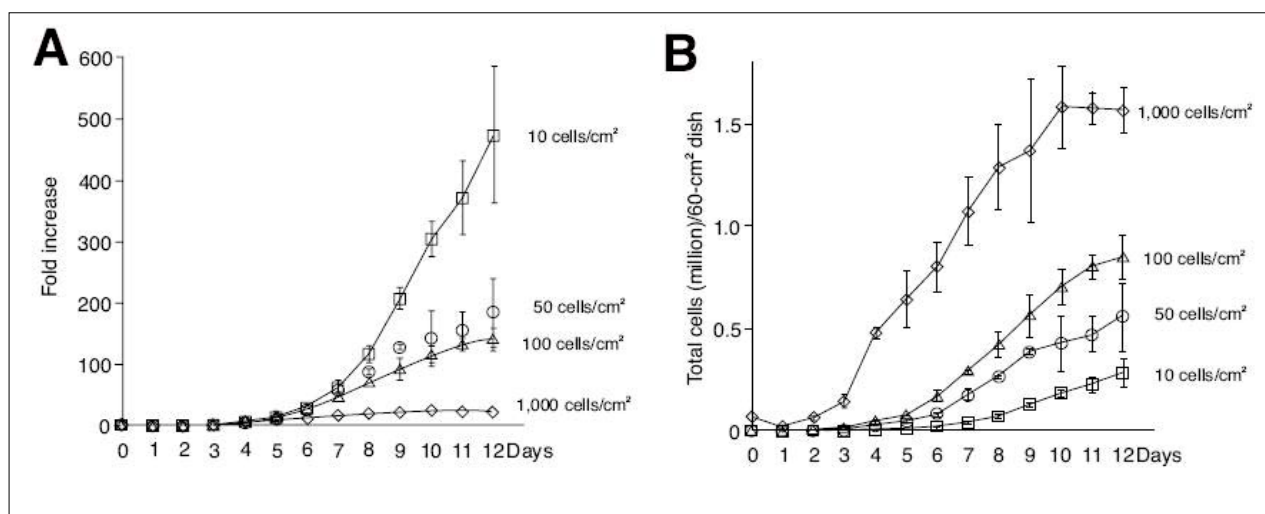


Figure 22. Effet d'une concentration d'ensemencement faible en flacon de 60 cm². A: Taux de multiplication cellulaire. B: Quantité de cellules obtenues. (Sekiya et al., 2002)

L'un des inconvénients des flacons statiques est le risque de contamination lié aux fréquentes manipulations lors des passages et des changements de milieu. Afin de pallier ce problème, des systèmes de cultures automatisés en chambres stériles ont été développés (Kino-Oka et Taya, 2009). Un autre inconvénient des flacons est la dureté du polystyrène qui peut conduire à une différenciation précoce des cellules à long terme (Engler et al., 2006). Cela peut être contourné en ajoutant une couche plus molle au fond des flacons, de type gel. Les flacons offrent également peu de possibilités de contrôle des paramètres physico-chimiques. Le développement de capteurs adhésifs de type Fluorometrix® ou PreSens® permet maintenant le suivi en ligne du pH et de la concentration en oxygène dissous. Cependant, une véritable régulation est compliquée à mettre en place. Enfin, l'extrapolation de ce type de culture nécessite l'utilisation de flacons à plusieurs étages de type CellFactory®, dont l'usage est contraignant, notamment au niveau du changement de milieu ou de la trypsination des cellules. Les systèmes de cultures en flacons sont donc essentiellement adaptés à la petite échelle.

1.3.1.2. Culture sur supports statiques en mode de perfusion continue

Le mode de culture perfusée présente de nombreux avantages. Il permet d'apporter en continu les éléments nutritifs et de soutirer les sous-produits métaboliques, tout en créant un environnement cellulaire homogène. Un exemple de culture sur support statique perfusée est rapporté par Scaglione et al. (2008). Des CSM humaines sontensemencées sur des plaques de verre de 20 cm², et un débit de 2,8 mL/min de milieu (3888 volumes/jour) est appliqué. Après 10 jours de culture, 5 doublements de population des CSM sont observés en culture statique discontinue contre seulement 3 en mode perfusé. Les principaux facteurs de transcription ostéogénique étant augmentés lors de la culture perfusée, les auteurs soulignent que les forces hydromécaniques générées par la perfusion pourraient induire cette différenciation, inhibant ainsi la prolifération cellulaire.

En parallèle des cultures en monocouches réalisées en flacon, les cultures perfusées peuvent aussi être mises en œuvre sur des matrices statiques. Les cultures de CSM sur des matrices sont principalement étudiées pour des applications en ingénierie tissulaire, notamment pour la différenciation ostéogénique. En effet, la culture tridimensionnelle permet d'obtenir une architecture proche des tissus osseux.

Certains auteurs combinent l'expansion et la différenciation cellulaire dans une même matrice. C'est le cas de Zhao et Ma (2005), qui amplifient des CSM humaines dans des matrices de PET modifié (Figure 23). Les cellules sontensemencées dans des petits disques de PET comportant des pores de 20 à 50 µm. Le milieu de culture est perfusé à 0,1 mL/min et le réservoir est changé tous les 5-8 jours. Le nombre de cellules est calculé par quantification de l'ADN après marquage par des sondes fluorescentes. En 40 jours, la densité

cellulaire atteint $4,2 \times 10^7$ cellules/mL, soit un facteur de multiplication de 53, après une phase de latence de 20 jours. Les cellules sont uniformément distribuées à travers la matrice. Lors de cette étude, la culture perfusée est comparée à des cultures en mode de perfusion séquentielle en microplaques. Les matrices en PET ont été placées au fond des puits et le milieu est changé tous les 2 jours. Contrairement aux cultures perfusées, la concentration cellulaire en microplaques atteint un plateau à partir du 25^{ème} jour de culture, avec un facteur de multiplication de 4,3. De plus, les cellules ne sont pas uniformément distribuées au sein de la matrice, mais plutôt sous forme d'agrégats à la périphérie. Les avantages de la perfusion sont donc ici mis en évidence lors de cultures sur matrice.

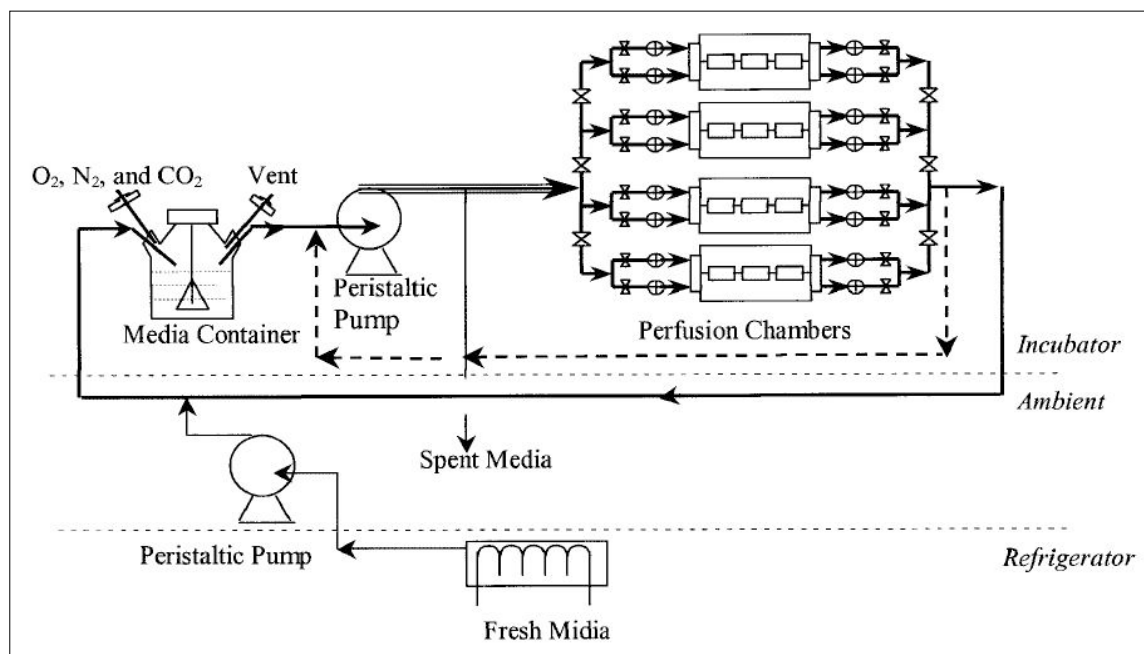


Figure 23. Schéma de l'installation des chambres de perfusion pour la culture de CSM humaines sur support statique (Zhao et Ma, 2005)

1.3.2. Culture de CSM sur microporteurs en mode agité

Pour améliorer l'expansion des CSM, le mode de culture agitée offre de nombreux avantages par rapport à la culture en monocouche statique. Tout d'abord, l'agitation du milieu de culture assure une plus grande homogénéité et moins de gradients de concentration. Par ailleurs, ce mode de culture permet la mise en œuvre en bioréacteurs pour effectuer plus facilement le suivi en ligne et le contrôle de paramètres opératoires. De plus, la culture de CSM en mode agité permet l'utilisation de microporteurs qui offrent en général un ratio de surface d'adhérence sur volume de milieu de culture supérieur aux cultures statiques, réduisant ainsi le volume et les coûts de milieu de culture.

Les premières cultures de CSM sur microporteurs pour une expansion à grande échelle ont débuté avec les travaux de Yang et al. (2007) et Frauenschuh et al. (2007). Depuis, environ une dizaine d'études ont été réalisées qui se distinguent par la variété des paramètres de culture testés lors des phases d'ensemencement et d'expansion. Diverses stratégies ont été étudiées pour maintenir la croissance cellulaire, comme l'alimentation en milieu de culture ou l'ajout de microporteurs. Différentes cellules ont aussi été utilisées, comme par exemple des CSM issues de cartilage et connues pour présenter des propriétés prolifératives plus élevées que les CSM de moelle osseuse (Sart et al., 2009 et 2010). Cependant, il est souvent difficile de comparer quantitativement les différents travaux, puisque les méthodes de comptage cellulaire ne sont pas standardisées. En effet, les auteurs utilisent soit des méthodes basées sur la respiration mitochondriale, quantifiée par le MTT ou l'Alamar Blue (Yang et al., 2007; Frauenschuh et al., 2007; Schop et al., 2008 et 2010; Han et al., 2009; Boo et al., 2011), soit des méthodes de comptage direct après trypsination des cellules et coloration au bleu trypan (Sart et al., 2009 et 2010; Yu et al., 2009; Sun et al., 2010), ou après lyse des cellules et coloration des noyaux au cristal violet (Weber et al., 2010; Hewitt et al., 2011).

1.3.2.1. Choix des microporteurs

Les cultures de CSM sur microporteurs utilisent principalement des supports déjà mis en œuvre pour les lignées continues adhérentes. Les porteurs les plus courants sont Cytodex 1 (Frauenschuh et al., 2007; Schop et al., 2008 et 2010; Boo et al., 2011), Cultispher (Yang et al., 2007; Sart et al., 2009, 2010; Eibes et al., 2010; Sun et al., 2010) et Cytodex 3 (Qiu et al., 1998; Han et al., 2009; Yu et al., 2009; Hewitt et al., 2011) (Figure 24). Les caractéristiques des principaux microporteurs sont présentées dans le Tableau 2. Certains ne sont proposés que par une seule étude, tels que Hillex (Meyers et al., 2005), les billes en verre (Weber et al., 2010) et Cytopore (Yang et al., 2007). Presque tous les auteurs observent une prolifération des CSM sur les différents microporteurs avec un facteur de multiplication d'au moins 4.

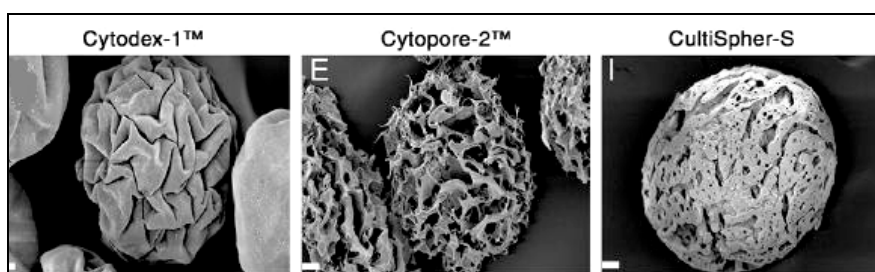


Figure 24. Exemples de microporteurs pour l'expansion de CSM: Cytodex 1, Cytopore 2 et Cultispher S (Yang et al., 2007). Observation par microscopie électronique à balayage

Tableau 2. Caractéristiques des principaux microporteurs rapportées dans la littérature pour la culture de CSM

Micro-porteurs	Fournisseurs	Références	Matériau	Diamètre humide (µm)	Macroporosité (µm)	Charges	Surface externe sèche (cm²/g)
Cytodex 1	GE Healthcare	Frauenschuh et al., 2007; Schop et al., 2008 et 2010; Boo et al., 2011	Dextrane et DEAE (1.5 meq/g)	190	Non	Positives	4400
Cultispher	PerCELL	Yang et al., 2007; Sart et al., 2009 et 2010; Eibes et al., 2010; Sun et al., 2010	Gélatine	255	20	Positives	2000
Cytodex 3	GE Healthcare	Qiu et al., 1998; Han et al., 2009; Yu et al., 2009; Hewitt et al., 2011	Dextrane et gélatine	175	Non	Positives	2700
Hillex	Solohill	Meyer et al., 2005	Polystyrène et triméthyle d'ammonium	170	Non	Positives	515
Verre	Sigma	Weber et al., 2010	Borosilicate	2000	Non	Positives	14
Cytopore 2	GE Healthcare	Yang et al., 2007	Cellulose et DEAE (1.8 meq/g)	240	30	Positives	5000

1.3.2.2. Ensemencement des CSM sur les microporteurs

Paramètres d'ensemencement

L'étape d'ensemencement des cellules sur les microporteurs est souvent définie comme la plus importante pour influencer la qualité de l'expansion cellulaire, car un maximum de cellules doit adhérer aux supports de façon homogène. La plupart des travaux appliquent des paramètres de culture différents entre la phase d'ensemencement et la phase d'expansion, afin de créer un environnement plus favorable à l'adhérence cellulaire. Les paramètres concernés sont le volume de culture, la vitesse d'agitation, la densité cellulaire initiale ou la concentration de sérum. La durée de l'ensemencement varie aussi, entre deux heures (Sun et al., 2010; Boo et al., 2011) et sept jours (Meyers et al., 2005). Le volume de culture à l'ensemencement peut être diminué pour augmenter la probabilité de contacts entre cellules et microporteurs (Frauenschuh et al., 2007; Sart et al., 2009 et 2010). Ces différents paramètres sont résumés dans le Tableau 3.

Tableau 3. Paramètres de culture pour l'ensemencement de CSM sur microporteurs

Référence	Cellules - Microporteurs	Quantité initiale de cellules (cellules/mL)	Quantité initiale de cellules (cellules/cm ²)	Quantité de microporteurs
Yang et al., 2007	CSM murines Cultispher S (revêtement fibronectine)	1,5 x 10 ⁷ cellules au total	NC	50 mg au total
Frauenschuh, et al., 2007	CSM porcines Cytodex 1	7 x 10 ⁵	10 ⁴	12 g/L
Schop et al., 2008	CSM ovines Cytodex 1	4 x 10 ⁴	2 x 10 ³	4,6 g/L
Sart et al., 2009	CSM murines Cultispher S	10 ⁵	NC	2 g/L
Schop et al., 2010	CSM humaines Cytodex 1	8 x 10 ⁴	4 x 10 ³	4,5 g/L
Sart et al., 2010	CSM murines Cultispher S	1,2 x 10 ⁴	NC	2 g/L
Weber et al., 2010	CSM-TERT humaines billes de verre	10 ⁴	10 ⁴	300 cm ³ (lit fixe)
Sun et al., 2010	CSM humaines Cultispher G	5 x 10 ⁴	1,1 x 10 ⁴	3 g/L
Boo et al., 2011	CSM lapines Cytodex 1	1,2 x 10 ⁵	NC	3 g/L
Hewitt et al., 2011	CSM humaines Cytodex 3	1,5 x 10 ⁴	NC	1 g/L

NC : non communiqué, TERT : telomerase reverse transcriptase.

Tableau 3 (suite). Paramètres de culture pour l'ensemencement de CSM sur microporteurs

Référence	Volume (mL)	Agitation	Efficacité d'attachement	Durée de la phase d'ensemencement
Yang et al., 2007	NC	non	NC	24
Frauenschuh, et al., 2007	14 (1/3 du volume final)	5 s à 20 rpm + 20 min statique	95 %	3
Schop et al., 2008	50	2 min à 30 rpm + 30 min statique	NC	18
Sart et al., 2009	50 (½ du volume final)	3 min à 70 rpm + 30 min statique	NC	4
Schop et al., 2010	50	30 rpm	57 %	18
Sart et al., 2010	50 (½ du volume final)	3 min à 70 rpm + 30 min statique	NC	4
Weber et al., 2010	4,8 x 10 ³	non	NC	NC
Sun et al., 2010	De 50 à 200	30 min 25 rpm + 10 min statique	NC	2
Boo et al., 2011	25	2 min 30 rpm + 30 min statique	NC	2
Hewitt et al., 2011	100	0 ou 30 rpm	NC	24

MTT : diméthyle-thiozol-2-yl-2,5-diphényl-tétrazolium bromide, NC : non communiqué.

Influence de l'agitation

La majorité des études appliquent une agitation intermittente lors de l'ensemencement (Frauenschuhr et al., 2007; Schop et al., 2008; Sart et al., 2009 et 2010; Sun et al., 2010; Boo et al., 2011). Elle comprend une phase d'agitation, qui varie de 5 secondes à 30 min, suivie d'une phase statique de 10 à 30 min. Hewitt et al. (2011) ont comparé la croissance de CSM humaines avec ou sans agitation à 30 rpm pendant les 24 premières heures de culture. Les facteurs de multiplication étaient respectivement de 13 et 20, avec et sans agitation. Dans ce cas, les conditions statiques permettraient probablement une plus grande durée de contact entre les microporteurs et les cellules, ce qui favoriserait ensuite la prolifération.

Influence de la concentration cellulaire initiale

Concernant la densité d'ensemencement, les études de Sun et al. (2010) et Sart et al. (2010) ont montré qu'une densité plus faible favorise un facteur de multiplication des cellules plus élevé. En neuf jours de culture de CSM humaines sur Cultispher G, Sun et al. (2010) ont obtenu un facteur d'environ 7 avec une concentration d'ensemencement de $0,7 \times 10^4$ cellules/cm², alors que ce facteur n'atteint qu'environ 3 avec une concentration d'ensemencement de $2,2 \times 10^4$ cellules/cm². De même, Sart et al. (2010) ont obtenu, après six jours de culture de CSM de rat sur Cultispher S, un facteur de multiplication de 5 avec un ensemencement de 15 cellules/porteur et un facteur de multiplication de seulement 2 avec un ensemencement de 100 cellules/porteur (Figure 25). Enfin, Hewitt et al. (2011) ont observé un facteur de multiplication de CSM humaines de 20 et 6 avec respectivement un ensemencement de 5 et 10 cellules/porteurs.

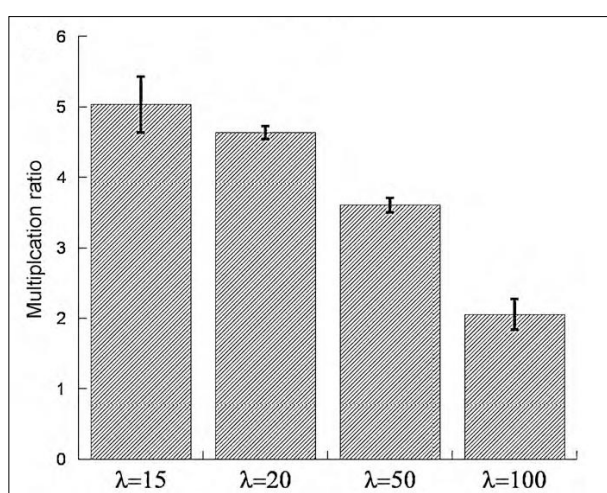


Figure 25. Influence du nombre de cellules par porteur à l'ensemencement (λ) sur le facteur de multiplication de CSM murines (« Multiplication ratio »)(Sart et al., 2010)

Influence de la concentration en microporteurs

Concernant la concentration en microporteurs, Sart et al. (2010) ont observé des croissances cellulaires similaires de CSM murines avec trois concentrations de Cultispher S (1, 2 et 3 g/L). En revanche, Hewitt et al. (2011) ont obtenu une croissance cellulaire de CSM humaines plus faible à une concentration de 2,5 g/L par rapport à 1 g/L de Cytodex 3. Cette diminution de la prolifération à une concentration de porteurs plus élevée pourrait résulter d'une augmentation de collisions entre microporteurs (Croughan et al., 2000).

Influence du type de microporteurs

L'efficacité d'adhérence des CSM dépend également de la nature du microporteur. Schop et al. (2010) ont testé l'adhérence de CSM humaines sur neuf types de microporteurs : Cytodex 1 et 3, ainsi que sept microporteurs en polystyrène avec diverses caractéristiques: chargé positivement («Hillex II»), réticulé («Plastic», «Plastic Plus»), recouvert avec de la fibronectine («ProNectin®F»), recouvert avec du verre («Glass»), recouvert avec de la gélatine cationique («FACT III») ou recouvert avec de la gélatine non cationique («Collagène»). Les cellules sont ensemencées dans des microplaques agitées, à une concentration de 5000 cellules/cm² pendant 18 heures. L'adhérence des cellules, mesurée par Alamar blue, varie de 11 % sur Hillex II à 57 % sur Cytodex 1 (Schop et al., 2010) (Figure 26). Frauenschuh et al. ont montré également une adhérence plus rapide de CSM porcines sur Cytodex 1 que sur Cytodex 2 ou 3 (Frauenschuh et al., 2007; Figure 27). Cela peut provenir du nombre de charges plus adapté à l'adhérence des CSM sur Cytodex 1 que sur les autres microporteurs.

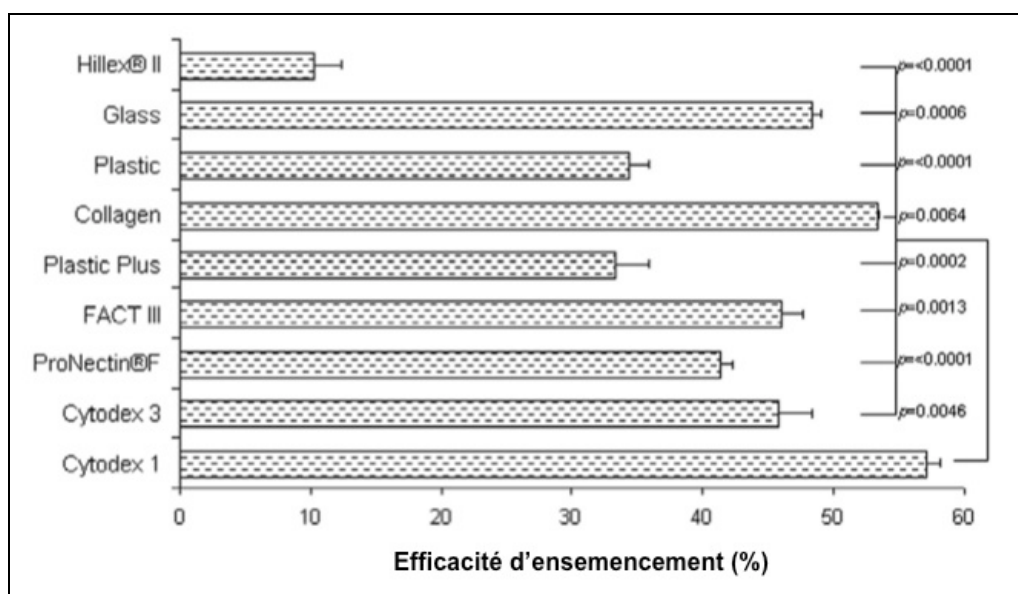


Figure 26. Efficacité d'ensemencement de CSM humaines sur différents microporteurs (Schop et al., 2010)

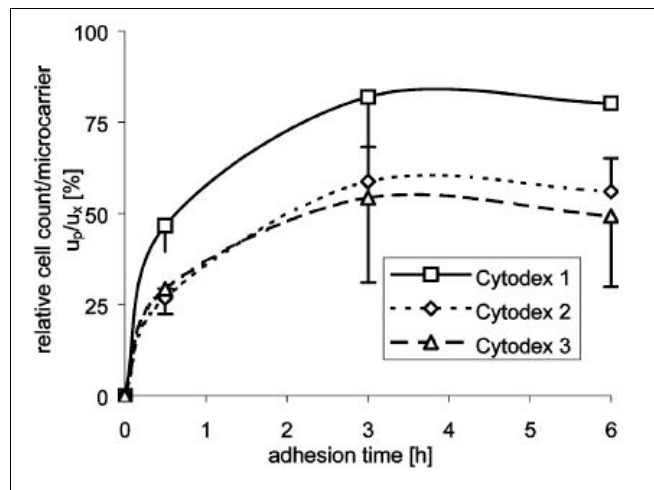


Figure 27. Adhérence de CSM porcines sur les microporteurs Cytodex 1, 2 et 3 (Frauenschuh et al., 2007)

1.3.2.3. Expansion des CSM sur microporteurs

Paramètres d'expansion cellulaire

Après la phase d'adhérence, les CSM entrent en phase d'expansion. La prolifération cellulaire débute souvent dès les premières 24 heures de culture. Contrairement à la phase initiale d'adhérence, l'agitation est généralement continue lors de cette phase. Seuls Han et al. (2009) et Hewitt et al. (2011) ont utilisé des conditions de culture statique, et seuls Frauenschuh et al. (2007) ont utilisé une agitation intermittente, avec une agitation de 20 rpm pendant 10 secondes et une phase statique de 20 min. Tous les autres travaux, réalisés en spinner, appliquent une agitation continue entre 15 rpm (Boo et al., 2011) et 70 rpm (Sart et al., 2009, 2010). Les volumes de culture varient entre 25 mL (Boo et al., 2011) et 1 L (Sart et al., 2009). Les concentrations de cellules et de microporteurs au début de la phase d'expansion varient grandement, de $1,2 \times 10^4$ cellules/mL (Sart et al., 2009) à $2,5 \times 10^5$ cellules/mL (Frauenschuh et al., 2007), et de 1 g/L de Cultispher S (Sart et al., 2009) à 10 g/L de Cytodex 3 (Yu et al., 2009). Les paramètres d'expansion cellulaire utilisés dans les travaux rapportés dans la littérature sont résumés dans le Tableau 4.

Tableau 4. Paramètres de culture lors de la phase d'expansion de CSM sur microporteurs

Référence	Cellules, Microporteurs	Alimentation en milieu de culture	Quantité de cellules au début de l'expansion
Yang et al., 2007	CSM murines Cultispher S (revêtement fibronectine)	j5, puis tous les 3 jours	$1,5 \times 10^7$
Frauenschuh et al., 2007	CSM porcines, Cytodex 1	Remplace 50 % tous les 2 jours	$2,5 \times 10^5$ cellules/mL
Schop et al., 2008	CSM ovines, Cytodex 1	Remplace 50 % après 18 h puis ajoute 30%	4×10^4 cellules/mL
Han et al., 2009	CSM humaines, Cytodex 3	NC	3×10^4 cellules/mL
Sart et al., 2009	CSM murines, Cultispher S	Remplace 50 % à J3	5×10^4 cellules/mL
	CSM murines, Cultispher S	Remplace 50 % tous les 3 jours	5×10^4 cellules/mL
	CSM murines, Cultispher S	Remplace 50 % tous les 3 jours	5×10^4 cellules/mL
Yu et al., 2009	CSM placenta humain, Cytodex 3	NC	10^4 cellules/mL
Eibes et al., 2010	CSM humaines Cultispher S revêtement SVF	Remplace 25 % tous les jours à partir de J3	5×10^4 cellules/mL
Schop et al., 2010	CSM humaines, Cytodex 1	Remplace 50 % et ajoute 30 % avec des porteurs tous les 3 jours	8×10^4 cellules/mL
Sart et al., 2010	CSM murines, Cultispher S	Remplace 50 % tous les 2 jours	$1,2 \times 10^4$ cellules/mL
Weber et al., 2010	CSM-TERT humaines billes de verre (2 mm)	Remplace 100 % tous les 5-8 jours	$1,2 \times 10^5$ cellules/cm ³
Sun et al., 2010	CSM humaines, Cultispher G	Ajoute 100 % tous les 3 jours	5×10^4 cellules/mL
Boo et al., 2011	CSM lapines, Cytodex 1	Remplace 50 % tous les 3 jours	$1,2 \times 10^5$ cellules/mL
Hewitt et al., 2011	CSM humaines, Cytodex 3	NC	$1,5 \times 10^4$ cellules/mL

Tableau 4 (suite). Paramètres de culture lors de la phase d'expansion de CSM sur microporteurs

Référence	Quantité de microporteurs	Volume de culture (mL)	Agitation	Durée de l'expansion (j)
Yang et al., 2007	50 mg	NC	15-50 rpm	35
Frauenschuh, et al., 2007	4 g/L	40	10 s à 20 rpm + 20 min statique	28
Schop et al., 2008	4,6 g/L	50	30 rpm	15
Han et al., 2009	10 g/L	0,1	statique	9
Sart et al., 2009	1 g/l	100	70 rpm	3
	1 g/l	10^3	70 rpm	5
	1 g/L puis 2 g/L	100	70 rpm	11
Yu et al., 2009	10 g/L	NC	40-60 rpm	5
Eibes et al., 2010	2 g/L	NC	NC	8
Schop et al., 2010	4,5 g/L	50	40 rpm	9
Sart et al., 2010	1 g/L	100	70 rpm	6
Weber et al., 2010	300 cm ³ (lit fixe)	$4,8 \times 10^3$	statique	7
Sun et al., 2010	3 g/L	200	25 rpm	9
Boo et al., 2011	3 g/L	25	15 rpm	14
Hewitt et al., 2011	1 g/L	100	30 rpm	7

NC : non communiqué

Influence des changements de milieu de culture

Après quelques jours de culture en mode discontinu, la concentration des CSM adhérentes sur les microporteurs a tendance à diminuer. Ce phénomène peut résulter d'un manque d'éléments nutritifs, d'un excès de produits métaboliques, ou encore d'un manque de surface d'adhérence. Afin de maintenir la croissance des CSM, plusieurs méthodes sont alors envisagées, telles que le changement ou l'ajout de milieu frais, combiné ou non à un ajout de porteurs frais. La majorité des travaux effectuent des remplacement de milieu réguliers, de 25 % tous les jours (Eibes et al., 2010), à 50 % tous les 2 ou 3 jours. Au lieu de remplacer le milieu, certaines études rapportent l'ajout de milieu sans soutirage, comme les travaux de Sun et al. (2010) où 100 % de milieu sont ajoutés tous les 3 jours. Les résultats de cette étude montrent cependant qu'il est plus avantageux de remplacer 50 % de milieu (facteur de multiplication cellulaire de 4,8), que d'ajouter 100 % de milieu (facteur de multiplication cellulaire de 2,9). Dans ces conditions de culture, une dilution trop importante des cellules semble donc ralentir la croissance des CSM.

Influence de l'ajout de microporteurs

L'ajout de microporteurs en cours de culture utilise la capacité des CSM à migrer d'un porteur à un autre, sans nécessité de trypsination des cellules lorsque les porteurs sont à confluence (Frauenschuh et al., 2007; Schop et al., 2008 et 2010; Sart et al., 2009 et 2010; Sun et al., 2010). Frauenschuh et al. (2007) ajoutent la même quantité initiale de Cytodex 1 (4 g/L) au 14^{ème} jour de culture. Les résultats montrent que la colonisation des nouveaux porteurs atteint 80 % au 24^{ème} jour (Figure 28). L'agitation étant intermittente tout au long de la culture, les cellules sont ainsi régulièrement en contact direct avec les porteurs neufs.

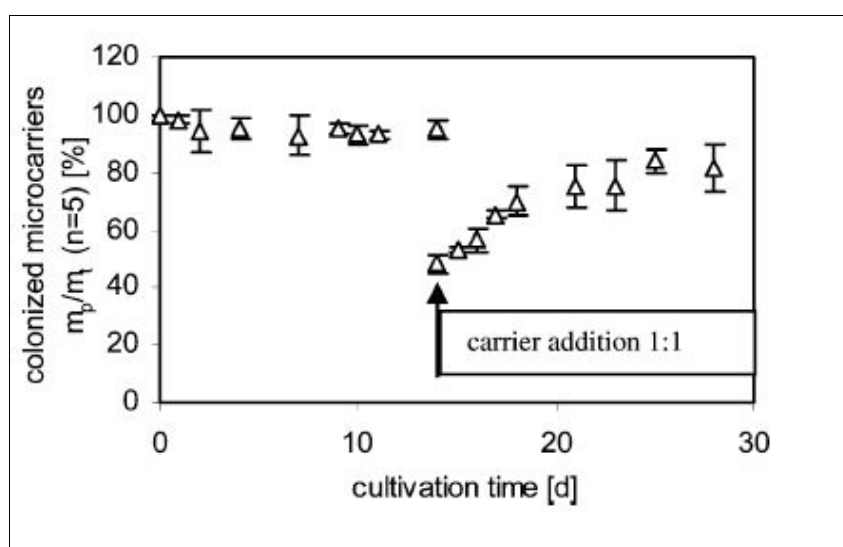


Figure 28. Effet de l'ajout de microporteurs en cours de culture sur la croissance de CSM porcines (Frauenschuh et al., 2007)

Dans l'étude de Sart et al. (2009), les microporteurs sont ajoutés dès le 4^{ème} jour de culture lorsque les cellules atteignent la confluence. L'ajout est suivi d'une phase d'agitation intermittente de 4 heures. Après l'ajout des porteurs, une phase de latence de 2 jours est observée. En fin de culture, la concentration cellulaire atteint $1,5 \times 10^6$ cellules/mL, soit un facteur de multiplication de 30 (Figure 29). L'expansion des CSM peut donc bénéficier avantageusement d'un ajout de microporteurs après quelques jours de culture.

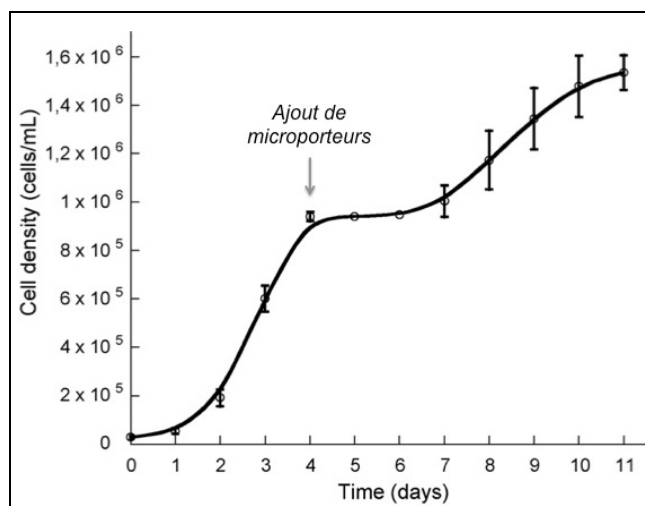


Figure 29. Effet de l'ajout de microporteurs au 4^{ème} jour sur la croissance de CSM murines sur Cultispher S (adapté de Sart et al., 2009)

L'ajout des microporteurs peut être réalisé en plusieurs étapes. En effet, Sun et al. (2010) comparent une culture de CSM humaines avec un ajout unique de microporteurs au 3^{ème} jour de culture (facteur de multiplication cellulaire de 5,8) ou avec des ajouts aux 3^{ème} et 6^{ème} jours de culture (facteur de multiplication cellulaire de 11,2). Dans leurs conditions de culture, des ajouts de microporteurs successifs permettent ainsi de doubler le facteur de multiplication.

Enfin, l'influence du changement de milieu de culture combiné à des ajouts successifs de microporteurs a été analysée dans les travaux de Schop et al. (2008) avec des CSM humaines. Les résultats montrent que sans aucun ajout, les cellules atteignent un facteur de multiplication de 2,5, avant une phase de déclin. L'ajout de 30 % de milieu de culture tous les 3 jours permet de multiplier le nombre de cellules initiales par 3,5, avec une phase stationnaire. Enfin, la culture réalisée avec l'ajout de 30 % de milieu et un ajout de microporteurs permet d'atteindre un facteur de multiplication de 6, sans phase de déclin ni stationnaire (Figure 30). Cette étude semble donc indiquer que l'ajout de milieu permettrait le maintien du nombre de cellules viables, alors que l'ajout de milieu, couplé à celui de porteur frais, favoriserait une densité cellulaire maximale plus élevée.

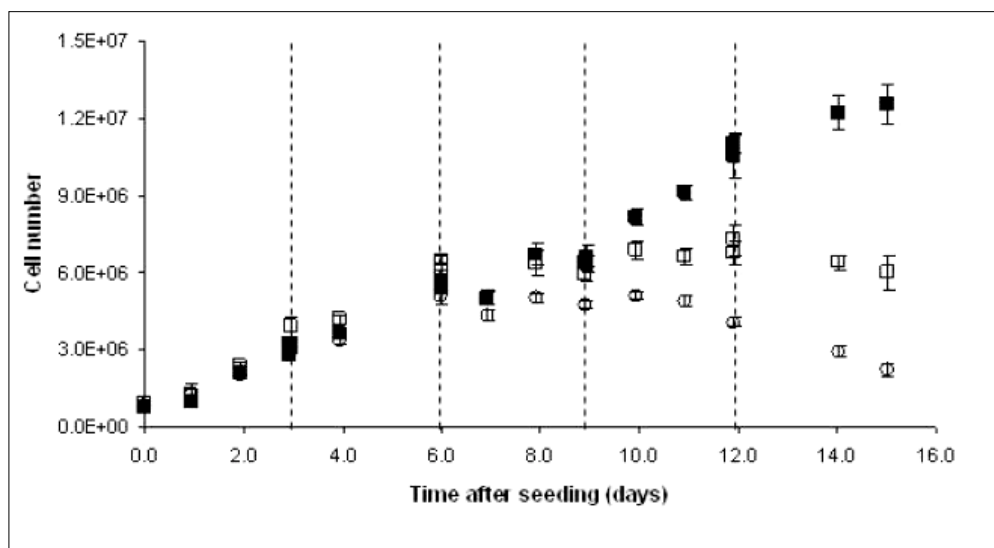


Figure 30. Effet de l'ajout de microporteurs et de changement de milieu en cours de culture de CSM humaines. ○ : pas d'ajout de microporteurs ni de changement de milieu. □ : Remplacement de milieu tous les 3 jours. ■ : Remplacement de milieu et ajout de microporteurs tous les 3 jours (Schop et al., 2010)

Influence de l'ajout de facteurs de croissance

Une étude de Sart et al. (2010) compare différentes stratégies d'alimentation de milieu de culture, de microporteurs et de facteurs de croissance (Figure 31). Un remplacement de 50 % du volume de milieu tous les 2 jours permet de doubler la concentration cellulaire finale (facteur = 1) par rapport à une culture en mode discontinu (facteur = 0,5). Par ailleurs, un remplacement de 50 % de milieu au 4^{ème} jour par du milieu contenant du SVF, du FGF2 ou du TGF- β permet d'augmenter le facteur de multiplication cellulaire de 1,5, 1,6 et 1,2, respectivement. De plus, l'ajout simultané de SVF et de TGF- β assure une meilleure croissance cellulaire, avec un facteur de 1,9. Ces ajouts simultanés permettent même d'atteindre de meilleures performances que lors de l'ajout de microporteurs seul (facteur de 1,7). Les auteurs démontrent ainsi que l'ajout de facteurs de croissance en cours de culture serait un facteur essentiel pour la croissance des CSM sur microporteurs.

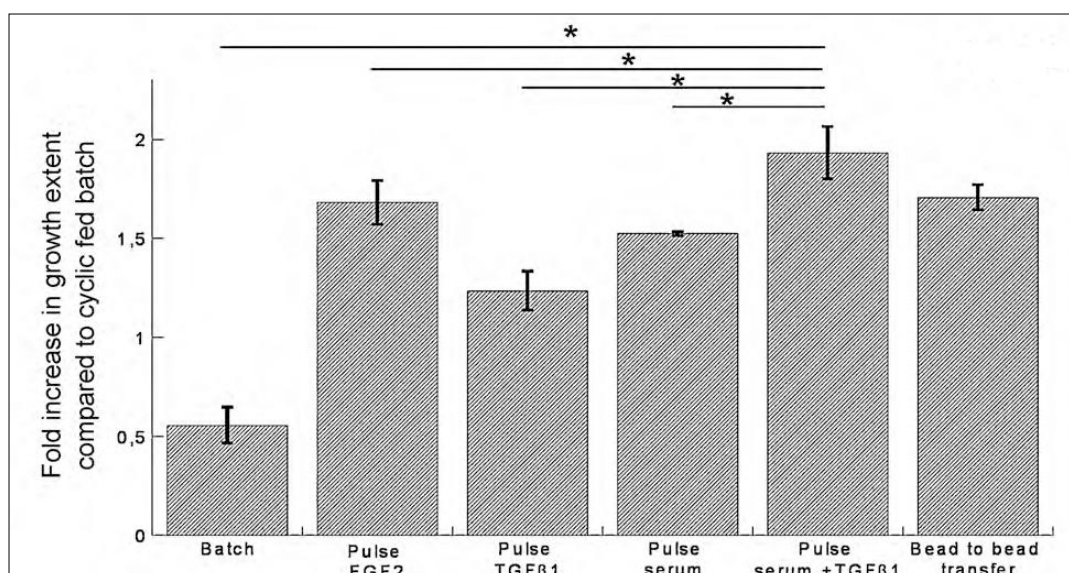


Figure 31. Efficacité des modes de culture pour améliorer l'extension de la croissance de CSM murines sur Cultispher S comparé à la culture en mode de perfusion séquentielle (* = p-value (t-test) < 0,005). (Sart et al., 2010)

En résumé, l'ensemble des études montre que le remplacement de milieu de culture, avec des microporteurs frais et des facteurs de croissance, permet de prolonger la croissance des CSM. Ces cellules sont capables de coloniser de nouveaux porteurs tels que Cytodex 1, Cultispher S et G. Ainsi, ces différents ajouts semblent représenter une stratégie intéressante pour améliorer les procédés d'expansion des CSM. Cependant, il semble aussi nécessaire de mieux identifier les facteurs limitant la croissance des CSM dans ce mode de culture.

1.3.2.4. Suivi et contrôle des paramètres physico-chimiques des cultures de CSM sur microporteurs

En plus du choix du microporteur et des paramètres d'ensemencement et d'expansion, trois études proposent le suivi et le contrôle des paramètres physico-chimiques pour améliorer la croissance des CSM sur microporteurs. Yu et al. (2009) ont réalisé le suivi hors ligne du pH et de l'osmolarité d'une culture de CSM provenant de placenta humain sur Cytodex 3. Ils observent que le pH se maintient entre 6,8 et 7,4, et l'osmolarité entre 300 et 320 mmOsmol/kg sur 6 jours de culture, avec des changements de milieu réguliers (non précisé dans l'article).

Dans l'étude de Weber et al. (2010), des CSM humaines immortalisées sont cultivées sur des microporteurs en verre de 2 mm de diamètre. Les billes sont mises en œuvre dans un réacteur perfusé en lit fixe de 300 cm³, soit une surface de 5500 cm², dans un volume de milieu de 4,8 L. Ce bioréacteur permet l'automatisation de l'ensemencement, de l'expansion et de la récolte des cellules. Le comptage des cellules

en ligne étant impossible, des capteurs optiques (PreSens®) à l'entrée et à la sortie de la perfusion permettent de suivre en ligne le taux d'oxygène dissous. Pendant 7 jours, la saturation en oxygène est stable à l'entrée de la perfusion, entre 90 et 100 %, alors qu'elle chute à 58 % en sortie de perfusion. La consommation d'oxygène est ainsi estimée à $1,08 \times 10^{-8}$ mg/heure/cellule, grâce à un comptage final des noyaux des cellules en fin de culture (méthode du cristal violet). Il n'y a ici pas de prise en compte d'une éventuelle lyse cellulaire.

Enfin, l'étude de Sart et al. (2010) rapporte un suivi en ligne de l'oxygène dissous dans un spinner de 250 mL, avec une sonde à oxygène galvanométrique. De l'air additionné de 5 % de CO₂ est apporté dans le spinner par une buse à un débit de 20 mL/min. Cette aération permet une vitesse de croissance supérieure, même si la concentration cellulaire finale est similaire à celle de cultures sans aération (5×10^5 cellules/mL). Dans ce cas, il apparaît que l'oxygène n'est pas limitant pour la prolifération des CSM, la vitesse spécifique de consommation d'oxygène sur Cultispher S étant de $8,2 \times 10^{-17}$ mol/seconde/cellule (soit $0,4 \times 10^{-8}$ mg/heure/cellule). Cet ordre de grandeur est comparable à la valeur rapportée dans l'étude de Weber et al. (2010).

L'une des seules études rapportant une régulation des paramètres physico-chimiques de culture de CSM sur microporteurs est celle de Schop (2010). Des CSM humaines étaient cultivées dans un bioréacteur de 1 L (Applikon®) muni d'une hélice marine. Les paramètres régulés étaient la température (37°C), la fréquence d'agitation (45-90 rpm), le pH (7,2-7,3) et le taux d'oxygène dissous (4 ou 21 % de la saturation en air). Alors que le taux d'oxygène dissous ne semblait pas affecter les cellules, la régulation du pH prolongeait la croissance cellulaire par comparaison à une culture sans régulation de pH, pour laquelle le pH décroissait jusqu'à 6,6 en 13 jours. Il est intéressant de constater que la vitesse spécifique maximale de croissance en spinner était de $0,02 \text{ h}^{-1}$, alors qu'elle n'était que de $0,01 \text{ h}^{-1}$ en bioréacteur contrôlé. L'agitation par hélice marine pourrait expliquer cet effet sur la croissance des CSM.

1.3.2.5. Performances de croissance des CSM sur microporteurs

Les vitesses spécifiques de croissance rapportées par Sun et al. (2010) pour des CSM humaines, et par Sart et al. (2010) pour des CSM murines sont assez élevées ($0,04 \text{ h}^{-1}$). Schop et al. (2010) et Eibes et al. (2010) rapportent des valeurs plus faibles ($0,02 \text{ h}^{-1}$) pour des CSM humaines. En ne prenant en compte que le nombre final de cellules totales, les meilleurs résultats sont obtenus par Sart et al. (2009) avec 7×10^8 cellules produites en 5 jours de culture dans un bioréacteur de 1 L, et Weber et al. (2010) avec 6×10^8 cellules produites en 7 jours dans un bioréacteur à lit fixe de 300 cm^3 . Par ailleurs, la concentration cellulaire la plus élevée est rapportée par Sart et al. (2009), avec une valeur de $1,5 \times 10^6$ cellules/mL. Enfin,

les facteurs de multiplication cellulaire les plus élevés sont montrés par Sart et al. (2009) avec un facteur de 30 en 11 jours de culture, et par Hewitt et al. (2011) avec un facteur de 20 en 10 jours. Ces résultats sont résumés dans le Tableau 5. Ils doivent cependant être comparés avec précaution en raison des différentes méthodes de comptage cellulaire utilisées.

Tableau 5. Comparaison des performances de croissance de CSM dans des différents systèmes d'expansion

Référence	Cellules Microporteurs	Facteur de multiplication cellulaire	Nombre maximal de cellules	Durée de culture (j)	Méthode de comptage
Yang et al., 2007	CSM murines Cultispher S (revêtement fibronectine)	8,3	NC	35	MTT
Frauenschuh et al., 2007	CSM porcines Cytodex 1	4,5	$4,5 \times 10^7$	28	MTT
Schop et al., 2008	CSM ovines Cytodex 1	7	$1,4 \times 10^7$	15	Alamar blue
Han et al., 2009	CSM humaines Cytodex 3	4,8	$1,4 \times 10^4$	9	MTT
Sart et al., 2009	CSM murines Cultispher S	18	9×10^7	3	Bleu trypan
	CSM murines Cultispher S	14	7×10^8	5	Bleu trypan
	CSM murines Cultispher S	30	$1,5 \times 10^8$	11	Bleu trypan
Yu et al., 2009	CSM placenta humain Cytodex 3	10	NC	5	Bleu trypan
Eibes et al., 2010	CSM humaines Cultispher S (revêtement SVF)	8,4	NC	8	NC
Schop et al., 2010	CSM humaines Cytodex 1	17	$6,8 \times 10^7$	9	Alamar blue
Sart et al., 2010	CSM murines Cultispher S	15	$7,5 \times 10^8$	6	Bleu trypan
Weber et al., 2010	CSM-TERT humaines billes de verre (2 mm)	17	6×10^8	7	Cristal violet (Un point final)
Sun et al., 2010	CSM humaines Cultispher G	11	$2,8 \times 10^8$	9	Bleu trypan
Boo et al., 2011	CSM lapines Cytodex 1	5	$1,5 \times 10^7$	14	MTT
Hewitt et al., 2011	CSM humaines Cytodex 3	20	3×10^7	7	Cristal violet

MTT:diméthyle-thiozol-2-yl-2,5-diphényl-tetrazolium bromide, NC : non communiqué, TERT : telomerase reverse transcriptase.

1.3.2.6. Organisation cellulaire des CSM sur microporteurs

L'organisation cellulaire des CSM sur les microporteurs varie en cours de culture. Une agrégation cellulaire est souvent observée après plusieurs jours de culture (Schop et al., 2010; Frauenschuh et al., 2007; Eibes et al., 2010), et peut être limitée par l'ajout de microporteurs (Schop et al., 2010). Les agrégats peuvent être composés de cellules et de microporteurs (Eibes et al., 2010; Frauenschuh et al., 2007) (Figure 32 et 33), ou uniquement de cellules (Schop et al., 2010) (Figure 34).

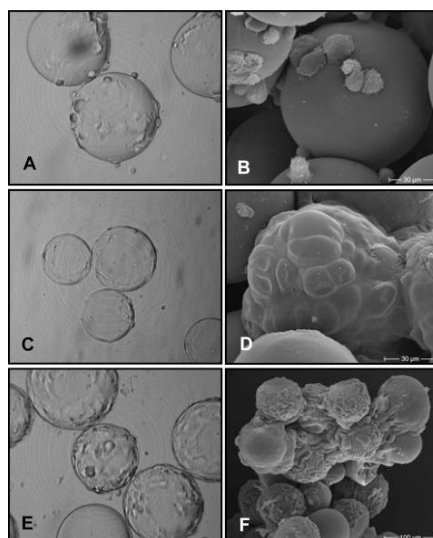


Figure 32. Observation par microscopie optique (A-C-E) ou électronique à balayage (B-D-F) de CSM porcines cultivées sur Cytodex 1 à l'ensemencement (A-B), après 14 jours de culture (C-D) et après 28 jours de culture (Frauenschuh et al., 2007)

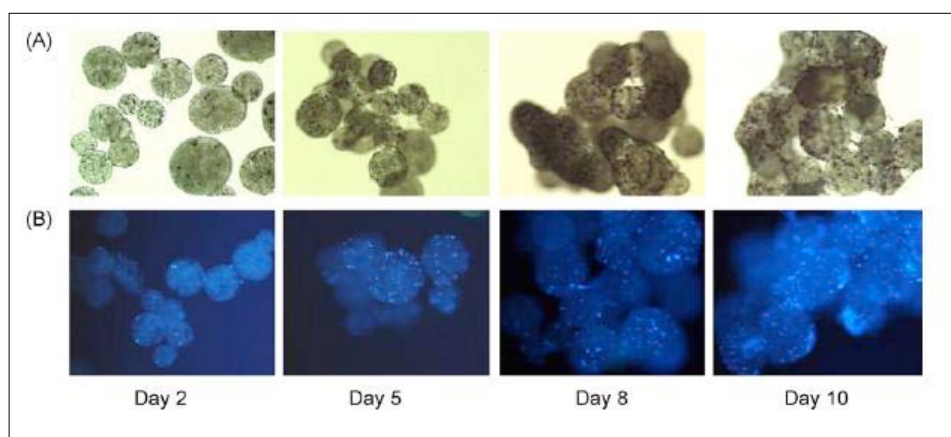


Figure 33. Observation microscopique de CSM humaines cultivées sur Cultispher S au cours du temps. A : marquage des cellules par MTT; B : marquage des cellules par sondes fluorescentes liées à l'ADN (Dapi) (Eibes et al., 2010)

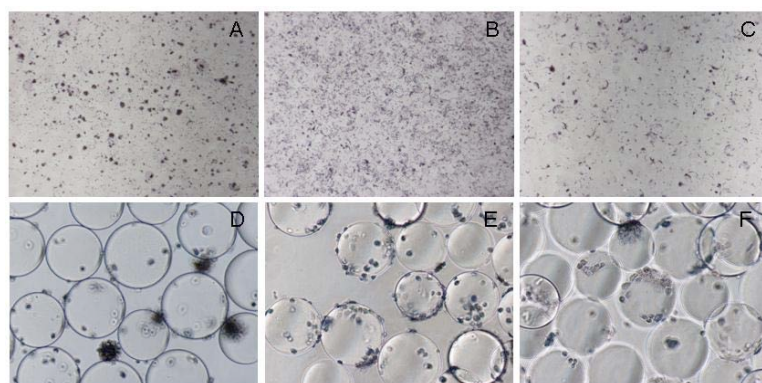


Figure 34. Observation microscopique de CSM humaines sur Cytodex 1 en fonction du changement de milieu et de l'ajout de microporteurs. A et D : ajout de 30 % de milieu; B et E: ajout de 30 % de milieu et de microporteurs; C et F : aucun ajout (A-C : 20 x; D-F : 100 x) (Schop et al., 2010)

1.3.3. Culture de CSM sans support d'adhérence en mode agité

Une technique récente consiste à cultiver les CSM sans support d'adhérence. Au lieu d'adhérer à des flacons ou à des microporteurs, les cellules sont simplement placées en suspension. Les cellules sont soit sous forme individuelle, soit sous forme d'agrégats de taille variable. Ces cultures nécessitent des conditions opératoires particulières, comme l'ajout de facteurs de croissance.

1.3.3.1. Culture de CSM en suspension unicellulaire

Origine de la culture en suspension unicellulaire de cellules souches

La culture en suspension unicellulaire est une technique utilisée depuis des décennies pour les lignées continues. Par rapport aux cultures avec supports d'adhérence, elle permet d'atteindre des concentrations cellulaires plus élevées, et facilite l'extrapolation en gardant une homogénéité de la culture (Griffiths, 2001). Les premières cultures de cellules souches en suspension ont été mises en œuvre pour des cellules non adhérentes, comme les cellules souches hématopoïétiques (CSH) (Andrade-Zaldivar et al., 2008). Les CSM sont cependant connues pour leur dépendance à l'adhérence concernant leur survie et leur prolifération (Benoit et al., 2007). Certaines informations rapportées dans la littérature semblent pourtant indiquer que les CSM pourraient survivre et proliférer sans adhérence. En effet, des CSM sont présentes dans le sang périphérique et celui du cordon ombilical sous une forme non adhérente (Roufosse et al., 2004). De plus, la morphologie des CSM au sein de la moelle osseuse, notamment par rapport à l'adhérence, n'est pas

clairement définie (Zhang et al., 2009). La dépendance des CSM à l'adhérence comme caractéristique des CSM reste peut-être à réexaminer (Dominici et al., 2006).

Mise en œuvre de culture de CSM en suspension

La mise en suspension des CSM doit être effectuée juste après leur extraction de la moelle osseuse (Baksh et al., 2003 et 2007; Chen et al., 2006), ou par sélection d'une sous-population non adhérente (Zhang et al., 2009). Les cellules sont placées dans des boîtes de Pétri statiques (Zhang et al., 2009), des spinners siliconés (Baksh et al., 2003 et 2007), ou des bioréacteurs à agitation rotative (Chen et al., 2006).

Les milieux de culture utilisés sont du DMEM supplémenté de 10 % de SVF (Zhang et al., 2009) ou du milieu sans sérum MyeloCult® (StemCell Technologies Inc), supplémenté par diverses cytokines recombinantes humaines (Baksh et al., 2003 et 2007; Chen et al., 2006). Le milieu est changé régulièrement, environ 20 % tous les jours (Chen et al., 2006), ou 1/3 toutes les semaines (Baksh et al., 2003 et 2007), sans rétention des cellules. Les quantités initiales de cellules varient de 2×10^3 cellules/mL (Baksh et al., 2007) à 10^6 cellules/mL (Baksh et al., 2003; Zhang et al., 2009). Les volumes de cultures varient de 10 mL (Zhang et al., 2009) à 100 mL (Baksh et al., 2007). Les systèmes sont statiques (Zhang et al., 2009) ou agités avec des fréquences d'agitation de 20 rpm (Chen et al., 2006) à 40 rpm (Baksh et al., 2003 et 2007). L'ensemble des paramètres de culture est résumé dans le Tableau 6.

Tableau 6. Paramètres de culture de CSM sans support d'adhérence

Référence	Cellules	Système de culture	Milieu de culture	Changement de milieu de culture	Concentration (cellules/mL)	Volume (mL)	Agitation
Baksh et al., 2003	Cellules dérivées de la moelle osseuse humaine	Spinner, mise en suspension juste après l'extraction	MyeloCult® 2 ng/mL rhIL-3 10 ng/mL rhSF 30 ng/mL rhPDGF-BB	Chaque semaine, changement de 30 %	10^6	50	40 rpm
Chen et al., 2006	Cellules dérivées de la moelle osseuse humaine	Bioréacteur rotatif (RCCS, Synthecon®)	MyeloCult®, 50 ng/mL SCF, 10 ng/mL IL-3 et IL-6, 10^{-6} M hydrocortisone	Changement de 20 % de milieu sans rétention de cellules tous les jours à partir de J3	$4,7 \times 10^3$	50	20 rpm
Baksh et al., 2007	Cellules dérivées de la moelle osseuse humaine	Spinner	MyeloCult® 2 ng/mL rhIL-3 10 ng/mL rhSF	Chaque semaine, changement de 30 % sans rétention des cellules	$1,9 \times 10^3$	100	40 rpm
Zhang et al., 2009	Cellules dérivées de la moelle osseuse murine	Boîte de Pétri (55 cm ²)	DMEM, 10 % SVF, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	Tous les jours	10^6	10	Statique

IL : Interleukine; NC : non communiqué; SF : steel factor; SVF : sérum de veau foetal; rh : recombinant humain; SCF : Steel Factor

Performances de croissance des CSM en suspension

La croissance des cellules est quantifiée par comptage des colonies (CFU-F). Cette méthode consiste à ensemencer les cellules à une faible concentration en plaques micropuits (100 cellules/puits), et à les cultiver pendant plusieurs jours. Le milieu de culture est ensuite retiré, et les cellules marquées au cristal violet. Seules les colonies visibles à l'œil nu sont énumérées, correspondant à plus de 50 cellules par colonie. Cette méthode, basée sur le postulat qu'une cellule forme une colonie, révèle que les facteurs de multiplication des CSM en suspension varient de 2,4 en 4 jours (Zhang et al., 2009) à 29 en 8 jours (Chen et al., 2006). Les cellules conservent une morphologie ronde au cours de la culture (Figure 35). Une agrégation des CSM est tout de même observée après 8 jours de culture dans le bioréacteur rotatif (Chen et al., 2006), de façon concomitante avec une baisse de la concentration cellulaire. Cette agrégation est accrue si la fréquence d'agitation du bioréacteur rotatif est de 10, 15 ou 23 rpm, au lieu de 20 rpm. L'ensemble des résultats rapportés dans la littérature est résumé dans le Tableau 7.

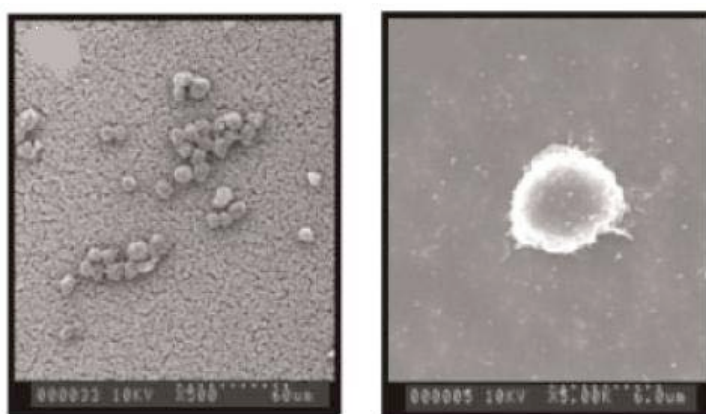


Figure 35. Morphologie de CSM humaines après 21 jours de culture en suspension à différents grossissements par microscopie électronique à balayage (Baksh et al., 2007)

Tableau 7. Performances de croissance cellulaire de CSM en suspension

Référence	Système de culture	Facteur de multiplication cellulaire	Concentration finale de cellules (cellules/mL)	Durée de culture (j)
Baksh et al., 2003	Spinner	14	$1,4 \times 10^7$	21
Chen et al., 2006	Bioréacteur rotatif (RCCS, Synthecon®)	29	$1,2 \times 10^6$	8
Baksh et al., 2007	Spinner	7	$1,3 \times 10^4$	42
Zhang et al., 2009	Boîte de Pétri (55 cm ²)	2,4	$2,4 \times 10^6$	4

Limites de la culture de CSM en suspension

Bien que la culture en suspension se rapproche de la structure tridimensionnelle des cellules *in vivo* (Chen et al., 2006), que la culture en bioréacteur rotatif est extrapolable (Zandstra et al., 1994), et que la multipotence des cellules est maintenue lors des différentes cultures en suspension (Baksh et al., 2003 et 2007; Chen et al., 2006; Zhang et al., 2009), l'inconvénient principal reste l'absence de purification des cellules. En effet, la moelle osseuse est directementensemencée dans les systèmes de culture, les CSM étant alors cultivées avec tous les autres types cellulaires, tels que les cellules souches hématopoïétiques, les macrophages, les adipocytes, etc. Une méthode de purification pourrait être développée en amont, par exemple par cytométrie en flux. De plus, des facteurs de croissance onéreux sont utilisés à de fortes concentrations (Baksh et al., 2003 et 2007; Chen et al., 2006), ce qui pourrait constituer un frein à la montée en échelle.

1.3.3.2. Culture de CSM sous forme d'agrégats

La culture de cellules eucaryotes sous forme agrégée a d'abord été utilisée pour les lignées cellulaires continues de types Véro (Goetghebeur et Hu, 1990), BHK (Moreira et al., 1995) ou HEK (Liu et al., 2006). Plus récemment, elle a été mise en œuvre pour les cellules souches embryonnaires (Bauwens et al., 2008), les cellules souches neuronales (Baghbaderani et al., 2011; Gilbertson et al., 2006; Kallos et al., 2003; Ng et Chase, 2008) ainsi que les cellules souches de pancréas (Serra et al., 2009). Les agrégats sont plus résistants aux contraintes hydrodynamiques et nécessitent moins de facteurs de croissance (Fok et Zandstra, 2005). De plus, ils permettent d'atteindre des concentrations cellulaires plus élevées (Goetghebeur et al., 1990). Certains inconvénients sont toutefois à prendre en compte, comme les limitations diffusionnelles des éléments nutritifs à l'intérieur des agrégats (Mohamet et al., 2010), ou encore la difficulté à contrôler la taille des agrégats (Nie et al., 2009).

L'intérêt des CSM sous forme agrégée a été plus particulièrement souligné par Potapova et al. (2007). Comparées à des CSM cultivées en monocouche, les CSM cultivées en sphéroïdes produisent 5 à 20 fois plus de facteurs de croissance comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) ou le FGF2, qui servent de médiateurs trophiques pour les cellules endothéliales. Les sphéroïdes auraient également des besoins réduits en sérum par rapport à des cellules cultivées en monocouche. En 2008, Potapova et al. ajoutent que les CSM sous forme de sphéroïdes présentent une plus grande quantité de CXCR-4, récepteurs permettant l'adhérence aux cellules endothéliales. De plus, Wang et al. (2009) ont observé un potentiel de différenciation accru, et Bartosh et al. (2010) ont révélé un potentiel anti-inflammatoire plus élevé chez les

CSM organisées en sphéroïdes qu'en monocouche. En parallèle, deux études affirment que les CSM organisées en agrégats présentent un grand intérêt pour les thérapies cellulaires (Wang et al., 2009; Lee et al., 2009). En effet, l'utilisation de CSM en sphéroïdes ne nécessite pas d'étape de trypsination, préservant leurs matrices extracellulaires et leurs jonctions intercellulaires. Ceci réduit les durées d'adhérence, de migration et de prolifération des cellules au site d'injection chez les patients.

Deux études ont rapporté la production de CSM en bioréacteur sous forme de sphéroïdes. Dans la première (Frith et al., 2010), des CSM ont été cultivées en spinner et en réacteur Couette. Quant à la seconde (Subramanian et al., 2010), elle décrit la culture de MAPC (Multipotent Adult Progenitor Cells), une sous-population très proliférative de CSM, en spinner de 250 mL. Les résultats sont encourageants, avec un facteur de multiplication cellulaire de 80 en 6 jours. Cependant, beaucoup de paramètres restent à maîtriser, comme par exemple la taille des agrégats. La revue de Saleh et Genever (2011) prédit que la culture en agrégats s'imposera de plus en plus, notamment du fait des similarités entre les microenvironnements au sein des agrégats et ceux des tissus *in vivo*. À noter que les agrégats peuvent aussi être encapsulés pour les protéger des conditions extérieures. Cependant, les études d'encapsulation de CSM ont été dédiées à la différenciation et non à l'expansion jusqu'à présent (Bartorsky et al., 2005; Benoit et al., 2007; Freimark et al., 2010; Karlsen et al., 2011). La culture de CSM en suspension, sous forme unicellulaire ou agrégée, représente donc un procédé prometteur, mais encore mal maîtrisé.

Les procédés d'expansion de CSM sont nécessaires à leur utilisation thérapeutique, et doivent tenir compte des paramètres biochimiques et physico-chimiques appliqués. En effet, de nombreux composés biochimiques présentent une influence sur la prolifération, la différenciation ou l'apoptose des cellules. Dans ce cas, la composition des milieux de culture doit être mieux définie et adaptée pour induire une prolifération sans différenciation ni apoptose cellulaire. Quant aux paramètres physico-chimiques, perçus et intégrés par les cellules, ils conduisent à une modification de la réponse cellulaire. Il est donc nécessaire, à long terme, de pouvoir suivre en ligne et contrôler ces paramètres biochimiques et physico-chimiques lors de culture de CSM. Pour répondre à ces besoins, les procédés d'expansion des CSM ont évolué récemment vers des systèmes de culture en mode agité, instrumentés pour le suivi en ligne et la régulation des conditions opératoires.

Objectifs de thèse

Mes travaux de thèse se sont inscrits dans le cadre d'un projet ANR « TELiTeR », dont l'objectif principal était de développer un bio-ligament par ingénierie tissulaire. Au sein du laboratoire LRGP, mes travaux se sont attachés à développer un procédé d'expansion de CSM porcines, pour obtenir une quantité suffisante de cellules pour la fabrication de ce bio-ligament. Pour cela, une étude bibliographique a permis d'analyser des données sur les caractéristiques des CSM, sur les paramètres biochimiques et physico-chimiques ayant une influence sur leur comportement, et enfin sur les différents procédés d'expansion existant dans la littérature. Cette étude a ainsi mis en avant certaines lacunes, correspondant à des questions scientifiques restées en suspens, et vers lesquelles nous avons dirigé nos travaux. Les principales questions soulevées étaient les suivantes :

- **Quelle est l'influence des paramètres de culture sur le comportement des CSM porcines?**
- **Quels sont les besoins biochimiques spécifiques des CSM porcines ?**
- **Quelle est la méthode d'expansion la mieux adaptée aux CSM porcines ?**
- **Quelle est la méthode de comptage la plus fiable pour les CSM sur microporteurs ?**
- **Quelle est l'influence de l'agitation sur le comportement des CSM ?**
- **Quels sont les moyens pour prolonger la croissance des CSM à grande échelle ?**

Afin de répondre à ces questions, mon mémoire de thèse a été divisé en trois chapitres de résultats, précédés par le matériel et les méthodes utilisés (**Chapitre 2. Matériel et Méthodes**). Dans un **premier chapitre de résultats (Chapitre 3. Influence des paramètres de culture sur la réponse des CSM porcines)**, l'influence des paramètres de culture sur l'adhérence, la croissance, le métabolisme, et la différenciation des CSM porcines a été étudiée. Ces paramètres de culture comprennent les conditions d'ensemencement (concentrations cellulaires, agitation, siliconage des surfaces du bioréacteur, âge des cellules), et les composants du milieu de culture (sérum, glucose, glutamine, antioxydants, facteurs de croissance). Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article auquel sont ajoutés des résultats complémentaires.

Dans un **deuxième chapitre de résultats (Chapitre 4. Influence du mode d'expansion sur la réponse des CSM porcines et évaluation des méthodes de comptage)**, l'influence des méthodes d'expansion en suspension, en agrégats ou adhérentes sur microporteurs a été étudiée sur le comportement des CSM. Dans le cas de la culture sur microporteurs, cinq types de porteurs ont été évalués relativement aux performances d'expansion du procédé. Pour compléter ce chapitre, une évaluation et une comparaison des méthodes de comptage cellulaire ont été réalisées (comptages directs des cellules ou des noyaux, ou comptages indirects par la consommation de glucose ou par la respiration mitochondriale).

Enfin, **dans un troisième chapitre de résultats (Chapitre 5. Influence des conditions opératoires sur la réponse des CSM porcines cultivées sur microporteurs)**, l'influence de l'agitation sur la croissance, la mort, le métabolisme, l'agrégation et la multipotence des CSM a été analysée. Ce chapitre est présenté sous la forme d'un article publié en 2012 dans *Biotechnology Progress*, auquel sont ajoutés des résultats complémentaires. La conclusion générale reprend les résultats majeurs de ce travail et relate les perspectives restant à entreprendre. Cette étude tend à établir la méthode d'expansion la plus appropriée, du point de vue de la rapidité d'exécution et du maintien qualitatif des propriétés de différenciation cellulaire.

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.1. Prélèvement et banque cellulaire	73
2.2. Milieux de culture.....	74
2.3. Culture des CSM en mode statique	75
2.3.1. Culture des CSM en microplaque 96-puits	75
2.3.2. Culture des CSM en flacons statiques	76
2.4. Culture de CSM en mode agité.....	76
2.4.1. Culture des CSM sur microporteurs en mode agité	76
2.4.2. Culture des CSM sous forme d'agrégats.....	78
2.4.3. Culture des CSM en suspensions unicellulaires	78
2.5. Analyse morphologique des CSM	79
2.5.1. Observation par microscopie optique.....	79
2.5.2. Observation par microscopie électronique à balayage.....	79
2.6. Analyse quantitative des cellules	79
2.6.1. Analyse des cellules en microplaques par analyse d'images.....	79
2.6.2. Analyse quantitative des cellules par microscopie optique	80
2.6.3. Analyse des cellules par cytométrie.....	81
2.6.4. Analyse des noyaux cellulaires par microscopie et cytométrie.....	81
2.6.5. Analyse de l'activité mitochondriale des cellules	82
2.6.6. Analyse de la lyse cellulaire	83
2.6.7. Analyse de l'apoptose et de la nécrose cellulaires	83
2.7. Analyse des propriétés de différenciation des CSM	84
2.7.1. Différenciation adipogénique	84
2.7.2. Différenciation chondrogénique	84
2.7.3. Différenciation ostéogénique	85
2.8. Étude du métabolisme cellulaire	85
2.8.1. Dosages enzymatiques du glucose et du lactate	85
2.8.2. Dosages enzymatiques de la glutamine	85
2.8.3. Dosage des ions ammoniums	86
2.9. Calculs des paramètres cinétiques et des contraintes de cisaillement	86
2.9.1. Calcul de la vitesse spécifique de croissance	86
2.9.2. Calcul des vitesses métaboliques spécifiques et des rendements.....	87
2.9.3. Calcul de la vitesse de dégradation spontanée de la glutamine.....	87
2.9.4. Calcul des contraintes de cisaillement en spinner	88

2.1. Prélèvement et banque cellulaire

Les CSM porcines proviennent de porcs âgés d'environ 3 mois. Les prélèvements ont été réalisés à l'Ecole de Chirurgie de Nancy. Les porcs sont anesthésiés avant d'insérer un trocart dans leur crête iliaque afin d'atteindre la moelle osseuse. Une seringue, contenant de l'héparine et du tampon phosphate, est connectée au trocart afin de recueillir environ une centaine de millilitres de moelle osseuse. Le prélèvement est rapidement transvasé stérilement dans des flacons de 75 cm² (environ 40 mL par flacon). Les flacons de culture sont alors placés dans un incubateur (Sanyo®, 5 % CO₂, 37 °C) pendant une semaine, avec du milieu de culture. Ce milieu est composé du milieu de base IMDM (Gibco®, 21980), de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (Invitrogen®, 26140), d'1 % (v/v) d'antibiotiques (10 000 unités de pénicilline G, 10 mg de streptomycine, et 25 µg d'amphotéricine B ; Fisher®, W3473M), et de 0,1 mM de β-mercaptoéthanol (Sigma®, M7522). La composition de l'IMDM est détaillée dans le Tableau 8. Lors du changement de milieu après une semaine, toutes les cellules non adhérentes sont éliminées (érythrocytes, adipocytes, cellules souches hématopoïétiques, etc..), pour ne conserver que les CSM et les macrophages. Les macrophages n'ayant pas de propriétés d'auto-renouvellement, ils disparaissent de la culture après quelques jours.

Par la suite, le milieu de culture des flacons est changé deux fois par semaine, jusqu'à ce que les cellules atteignent la confluence (en 1 à 2 semaines). Elles sont alors détachées avec de la trypsine-EDTA (0,05 %) et ensemencées dans de nouveaux flacons de culture de 175 cm² à une concentration de 5000 cellules/cm², ce qui correspond au premier passage (P1). Lorsque les cellules ont à nouveau atteint la confluence, elles sont trypsinées et congelées en aliquots, à une concentration de 10⁷ cellules/mL dans des cryotubes de 1 mL. Le milieu de congélation est composé de 70 % de milieu de culture, 20 % de SVF et 10 % de DMSO (Prolabo®). Les aliquots sont refroidis par paliers dans un cryoconservateur (Cryodiffusion®), puis stockés dans de l'azote liquide. Lors de l'utilisation des cellules, un aliquot est décongelé et ensemencé à une concentration de 5000 cellules/cm² en flacons de 175 cm², ce qui correspond au passage 2 (P2). Les cellules sont ensuite propagées pendant 1 ou 2 passages supplémentaires, pour être utilisées entre les passages 4 à 6 (P4-P6) au cours des différentes expériences.

2.2. Milieux de culture

Différents milieux de culture de base ont été utilisés pour cultiver les cellules, tels que l'IMDM (Gibco®, 21980), l'αMEM (Sigma®, M0894 et M4526), et le DMEM (Sigma®, M5796), dont les principales différences sont les concentrations en glucose, en glutamine et en antioxydants. La composition de ces milieux est détaillée dans le Tableau 8. Ils sont supplémentés par 10 % de SVF et 1 % d'antibiotiques.

Tableau 8. Composition des milieux de base IMDM, αMEM et DMEM (concentrations exprimées en mg/L)

	IMDM	αMEM 4526	αMEM 0894	DMEM
VITAMINES				
L-acide ascorbique. Na		500	500	
Biotine (B7)	0,013	0,1	0,1	
Choline Chloride	4	1	1	4
Acide folique (B9)	4	1	1	4
Myo-Inositol	7	2	2	7
Niacinamide (B3)	4	1	1	4
D-acide pantothénique-1/2 Ca (B5)	4	1	1	4
Pyridoxal.HCl (B6)	4	1	1	
Pyridoxine.HCl				4
Riboflavine (B2)	0,4	0,1	0,1	0,4
Thiamine.HCl (B1)	4	1	1	4
Vitamine B12	0,013	1,36	1,36	
SELS INORGANIQUES				
CaCl ₂ ·2H ₂ O	219	265	265	200
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O				0,1
K Cl	330	400	400	400
K NO ₃	0,076			
MgSO ₄ (anhyd.)		98	98	98
MgSO ₄ 2H ₂ O	200			
NaCl	4500	6800	6800	6400
NaHCO ₃	3000	2200		3700
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	140			
NaH ₂ PO ₄ (anhyd.)		122	122	109
NaSeO ₃	0,017			
AUTRES				
HEPES	6000			
Rouge phenol.Na	15	11	11	16
Pyruvate. Na	110	110	110	
D-Glucose	4500	1000	1000	4500
Acide thiocétique			0,2	

Tableau 8 (suite). Compositions des milieux de base IMDM, α MED et DMED (concentration en mg/L)

	IMDM	α MED 4526	α MED 0894	DMED
ACIDES AMINES				
Alanine	25	25	25	
L-arginine.HCl	84	126	126	84
L-asparagine H ₂ O	28,4	50	50	
L-acide aspartique	30	30	30	
L-Cystéine-HCl-monohydrate		100	100	63
L-cystine-2 HCl	70	31	31	
L-acide glutamique	75	75	75	
L-glutamine	584		292	584
Glycine	30	50	50	30
L-histidine-HCl-H ₂ O	42	42	42	42
L-isoleucine	105	52	52	105
L-leucine	105	52	52	105
L-lysine-HCl	146	75	72,5	146
L-Méthionine	30	15	15	30
L-Phénylalanine	66	32	32	66
L-Proline	40	40	40	
L-sérine	42	25	25	42
L-thréonine	95	48	48	95
L-tryptophane	16	10	10	16
L-tyrosine-Na ₂ -H ₂ O	103,8	51,9	51,9	103,8
L-valine	94	46	46	94

2.3. Culture des CSM en mode statique

2.3.1. Culture des CSM en microplaque 96-puits

Les cultures en microplaque permettent de tester rapidement plusieurs compositions de milieu de culture sur la croissance des CSM. Les cellules sontensemencées à 6000 cellules/cm² dans chaque puits, d'une surface de 0,33 cm² et contenant 200 μ L de milieu de culture (IMDM, α MED ou DMED, 10 % de SVF, 1 % d'antibiotiques, 0,1 mM de β -mercaptoéthanol), soit une concentration cellulaire de 9900 cellules/mL. Les puits situés en bordure de plaque ne sont pas utilisés en raison d'une évaporation accrue du milieu. Tous les jours, six puits,ensemencés dans les mêmes paramètres opératoires de culture, sont rincés avec du PBS (Phosphate Buffer Saline, Sigma D5652). Après 5 min de trypsination (50 μ L; 0,05 %) à 37 °C, 150 μ L de milieu de culture sont ajoutés et l'ensemble est homogénéisé. La plaque est maintenue 20 mn à 37°C pour que les cellules sédimentent au fond des puits avant d'être dénombrées par analyse d'images (Cellscreen®).

Un comptage des cellules sans étape de trypsination a également été testé : le Cellscreen® permet en effet de quantifier les cellules en fonction de la surface qu'elles occupent au fond de chaque puits (cf. 2.6.1. Analyse des cellules sur microplaques par analyse d'images).

2.3.2. Culture des CSM en flacons statiques

Les CSM porcines sontensemencées en flacons statiques de 25 cm² à une concentration initiale de 6000 cellules/cm², dans un volume de milieu de culture de 5 mL, soit une concentration de 3×10^4 cellules/mL. Les cultures sont réalisées soit avec changement de milieu (50 % du volume) tous les deux jours à partir du 3^{ème} jour, soit sans changement de milieu. Le dénombrement des cellules est fait soit après trypsination, soit après lyse cellulaire (cf. 2.6. Analyse quantitative des cellules).

2.4. Culture de CSM en mode agité

2.4.1. Culture des CSM sur microporteurs en mode agité

Les cultures, mettant en œuvre les CSM adhérees sur microporteurs, sont effectuées dans des flacons agités de type «spinner» (Techne), préalablement siliconés (Sigmacote®, Sigma SL2), de 500 mL de volume total (Figure 36). Les cellules sontensemencées dans 100 mL de milieu de culture à une concentration de 6000 cellules/cm² sur une surface externe totale de microporteurs de 1000 cm². Après une période d'incubation de 24 h sans agitation, le volume est ajusté à 200 mL, ce qui correspond à 3×10^4 cellules/mL et à 5 cm²/mL de surface de microporteurs. Les spinners sont placés dans un incubateur (37°C, 5 % CO₂) sur une table d'agitation magnétique de type pendulaire (Variomag®, Biosystem®), et les fréquences d'agitation sont fixées à 0, 25 ou 75 rpm. Les cultures sont effectuées soit en mode discontinu, soit avec un changement de milieu tous les deux jours à partir du 3^{ème} jour. A chaque changement de milieu, les microporteurs sédimentent pendant 5 mn sans agitation, avant que le milieu usagé ne soit prélevé en surface.



Figure 36. Schéma d'un spinner avec agitation par rotation magnétique

Différents types de microporteurs chargés positivement sont testés : Hillex (Sigma®, M4060), Cytodex 1 (Sigma®, C0646), Cytodex 3 (Sigma®, C3275), Cytopore 2 (GE healthcare®, 17-1271-01) et Cultispher G (Sigma®, M9418). Leurs caractéristiques sont décrites dans le Tableau 9. Avant utilisation, les microporteurs sont hydratés et lavés plusieurs fois dans du PBS ne contenant ni Ca^{2+} , ni Mg^{2+} , puis autoclavés et rincés dans du milieu de culture avant utilisation. La concentration de microporteurs est calculée pour obtenir une surface totale externe de 1000 cm^2 . Pour cela, la surface externe sèche des différents microporteurs (valeurs données par les fournisseurs ou calculées à partir du diamètre et de la masse volumique) est utilisée pour calculer le poids sec de microporteurs nécessaire pour obtenir une surface de 1000 cm^2 . Une concentration de microporteurs par volume de milieu de culture est ensuite calculée.

Tableau 9. Principales caractéristiques des différents microporteurs utilisés

Microporteurs	Matériau	Diamètre humide moyen (μm)	Porosité (μm)	Surface externe sèche (cm^2/g)	Poids (g) pour 1000 cm^2	Concentration (g /L) pour 1000 cm^2
Hillex II	Polystyrène et triméthyle d'ammonium	170	Non	515	1,94	9,7
Cytodex 1	Dextrane et DEAE (1,5 meq/g)	190	Non	4400	0,23	1,2
Cytodex 3	Dextrane et gélatine	175	Non	2700	0,37	1,8
Cytopore 2	Cellulose et DEAE (1,8 meq/g)	240	30	5000	0,20	1
Cultispher G	Gélatine	255	20	2000	0,50	2,5

2.4.2. Culture des CSM sous forme d'agrégats

Avant de cultiver les CSM sous forme d'agrégats en flacons agités, les cellules sont préalablement ensemencées dans des flacons statiques. Afin d'obtenir une suspension homogène d'agrégats, la surface des flacons statiques doit inhiber l'adhérence des cellules. Pour cela, une solution à 2 % d'agarose dans de l'eau distillée est préparée et autoclavée. Celle-ci est ajoutée stérilement dans les flacons statiques de 175 cm² afin de former une couche épaisse de gel. Les flacons sont refroidis pendant 24 h avant d'être utilisés. Puis, les CSM sont pré-ensemencées dans deux de ces flacons préparés à une concentration de 6×10^4 cellules/mL dans un total de 100 mL de milieu de culture. Une période statique de 24 h permet aux cellules de former des agrégats de petites tailles. Puis, le contenu des deux flacons est transvasé dans un spinner siliconé. La fréquence d'agitation est fixée à 25 rpm, sans phase statique. Après 24 h, le volume du milieu de culture est ajusté à 200 mL, la concentration cellulaire étant alors de 3×10^4 cellules/mL. Le milieu de culture n'est pas changé.

2.4.3. Culture des CSM en suspensions unicellulaires

Les CSM porcines sont ensemencées à 6×10^4 cellules/mL dans des spinners siliconés. Le volume d'ensemencement est de 100 mL avec une fréquence d'agitation de 25 rpm sans phase statique. Après 24 h, le volume du milieu de culture est ajusté à 200 mL, la concentration cellulaire étant alors de 3×10^4 cellules/mL. Le milieu de culture n'est pas remplacé au cours de la culture. Les conditions opératoires des différentes cultures sont résumées dans le Tableau 10.

Tableau 10. Conditions opératoires des cultures de CSM dans différents systèmes

Système de culture	Cellules/cm ²	Volume de milieu (mL)	Cellules/mL	Surface (cm ²)	Surface/mL (cm ² /mL)
Microplaque	6000	0,2	9×10^3	0,3	1,5
Flacon statique	6000	5	3×10^4	25	5
Microporteur	6000	200	3×10^4	1000	5
Agrégat		200	3×10^4		
Suspension unicellulaire		200	3×10^4		

2.5. Analyse morphologique des CSM

2.5.1. Observation par microscopie optique

Afin d'observer les cellules sur les microporteurs Cytodex 1, un échantillon de culture est placé sur une lame de microscope inversé (Axiovert 10, Zeiss®, x 40). Une meilleure observation des cellules est rendue possible par un marquage préalable avec 1 % (v/v) de bleu de méthylène (Fluka®, 66721) pendant 5 mn à 37°C. Puis, les cellules sont rincées deux fois au PBS. Afin de fixer les cellules, une solution de 2,5 % de glutaraldéhyde (Sigma®, G6275) est ajoutée avant de les observer sous microscope.

2.5.2. Observation par microscopie électronique à balayage

Les cellules peuvent également être observées par microscopie électronique à balayage (MEB, JSM 6490LV Jeol®, x 1500). Les prélèvements sont rincés avec du PBS, fixés dans 2,5 % de glutaraldéhyde et déshydratés par des bains d'acétone (Carlo Erba®) de concentrations croissantes (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %) pendant 10 mn chacun. Puis les échantillons sont recouverts d'une fine couche d'or (Jeol®, JFC-1100 Ion sputter®) avant l'observation par le MEB.

2.6. Analyse quantitative des cellules

L'analyse des cellules a été réalisée en utilisant plusieurs méthodes basées sur la microscopie, l'analyse d'images, la cytométrie ou la spectrométrie.

2.6.1. Analyse des cellules en microplaques par analyse d'images

La numération des cellules cultivées en microplaques 96-puits est réalisée par analyse d'images à l'aide de l'équipement Cellscreen® (Innovatis®). Les cellules totales sont dénombrées soit en mode suspension, soit en mode adhérent. Le module suspension détecte les cellules selon des paramètres de taille et de circularité (Figure 37a), après trypsination des CSM. Le module adhérence détecte le contour des cellules adhérentes par analyse des niveaux de gris (Figure 37b). L'évolution du pourcentage de la surface des puits occupée par les cellules est ainsi suivie. La microplaque 96-puits est placée sous la caméra à phase inverse intégrée

au Celscreen®. Les images des puits sont analysées par un logiciel dédié. Chaque condition est répliquée 6 fois et l'erreur de numération a été estimée avec les CSM à 20 %.

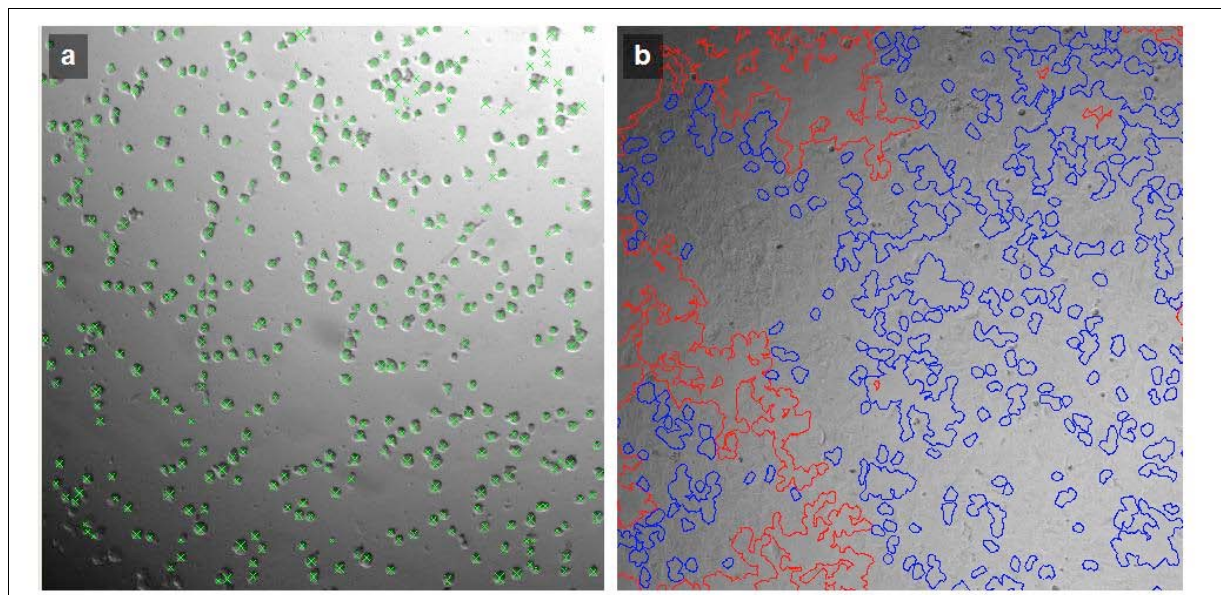


Figure 37. Comptage des CSM par analyses d'image avec le Celscreen®. (a) Comptage des cellules en suspension, chaque cellule est comptée individuellement. (b) Comptage des cellules adhérentes, la surface de recouvrement est quantifiée en délimitant les contours extérieur (bleu) et intérieur (rouge)

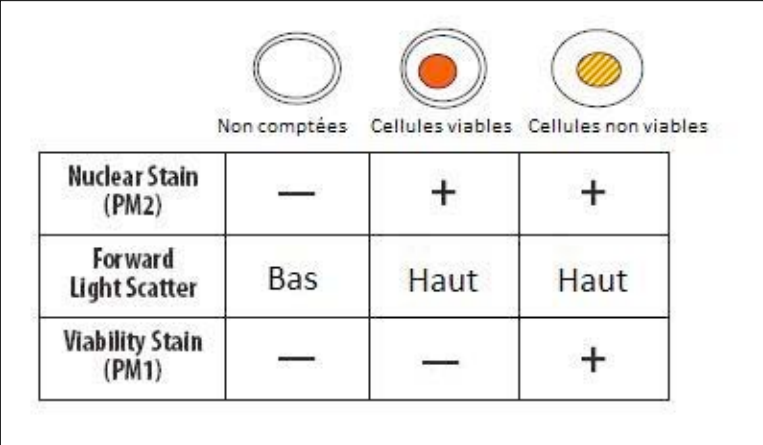
2.6.2. Analyse quantitative des cellules par microscopie optique

Le comptage des cellules cultivées en flacons statiques ou sur microporteurs peut être réalisé par microscopie optique. Dans ce cas, les cellules doivent d'abord être détachées de leur support par trypsination. La trypsination en flacon statique s'effectue en rinçant les cellules avec du PBS et en ajoutant environ 50 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ de trypsine à 0,05 %. Le flacon est maintenu 5 mn à 37°C, avant d'ajouter du milieu de culture (100 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$). Pour les cellules cultivées sur microporteurs, le surnageant est éliminé une fois les microporteurs sédimentés. Ceux-ci sont ensuite rincés avec du PBS. De la trypsine à 0,25 % est ajoutée (0,5 mL/mL) aux microporteurs, suivi d'une incubation à 37°C pendant 10 mn. Du milieu de culture est ensuite ajouté (1 mL/mL). Dans les deux cas, les cellules sont marquées au bleu trypan (10 % v/v). Le comptage des cellules vivantes et des cellules mortes est ensuite réalisé sous microscope au moyen d'un hémacytomètre. L'erreur de numération est évaluée à 20 %.

2.6.3. Analyse des cellules par cytométrie

Le comptage des cellules par cytométrie a été réalisé à l'aide du cytomètre Guava EasyCyte® (Millipore), après trypsination des cellules et marquage avec 10 % (v/v) de réactif Guava Viacount® (Millipore®, 4000-0041). Les échantillons sont préalablement filtrés (40 µm) afin de supprimer les microporteurs et éviter de colmater le capillaire du cytomètre. La distinction entre cellules viables et non-viables se fait sur la base de la perméabilité membranaire à deux molécules fluorescentes s'intercalant dans l'ADN, contenues dans le réactif Viacount®. Une des deux molécules diffuse à travers les membranes de toutes les cellules et est détectée par le photomultiplicateur 2 (PM2). L'autre molécule pénètre dans les cellules dont l'intégrité membranaire est compromise, et est détectée par le photomultiplicateur 1 (PM1), qui quantifie ainsi les cellules non viables.

La taille des cellules est mesurée par l'intensité de la dispersion de la lumière (Forward Light Scatter, FSC). Les débris cellulaires (FSC bas) ne sont ainsi pas pris en compte. Chaque population de cellules est représentée sous forme de graphes: viabilité (PM1) vs. cellules nucléées (PM2), et taille des cellules (FSC) vs. viabilité (PM1). La méthode permet ainsi de comptabiliser les cellules viables et les cellules mortes non lysées (Figure 38).



	Non comptées	Cellules viables	Cellules non viables
Nuclear Stain (PM2)	—	+	+
Forward Light Scatter	Bas	Haut	Haut
Viability Stain (PM1)	—	—	+

Figure 38. Comptage des cellules et estimation de leur viabilité par le cytomètre Guava

2.6.4. Analyse des noyaux cellulaires par microscopie et cytométrie

Le comptage des noyaux cellulaires nécessite une étape préalable de lyse des cellules avec de l'acide citrique (Sigma®, 27109) à une concentration de 0,1 M pour libérer les noyaux. Dans le cas de l'analyse par

microscopie, les noyaux sont ensuite marqués avec du cristal violet (1 g/L). Les échantillons sont placés à 37°C sous agitation pendant 1 h, puis les noyaux sont comptés sur un hémacytomètre.

Le comptage des noyaux cellulaires par cytométrie a été développé spécifiquement au sein du laboratoire. Dans ce cas, les échantillons sont filtrés (40 µm) afin d'éliminer les microporteurs. Le réactif Guava Viacount® est ajouté (10 %, v/v). Après 5 mn d'incubation, les échantillons sont analysés par cytométrie. L'erreur maximale de comptage entre deux échantillons prélevés au même moment est de l'ordre de 20 %. Le réactif Viacount® contient des molécules fluorescentes qui s'intercalent dans l'ADN, et permettent ainsi de dénombrer les noyaux. La représentation des noyaux est localisée au même endroit que les cellules non viables, soit une détection par le PM1 et le PM2, et une FSC haute (Figure 39). Les débris cellulaires ne sont pas détectés par le PM1, et les mitochondries ont une taille inférieure aux noyaux.

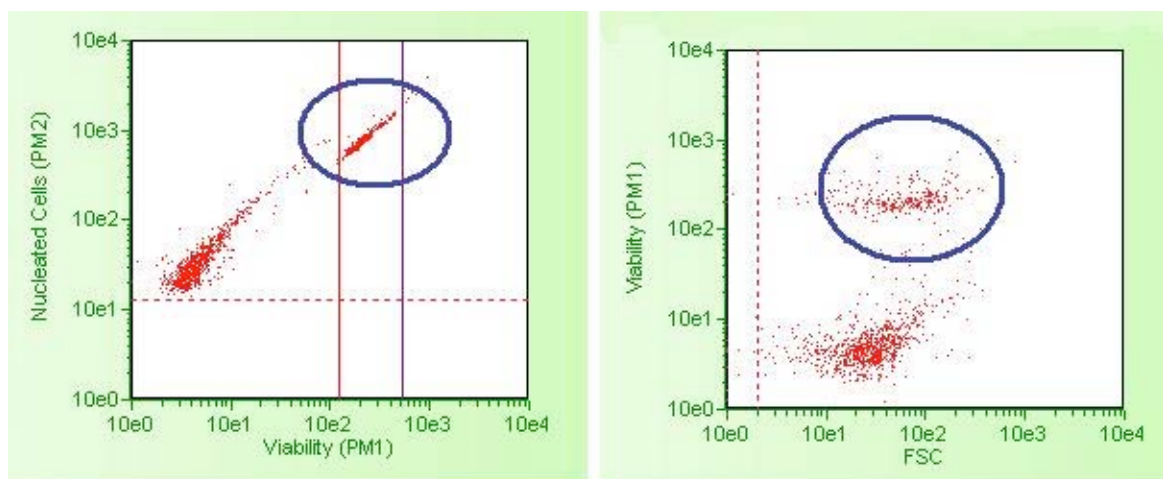


Figure 39. Localisation des noyaux de CSM porcines marqués par le réactif Viacount®. Les noyaux marqués sont représentés en haut à droite des graphes

2.6.5. Analyse de l'activité mitochondriale des cellules

Les cellules peuvent être dénombrées indirectement par la mesure de leur activité mitochondriale. Cette méthode est basée sur la réduction de sels de tétrazolium ((3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényl tétrazolium bromide), ou MTT, par l'enzyme mitochondriale succinique déshydrogénase des cellules viables, qui conduit à la formation de cristaux violets de formazan, non solubles en solution aqueuse (Chiba et al., 1998). Cette méthode a été adaptée à des cellules adhérentes sur microporteurs. Une solution à 5 g/L de MTT (Sigma®, M5655) est rapidement ajoutée à l'échantillon (10 % v/v), placé à 37°C pendant 1 h. Le surnageant est ensuite enlevé après centrifugation et 500 µL de DMSO sont ajoutés au culot pour dissoudre les cristaux de formazan formés. L'échantillon est agité et centrifugé (5 mn; 800 rpm). Le surnageant est

placé dans une microplaque pour une lecture de la coloration par un spectromètre (Titertek Instruments®) à 570 nm. Une gamme étalon est effectuée avec des concentrations de cellules sur microporteurs déterminées par une autre méthode de comptage (trypsination et comptage sur hémacytomètre).

2.6.6. Analyse de la lyse cellulaire

La lyse cellulaire est quantifiée par mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le surnageant de culture, à l'aide d'un analyseur automatique (Vitalab Selectra®) et d'un kit enzymatique (LDH PAP, Ellitech®). Le principe de la réaction repose sur la conversion du L-lactate en présence de NAD^+ en pyruvate et NADH (et H^+) par la LDH. L'apparition du NADH est quantifiée par mesure de l'absorbance à 340 nm. Afin de rapporter l'activité de la LDH présente dans le surnageant à un nombre de cellules lysées, l'activité de la LDH intracellulaire est préalablement mesurée avec des cellules viables. Pour cela, les cellules vivantes sont comptées et centrifugées. Le culot est repris dans une solution de lyse (PBS sans Ca^{2+} ni Mg^{2+} , contenant du tween 20 à une concentration de 2°/°). Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation et l'activité de la LDH intracellulaire est mesurée dans le surnageant. La valeur de la LDH interne mesurée dans les CSM porcines est de 1 U pour $3,5 \times 10^5$ cellules viables.

2.6.7. Analyse de l'apoptose et de la nécrose cellulaires

Cette analyse est réalisée par cytométrie (Guava Easycyte®). Dans un premier temps, les cellules cultivées sur microporteurs sont trypsinées. Puis, 100 μL de l'échantillon sont placés dans une microplaque de 96-puits ainsi que 100 μL de réactif (Guava Nexin®, Millipore, 4700-1140). La plaque est laissée à l'obscurité pendant 20 mn, puis analysée par le cytomètre. La population de cellules non apoptotiques témoin est issue d'un prélèvement d'une culture de 4 h sur microporteurs en conditions statiques.

Le réactif Nexin® contient de l'annexine V liée à de la phycoérythrine (Annexin V-PE), et du 7-aminoactinomycine D (7-AAD). L'annexine V se lie à la phosphatidyl-sérine (PS), un phospholipide de la face interne de la membrane plasmique, transloqué sur la face externe lorsque les cellules entrent en apoptose. Du à une différence de potentiel de membrane, le 7-AAD ne diffuse pas à travers la membrane plasmique des cellules viables et en apoptose précoce, mais pénètre dans les cellules en apoptose tardive ou mortes.

2.7. Analyse des propriétés de différenciation des CSM

Afin de vérifier que les CSM porcines ne se sont pas différenciées pendant le procédé d'expansion, leur multipotence est analysée en induisant une différenciation *in vitro* en adipocytes, en chondrocytes et en ostéocytes. Cette multipotence est analysée sur des cellules obtenues à la fin du procédé d'expansion lors de cultures réalisées en flacon statique, et sur Cytodex 1 en flacons agités à 25 rpm ou non agité. La différenciation est induite par des kits de différenciation, sur des cellulesensemencées dans des microplaques 96-puits.

2.7.1. Différenciation adipogénique

La différenciation adipogénique est induite par un kit spécifique (Fisher®, Stempro adipogenesis differentiation kit, W59599). Les cellules, issues de l'expansion, sontensemencées à une concentration de 10^4 cellules/cm² dans un milieu de différenciation adipogénique, changé deux fois par semaine. Après deux semaines, les cellules sont lavées dans du PBS, fixées avec 2,5 % de glutaraldéhyde et colorées avec un marqueur rouge spécifique des lipides, l'Oil-red-O (Sigma®, O0625). Les cellules différenciées en adipocytes sont reconnaissables à leurs contenus riches en lipides.

2.7.2. Différenciation chondrogénique

La différenciation chondrogénique est induite par un kit dédié (Fisher®, Stempro chondrogenesis differentiation kit, W59972). Les cellules, issues de l'expansion, sontensemencées en gouttes de 5 µL à une concentration de $1,6 \times 10^7$ cellules/mL. Chaque goutte est placée au milieu d'un puits de la microplaque afin que les cellules adhèrent les unes aux autres. Après deux heures, le milieu de différenciation chondrogénique est ajouté et changé deux fois par semaine. Après trois semaines, les cellules sont lavées avec du PBS, fixées avec 2,5 % de glutaraldéhyde et colorées avec un marqueur bleu spécifique des protéoglycanes, l'alcan bleu (Sigma®, A9186). Les cellules différenciées en chondrocytes sont reconnaissables à leur forte production de protéoglycanes.

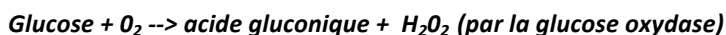
2.7.3. Différenciation ostéogénique

La différenciation ostéogénique est induite par un kit spécifique (Fisher®, Stempro osteogenesis differentiation kit, W5959A). Les cellules, issues de l'expansion, sontensemencées à une concentration de 5000 cellules/cm² dans du milieu de différenciation ostéogénique, changé deux fois par semaine. Après trois semaines, les cellules sont lavées par du PBS, puis fixées avec 2,5 % de glutaraldéhyde et colorées avec un marqueur rouge spécifique des dépôts de calcium, l'alizarine (Sigma®, A5533). Les cellules différenciées en ostéocytes sont reconnaissables à leur production de dépôt de calcium.

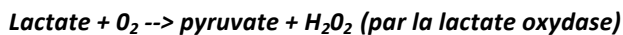
2.8. Étude du métabolisme cellulaire

2.8.1. Dosages enzymatiques du glucose et du lactate

Des kits enzymatiques permettant de doser le D-glucose (Glucose PAP, Elitech®) et le L-lactate (Lactate PAP, Biomérieux®) dans les surnageants de cultures ont été mis en œuvre dans l'analyseur automatique (Vitalab Selectra®). Le dosage du glucose est effectué par la glucose oxydase/peroxydase, selon deux réactions consécutives:



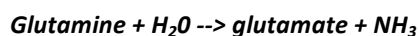
La quantité de quinonéimine, proportionnelle à la quantité de glucose, est mesurée par l'absorbance à 500 nm. De même, le dosage du lactate est effectué par la lactate oxydase/peroxydase, selon deux réactions consécutives:



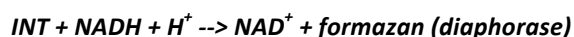
La quantité de quinonéimine, proportionnelle à celle de lactate, est mesurée par absorbance à 500 nm.

2.8.2. Dosages enzymatiques de la glutamine

Le dosage de la glutamine dans le surnageant des cultures est basé sur le dosage du glutamate par un kit enzymatique (Glutamate, R-Biopharm®) et un spectrophotomètre (Thermo Scientific®, Multiskan Go®). La glutamine est d'abord convertie en glutamate par l'asparaginase (Roche®, 139092) :



Puis le glutamate est dosé selon la réaction suivante:



La quantité de formazan est évaluée à 492 nm. Une soustraction du glutamate présent initialement dans l'échantillon permet ensuite d'obtenir la concentration réelle en glutamine.

2.8.3. Dosage des ions ammoniums

Les concentrations extracellulaires en ions ammoniums sont mesurées avec une électrode à diffusion gazeuse (Orion®). A pH basique, les ions ammoniums sont convertis en NH_3 gazeux. Les surnageants de culture (3 mL) sont mis en contact avec le même volume de soude (0,5 N). L'ammoniaque formée fait varier le potentiel de l'électrode par diffusion au travers de la membrane en téflon. Une gamme étalon est réalisée avec des solutions de concentrations croissantes en NH_4Cl (de 0,5 à 20 mM).

La concentration d'ions ammoniums est ensuite calculée à partir de la loi de Nernst:

$$E = E_0 - S \cdot \log[\text{NH}_3]$$

Avec : E , le potentiel mesuré (mV); E_0 , le potentiel de référence (mV); S , la pente de la courbe et $[\text{NH}_3]$, la concentration en ammoniac (mM).

2.9. Calculs des paramètres cinétiques et des contraintes de cisaillement

2.9.1. Calcul de la vitesse spécifique de croissance

Les points expérimentaux (un à deux par jour) sont rapportés dans le logiciel Kyplot®. Les courbes sont lissées grâce à la fonction splines ("smoothing spline regression"). Les vitesses spécifiques de croissance μ sont calculées à partir des courbes lissées, durant la phase active de croissance (entre 24 h et 50 h de culture) selon la formule suivante, établie à partir du bilan de matière sur les cellules en réacteur fermé :

$$\mu = \frac{dX}{dt \cdot X_i} \quad (\text{h}^{-1})$$

où dt est l'intervalle de temps ($t_{i+1} - t_{i-1}$), dX est la différence des concentrations cellulaires lissées à t_{i-1} et t_{i+1} , et X_i est la concentration cellulaire au temps t_i .

2.9.2. Calcul des vitesses métaboliques spécifiques et des rendements

Les points expérimentaux (un à deux par jour) sont rapportés dans le logiciel Kyplot®. Les courbes sont lissées grâce à la fonction splines ("smoothing spline regression"). Les vitesses spécifiques de consommation q_s des substrats S (glucose et glutamine) sont calculées selon la formule suivante:

$$q_s = \frac{-dS}{dt * X_i} \quad (\text{pmol/cellule/h})$$

où dt est l'intervalle de temps ($t_{i-1} - t_{i+1}$), dS est la différence des concentrations en substrat lissées à t_{i-1} et t_{i+1} , et X_i est la concentration cellulaire au temps t_i .

Les vitesses spécifiques de production q_p des produits P (lactate et ammonium) sont calculées selon la formule suivante:

$$q_p = \frac{dP}{dt * X_i} \quad (\text{pmol/cellule/h})$$

où dt est l'intervalle de temps ($t_{i-1} - t_{i+1}$), dP est la différence des concentrations en produit lissées à t_{i-1} et t_{i+1} , et X_i est la concentration cellulaire au temps t_i .

Les rendements $Y_{p/s}$ des produits P générés par rapport aux substrats S consommés ($Y_{\text{lactate/glucose}}$ et $Y_{\text{ammonium/glutamine}}$) sont calculés selon la formule suivante:

$$Y_{p/s} = \frac{dP}{dS}$$

2.9.3. Calcul de la vitesse de dégradation spontanée de la glutamine

La dégradation spontanée de la glutamine a été quantifiée dans les mêmes conditions opératoires que celles des cultures, mais en absence de cellules (spinner agité à 25 rpm ; 37°C). Le milieu de culture est le même que pour les cultures ensemencées, soit de l' α MEM, supplémenté de 10 % de SVF, avec une concentration initiale totale en glutamine de 4 mM. La vitesse de dégradation calculée à partir de la moyenne de deux essais est de 6 μ M de glutamine par heure. En parallèle, la vitesse de production des ions ammoniums est de 9 μ M de NH_4^+ par heure (Figure 40).

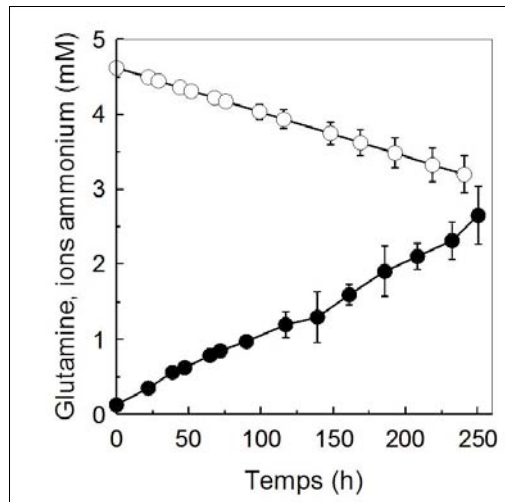


Figure 40. Dégradation de la glutamine (●) et formation d'ions ammoniums (○) dans un essai sans cellules en spinner agité à 25 rpm et placé dans un incubateur à 37 ° C (Milieu de culture composé d'αMEM, de 10 % de SVF, et d'un total de 4 mM de glutamine)

2.9.4. Calcul des contraintes de cisaillement en spinner

Afin de calculer les contraintes de cisaillement maximales dans le spinner à une fréquence d'agitation N de $0,42 \text{ s}^{-1}$ (25 rpm) et de $1,25 \text{ s}^{-1}$ (75 rpm), le nombre de Reynolds Re est d'abord calculé en utilisant par définition la formule suivante, valable dans nos systèmes pendulaires:

$$Re = \frac{\rho N D^2}{\mu}$$

où D est le diamètre orbital de l'agitation (7,2 cm). La viscosité dynamique μ (Pa.s), et la densité ρ du milieu (kg.m^{-3}) sont similaires à celles de l'eau à une température de 37° C. Les valeurs du nombre de Reynolds obtenus sont de 3100 à 25 rpm et 9200 à 75 rpm, indiquant que le régime d'écoulement n'est pas complètement turbulent (Hewitt et al., 2011). Le calcul du taux de cisaillement G (s^{-1}) en tout point du bioréacteur est envisageable mais implique une simulation numérique de l'hydrodynamique, ce qui n'est pas le propos de cette étude. Ainsi, seule une estimation du taux de cisaillement maximal $G_{\max}$ (s^{-1}) est ici réalisée, selon la formule suivante, illustrée par la Figure 41:

$$G_{\max} = \frac{\pi N D}{e}$$

où e est l'espace entre la boule et le fond du spinner, égale ici à 5 mm,

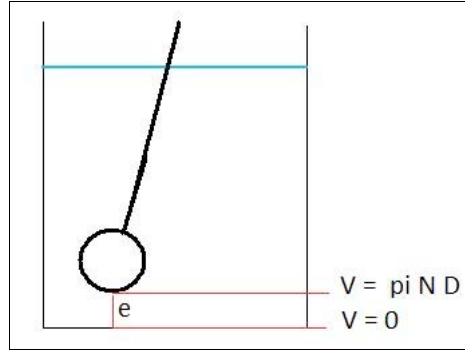


Figure 41. Illustration du calcul du taux de cisaillement maximal dans un spinner. Avec e , l'espace entre la sphère rotative et le fond du spinner; V , la vitesse au fond du spinner (nulle) et au niveau de la sphère rotative (égale à π , multiplié par l'agitation N et le diamètre orbital D de l'agitation)

La contrainte de cisaillement maximale σ_{max} (Pa) est ensuite calculée en utilisant le taux de cisaillement maximal G_{max} , et la viscosité dynamique μ , et en supposant que le cisaillement laminaire est dominant, selon la formule suivante:

$$\sigma_{max} = \mu G_{max} = \mu \frac{\pi N D}{e}$$

Dans le cas où un écoulement turbulent serait considéré, notamment dans le voisinage de l'agitateur, il conviendrait de calculer la dissipation volumique escomptée. Dans le cas des bioréacteurs de type spinner, une bonne estimation du nombre de puissance est $Np = 0,5$, comme indiqué par Hewitt et al. (2011). Ainsi, la dissipation volumique, P/V , et le taux de dissipation moyen de l'énergie cinétique turbulente, ϵ , sont données, en régime turbulent, respectivement par :

$$P/V = Np \frac{\rho N^3 D^5}{V} \quad \langle \epsilon \rangle = \frac{1}{\rho} \frac{P}{V}$$

Il est alors possible d'estimer le cisaillement global G_{turb} dans le réacteur par :

$$G_{turb} = \sqrt{\frac{1}{\mu} \frac{P}{V}}$$

Le calcul de la dissipation volumique permet également d'accéder à l'échelle de Kolmogorov, l_k , qui est l'échelle des plus petits tourbillons dans le bioréacteur :

$$l_k = \left(\frac{\mu^3}{\rho^3 \langle \epsilon \rangle} \right)^{0,25}$$

Les résultats donnés dans le Tableau 11 indiquent que les microporteurs sont transportés dans la zone inertielle de la turbulence, ce qui permet de donner la valeur du gradient de vitesse à l'échelle de la particule (Bouyer et al., 2005) :

$$G(d_p) = 2^{5/3} \sqrt{3 \cdot 0,73/2} \left(\frac{\epsilon}{d_p^2} \right)^{1/3}$$

et de la contrainte turbulente en résultant :

$$\sigma_{turb} = \rho G(d_p)^2 d_p^2$$

Tableau 11. Principales grandeurs hydrodynamiques calculées dans le bioréacteur pour les conditions de culture utilisées

Hypothèse du régime d'écoulement		Re	G_{max} (s ⁻¹)	σ_{max} (Pa)	P / V (W.m ⁻³)	l_K (μm)	G_{turb} (s ⁻¹)	$G(d_p)$ (s ⁻¹)	σ_{turb} (Pa)
Laminaire	N = 25 rpm	3060	19	0,013	*	*	*	*	*
	N = 75 rpm	9200	56	0,04	*	*	*	*	*
Turbulent	N = 25 rpm	3060	*	*	0,35	178	22	68	0,18
	N = 75 rpm	9200	*	*	9,4	78	116	205	1,7

Chapitre 3. Influence des paramètres de culture sur la réponse des CSM porcines

3.1. Étude préliminaire des paramètres d'ensemencement	94
3.1.1. Concentration d'ensemencement des CSM en mode statique	94
3.1.2. Conditions d'ensemencement de CSM en mode agité	95
3.1.3. Influence d'une agitation initiale sur l'adhérence des CSM	97
3.1.4. Influence de la siliconisation des spinners	98
3.1.5. Influence de l'âge des CSM ensemencées	100
3.2. Influence des composés du milieu de culture	104
3.2.1. Influence du sérum de veau fœtal	104
3.2.2. Influence des autres composés du milieu de culture.....	105
Conclusion du chapitre 3	119

Introduction du Chapitre 3

L'étude bibliographique a permis de montrer que la réponse des CSM dépend fortement des paramètres environnementaux, tels que les facteurs de croissance ou les surfaces d'adhérence (Kolf et al., 2007; Docheva et al., 2007). L'expansion des CSM doit donc être réalisée dans un environnement adapté à leur croissance, mais sans induire leur différenciation. Pour définir cet environnement, l'influence des principaux paramètres de culture doit d'abord être évaluée sur le comportement des CSM. Ces paramètres de culture incluent des paramètres biochimiques, tels que la concentration en glucose, en acides aminés, ou le type d'antioxydant, et des paramètres physico-chimiques, tels que la concentration en oxygène dissous, le pH, ou les contraintes de cisaillement induites par l'agitation.

Dans ce premier chapitre de résultats, l'influence de plusieurs paramètres de culture a été évaluée dans le cas particulier des CSM porcines. Tout d'abord, l'influence des paramètres d'ensemencement, tels que les concentrations cellulaires, a été analysée en mode statique. L'influence de la fréquence d'agitation, de la concentration d'ensemencement cellulaire et de microporteurs a ensuite été étudiée lorsque les CSM, adhérentes sur des microporteurs, sont cultivées en suspension dans des spinners. D'autres paramètres ont été pris en compte, tels que la siliconisation des spinners et l'âge des cellules. Par la suite, des milieux de culture de compositions différentes ont été évalués en mode statique, afin de déterminer les plus adaptés, non seulement à la croissance cellulaire mais également au maintien de la multipotence des cellules. Les composés testés étaient le sérum de veau fœtal, des éléments nutritifs (glucose et glutamine), et des produits bioactifs (antioxydants et facteurs de croissance humains). Enfin, des études cinétiques approfondies ont été réalisées pour quantifier les paramètres cinétiques du métabolisme.

3.1. Étude préliminaire des paramètres d'ensemencement

La phase d'ensemencement est souvent considérée comme la plus critique d'un procédé d'expansion de cellules animales. Dans la littérature, les conditions d'ensemencement des CSM varient très souvent en durée, en concentration cellulaire initiale, en surface d'adhérence, en stratégie d'agitation, en volume de milieu de culture, etc. Néanmoins, aucune standardisation ne semble se dessiner quant au choix de conditions optimales d'ensemencement.

Dans le cas spécifiques des CSM porcines, nous avons étudié, dans un premier temps en mode statique, l'influence de la concentration cellulaire d'ensemencement sur la croissance des CSM. Dans un deuxième temps, les cellules ont été mises en culture en mode agité et l'influence du rapport cellule/microporteur et de la concentration en microporteurs a été caractérisée. Puis, l'effet de l'agitation sur l'adhérence des CSM a été décrit. Enfin, l'influence de la siliconisation, qui permet de limiter l'adhérence des microporteurs et des cellules aux parois des spinners, a été analysée.

3.1.1. Concentration d'ensemencement des CSM en mode statique

L'influence de la concentration cellulaire lors de l'ensemencement a été évaluée en plaque 96-puits pour le mode statique, et en spinner dans un volume de 200 mL de milieu de culture pour le mode agité. En plaque 96-puits, les CSM ont été ensemencées entre 150 et 15 000 cellules/cm² dans des puits de 0,33 cm² contenant 200 µL de milieu de culture (milieu basal IMDM, supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal et de 0,1 mM de β-mercaptoéthanol). La croissance cellulaire a été estimée en mesurant l'augmentation de la surface occupée (surface de recouvrement) par analyse d'images au moyen du Cellscreen®. Les résultats présentés dans la Figure 42 montrent qu'il n'y a quasiment pas de recouvrement des puits aux concentrations d'ensemencement de 150 et 750 cellules/cm² pendant 10 jours de culture. En revanche, une concentration d'ensemencement de 1500 cellules/cm² permet d'atteindre 45 % de recouvrement au 10^{ème} jour de culture. Avec 7500 cellules/cm², 59 % des puits sont recouverts au 9^{ème} jour de culture. Enfin, la concentration de 15 000 cellules/cm² permet d'obtenir 71 % de recouvrement au 9^{ème} jour de culture. Les résultats indiquent donc que, dans nos conditions opératoires, aucune croissance cellulaire n'est visible en-dessous du seuil des 1500 cellules/cm² jusqu'à 10 jours de culture. Ce temps de latence peut être lié à une trop faible concentration des cellules, qui pourrait diluer les sécrétions de facteurs paracrines nécessaires à leur croissance (Haynesworth et al., 1996). Cependant, certains travaux de la littérature rapportent une prolifération de CSM humaines ensemencées en flacon statique (milieu basal αMEM supplémenté de 20 %

de sérum) à des concentrations très basses de 2 cellules/cm², après une période de latence minimale de 5 jours (Javazon et al., 2001). Cette différence peut provenir de la concentration plus élevée en sérum, ou de l'origine humaine des cellules.

Au vu de ces résultats, et pour éviter la période de latence, nous avons choisi pour la suite des travaux une concentration d'ensemencement de CSM porcines de 5000 +/- 1000 cellules/cm², soit 3×10^4 cellules/mL, dans un volume de culture représentant 5 mL/cm². Cela permet d'obtenir un facteur de multiplication des cellules d'environ 5 avant d'atteindre la confluence. Ce facteur de multiplication serait plus faible à une concentration cellulaire plus élevée car la confluence serait atteinte plus rapidement.

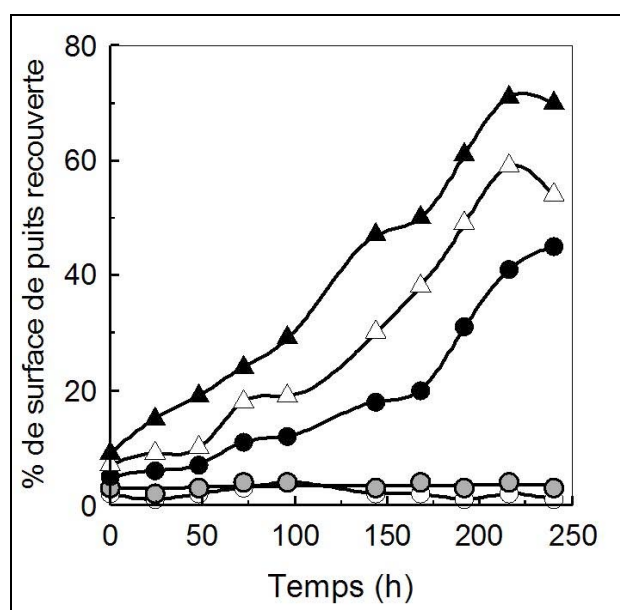


Figure 42. Influence de la concentration d'ensemencement sur la prolifération des CSM porcines. Les cellules sont ensemencées en plaque 96-puits à (○) 150 cellules/cm², (●) 750 cellules/cm², (●) 1500 cellules/cm², (△) 7500 cellules/cm², et (▲) 15 000 cellules/cm².

3.1.2. Conditions d'ensemencement de CSM en mode agité

La concentration cellulaire d'ensemencement choisie pour la culture en mode statique a été transposée à la culture en mode agité sur microporteurs, et comparée à deux autres concentrations cellulaires. Les CSM porcines ont été ensemencées en présence de microporteurs Cytodex 1 agités à 25 rpm dans des spinners de 200 mL de volume de milieu de culture, à raison de 3 à 12 cellules/microporteur (soit 3000 à 12 000 cellules/cm²). Les résultats présentés dans la Figure 43 indiquent un facteur de multiplication des cellules de 9 (après 240 h de culture), 7 (après 180 h de culture), et 3 (après 120 h de culture), respectivement pour des ensemencements de 3, 6 et 12 cellules/porteur. La croissance cellulaire est donc favorisée par un nombre initial de cellules par porteur plus faible.

Ce phénomène est également observé dans des études rapportées dans la littérature. Dans les travaux de Sart et al. (2010), des CSM de rat ont été cultivées sur Cultispher G, ce qui s'est traduit par des facteurs de multiplication passant de 2 à 5 lorsque le ratio initial cellules/porteur était diminué de 100 à 15 (correspondant à 8×10^4 et $1,2 \times 10^4$ cellules/mL). De même, Hewitt et al. (2011) ont cultivé des CSM humaines sur Cytodex 3, et ont observé un facteur de multiplication de 20 avec 5 cellules/porteur ($1,5 \times 10^4$ cellules/mL), alors qu'il diminuait à 6 avec 10 cellules/porteur (3×10^4 cellules/mL). Cette augmentation de la croissance cellulaire, induite par un ensemencement plus faible, peut être liée à une plus grande surface disponible pour la prolifération des cellules, et donc une confluence atteinte moins rapidement.

Dans notre étude, la concentration en microporteurs semble également avoir une influence sur la croissance des CSM porcines. En effet, pour une même concentration cellulaire initiale (3×10^4 cellules/mL), la phase de déclin cellulaire est retardée de 4 jours avec 2,4 g/L de Cytodex 1 par rapport à 1,2 g/L (Figure 43). Ce résultat peut également s'expliquer par une plus grande surface totale disponible pour les cellules. Sart et al. (2010) n'ont pas observé une telle différence entre des cultures réalisées à différentes concentrations de Cultispher S (1, 2 et 3 g/L ; $1,2 \times 10^4$ cellules/mL) pendant 6 jours. Cela pourrait s'expliquer par le fait que les microporteurs Cultispher sont macroporeux, contrairement aux microporteurs Cytodex 1, et offrent une surface d'adhérence supérieure à l'intérieur des pores. En revanche, Hewitt et al. (2011) rapportent un facteur de multiplication cellulaire plus élevé ($\times 20$) avec 1 g/L de Cytodex 3 qu'avec 2,5 g/L ($\times 10$), à une concentration cellulaire similaire de $1,2 \times 10^4$ cellules/mL. Dans ce cas, la nature de l'agitation (tige horizontale) pourrait expliquer les différences avec nos résultats (culture sous agitation pendulaire).

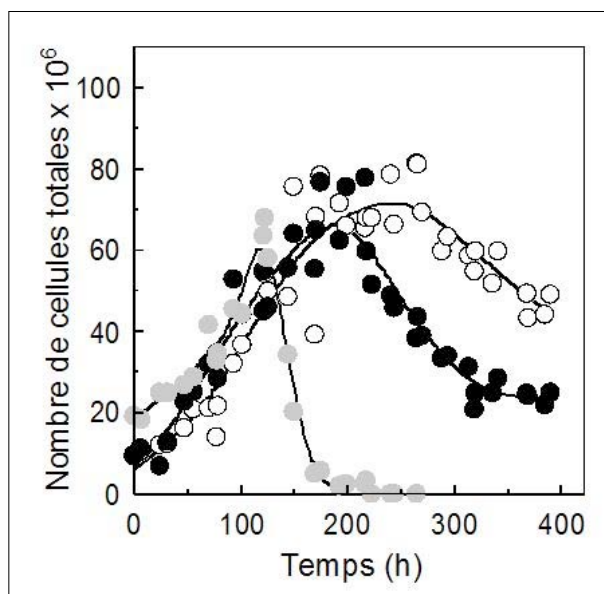


Figure 43. Influence de la concentration d'ensemencement sur la culture de CSM porcines sur Cytodex 1 en spinner (200 mL ; 25 rpm). (○) 3 cellules/microporteur (2,4 g/L Cytodex 1; 3×10^4 cellules/mL), (●) 6 cellules/microporteur (1,2 g/L Cytodex 1; 3×10^4 cellules/mL), et (●) 12 cellules/microporteur (1,2 g/L Cytodex 1; 6×10^4 cellules/mL) ; l'erreur est estimée à 20 %

L'expansion de CSM porcines sur microporteurs en culture agitée nécessite donc de sélectionner certains paramètres d'ensemencement, comme la concentration cellulaire et la concentration en porteurs (Tableau 12).

Tableau 12. Influence de la concentration d'ensemencement et de la concentration en microporteurs sur la croissance des CSM porcines

Paramètres d'ensemencement	Faible valeur du paramètre d'ensemencement	Haute valeur du paramètre d'ensemencement
Nombre de cellules/mL	La dilution des cellules peut induire une latence (Figure 42)	Le phénomène paracrine augmente la croissance cellulaire (Haynesworth et al., 1996)
Nombre de microporteurs/mL	Moins de surfaces disponibles	Augmentation des collisions entre porteurs (Croughan et al., 2000)
Nombre de cellules/porteur	Être au moins à 1 cellule/porteur pour une bonne homogénéité de la culture	La surface disponible pour la prolifération cellulaire diminue (Figure 43)

3.1.3. Influence d'une agitation initiale sur l'adhérence des CSM

L'agitation appliquée lors de la phase d'ensemencement des CSM est un paramètre qui varie souvent dans les travaux rapportés de la littérature. Dans un premier temps, nous avons déterminé le temps nécessaire aux CSM porcines pour adhérer et s'étaler sur une surface de polystyrène traitée (surface des plaques 96-puits), grâce à une observation au Cellscreen® réalisée au cours du temps. Les résultats présentés dans la Figure 44 montrent que les cellules, ensemencées sans aucune agitation, commencent à adhérer au bout de 2,5 h. Ce résultat est cohérent avec celui de Frauenschuh et al. (2007) qui rapportent une adhérence complète des CSM porcines après 3 h d'adhérence sur Cytodex 1, 2 et 3 sous agitation intermittente (5 secondes à 20 rpm ; 20 minutes statiques).

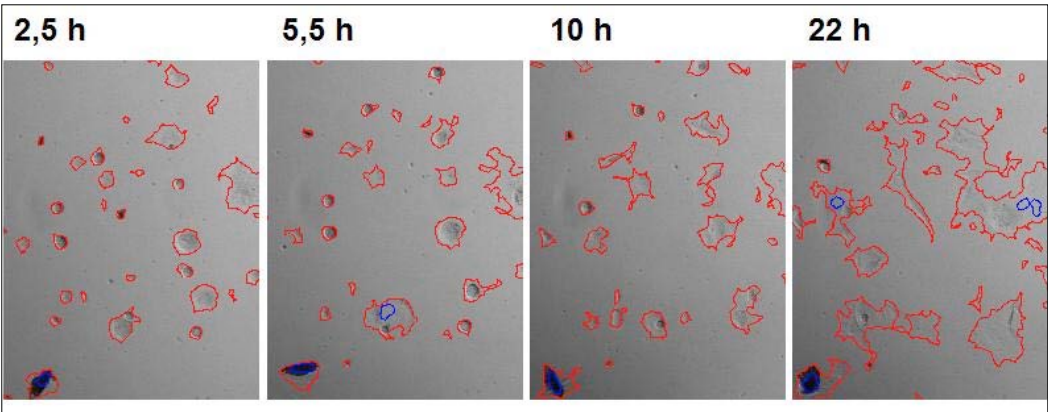


Figure 44. Observation par Cellscreen® des CSM porcines après 2,5 h, 5,5 h, 10 h et 22 h de culture en plaque 96-puits sans agitation. La délimitation réalisée par le logiciel traduit l'étalement cellulaire (x 40)

Sur la base des observations réalisées en plaques, les cellules ont alors été ensemencées en spinner sur les microporteurs Cytodex 1 sans aucune agitation (volume de 200 mL ; 3×10^4 cellules/mL ; 1,2 g/L de microporteurs). Afin d'augmenter l'homogénéité de la répartition des cellules, une agitation de 25 rpm a été testée pendant 1 h en début de phase d'ensemencement. Les résultats de la Figure 45 montrent qualitativement que la répartition des cellules sur les microporteurs est plus homogène qu'en conditions statiques. En revanche, Hewitt et al. (2011) montrent des facteurs de multiplication de CSM humaines sur Cytodex 3 supérieurs en conditions d'ensemencement statiques (multiplication $\times 20$) par rapport à des conditions agitées (multiplication $\times 13$). Comme dans notre étude, des travaux montrent cependant que l'adhérence des cellules est favorisée lorsque l'ensemencement est réalisé en mode agité (Korn et Schwarz, 2006; Shiragami et al., 1997). Dans la suite de nos travaux, les cultures sont ainsi ensemencées avec une agitation d'1 h en début de culture, suivie d'une phase statique de 23 h.

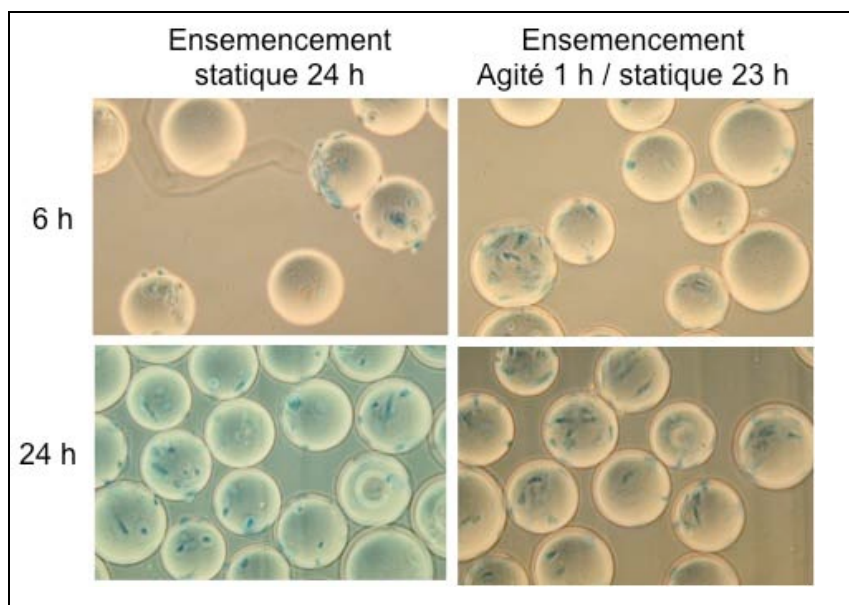


Figure 45. Comparaison entre un ensemencement statique et un ensemencement agité pendant 1 h puis statique pendant 23 h sur la distribution des CSM sur Cytodex 1. Observation microscopique à 6 h et 24 h de culture, après marquage au bleu de méthylène ($\times 40$)

3.1.4. Influence de la siliconisation des spinners

L'influence de la siliconisation des spinners a été étudiée sur la croissance des CSM porcines cultivées sur Cytodex 1, en conditions statiques et agitées à deux vitesses (25 et 75 rpm). Les cellules sont ensemencées à 3×10^4 cellules/mL, dans des spinners en verre (200 mL). La siliconisation des spinners est nécessaire pour rendre le verre plus hydrophobe et ainsi limiter l'adhérence des microporteurs et des cellules aux parois. En effet, l'adhérence des porteurs diminue la surface disponible pour les cellules, et par ailleurs, les cellules

adhérées au verre ne peuvent pas être récoltées. La fréquence de la siliconisation n'est cependant pas précisée dans les études rapportées dans la littérature. C'est pourquoi, nous avons testé deux conditions : un spinner siliconé juste avant la culture (siliconisation « récente »), et un spinner ayant déjà été utilisé pour une culture de 13 jours après la siliconisation (siliconisation « ancienne »), ensemencés avec les mêmes CSM porcines.

Les résultats présentés dans la Figure 46 montrent clairement que les concentrations cellulaires maximales atteintes dans des spinners avec une siliconisation ancienne sont près de deux fois inférieures à celles obtenues dans des spinners avec une siliconisation récente, et ce quelle que soit la vitesse d'agitation. La siliconisation récente améliore donc la croissance cellulaire, que ce soit en condition statique (0 rpm) ou en condition agitée (25 et 75 rpm). Cela peut être lié à une dégradation de la siliconisation du verre en cours de culture. Pour la suite des études, les spinners ont été siliconés juste avant chaque culture.

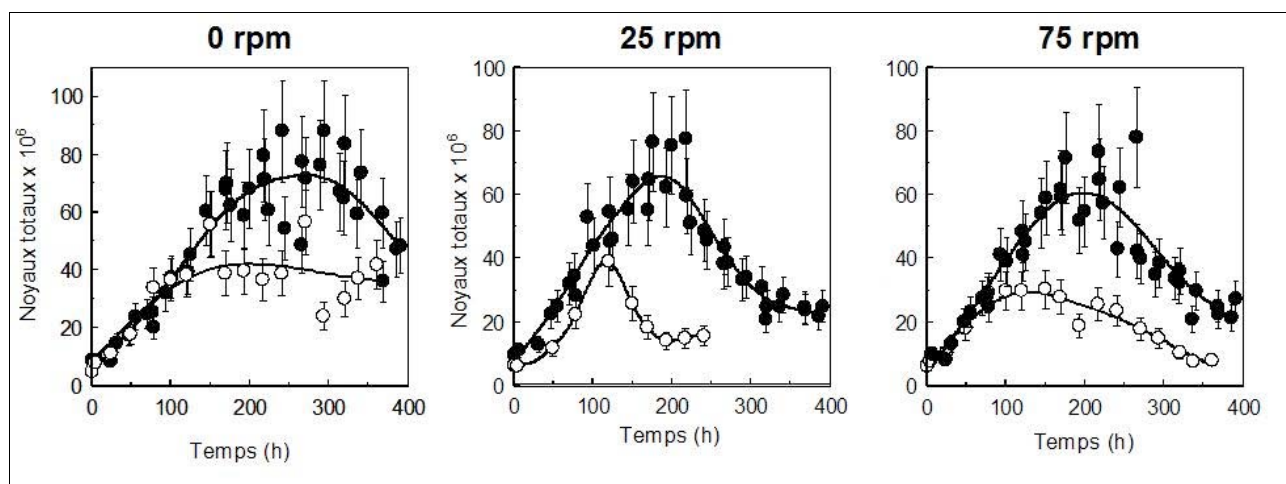


Figure 46. Influence de la siliconisation des spinners sur la croissance des CSM à 0 rpm, 25 rpm et 75 rpm. (●) Spinners avec une siliconisation récente, (○) Spinners avec une siliconisation ancienne

Grâce à ces études préliminaires, les conditions d'ensemencement favorables à la croissance des CSM porcines s'orientent vers une concentration cellulaire de 5000 cellules/cm² en plaque 96-puits, un ratio cellules/porteur de 3 à 6 en spinner, ainsi qu'une siliconisation récente des spinners. De plus, une agitation initiale d'une heure permet une meilleure homogénéité des cellules adhérentes sur les microporteurs. Ces paramètres d'ensemencement ont été retenus pour la suite de nos études d'expansion cellulaire.

3.1.5. Influence de l'âge des CSM ensemencées

Après un certain nombre de divisions cellulaires, les cellules somatiques cessent de proliférer et entrent en sénescence (Wagner et al., 2008). Cette sénescence répllicative serait principalement due à un raccourcissement des télomères, et servirait *in vivo* à échapper à une cancérisation (Sharpless et al., 2004). Dans le cas des CSM cultivées *in vitro*, une sénescence répllicative est également observée (Bonad et al., 2006; Izadpanah et al., 2008). Elle débiterait dès le premier passage en culture, et impliquerait une altération du phénotype, du potentiel de différenciation et de l'expression génique (Wagner et al., 2008). Il est possible d'éviter cette sénescence en transfectant le gène de la télomérase, une enzyme qui limite l'érosion des télomères (Hiyama et al., 2007; Weber et al., 2010). Cette transformation n'est cependant pas encore admise pour les CSM à usage thérapeutique. La sénescence répllicative des CSM reste une limite pour leur culture *in vitro* à long terme. Or, peu de données sont disponibles sur cette sénescence des CSM *in vitro*, et sur son implication à la fois sur leur prolifération et leur métabolisme. Il est donc intéressant de mieux caractériser le comportement de CSM porcines lors de leur culture à long terme jusqu'à 85 jours.

Pour cela, les CSM porcines sont cultivées en spinner de 200 mL, adhérentes sur les microporteurs Cultispher G, qui sont le plus souvent utilisés dans les études d'expansion de CSM rapportées dans la littérature. Les cellules sont ensemencées à une concentration de 3×10^4 cellules/mL (6×10^3 cellules/cm²), sous une agitation de 25 rpm. Les cinétiques de prolifération et de lyse cellulaire, de consommation de glucose et de glutamine, et de production de lactate et d'ions ammonium ont été analysées.

Les CSM porcines utilisées dans cette étude proviennent d'un prélèvement de 140 mL de moelle osseuse, correspondant à environ $1,4 \times 10^4$ CSM selon l'estimation rapportée dans les travaux de Kasten et al. (2008). Après un premier passage de 15 jours (passage 0, dit P0), 2×10^7 CSM sont obtenues, correspondant à 10 doublements de population (DP). Lors du second passage (P1), les cellules se divisent plus lentement (2,5 DP). Les cellules sont alors congelées pour réaliser une banque cellulaire. Après décongélation, les cellules sont amplifiées pendant encore 2 passages (P2 et P3) (4,5 DP), avant de démarrer notre étude. Au cours du passage P4 (après 47 jours de culture *in vitro*, noté J47), les CSM sont cultivées, soit sur microporteurs en spinners, soit en flacons statiques de 175 cm². Les cellules amplifiées en flacons servent ensuite à ensemencer les spinners lors du passage P5 (J59), ainsi que des flacons statiques, servant à leur tour à ensemencer les spinners du passage P6 (J75) (Figure 47). À la fin de l'étude, les cellules ont donc subi 6 passages, pendant une durée de 85 jours de culture (représentant théoriquement 23 DP).

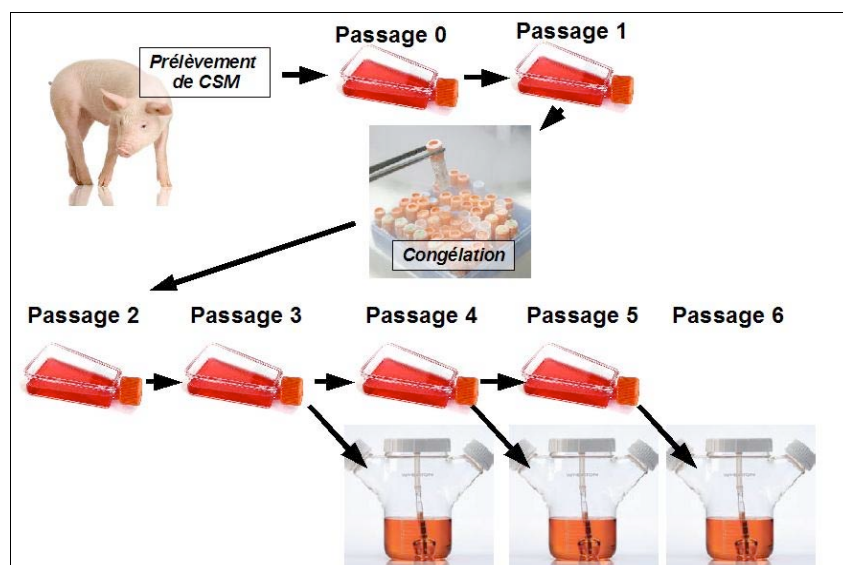


Figure 47. Protocole de culture de CSM porcines pendant 85 jours

Les cinétiques de croissance observées en spinner aux passages 4, 5, et 6 sont présentées dans la Figure 48a. Les vitesses spécifiques maximales de croissance calculées à partir de ces résultats diminuent au fur et à mesure du nombre de passages, avec des valeurs de $0,020 \text{ h}^{-1}$, $0,018 \text{ h}^{-1}$ et $0,016 \text{ h}^{-1}$ respectivement pour les cellules cultivées aux passages 4, 5 et 6. En revanche, l'activité de la LDH dans le surnageant de culture n'est pas proportionnelle aux nombres de passage subis par les CSM porcines, avec une lyse cellulaire de 15 % des cellules au passage 4, de 32 % des cellules au passage 5, et de 12 % des cellules au passage 6 (Figure 48b).

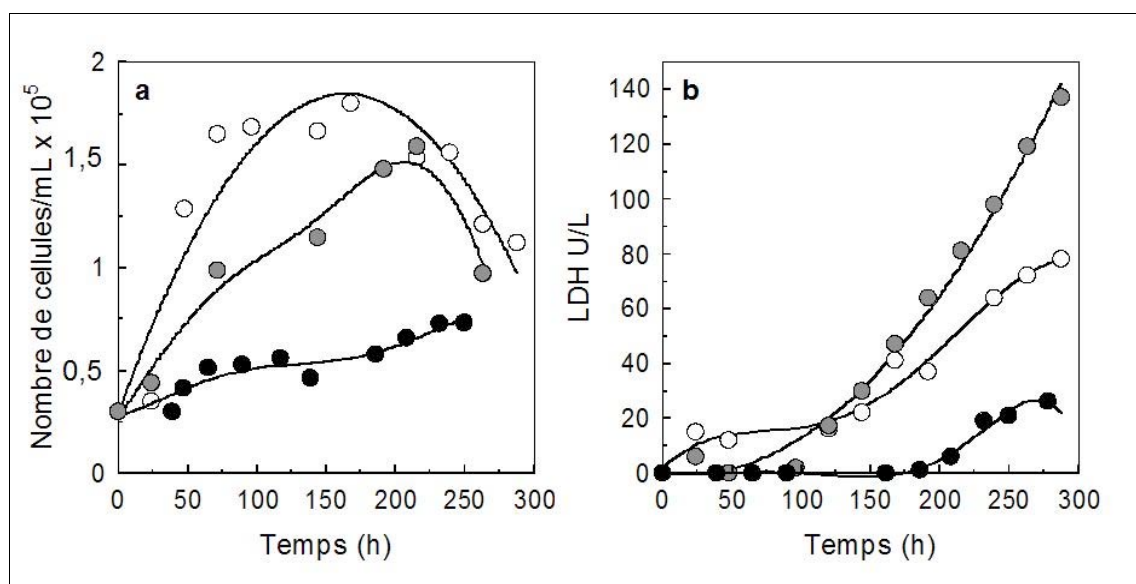


Figure 48. Influence de l'âge des cellules ensemencées sur les cinétiques de croissance et de lyse des CSM porcines cultivées en spinner sur Cultispher G. (a) Concentration cellulaire des cultures à passage (○) 4, (●) 5, et (●) 6. (b) Activité extracellulaire de la lactate déshydrogénase (LDH) dans le surnageant de cultures à passage (○) 4, (●) 5 et (●) 6 ; l'erreur est estimée à 20 %

Afin d'identifier les raisons de cette baisse de vitesse de croissance des CSM, les concentrations de glucose, glutamine, lactate et ions ammonium ont été mesurées dans le surnageant des cultures et les vitesses spécifiques de consommation et de production ont été calculées (Figure 49). Les résultats indiquent que ces vitesses spécifiques augmentent avec l'âge des cellules ensemencées. En revanche, aucune différence significative des rendements lactate/glucose et glutamine/ammonium n'a été observée (Figure 50). Aucun shift métabolique entre le glucose et la glutamine ne semble donc être induit par la sénescence.

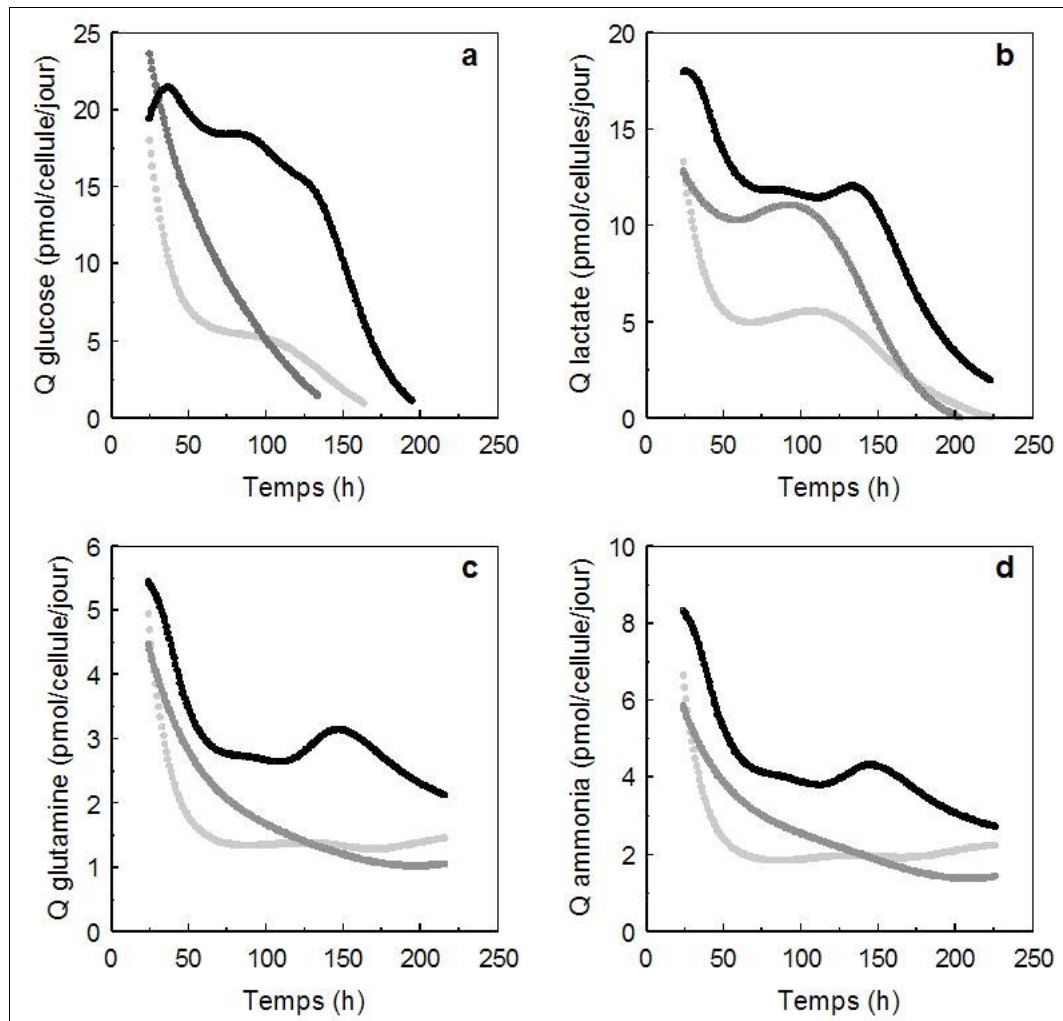


Figure 49. Vitesses spécifiques de consommation du glucose (a) et de la glutamine (c), et de la production de lactate (c) et d'ions ammonium (d) des CSM porcines cultivées aux passages (○) 4, (●) 5 et (●) 6 en spinner sur Cultispher G (25 rpm ; 200 mL)

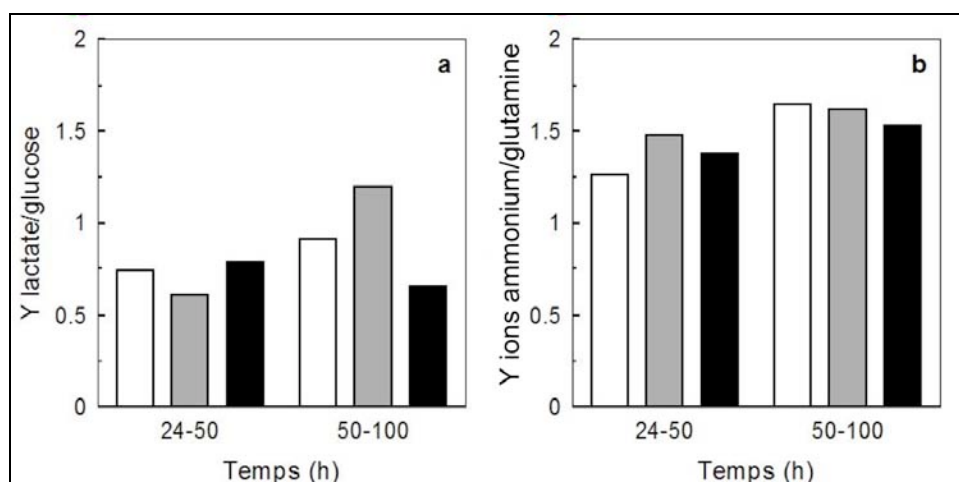


Figure 50. Rendement lactate/glucose (a) et ions ammonium/glutamine (b) au cours de cultures de CSM porcines aux passages (□) 4, (■) 5 et (■) 6 cultivées sur Cultispher G (25 rpm ; 200 mL)

Nos résultats ont ainsi montré un ralentissement de la prolifération des CSM, au fur et à mesure des passages. Ce phénomène a également été observé dans des travaux rapportés de la littérature. Ainsi, Wagner et al. (2008) ont remarqué que des CSM humaines présentaient des modifications morphologiques, un élargissement de leur taille et un arrêt de la prolifération après 43 à 77 jours de culture (entre le passage 7 et le passage 12). Bonad et al. (2006) ont également cultivé des CSM humaines pendant 118 jours (jusqu'à passage 9). Ils ont montré que la longueur des télomères se raccourcissait de 9,19 Kbp à 8,7 Kbp au cours de la culture, tandis que le doublement de population diminuait de 7,7 à 1,2 entre le premier et le dernier passage. Par ailleurs, dans les travaux de Bruder et al. (1997), les CSM humaines cessent de proliférer après le passage 15, correspondant à 38 DP. Enfin, Vacanti et al. (2005) ont réussi à maintenir des CSM porcines en prolifération jusqu'à 100 DP (40 passages), même si la prolifération des cellules commençait à diminuer à partir du 15^{ème} passage (35-40 DP).

Nos travaux ont également permis d'observer une augmentation des vitesses spécifiques du métabolisme cellulaire avec l'âge des cellules. Malheureusement, peu de données sont disponibles sur cette évolution du métabolisme des CSM. Quelques études rapportées dans la littérature évoquent cependant un effet de la sénescence répliquative des fibroblastes, cellules proches des CSM, sur leur métabolisme. Des travaux réalisés avec des fibroblastes humains montrent un métabolisme actif en sénescence répliquative (Goldstein, 1990). Burns et Richter (2008) montrent que les protéines CREB (Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein) et p53 sont impliquées dans la sénescence des fibroblastes, notamment dans la maintenance de la longueur des télomères, mais également dans leur métabolisme, avec entre autres la régulation de SCO2 (Synthesis of Cytochrome Oxidase 2). Par ailleurs, Zwerschke et al. (2003) rapportent une augmentation de la consommation de glucose et de la production de lactate chez des fibroblastes

humains en sénescence. Les auteurs émettent l'hypothèse d'une dérégulation de certaines enzymes de la glycolyse, conduisant à une déplétion en ATP suivi d'une accumulation d'AMP, qui induirait alors la sénescence des cellules.

Nos résultats sur l'évolution des vitesses spécifiques de croissance et de métabolisme en fonction de l'âge des cellules ensemencées soulignent la nécessité d'effectuer nos études au même passage afin de pouvoir réaliser des études comparatives. C'est pourquoi, nos études en spinner ont été ensuite réalisées avec des cellules ensemencées au passage 4.

3.2. Influence des composés du milieu de culture

Les nombreux travaux rapportés dans la littérature sur les CSM ont essentiellement analysé les besoins biochimiques des CSM humaines et murines. Cependant, malgré l'intérêt de l'utilisation de CSM porcines dans les essais de greffes autologues, peu de travaux ont été réalisés pour analyser leurs besoins biochimiques. Or, il est communément admis que chaque type cellulaire présente des exigences spécifiques (Sotiropoulou et al., 2006; Schop et al., 2009). C'est pourquoi, nous avons quantifié les cinétiques cellulaires dans le cas d'expansion de CSM porcines en faisant varier la composition du milieu de culture. Tout d'abord, l'influence du sérum de veau fœtal (SVF), composé classiquement ajouté dans les milieux de culture des CSM, a été analysée sur la croissance des cellules. Les cellules ont été cultivées en plaque 96-puits et leur croissance quantifiée par analyse d'images. Puis, l'effet de divers constituants, tels que le glucose, la glutamine, les antioxydants et les facteurs de croissance, a été évalué sur la croissance, le métabolisme et la multipotence des cellules, en plaque 96-puits et en flacon statique de 25 cm². Les résultats ont permis la formulation d'un milieu de culture plus spécifiquement adapté aux CSM porcines.

3.2.1. Influence du sérum de veau fœtal

L'ajout de SVF aux milieux de culture de base (IMDM, α MEM, DMEM) est indispensable à la culture des CSM, ces milieux de base ne contenant pas tous les composés nécessaires à leur expansion. Bien que les procédés d'expansion des CSM à usage thérapeutique s'orientent vers l'utilisation de milieux sans composés d'origine animale (Santos et al., 2011), le SVF reste encore largement utilisé en recherche. Dans notre étude, les cellules ont été cultivées dans de l'IMDM en présence de concentrations de SVF de 0 à 15 % (v/v), pendant 13 jours en plaque 96-puits. Les résultats présentés dans la Figure 51 confirment qu'en

l'absence de sérum, une baisse du pourcentage de recouvrement des puits intervient dès le 2^{ème} jour de culture, probablement en raison de la mort et du détachement des cellules. Avec une concentration de 5 % de SVF, les cellules restent adhérentes, mais le pourcentage de recouvrement des puits n'augmente qu'à partir de 10 jours de culture. En revanche, avec 10 % et 15 % de SVF, le pourcentage atteint 55 et 60 %, respectivement. La croissance des CSM porcines dans le milieu IMDM nécessite donc des concentrations de SVF supérieures à 5 %. Dans la littérature, les milieux de culture pour CSM porcines contiennent entre 5 et 10 % de SVF (Vacanti et al., 2005; Frauenschuh et al., 2007). Cette étude préliminaire sur l'influence du SVF nous a permis de retenir la valeur de 10 % de SVF pour la suite de nos travaux. La concentration de 10 % de SVF par rapport à 15 % a été choisie avec l'objectif à long terme de remplacer le SVF par un substitut d'origine non animale.

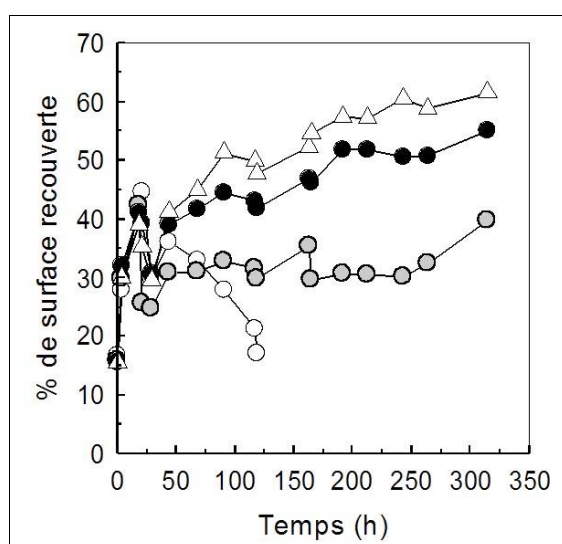


Figure 51. Influence de la concentration en sérum de veau fœtal (SVF) sur la croissance des CSM porcines. Les cellules sontensemencées à des concentrations de 5000 cellules/cm² en plaque 96-puits, (○) sans SVF, dans (●) 5 % de SVF, dans (●) 10 % de SVF ou dans (△) 15 % de SVF, l'erreur est estimée à 20 %

3.2.2. Influence des autres composés du milieu de culture

Les besoins des cellules sont tout d'abord nutritifs, et reposent principalement sur l'apport en glucose et en acides aminés. Alors que le glucose a été montré comme la source principale d'énergie des CSM, les acides aminés sont souvent moins consommés (Schop, 2010). Les CSM requièrent aussi des molécules bioactives, telles que les antioxydants et les facteurs de croissance (Molchanova et al., 2008). En effet, même si les CSM possèdent leurs propres mécanismes de défense vis-à-vis des ROS (Reactive Oxygen Species), l'ajout de molécules antioxydantes supplémentaires dans le milieu de culture peut être bénéfique (Ebert et al., 2006). Par ailleurs, bien que le SVF contienne des facteurs de croissance, il a été montré que

l'augmentation de ces concentrations basales, tels que celle du FGF2, permettrait de favoriser la croissance de CSM humaines par un facteur 10 (Sotiropoulou et al., 2006).

L'influence de ces composés sur le comportement des CSM n'est cependant pas encore bien établie dans les différents travaux rapportés dans la littérature. En effet, les résultats sont contradictoires quant à l'effet d'une forte concentration de glucose (25 mM) sur la croissance des CSM, et quant à la consommation de la glutamine. De plus, peu d'informations sont disponibles sur les effets des antioxydants sur la croissance des CSM porcines. Enfin, la nature et la concentration des facteurs de croissance varient d'une étude à l'autre, rendant difficile toute généralisation quant à leurs effets. C'est pourquoi, nous avons réalisé des études cinétiques détaillées sur l'influence de ces différents composés dans le cas particulier de l'expansion de CSM porcines. Ces travaux sont rassemblés dans un projet de publication intitulé: «Kinetic studies of porcine mesenchymal stem cell growth : biochemical requirements for rapid expansion».

Dans cette étude, les CSM porcines ont été cultivées en plaque 96-puits en présence de différentes formulations de milieu de culture, et leur croissance a été quantifiée par analyse d'images. Après avoir sélectionné le milieu de base le plus adapté aux CSM porcines, l'influence de plusieurs concentrations de glucose et de glutamine, de différents antioxydants et de deux facteurs de croissance recombinants humains a été étudiée. Des études cinétiques ont alors été réalisées en flacons statiques, dans la formulation de milieu retenue, afin de quantifier le métabolisme du glucose et de la glutamine. Enfin, la multipotence des CSM porcines a été vérifiée après une semaine d'expansion dans ce milieu de culture.

Kinetic Studies of Porcine Mesenchymal Stem Cell Growth: Biochemical Requirements for Rapid Expansion

Caroline Ferrari, Frédérique Balandras, Emmanuel Guedon, Eric Olmos, Isabelle Chevalot, Annie Marc

Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UPR-CNRS 3349, Université de Lorraine, 54505 Vandoeuvre-lès-Nancy, France

ABSTRACT

The extensive use of mesenchymal stem cells in tissue engineering and cell therapy increases the necessity to improve their expansion, in order to provide the high quantities required for therapeutic applications. Among these, porcine mesenchymal stem cells are valuable models for tissue engineering. However, their biochemical requirements for a rapid expansion phase have not been fully determined. In the present study, the effect of glucose, glutamine, antioxidant and growth factors concentrations on porcine MSC expansion were analyzed by performing kinetic studies. The results showed that a lower glucose concentration (5.5 mM) enabled to increase maximal cell concentration by 40 % compared with a higher one (25 mM), while addition of 2 to 6 mM of glutamine increased maximal cell concentration by more than 25 % compared with no glutamine supplementation. Moreover, supplementation with 1 μ M thiocetic acid increased maximal cell concentration by 40 % compared with no supplementation. Finally, the addition of 1 ng/mL human fibroblastic growth factor 2 (FGF2) increased maximal cell concentration by 40 % compared with no addition. Using these conditions, the cells multiplied by more than 14 folds in 10 days and retained their multipotency. Porcine MSC expansion thus benefited from this adapted culture medium.

KEYS WORDS: Mesenchymal stem cell, Expansion, Metabolism, Antioxidant, Growth factors, Culture medium

INTRODUCTION OF THE PUBLICATION

The emerging fields of tissue engineering and cell therapy take great interest in mesenchymal stem cells (MSC) [1]. MSC are adult stem cells, mainly extracted from the bone marrow, and exhibit properties of self-renewal, differentiation, immunoregulation and cytokine secretion [2,3]. The scarcity of MSC within the bone marrow is the main reason that justifies their amplification for therapeutic purposes. The development of *in vitro* expansion methods for MSC is becoming an important aspect of tissue engineering and cell therapy. In order to obtain high quantities of MSC in a short period of time, culture parameters have to be adapted to meet the cells needs. In parallel to human MSC, porcine MSC are commonly used as cell model to fulfill the human-mouse gap, exhibiting the complexity of human diseases [4]. Indeed, according to Vacanti et al. (2005) [5], porks present morphologic and physiologic similarities with humans, which make porcine MSC a valuable preclinical model for heart [6], cartilage [7] or tooth [8] repair studies. Porcine MSC are also an attractive source for preclinical autologous tissue engineering studies [9].

However, few data are available on the culture parameters for porcine MSC rapid expansion. Several studies reported in the literature used porcine MSC [4, 5, 10-14], but only one study tested different media components on porcine MSC growth [9]. Data on culture parameters of other MSC species including human, goat and murine origin exist, but differences between those species have to be underlined [15,16]. Concerning growth media, the basal media generally used for MSC expansion are the alpha Minimum Essential Medium (α MEM) [4, 9, 16], the Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) [11, 12, 13, 14, 17, 18, 19] or the Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) [20]. Those basal media contain inorganic salts, nutritional components such as glucose and amino acids, including vitamins and antioxidants and are generally supplemented with fetal bovine serum. Serum-free media are available for MSC expansion, however their composition being usually confidential, the study of the influence of specific compounds on MSC growth is difficult. Moreover, serum-free media are expensive, and not significant for preliminary studies of MSC mass expansion.

Glucose concentration in basal media has been shown to have different impacts, positive or negative, on MSC growth, depending on the studies [15, 19, 21, 22]. Variable consumptions of glutamine by MSC were reported, depending on the studies [16, 23, 24]. Moreover, the antioxidants present in the basal media, such as ascorbic acid in α MEM, and sodium selenium in IMDM, have been shown to have a positive effect on human MSC growth [25, 26] but none on porcine MSC growth [9]. Concerning growth factors, the addition of the fibroblastic growth factor 2 (FGF2) enabled to stimulate human MSC proliferation [27-29]. The hepatocyte growth factor (HGF) is known for its ability to enhance MSC growth and to exhibit antiapoptotic activity [30, 31]. HGF is secreted by ischemic myocardium to recruit and amplify MSC [31].

In the present study, the mass expansion of porcine MSC was investigated by adapting growth media to the cells need. First, various basal media classically used for MSC were tested on porcine MSC growth. Then, the biochemical components such as glucose and glutamine, various antioxidants and human growth factors were studied for their ability to promote porcine MSC growth. An adapted culture medium for porcine MSC expansion was then proposed.

MATERIAL AND METHODS

Primary culture of porcine MSC

Bone marrow was extracted from the iliac crest of three month old pigs and seeded in 175 cm² T-flasks. Culture medium was composed of α MEM (Sigma M0894) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, 26140), 1 % antibiotics (composed of 10 000 U/L of penicillin G, 10 mg/mL of streptomycin and 25 μ g/mL of amphotericin B, Fisher W3473M), 2 mM glutamine (Eurobio, CSTGLU00-0P), 1 ng/mL FGF2 (Millipore, GF003) and 0.1 mM β -mercaptoethanol (Sigma M7522). After a week, the medium was changed twice a week. Two weeks later, the remaining adherent cells were trypsinized and seeded at a density of 0.5×10^4 cells/cm² in 175 cm² T-flasks. After two passages, porcine MSC were pooled and cryopreserved in culture medium containing 10 % DMSO for cell banking at 10^7 cells/mL. For further studies, cells were thawed from the bank and seeded at a density of 0.5×10^4 cells/cm² in T-flasks, before their use in 96-well plates, 25 cm² T-flasks or spinner flasks at passage 5.

Kinetic studies of porcine MSC growth in 96-well plates

Porcine MSC growth kinetics were performed using the Cellscreen system (Innovatis) [32, 33]. Cells were seeded in 96-well plates at 0.6×10^4 cells/cm² with 200 μ L medium in each well (0.9×10^4 cells/mL). Every day, 6 wells for each condition were rinsed with phosphate buffer saline (PBS) and trypsinized with 50 μ L of 0.05 % trypsin for 5 min. Then, 150 μ L of culture medium was added and the cells were homogenized and settled for 20 min. The plate was displayed under the microscope within the Cellscreen. Images of the wells were taken by a CCD camera and analyzed by an image post-treatment software to enumerate the cells. The wells on the edges of the plate were not used, due to evaporation bias. The mean standard deviation between the replicates (6 wells for each condition) represented 20 %.

The effect of basal culture media was tested by comparing porcine MSC growth in two types of α MEM (Sigma, M0894 noted A, and M4526 noted B), in DMEM (Sigma, M5796) and in IMDM (Gibco, 21980) (Table 1). All media were supplemented with 10 % FBS and 1 % antibiotics. The main differences between the four basal media were thus the glucose and glutamine concentrations, and the antioxidant molecule.

Glucose concentration was tested at 5.5, 13.5 and 25 mM in α MEM A supplemented with 10 % FBS and 1 % antibiotics. Glutamine concentration was tested at 0, 2, 4 and 6 mM in α MEM B supplemented with 10 % FBS and 1% antibiotics. Antioxidant thiocetic acid was tested by comparing α MEM A (supplemented with 10 % FBS and 1 % antibiotics), and α MEM B (supplemented with 10 % FBS, 1 % antibiotics, and 2 mM glutamine). Antioxidants sodium selenium (Sigma, S5261) and β -mercaptoethanol (Sigma, M7522) were tested at 0, 0.01, 0.02, 100 μ M and 0, 0.1 and 1 mM respectively, in α MEM A supplemented with 10 % FBS and 1 % antibiotics. Human growth factor FGF2 (Millipore, GF003) was tested at 0, 0.1, 0.5, 1, 5 and 12.5 ng/mL in α MEM A (supplemented with 10 % FBS and 1 % antibiotics). The effect of the human growth factor HGF (Millipore, GF116) was tested at 0, 1, 5 and 10 ng/mL in α MEM A (supplemented with 10 % FBS and 1 % antibiotics).

Table 1. Concentrations of glucose and glutamine, and antioxidant molecules present in the commercial culture media

Media	Glucose [mM]	Glutamine [mM]	Antioxidant
α MEM A	5.5	2	0.28 mM ascorbic acid 1 μ M thiocetic acid
α MEM B	5.5	0	0.28 mM ascorbic acid
DMEM	25	4	None
IMDM	25	4	0.01 μ M sodium selenium

Kinetic studies of porcine MSC growth in T-flasks

The following medium was used: α MEM A supplemented with 1 % antibiotics, 10 % FBS, 2 mM glutamine, 1 ng/mL FGF2. Cells were seeded in 25 cm² T-flasks (5 mL) in the following conditions: 0.6 x 10⁴ cells/cm², 3 x 10⁴ cells/mL and no medium change.

Growth and metabolism analysis of porcine MSC

Each day, three T-flasks were counted by the crystal violet method (detailed below). A solution of 0.1 M citric acid containing 1 % crystal violet (Sigma) was added to the samples, which were placed at 37°C under agitation for at least one hour to release the cell nuclei. Those nuclei were then counted on Fush-Rosenthal hemacytometer. The maximal specific growth rates were calculated during the active growth phase between 24 and 50 hours of culture.

Porcine MSC metabolism was analyzed by using enzymatic kits. Extracellular glucose concentrations (Glucose PAP, Elitech) and extracellular lactate concentrations (Lactate PAP, Biomérieux) were measured with an automated multiparameter analyzer (Vitalab Selectra). Measurements of extracellular glutamine concentration (Glutamate, R-Biopharm) were performed in 96-well plates using a spectrometer (Titertek Instruments). The corrected glutamine concentration was calculated by performing experiments in the same conditions but without cells, taking into account the spontaneous decomposition of glutamine at

37°C. Extracellular ammonia concentrations were measured with a selective probe (Orion). Maximal specific consumption and production rates were calculated between 24 and 50 hours of culture.

Porcine MSC characterization

Cell multipotency was assayed by using differentiation kits in 96-well plates. Adipogenesis (Fisher, Stempro® adipogenesis differentiation kit W59599) was tested by seeding 10^4 cells/cm² in adipogenic differentiation medium that was changed twice a week. After 2 weeks, cells were rinsed in PBS, fixed in glutaraldehyde and stained with the specific marker of lipids, Oil-red O. Chondrogenesis (Fisher, Stempro® chondrogenesis differentiation kit W59972) was tested by generating a 5 µL drop of cell solution at 1.6×10^7 cells/mL in the center of a well. Two hours later, the chondrogenic differentiation medium was added and then changed twice a week. After 3 weeks, cells were rinsed in PBS, fixed in glutaraldehyde and stained with the specific marker of proteoglycans, alcian blue. Osteogenesis (Fisher, Stempro® osteogenesis differentiation kit W5959A) was tested by seeding MSC at 5×10^3 cells/cm² in osteogenic differentiation medium changed twice a week. After 3 weeks, cells were rinsed in PBS, fixed in glutaraldehyde and stained with the specific marker of deposited calcium, Alizarin red.

RESULTS AND DISCUSSION

Porcine MSC expansion requires an adapted growth medium

In order to expand porcine MSC in an adapted growth medium, four commercial media classically used for human and rat MSC were first tested on cell growth in 96-well plates: αMEM A, αMEM B, DMEM and IMDM (Table 1), all supplemented with 1 % antibiotics and 10 % FBS. The maximum cell concentration was similar between αMEM B ($0.6 \pm 0.1 \times 10^5$ cells/mL) and DMEM ($0.7 \pm 0.1 \times 10^5$ cells/mL) (Figure 1). Compared to αMEM B, an increase of 66 % and 133 % of the maximal cell concentration was observed in IMDM ($1.0 \pm 0.2 \times 10^5$ cells/mL) and in αMEM A ($1.4 \pm 0.3 \times 10^5$ cells/mL), respectively (Figure 1). The basal medium αMEM A appeared therefore more adapted to the expansion of porcine MSC compared to αMEM B, DMEM or IMDM.

Such an advantage of αMEM over DMEM was observed on human MSC in other studies [15, 34]. Sotiropoulou et al. (2006) also pointed out that the basal medium IMDM promoted murine MSC expansion but not human MSC expansion [15]. In the present study, porcine MSC were able to proliferate and to multiply by 10 fold in IMDM, suggesting that a difference exists between human and porcine biochemical needs. The main differences between the four basal media (αMEM A, αMEM B, DMEM, IMDM) lie in their glucose and glutamine concentrations, and the antioxidant present in their composition. Thus, the advantage of αMEM A over the other basal media could come from either its glucose and glutamine

concentration, the presence of antioxidants, or from any combination of these components. The influence of glucose, glutamine and antioxidants are therefore further studied on porcine MSC growth. Other minor composition differences such as amino acid concentrations or inorganic salt composition were in the present study not investigated.

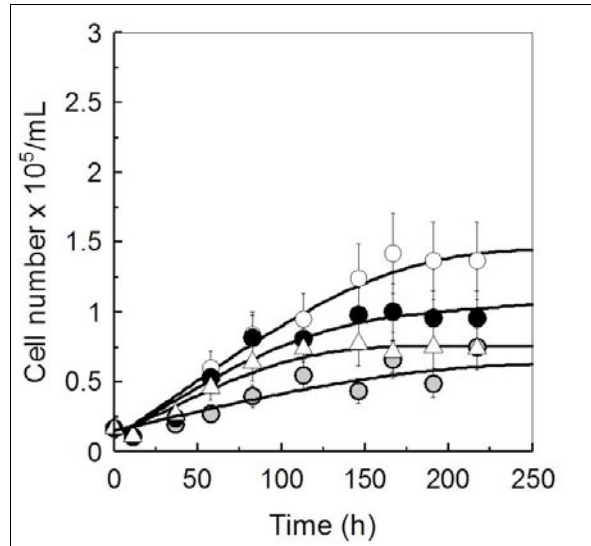


Figure 1. Effect of basal media on porcine MSC growth kinetics (supplemented with 10 % FBS): αMEM A (○), αMEM B (●), IMDM (●) and DMEM (△)

To study the effect of glucose concentration on porcine MSC growth kinetics, cells were expanded in 96-well plates with glucose concentrations varying from 5.5 mM to 25 mM in αMEM A (10 % FBS). Results showed that an increase in glucose concentration was not beneficial to porcine MSC growth (Figure 2).

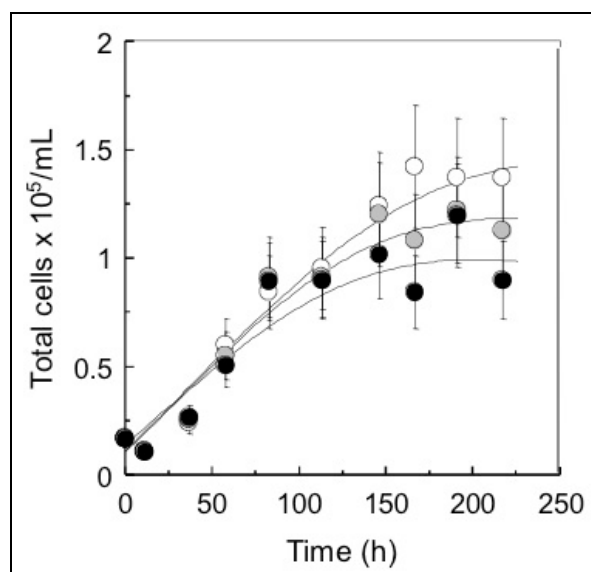


Figure 2. Effect of glucose concentration on porcine MSC growth kinetics, cultured in αMEM A (10 % FBS): 5.5 mM (○), 13.5 mM (●) and 25 mM (●)

According to the literature, the effect of glucose on MSC expansion is controversial. Some studies reported that a high glucose concentration (25 mM) was detrimental for human and rat MSC growth [15, 35] while, in other studies, no impact of high glucose concentration on human MSC growth was described [21]. In the study of Jung et al. (2010), a positive effect of high glucose concentration on human MSC growth was shown [22]. The effect of glucose concentration on MSC growth could be influenced by other factors, such as the time of exposure, or oxygen levels [36].

To study the effect of glutamine concentration on porcine MSC growth kinetics, the cells were expanded in 96-well plates at various concentrations of glutamine. Basal medium α MEM B (10 % FBS) was enriched with 2 to 6 mM glutamine. Since FBS has been reported to be initially composed of up to 0.5 mM glutamine [37], the culture medium is already enriched with up to 0.05 mM glutamine. Results showed that the maximum porcine MSC concentrations were 25 % higher with 2 to 6 mM glutamine supplementation than without any (Figure 3). It has to be underlined that porcine MSC could survive and proliferate without any additional supplementation of glutamine, other than the one initially present in the serum. The effect of glutamine concentration on MSC growth was not reported in the literature for other species.

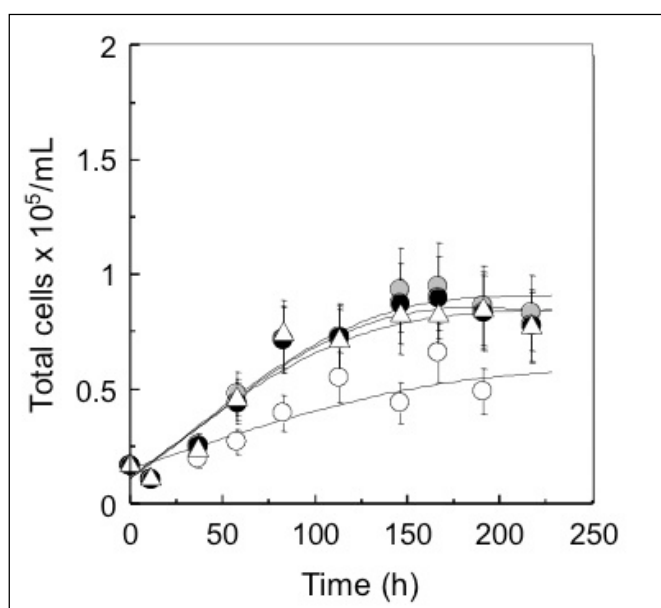


Figure 3. Effect of glutamine supplementation on porcine MSC growth kinetics, cultured in α MEM B (10 % FBS): no supplementation (○), 2 mM (●), 4 mM (●) and 6 mM (△) glutamine supplementation

To study the influence of antioxidants on porcine MSC growth, the medium was supplemented with various concentrations of three different antioxidants: thiocetic acid, sodium selenium and β -mercaptoethanol. Basal medium α MEM B (supplemented with 2 mM glutamine and 10 % FBS) initially containing 0.28 mM ascorbic acid was compared with α MEM A (supplemented with 10 % FBS) initially containing 0.28 mM ascorbic acid and 1 μ M thiocetic acid. Cultures with 1 μ M thiocetic acid reached a maximal cell concentration

that was 40 % higher than when no thiocetic acid was present (Figure 4a). Moreover, addition of 0.01 and 0.02 μM sodium selenium in $\alpha\text{MEM A}$ (10 % FBS, containing 0.28 mM ascorbic acid and 1 μM thiocetic acid) did not significantly increase the maximal cell concentration, whereas addition of 100 μM sodium selenium inhibited the cell growth (Figure 4b). Finally, $\alpha\text{MEM A}$ (10 % FBS), containing 0.28 mM ascorbic acid and 1 μM thiocetic acid, was supplemented with β -mercaptoethanol. Addition of 0.1 and 0.5 mM β -mercaptoethanol did not significantly increase the maximal cell concentration and a reduction of the maximal cell concentration was observed when 1 mM β -mercaptoethanol was added (Figure 4c).

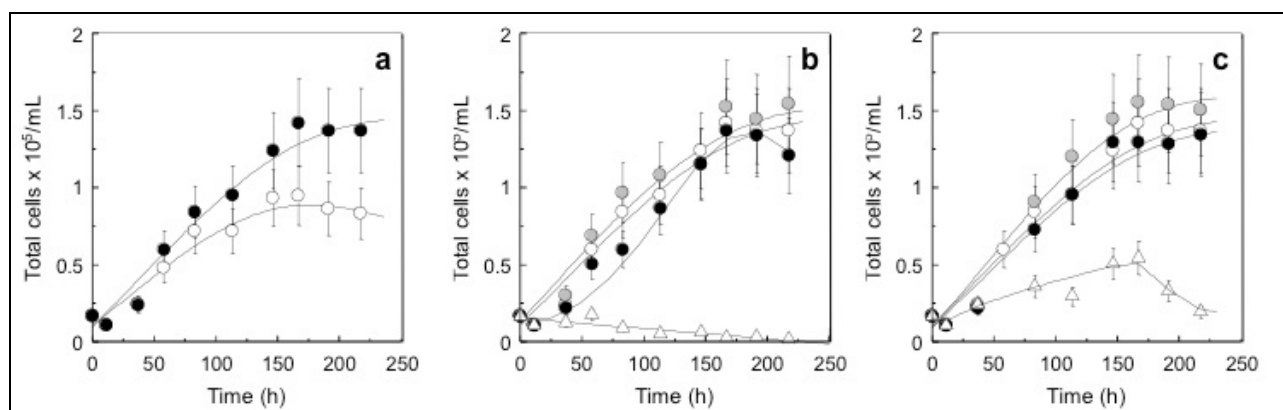


Figure 4. Influence of various antioxidant molecules on porcine MSC growth. (a) (○) No thiocetic acid supplementation ($\alpha\text{MEM B}$, supplemented with 2 mM glutamine, 10 % FBS), (●) thiocetic acid 1 μM ($\alpha\text{MEM A}$, 10 % FBS). (b) Sodium Selenium at various concentrations in $\alpha\text{MEM A}$ (10 % FBS): 0 μM (○), 0.01 μM (●), 0.02 μM (●) and 100 μM (△). (c) β -mercaptoethanol at various concentrations in $\alpha\text{MEM A}$ (10 % FBS): 0 mM (○), 0.1 mM (●), 0.5 mM (●), and 1 mM (△).

The results indicated that thiocetic acid supplementation was beneficial for porcine MSC growth. However, the additional supplementation of $\alpha\text{MEM A}$ medium with sodium selenium and β -mercaptoethanol did not increase the cell growth and was even detrimental at higher concentrations. The neutral or negative effects of sodium selenium and β -mercaptoethanol could be due to the presence of ascorbic acid and thiocetic acid in the basal medium, and possibly to the presence of selenium in the serum [38]. Few studies described the effect of antioxidants on MSC expansion [9, 25, 26]. A higher human MSC growth was observed when selenium and ascorbic acid were added in the medium [25, 26]. On the contrary, Bosch et al. (2006) did not observe any improvement in porcine MSC growth by adding ascorbic acid up to 5 mg/mL [9]. Inui et al. (1997) underlined that β -mercaptoethanol enhanced human osteoprogenitor cell growth, a cell type close to MSC [39]. Thiocetic acid has not yet been tested on MSC growth, but is known to restore glutathione levels [40] and to regenerate ascorbic acid [41]. In this study, the addition of 1 μM thiocetic acid in a medium containing 0.28 mM ascorbic acid and 10 % FBS enabled to enhance porcine MSC maximal cell concentration by 40 %.

From the results obtained on the influence of glucose, glutamine and antioxidants on porcine MSC growth, the advantage of the basal medium $\alpha\text{MEM A}$ over $\alpha\text{MEM B}$, DMEM and IMDM originates from the

combination of a low glucose concentration (5.5 mM), the presence of glutamine (2 mM), and the presence of thioctic acid (1 μ M).

In order to further improve the growth medium for porcine MSC, the supplementation with human growth factors was studied. Cells were cultivated in 96-well plates with two different human recombinant growth factors, FGF2 and HGF, since commercial porcine growth factors were not available at that time. FGF2 was added in the medium at a concentration ranging from 0.1 ng/mL to 12.5 ng/mL with 1 % antibiotics and 10 % FBS. Results showed that porcine MSC growth was stimulated by human FGF2 (Figure 5a). However, the maximum cell concentrations remained similar when HGF was tested, whatever the concentration used (Figure 5b). According to the literature, human growth factor FGF2 is known to enhance human MSC proliferation while maintaining the multipotency of cells [27-29]. Human FGF2 was shown to also stimulate the growth of rat MSC [30]. In the present study, addition of human FGF2 at a low concentration (1 ng/mL) enabled to increase porcine MSC concentration by 40 %. Besides economical reasons, a low concentration of growth factor has to be preferred in order to prevent a potential cell differentiation [27].

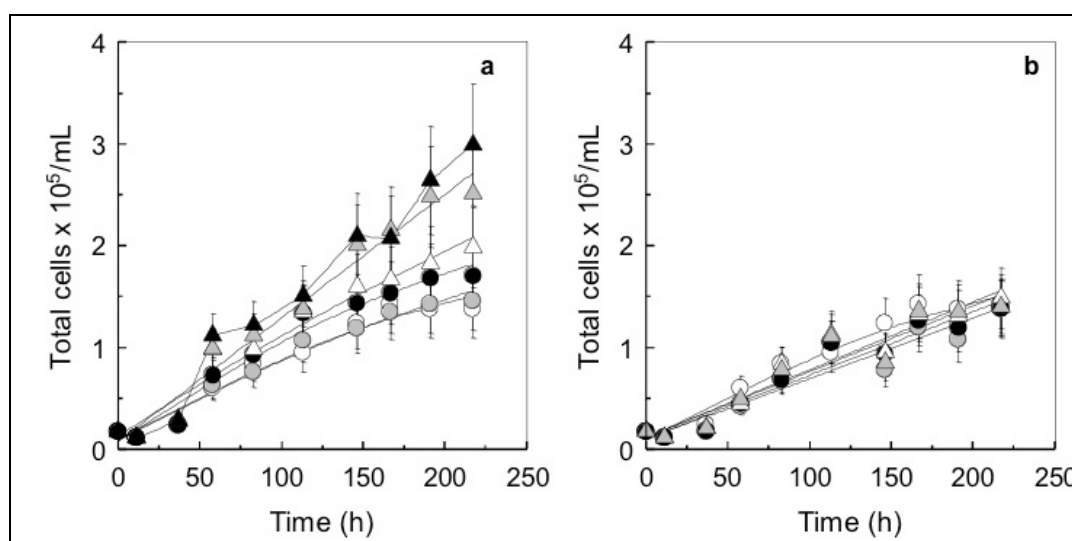


Figure 5. Effect of human growth factors on porcine MSC kinetics. (a) Human FGF2 at various concentrations in α MED A (10 % FBS): 0 ng/mL (○), 0.1 ng/mL (●), 0.5 ng/mL (●), 1 ng/mL (△), 5 ng/mL (▲) and 12.5 ng/mL (▲). (b) Human HGF at various concentrations in α MED A (10 % FBS): 0 ng/mL (○), 0.5 ng/mL (●), 1 ng/mL (●), 5 ng/mL (△) and 10 ng/mL (▲)

An adapted medium for porcine MSC can therefore be proposed, composed of α MED A supplemented with 10 % FBS, 1 ng/mL FGF2 and 2 mM glutamine. This medium was used for MSC expansion in 25 cm² T-flasks at a seeding concentration of 0.6 x 10⁴ cell/cm² and 3 x 10⁴ cells/mL (5 cm²/mL). The cells multiplied by 4-fold and reached a total cell number of 6 x 10⁵ cells (1.2 x 10⁵ cells/mL), while retaining their multipotency (Figure 6). This design of an adapted culture medium for improved porcine MSC expansion could serve as a basis for further optimization, which would include experimental designs and chemically defined serum-free media.

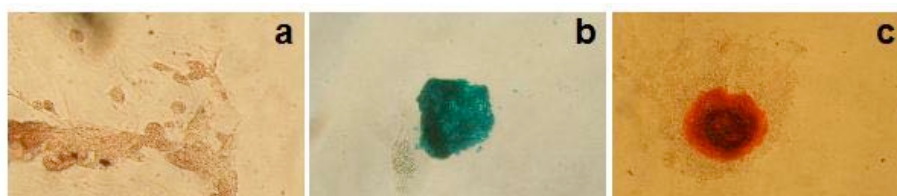


Figure 6. MSC multipotency test. Cells expanded in T-flasks were differentiated along the adipogenic (a), chondrogenic (b), and osteogenic (c) pathway

Porcine MSC metabolism is similar to other MSC species

In order to study porcine MSC metabolism, the maximal specific consumption and production rates of the cells in T-flasks were calculated (Table 2). Values of glucose and glutamine consumption rates, lactate and ammonia production rates, and lactate/glucose yield were in a similar range as other MSC species such as human, goat and rat MSC, reported in the literature (Table 3). Only the yield of ammonia from glutamine in our study was significantly lower than the values reported in the literature. One hypothesis could be the production of alanine, lowering the production of ammonia [42].

Table 2. Maximal specific growth rates, glucose and glutamine consumption rates, and lactate and ammonia production rates of MSC cultured in T-flasks

	μ [d ⁻¹]	q_{gluc} [pmol/cell/day]	q_{lact} [pmol/cell/day]	q_{glut} [pmol/cell/day]	q_{amm} [pmol/cell/day]	$Y_{\text{lac/gluc}}$ [mmol/mmol]	$Y_{\text{amm/glut}}$ [mmol/mmol]
T-flask	0.31	12	24	6	2	2.0	0.1

Table 3. Comparison of MSC metabolism from different species reported in the literature

MSC specie	q_{gluc} [pmol/cell/day]	q_{lact} [pmol/cell/day]	q_{glut} [pmol/cell/day]	q_{amm} [pmol/cell/day]	$Y_{\text{lac/gluc}}$ [mmol/mmol]	$Y_{\text{amm/glut}}$ [mmol/mmol]
Human	15 [24] 3 [16]	37 [24] 10.3 [23]	30 [24] 1 [23] 0.007 [16]*	45 [24] 1 [23]	2 [16]	1.6 [24] 1.2 [23] 1.6 [16]
Goat	2.6 [16]		0.003 [16]*		0.8 [16]	1.3 [16]
Rat	6 [16]		0.006 [16]*		1.9 [16]	1.6 [16]

*: corrected for spontaneous glutamine decomposition at 37°C ; [24] Dos Santos, 2010; [23] Eibes, 2010; [16] Schop, 2009

CONCLUSION

Porcine MSC were used in several studies reported in the literature, due to their value as a model for autologous tissue engineering. However, few data exist on their biochemical needs. Since differences in the metabolism of human, goat and murine MSC have been underlined, it was assumed that porcine MSC exhibited specific requirements to promote their growth. In the present study, a culture medium enabling a rapid expansion of porcine MSC is therefore proposed. Indeed, kinetic analysis demonstrated that porcine

MSC were able to grow efficiently in α MEM A, initially containing 5.5 mM glucose, 2 mM glutamine, 0.28 mM ascorbic acid, 1 μ M thiocetic acid, and supplemented with an additional 2 mM of glutamine and 1 ng/mL human FGF2. However, HGF failed to improve porcine MSC growth. The high glucose concentrations tested (up to 25 mM) did not improve the cell growth. Whereas additional glutamine supplementation was not essential to promote the growth of porcine MSC, addition of 2 mM glutamine allowed to increase the MSC expansion by more than 25 %. Other basal media tested (α MEM B, IMDM, DMEM) appeared less adapted to porcine MSC expansion. Using the supplemented α MEM A medium, porcine MSC metabolism analysis showed that the values of consumption and production rates of glucose, glutamine, lactate and ammonia were similar with the values reported on other MSC species. This design of an adapted culture medium for improved porcine MSC expansion could serve as a basis for further optimization, using design of experiments and serum-free media.

ACKNOWLEDGEMENTS

Funding for this project was supported by the French National Research Agency (ANR). C. Ferrari received a grant from the Ministry of Research and National Education.

REFERENCES

1. Jorgensen, C., Gordeladze, J., Noël, D. (2004) *Curr. Opin. Biotech.* 15, 406-410.
2. Caplan, A. I., Dennis, J. E. (2006) *J. Cell. Biochem.* 98, 1076-1084.
3. Kolf, C. M., Cho, E., Tuan, R. S. (2007) *Arthritis. Res. Ther.* 9, 204.
4. Comite, P., Cobianchi, L., Avanzini, M. A., Zonta, S., Mantelli, M., Achille, V., De Martino, M., Cansolino, L., Ferrari, C., Alessiani, M., Maccario, R., Gandolfo, G. M., Dionigi, P., Locatelli, F., Bernardo, M. E. (2010) *Transplant. P* 42, 1341-1343
5. Vacanti, V., Kong, E., Suzuki, G., Sato, K., Canty, J. M, Lee, T. (2005) *J. Cell. Physiol.* 205, 194-201.
6. Van der Spoel, T. I. G., Jansen of Lorkeers, S. J., Agostoni, P., van Belle, E., Gyöngyösi, M., Sluijter, J. P. G., Cramer, M. J., Doevendans, P. A., Steven A.J. Chamuleau S. A. J (2011) *Cardiovasc. Res.* 91, 649–658.
7. Chung, R., Foster, B. K., Xian, C. J. (2011) *Stem Cells Int.* doi:10.4061/2011/570125
8. Zheng, Y., Liu, Y., Zhang, C. M., Zhang, H. Y., Li, W. H., Shi, S., Le, A. D., Wang, S. L. (2009) *J. Dent. Res.* 88, 249-254.
9. Bosch, P., Pratt, S. L., Stice, S. L. (2006) *Biol. Reprod.* 74, 46-57.
10. Ringe, J., Kaps, C., Schmitt, B., Büscher, K., Bartel, J., Smolian, H., Schultz, O., Burmester, G. R., Häupl, T., Sittering, M. (2002) *Cell Tissue. Res.* 307, 312-327.
11. Zou, X., Li, H., Chen, L., Baatrup, A., Bünger, C., Lind, M. (2004) *Biomaterials* 25, 5375-5385
12. Jin, Y., Kato, T., Furu, M., Nasu, A., Kajita, Y., Mitsui, H., Ueda, M., Aoyama, T., Nakayama, T., Nakamura, T., Toguchida, J. (2007) *Biochem. Bioph. Res. Co.* 391, 1471-1476.
13. Frauenschuh, S., Reichmann, E., Ibold, Y., Goetz, P. M., Sittering, M., Ringe, J. (2007) *Biotechnol. Prog.* 23, 187-193.
14. Mahajan, A., Stahl, C. H. (2009) *J. Nutr. Biochem.* 20,512-520.
15. Sotiropoulou, P. A., Perez, S. A., Salagianni, M., Baxevanis, C. N., Papamichail, M. (2006) *Stem Cells* 24, 462-471.
16. Schop, D., Janssen, F. W., Van Rijn, L. D. S., Fernandes, H., Bloem, R. M., De Bruijn, J. D., Van Dijkhuizen-Radersma, R. (2009) *Tissue Eng. Part A* 15, 1877-1886.
17. Bruder, S. P., Jaiswal, N., Haynesworth, S. E. (1997) *J. Cell Biochem.* 64, 278-294.
18. Sart, S., Schneider, Y. J., Agathos, S. N. (2009) *J. Biotechnol.* 139, 291-299.
19. Deorosan, B., Nauman, E. A. (2011) *Stem Cells Int.* doi:10.4061/2011/429187
20. Zhu, W., Chen, J., Cong, X., Hu, S., Chen, X. (2006) *Stem Cells* 24, 416-425.
21. Li, Y. M., Schilling, T., Benisch, P., Zeck, S., Meissner-Weigl, J., Schneider, D., Limbert, C., Seufert, J., Kassem, M., Schütze, N., Jakob, F., Ebert, R. (2007) *Biochem. Bioph. Res. Co.* 363, 209-215.

22. Jung, M. R., Min, Y. L., Seung, P. Y., Ho, J. H. (2010) *J. Cell. Physiol.* 224, 59-70.
23. Eibes, G., dos Santos, F., Andrade, P. Z., Boura, J. S., Abecasis, M. M. A., da Silva, C. L., Cabral, J. M. S. (2010) *J. Biotechnol.* 146, 194-197.
24. Dos Santos, F., Andrade, P. Z., Boura, J. S., Abecasis, M. M., Da Silva, C. L., Cabral, J. M. S. (2010) *J. Cell. Physiol.* 223, 27-35.
25. Ebert, R., Ulmer, M., Zeck, S., Meissner-Weigl, J., Schneider, D., Stopper, H., Schupp, N., Kassem, M., Jakob, F. (2006) *Stem Cells* 24, 1226-1235.
26. Choi, K. M., Seo, Y. K., Yoon, H. H., Song, K. Y., Kwon, S. Y., Lee, H. S., Park, J. K. (2008) *J. Biosci. Bioeng.* 105, 586-594.
27. Tsutsumi, S., Shimazu, A., Miyazaki, K., Pan, H., Koike, C., Yoshida, E., Takagishi, K., Kato, Y. (2001) *Biochem. Bioph. Res. Co.* 288, 413-419.
28. Bianchi, G., Banfi, A., Mastrogiacomio, M., Notaro, R., Luzzatto, L., Cancedda, R., Quarto, R. (2003) *Exp. Cell. Res.* 287, 98-105.
29. Ahn, H. J., Lee, W. J., Kwack, K., Kwon, Y. D. (2009) *FEBS Letters* 583, 2922-2926.
30. Forte, G., Minieri, M., Cossa, P., Antenucci, D., Sala, M., Gnocchi, V., Fiaccavento, R., Carotenuto, F., De Vito, P., Baldini, P. M., Prat, M., Di Nardo, P. (2006) *Stem Cells* 24, 23-33.
31. Deuse, T., Peter, C., Fedak, P. W. M., Doyle, T., Reichenspurner, H., Zimmermann, W. H., Eschenhagen, T., Stein, W., Wu, J. C., Robbins, R. C., Schrepfer, S. (2009) *Circulation* 120, S247-S254
32. Viebahn, C. S., Tirnitz-Parker, J. E. E., Olynyk, J. K., Yeoh, G. C. T. (2006) *Eur. J. Cell. Biol.* 85, 1265-1274.
33. Brinkmann, M., Lütkemeyer, D., Gudermann, F., Lehmann, J. (2002) *Cytotechnology* 38, 119-127.
34. Javazon, E. H., Colter, D. C., Schwarz, E. J., Prockop, D. J. (2001) *Stem Cells* 19, 219-225.
35. Stolzing, A., Coleman, N., Scutt, A. (2006) *Rejuven. Res.* 9, 31-35.
36. Chen, C. T., Hsu, S. H., Wei, Y. H. (2010) *Biochim. Biophys. Acta.* 1800, 257-263.
37. Baetz, A. L., Hubbert, W. T., Graham, C. K. (1975) *J. Reprod. Fert.* 44, 437-444.
38. Safaralizadeh, R., Kardar, G. A., Pourpak, Z., Moin, M., Zare, A., Teimourian, S. (2005) *Nutrition Journal* 4, 32 doi: 10.1186/1475-2891-4-32
39. Inui, K., Oreffo, R. O. C., Triffitt, J. T. (1997) *Cell. Biol. Int.* 21, 419-425.
40. Shay, K. P., Moreau R. F., Smith, E. J., Smith, A. R., Hagen, T. M. (2009) *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 1149-1160.
41. Gonzalez-Perez, O., Gonzalez-Castaneda, R. E. (2006) *Nutr. Res.* 26, 1-5.
42. Zwerschke, W., Mazurek, S., Stöckl, P., Hütter, E., Eigenbrodt, E., Jansen-Dürr, P. (2003) *Biochem. J.* 376, 403-411.

Principales contributions du projet de publication

Cette étude nous a permis de mieux caractériser les principaux besoins biochimiques des CSM porcines au cours de leur expansion cellulaire. Les résultats ont montré que certains milieux de base, comme l' α MEM, étaient plus adaptés aux besoins des CSM porcines que d'autres. Cela résulte principalement de leur concentration en glucose et en glutamine, ainsi que de la présence ou non de molécules antioxydantes. Ainsi, une faible concentration en glucose (5,5 mM) a permis d'augmenter la concentration cellulaire maximale de 40 % en comparaison d'une concentration de glucose plus élevée (25 mM). Par ailleurs, l'addition de 2 à 6 mM de glutamine a amélioré la concentration cellulaire de 25 % par rapport à une culture sans ajout de glutamine. La supplémentation en acide thiocétique (1 μ M) a favorisé la concentration maximale cellulaire de 40 %. Enfin, un gain de 40 % a aussi été obtenu grâce à l'ajout de 1 ng/mL de FGF2. La mise en commun de toutes ces conditions favorables a permis l'obtention d'un facteur de multiplication des cellules de 14 en 10 jours, sans perte de leur multipotence, ce qui est supérieur aux autres études rapportées dans la littérature amplifiant des CSM porcines en flacons statiques (Vacanti et al., 2005; Ringe et al., 2002; Bosch et al., 2006). Outre le fait de pouvoir accélérer l'expansion des CSM porcines, nous avons quantifié leur métabolisme par le calcul des vitesses spécifiques de consommation de glucose et de glutamine, et de production de lactate et d'ions ammonium. Ces paramètres cinétiques, représentatifs des CSM porcines dans le milieu choisi, présentent des ordres de grandeurs proches de ceux rapportés dans la littérature pour les CSM murines et humaines. Cette formulation de milieu de culture a été utilisée dans la suite des travaux présentés.

Conclusion du chapitre 3

Dans cette partie, l'influence de divers paramètres de culture sur la réponse des CSM porcines a été évaluée, en conditions statiques et agitées (Figure 52). Nous avons pu ainsi mettre en évidence les conditions favorisant l'expansion des CSM porcines. Ainsi, la concentration cellulaire d'ensemencement en flacons statiques doit être supérieure à 1500 cellules/cm² (0,75 x 10⁴ cellules/mL). En conditions agitées, avec les cellules adhérentes sur microporteurs, elle doit être comprise entre 3 à 6 cellules/porteur. Par ailleurs, une agitation initiale de 25 rpm pendant une heure est nécessaire pour une adhérence homogène sur les microporteurs. Une siliconisation des spinners doit être réalisée avant chaque culture afin d'éviter l'adhérence des microporteurs et des cellules aux parois des récipients. Enfin, du fait de la sénescence répliquative des CSM porcines observée en cours de culture, les cellules doivent êtreensemencées avant le passage 5. La composition du milieu de culture doit également être soigneusement choisie pour l'expansion

des CSM porcines. Une concentration en SVF de 10 % est nécessaire pour la prolifération des cellules. Les concentrations d'autres composés du milieu de culture ont été adaptées aux CSM porcines, tels que le glucose (5,5 mM), la glutamine (2 mM), l'acide ascorbique (0,28 mM), l'acide thioctique (1 μ M), et le FGF2 (1 ng/mL).

Ce premier chapitre de résultats a donc permis de définir plus précisément les paramètres d'ensemencement des CSM porcines en conditions statiques et agitées. De plus, le milieu de culture a pu être adapté aux besoins spécifiques des CSM porcines en nutriments et en molécules bioactives, et des données sur le métabolisme des cellules ont été acquises. Enfin, l'influence de l'âge des cellules ensemencées sur la prolifération et le métabolisme a souligné la nécessité d'une expansion la plus courte possible des CSM à usage thérapeutique. Sur la base de ces données préliminaires, les différents modes d'expansion de CSM porcines ont été étudiés plus en détails dans le second chapitre de résultats.

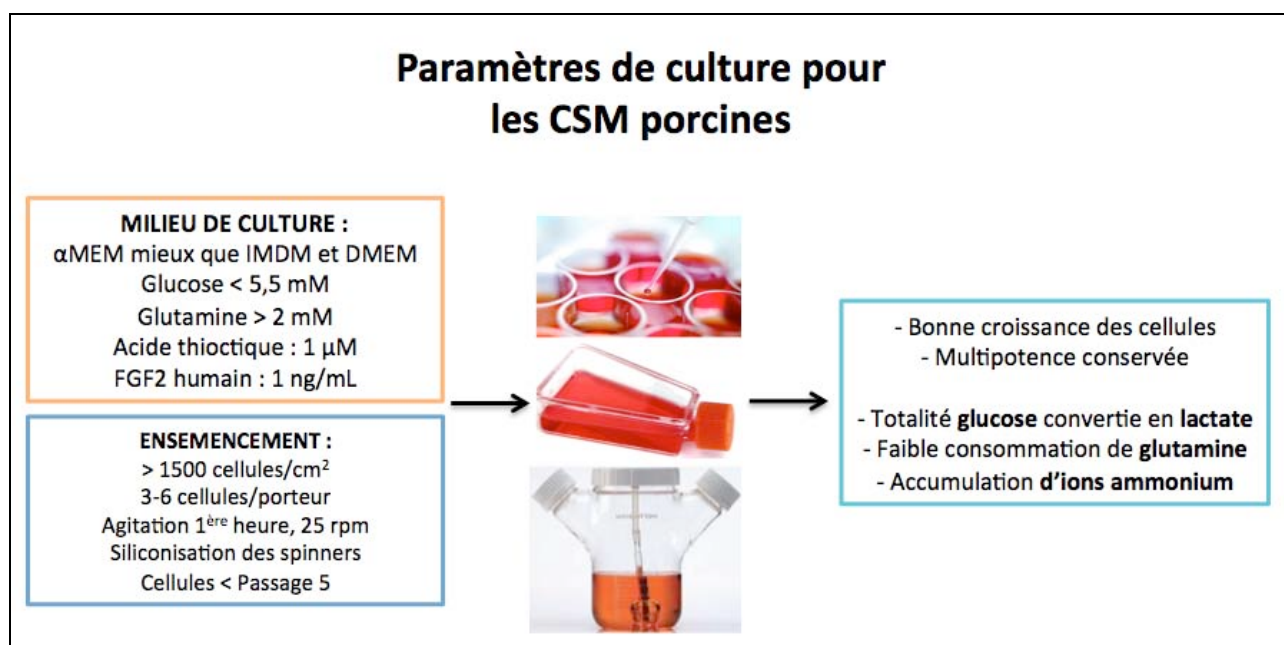


Figure 52. Résumé du Chapitre 3 sur les paramètres de culture adaptées aux CSM porcines

Chapitre 4. Influence du mode d'expansion sur la réponse des CSM porcines et évaluation des méthodes de comptage

4.1. Influence des modes d'expansion en conditions agitées sur la réponse des CSM porcines ...	124
4.1.1. Culture de CSM en suspension et sous forme d'agrégats	125
4.1.2. Culture de CSM sur différents microporteurs.....	126
4.1.3. Influence du type de microporteur sur la réponse des CSM	129
4.1.4. Choix du microporteur pour l'expansion des CSM.....	131
4.2. Étude des méthodes de comptage des CSM cultivées sur Cytodex 1	133
4.2.1. Méthode innovante de comptage des noyaux cellulaires par cytométrie.....	133
4.2.2. Caractéristiques et comparaisons des différentes méthodes de comptage de CSM sur microporteurs.....	134
Conclusion du Chapitre 4.....	137

Introduction du Chapitre 4

L'expansion des CSM porcines est fortement dépendante des paramètres cultureux, biochimiques et physico-chimiques, comme l'a montré l'étude bibliographique. L'analyse et la compréhension de l'influence des paramètres environnementaux sur la réponse des CSM sont nécessaires pour améliorer leur expansion. Le Chapitre 3 a ainsi montré l'importance des principaux composés du milieu de culture sur l'adhérence, la croissance et le métabolisme des cellules. Cela nous a permis de définir des conditions de culture adaptées aux CSM porcines, et d'améliorer l'expansion cellulaire en flacons statiques et en flacons agités avec les cellules adhérentes sur microporteurs. D'autres modes d'expansion des CSM en culture agitée sont rapportés dans la littérature, tels que la culture sur différents types de microporteurs, la culture en suspension unicellulaire, ou encore la culture sous forme d'agrégats (Frauenschuh et al., 2007; Baksh et al., 2007; Frith et al., 2010). Or, ces méthodes d'expansion n'ont jamais été comparées toutes ensemble dans une même étude. Par ailleurs, il est souvent difficile de comparer les travaux des différents auteurs car les méthodes de comptage sont très disparates, et reposent sur différentes propriétés des cellules.

Dans cette partie, nous nous sommes attachés à la sélection d'un mode d'expansion en conditions agitées, qui soit adapté aux CSM porcines. Pour cela, différents modes de culture ont été comparés sur la base de la réponse physiologique des cellules. Ainsi, les CSM ont été cultivées en spinner, soit sans support d'adhérence, en suspension ou en agrégats, soit adhérentes sur des microporteurs (Cytodex 1, Cytodex 3, Hillex, Cultispher G et Cytopore). Les cinétiques de croissance, de mort et de métabolisme des cellules ont été analysées tout au long des cultures, puis comparées à des cultures de mêmes cellules réalisées en flacons statiques. De plus, il nous a semblé nécessaire d'apporter une contribution à une éventuelle standardisation de l'évaluation de la concentration cellulaire. Ainsi, une comparaison des principales méthodes de comptage des CSM cultivées sur microporteurs a été réalisée. Une nouvelle technique a également été proposée pour permettre le comptage automatisé des CSM sur microporteurs sans trypsination.

4.1. Influence des modes d'expansion en conditions agitées sur la réponse des CSM porcines

L'expansion des CSM est généralement réalisée dans des flacons statiques (Sotiropoulou et al., 2006). Ce système de culture présente cependant des inconvénients, tels qu'une limitation de l'extrapolation et un manque de régulation des paramètres physico-chimiques (Frauenschuh et al., 2007). Ces inconvénients peuvent être levés en mettant en œuvre des cultures en bioréacteurs agités et contrôlés. L'agitation des cellules est obtenue par leur mise en suspension, soit sous forme unicellulaire ou d'agrégats, soit sur des microporteurs. Les cultures en suspension unicellulaire sont largement utilisées pour les lignées cellulaires continues, et ont déjà été appliquées aux cellules souches de type hématopoïétiques (Andrade-Zaldivar et al., 2008). Les cultures sous formes d'agrégats sont également utilisées pour les lignées continues (Goetghebeur et al., 1990; Moreira et al. 1995), ainsi que pour les cellules souches embryonnaires (Bauwens et al., 2008) et les cellules souches adultes (Kallos et al., 2003; Serra et al., 2009; Youn et al., 2005). Enfin, les cultures sur microporteurs sont classiquement utilisées pour les lignées continues adhérentes (van Wezel, 1976; Tharmalingam et al., 2010) et récemment pour les cellules souches embryonnaires (Alfred et al., 2010; Chen et al., 2011). Le principal avantage des microporteurs pour la culture de cellules adhérentes est le rapport important entre la surface d'adhérence et le volume de milieu de culture comparé aux cultures statiques, ce qui minimise le coût et l'espace nécessaire aux cultures. Différents microporteurs sont proposés sur le marché, qui varient en fonction de leur forme (en bâtonnet, sphérique), de leur taille (de 10 μm à 2 mm), de leur composition (dextrane, cellulose, gélatine, polystyrène), de leur densité (1,03 à 1,10 g/L), de leur charge (positive ou négative), ainsi que de leur porosité (micro ou macroporosité, taille des pores).

Plusieurs études focalisées sur des cultures de CSM en suspension (Baksh et al., 2007 ; Chen et al., 2006), sous forme d'agrégats (Subramanian et al., 2011; Frith et al., 2010), ou sur microporteurs (Frauenschuh et al., 2007; Schop et al., 2008 et 2010; Yang et al., 2007; Yu et al., 2009; Boo et al., 2011; Sart et al., 2009 et 2010; Eibes et al., 2010) ont été rapportées. Cependant, il est difficile de comparer les différents résultats car de nombreux paramètres diffèrent d'une étude à l'autre, tels que ceux concernant la phase d'ensemencement, la concentration initiale en cellules et en microporteurs, les fréquences d'agitation, la composition du milieu de culture, les volumes de culture, les méthodes de comptage des cellules, ou encore les régimes d'alimentation. Bien que certaines études comparent l'expansion sur différents microporteurs (Frauenschuh et al., 2007; Yang et al., 2007; Sart et al., 2010), aucune comparaison entre les différents modes de culture agitées n'a été réalisée.

Afin d'établir les conditions propices à l'expansion des CSM porcines en conditions agitées, l'influence de plusieurs systèmes de culture agitée a été testée, notamment sur l'adhérence, la croissance, la mort et le métabolisme cellulaires. Les différents modes de culture évalués sont la culture en suspension, la culture sous forme d'agrégats, ainsi que la culture sur cinq types de microporteurs différents : microporeux (Cytodex 1, Cytodex 3 et Hillex), ou macroporeux (Cultispher G et Cytopore 2).

4.1.1. Culture de CSM en suspension et sous forme d'agrégats

Afin de cultiver les CSM en suspension, celles-ci ont été directementensemencées dans un spinner sous agitation (200 mL; 25 rpm). Dans ces conditions, aucune croissance apparente des cellules n'a été observée. Les cellules restent cependant métaboliquement actives, puisque 2 mM de glucose ont été consommés, et 3 mM de lactate ont été produits pendant les premières 180 h de culture. En revanche, aucune activité de la LDH n'a été observée dans le surnageant. Après 24 h de culture, les cellules ont formé un agrégat unique, de plusieurs millimètres de diamètre. Il semblerait donc que les cellules se soient agrégées sans mortalité cellulaire apparente.

Ces résultats sont en accord avec les travaux de Baksh et al. (2003) qui ont observé que des CSM humaines cultivées en suspension s'agrègent rapidement et perdent leur potentiel de prolifération. Les cultures en suspension ne seraient possibles que lorsque les CSM n'ont jamais préalablement adhéré sur un support. Dans ces conditions, plusieurs études ont rapporté des amplifications réussies de CSM cultivées en suspension (Baksh et al., 2003; Chen et al., 2006; Zhang et al., 2009). Le fait de ne jamais faire adhérer les cellules est cependant contraignant, notamment pour réaliser les banques cellulaires. Une étude de Benoit et al. (2007) a montré que l'activité constitutive de la kinase ILK (Integrin Linked Kinase), une enzyme clé intégrant les voies signalétiques d'adhérence et de prolifération, permettait d'amplifier en suspension des CSM préalablement adhérentes. En parallèle, Feng et al. (2007) ont obtenu des résultats similaires en ajoutant un inhibiteur de la Caspase 3, une enzyme impliquée dans le mécanisme apoptotique déclenché par l'impossibilité d'adhérence des cellules.

Concernant la culture sous forme d'agrégats, les CSM porcines ont d'abord étéensemencées dans des flacons recouverts d'agarose afin de former des agrégats de petite taille. Après 24 h, les agrégats ont été transférés dans des spinners sous agitation (200 mL; 25 rpm). Dans ces conditions, les agrégats se sont rassemblés en un agrégat unique après 24 h de culture, semblable à celui formé par les CSMensemencées en suspension. Deux études rapportent la culture de CSM sous forme d'agrégats (Subramanian et al., 2011; Frith et al., 2010). Cependant, Subramanian et al. (2011) ont utilisé une sous-population très proliférative

de CSM, les MAPC (Multipotent Adult Progenitor Cells), et Frith et al. (2010) n'ont détecté à l'intérieur des agrégats que des cellules viables, sans aucune prolifération apparente.

Même si peu d'études ont rapporté la culture de CSM sans support d'adhérence, ces modes de culture présentent tout de même des avantages pour la culture à grande échelle. En effet, l'absence de support d'adhérence supprime l'étape de digestion enzymatique pour détacher les cellules, ce qui simplifie le procédé. De plus, aucune particule issue des microporteurs ne pollue les cellules après la récolte (Shaw, 2010), ce qui est capital pour une application en ingénierie cellulaire. Par ailleurs, des agrégats de cellules BHK (Baby Hamster Kidney) ont montré une résistance accrue aux contraintes hydrodynamiques par rapport à des cellules sur microporteurs (Moreira et al., 1995). Ces cultures sont donc prometteuses mais nécessitent encore beaucoup d'études pour éviter l'agrégation massive des cellules, et induire une prolifération cellulaire satisfaisante.

4.1.2. Culture de CSM sur différents microporteurs

Dans nos conditions de culture, les CSM porcines ne présentent pas de prolifération apparente sans support d'adhérence. La culture sur microporteurs a donc été envisagée, en testant cinq types de microporteurs différents : trois sont microporeux, tels que Hillex (515 cm²/g sec), Cytodex 1 (4400 cm²/g sec) et Cytodex 3 (2700 cm²/g sec), deux sont macroporeux, tels que Cytopore 2 (surface externe de 5000 cm²/g sec, pores de 30 µm) et Cultispher G (surface externe de 2000 cm²/g sec, pores de 20 µm). Mise à part la porosité, les microporteurs diffèrent par leur composition (cf. Tableau 8 dans le Chapitre 2. Matériel et Méthodes). Les microporteurs Hillex, Cytodex 1 et Cytopore 2 sont chargés positivement, grâce à des résidus triméthylammonium (Hillex) ou de DEAE (Cytodex 1 et Cytopore 2). En ce qui concerne les microporteurs Cytodex 3 et Cultispher G, leur surface est composée de gélatine. Le point isoélectrique de la gélatine dépend de son origine (Zhang et al., 2006). Dans le cas de Cytodex 3 et de Cultispher G, la gélatine provient de la peau de porc, avec un point isoélectrique d'une valeur de 9,4 (Malafaya et al., 2007 ; Berthold et al., 1998). Au pH des cultures de CSM (autour de 7,4), ces deux microporteurs sont alors chargés positivement (Lim et Kim, 1995).

Les CSM porcines ont étéensemencées sur les cinq types de microporteurs dans les mêmes conditions de culture, à une concentration cellulaire de 6000 cellules/cm² et de 3 x 10⁴ cellules/mL, sans renouvellement de milieu. Pour chaque culture, la concentration en microporteurs a été adaptée pour atteindre une surface de 1000 cm² dans chaque spinner de 200 mL agité à 25 rpm (volume d'ensemencement de 100 mL, agité 1 h à 25 rpm, puis 23 h sans agitation). Le pourcentage de cellules adhérees après 5 h

d'ensemencement varie en fonction des différents systèmes de culture, avec une plus forte valeur en flacons statiques (80 %) (Tableau 13). Selon le type de microporteur utilisé, le pourcentage de cellules adhérees le plus élevé est obtenu avec Cytodex 1 (69 %), alors que le plus bas est obtenu sur Hillex (46 %). À la fin de la phase d'ensemencement (24 h), toutes les cellules sont adhérees quel que soit le système de culture. De la même façon, l'étude de Schop et al. (2010) a montré un pourcentage de cellules adhérees plus élevé après 18 h d'ensemencement sur Cytodex 1 (58 %) contre 11 % avec les microporteurs Hillex.

Tableau 13. Pourcentage de cellules adhérees après 5 h d'ensemencement selon les différents systèmes de culture utilisés

Système de culture		% de cellules adhérees après 5 h d'ensemencement
Flacon statique		80 ± 16
Spinner avec cellules sur microporteurs	Hillex	46 ± 9
	Cytodex 1	69 ± 14
	Cytodex 3	63 ± 13
	Cytopore 2	54 ± 11
	Cultispher G	61 ± 12

Après la phase d'ensemencement de 24 h, les cellules sont soumises à une agitation continue de 25 rpm. Leurs vitesses spécifiques de croissance sont calculées entre 24 h et 50 h de culture. Les données sont résumées dans le Tableau 14 et les cinétiques de croissance sont présentées dans la Figure 53. Par comparaison à la culture en flacon statique ($0,31 \text{ j}^{-1}$), les cellules sur microporteurs présentent une vitesse spécifique de croissance plus élevée, sauf sur Hillex ($0,25 \text{ j}^{-1}$).

Plusieurs études ont rapporté une prolifération des CSM sur microporteurs, tels que sur Cytodex 1 (Frauensschuh et al., 2007; Schop et al., 2008; Boo et al., 2011), Cytodex 3 (Yu et al., 2009; Sart et al., 2010), et Cultispher (Yang et al., 2007; Sart et al., 2009; Sun et al., 2010). Cependant, les comparaisons entre ces études sont difficiles à effectuer en raison du manque de standardisation entre les protocoles d'expansion. Sart et al. (2010) ont comparé la culture de CSM de rat sur Cultispher S et Cytodex 3 pendant six jours, en conditions agitées à 70 rpm. La concentration cellulaire la plus élevée a été obtenue avec les Cultispher S. Les auteurs émettent l'hypothèse que les pores des supports Cultispher S protégeraient les cellules des contraintes de cisaillement, contrairement aux porteurs microporeux Cytodex 3. De la même façon, Eibes et al. (2010) ont indiqué que la porosité de Cultispher créait une niche hypoxique favorable à la croissance des CSM. Dans notre étude, nous n'observons pas de différence significative de prolifération des CSM porcines entre les microporteurs macroporeux (Cultispher G, Cytopore 2) et microporeux (Cytodex 1, Cytodex 3) lors d'une agitation à 25 rpm en spinner. Cela peut être dû à des conditions plus douces d'agitation en spinner par rapport aux travaux de la littérature.

Enfin, deux études ont comparé la croissance de CSM sur microporteurs par rapport à celle observée en

flacons statiques (Yu et al., 2009; Sart et al., 2009). Les deux études n'ont pas trouvé de différence entre les deux modes de cultures. Par contre, dans notre étude, une vitesse spécifique de croissance significativement plus élevée a été observée sur Cytodex 1, Cytopore 2 et Cultispher G par rapport à la culture en flacon statique. Ces différences, par rapport aux études rapportées dans la littérature, peuvent s'expliquer par les conditions opératoires de culture. Par exemple, notre phase d'ensemencement comprend une heure d'agitation à 25 rpm suivie de 23 h en phase statique, alors que l'étude de Sart et al. (2009) applique une agitation intermittente à la culture, peut-être moins favorable à l'adhérence initiale des cellules sur les microporteurs.

Tableau 14. Vitesses spécifiques de croissance des CSM porcines cultivées dans différents systèmes

Système de culture		μ (j^{-1})
Flacon statiques		0,31
Spinner avec cellules sur microporteurs	Hillex	0,25
	Cytodex 1	0,54
	Cytodex 3	0,38
	Cytopore 2	0,48
	Cultispher G	0,46

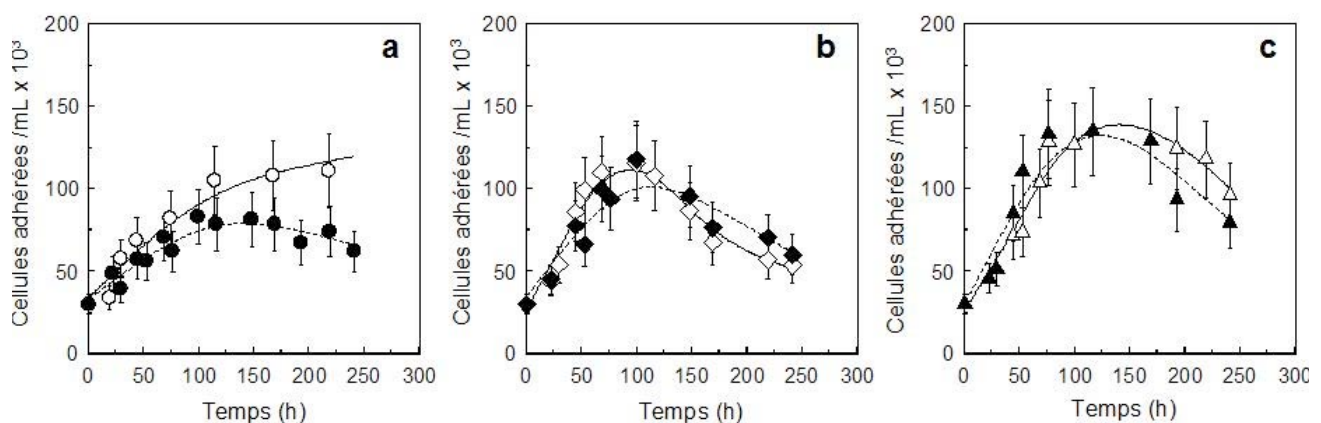


Figure 53. Cinétiques de croissance des CSM porcines cultivées dans différents systèmes de culture, en conditions statiques (flacon) ou agitées sur microporteurs (25 rpm) (a) Culture en flacon statique (○) et sur Hillex (●). (b) Culture sur Cytodex 1 (◇) et Cytodex 3 (◆). (c) Culture sur Cytopore 2 (△) et Cultispher G (▲)

4.1.3. Influence du type de microporteur sur la réponse des CSM

Influence des différents microporteurs sur la mortalité cellulaire

Afin de déterminer l'influence du type de microporteurs sur la mortalité cellulaire, l'activité de la LDH dans les surnageants de culture a été mesurée et comparée aux cultures en flacons statiques (Figure 54). Lors des cultures sur Hillex, la concentration cellulaire atteint une phase stationnaire et décroît lentement, avec une activité maximale de LDH mesurée de 114 U/L. Alors que l'activité de la LDH est plus faible dans les cultures réalisées avec Cytodex 1 (68 U/L) et Cytodex 3 (54 U/L), la concentration cellulaire diminue rapidement après 100 h de culture, et une agrégation cellulaire apparaît à la surface de ces microporteurs. L'activité de la LDH est aussi élevée dans les cultures sur Cultispher G (112 U/L), alors que la concentration cellulaire diminue lentement. L'activité de la LDH est plus faible lors des cultures sur Cytopore 2 (51 U/L), et la concentration cellulaire diminue lentement aussi. Aucune agrégation cellulaire n'est visible sur Cultispher G et Cytopore 2. Dans les flacons statiques, aucune baisse de la concentration cellulaire n'est observée, et l'activité de la LDH est plus faible (36 U/L) que dans les cultures sur microporteurs. On remarque donc que l'activité de la LDH extracellulaire n'est pas ici liée à la baisse apparente de la concentration cellulaire. Un biais est probablement introduit par la méthode de comptage cellulaire, basée sur le comptage des noyaux cellulaires colorés par du cristal violet.

Dans l'étude de Schop et al. (2010), une agrégation des CSM ovines est également observée sur Cytodex 1. Par ailleurs, il a été rapporté que les surfaces chargées positivement pouvaient entraîner une diminution de la production de matrice extracellulaire par les cellules, et donc affaiblir leur adhérence (Varani et al., 1995). Pourtant, les microporteurs Cultispher G et Cytopore 2 sont aussi chargés positivement, alors qu'aucune agrégation cellulaire n'a été observée à leur surface. Leur structure macroporeuse pourrait, soit rendre non observable les cellules, soit inhiber l'agrégation cellulaire. Concernant les cultures sur Hillex, microporteur également chargé positivement, de nombreux débris cellulaires ont été observés dans le surnageant de culture, ce qui traduit un détachement et une lyse des cellules, confirmée par l'accumulation de LDH extracellulaire.

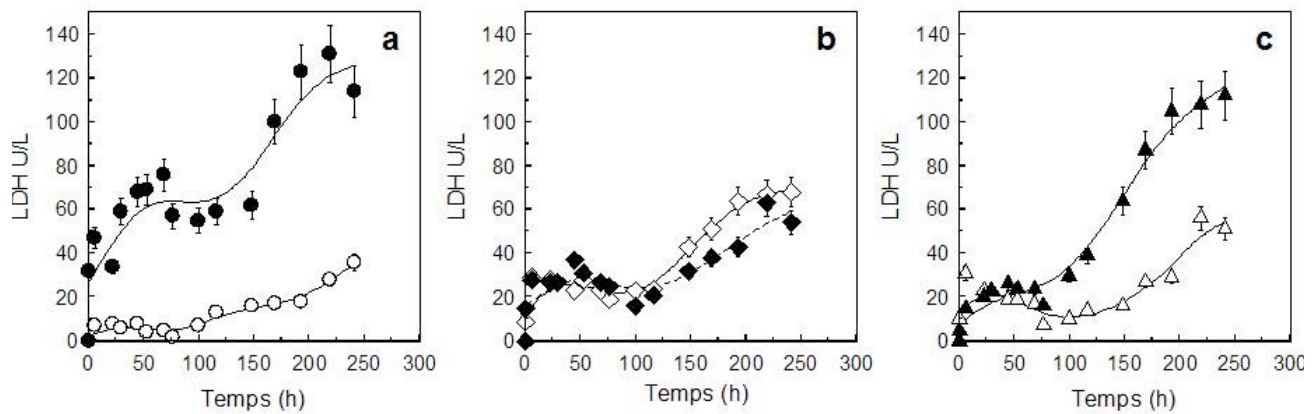


Figure 54. Activité de la LDH dans le surnageant de cultures de CSM porcines, réalisées dans différents systèmes de culture, en conditions statiques (flacon) ou agitées sur microporteurs (25 rpm) (a) Culture en flacon statique (○) et sur Hillex (●). (b) Culture sur Cytodex 1 (◇) et Cytodex 3 (◆). (c) Culture sur Cytopore 2 (△) et Cultispher G (▲)

Influence des différents microporteurs sur le métabolisme des CSM

Afin de déterminer l'influence des différents modes de culture sur le métabolisme des CSM porcines, les vitesses spécifiques maximales de consommation de glucose, de glutamine, et de production de lactate et d'ions ammonium, ainsi que les rendements lactate/glucose et ions ammonium/glutamine ont été calculés, sur la même durée de culture de 250 h (Tableau 15). Les résultats ne montrent aucune différence significative entre les cultures de CSM sur microporteurs et en flacons statiques, sauf en ce qui concerne le rendement ions ammonium/glutamine. Ce rendement est de 0,1 pour les cultures en flacons statiques, de 0,7 pour les cultures sur Hillex, et d'une valeur moyenne de 0,3 pour les autres systèmes de culture. La valeur élevée de rendement ions ammonium/glutamine lors de culture de CSM sur Hillex pourrait provenir d'une libération à partir du triméthylammonium présent dans la composition de ce microporteur.

Tableau 15. Vitesses spécifiques maximales de consommation de glucose, de glutamine et de production de lactate et d'ions ammonium, rendements lactate/glucose et ions ammonium/glutamine de CSM porcines cultivées en conditions statiques (flacon) ou agitées à 25 rpm sur différents types de microporteurs.

Système de culture		q_{gluc} [pmol/cell/j]	q_{lact} [pmol/cell/j]	q_{glut} [pmol/cell/j]	q_{amm} [pmol/cell/j]	$Y_{\text{lac/gluc}}$ [mM/mM]	$Y_{\text{amm/glut}}$ [mM/mM]
Flacon statique		12	24	6	2	2,0	0,1
Spinners avec cellules sur microporteurs	Hillex	13	24	5	4	1,8	0,7
	Cytodex 1	11	26	6	4	2,1	0,3
	Cytodex 3	12	24	7	4	1,8	0,2
	Cytopore 2	10	20	6	3	1,8	0,5
	Cultispher G	11	20	9	3	1,6	0,2

Comparées à d'autres études rapportées dans la littérature sur le métabolisme des CSM (Schop et al., 2008, 2009 et 2010; Eibes et al., 2010; Dos Santos et al., 2010), les vitesses spécifiques de consommation de glucose, de glutamine, de production de lactate et d'ammonium obtenues dans nos conditions représentent des valeurs intermédiaires (Tableau 16). Les rendements lactate/glucose au-dessus de 2, comme ceux observés lors de cultures sur Cytodex 1, peuvent s'expliquer par la contribution d'autres sources de carbone, telles que la glutamine, ainsi que par un métabolisme oxydatif très peu efficace (Schop et al., 2008; Eibes et al., 2010). Enfin, les rendements ions ammonium/glutamine dans notre étude (moyenne de 0,3) sont significativement plus faibles que les valeurs rapportées dans la littérature (1,2 - 1,6) (Eibes et al., 2010 ; Schop et al., 2009). Cela pourrait s'expliquer, dans nos conditions de cultures, par la production d'alanine par l'alanine déshydrogénase, diminuant la concentration d'ions ammonium (Zwerschke et al., 2003). Une production d'alanine a en effet été observée par Schop (2010) à hauteur de 0,45 pmol/cellule/jour par des CSM humaines lors de culture de 144 h.

Tableau 16. Synthèse des vitesses spécifiques de consommation de glucose et de glutamine, de production de lactate et d'ions ammonium, et de rendements lactate/glucose et ions ammonium/glutamine de CSM de différentes origines rapportées dans la littérature.

Origine des CSM	q_{gluc} [pmol/cell/j]	q_{lact} [pmol/cell/j]	q_{glut} [pmol/cell/j]	q_{amm} [pmol/cell/j]	$Y_{\text{lac/gluc}}$ [mM/mM]	$Y_{\text{amm/glut}}$ [mM/mM]
Humaine	15 [1] 3 [2]	37 [1] 10,3 [3]	30 [1] 0,007 [2]* 1 [3]	45 [1] 1 [3]	2 [2]	1,6 [1] 1,6 [2] 1,2 [3]
Ovine	2,6 [2]		0,003 [2]*		0,8 [2]	1,3 [2]
Murine	6 [2]		0,006 [2]*		1,9 [2]	1,6 [2]

*: valeurs corrigées avec la dégradation spontanée de la glutamine à 37°C ; [1] Dos Santos et al., 2010; [2] Schop et al., 2009; [3] Eibes et al., 2010.

4.1.4. Choix du microporteur pour l'expansion des CSM

Nos résultats montrent que les CSM porcines sont capables d'adhérer et de proliférer sur les cinq types de microporteurs testés, tout en présentant un métabolisme actif. Les cultures sur les microporteurs Cytodex 1, Cytopore 2 et Cultispher G ont permis d'atteindre des vitesses spécifiques de croissance de plus de 40 % supérieures à celle des cellules en culture en flacon statique. Parmi ces trois microporteurs, seul Cultispher G comporte des composés d'origine animale (gélatine de porc). Ce microporteur a donc été écarté pour la suite des travaux, le but à long terme étant l'utilisation thérapeutique des cellules amplifiées. De plus, la gélatine pourrait induire une différenciation ostéogénique indésirable (Song et al., 2008). Quant aux microporteurs Cytodex 1 et Cytopore 2, leur principale différence réside dans leur porosité. Alors que Cytodex 1 est microporeux, Cytopore 2 possède des pores d'une taille de 30 μm que les cellules peuvent coloniser. Cette porosité peut être problématique lors de la récolte des cellules, car elle nécessite un

traitement à la trypsine plus long, ce qui peut entraîner une altération des cellules. De plus, les pores peuvent masquer les cellules, nécessitant un marquage fluorescent pour visualiser leur morphologie.

Le microporteur Cytodex 1 (Figure 55) a donc été choisi pour la suite de nos travaux, car il rassemble plus d'avantages que les autres, notamment une vitesse de croissance des cellules significativement plus élevée qu'en flacon statique, une absence de composés d'origine animale, et un temps de récolte des cellules relativement court. La multipotence des cellules cultivées pendant une semaine sur Cytodex 1 en conditions agitées à 25 rpm a été vérifiée, en les différenciant en trois types cellulaires (adipocytes, chondrocytes et ostéocytes) (Figure 56).

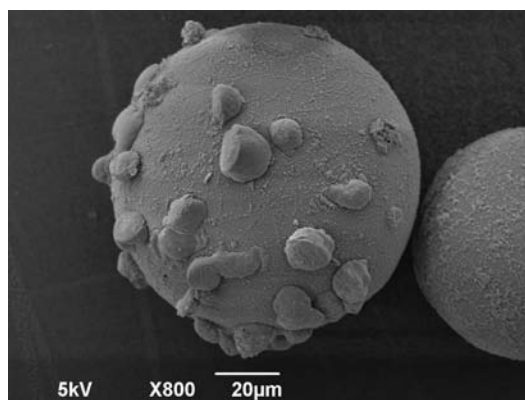


Figure 55. CSM porcines adhérentes sur Cytodex 1 après 4 h de culture en spinner, observées par microscopie électronique à balayage (x 800).

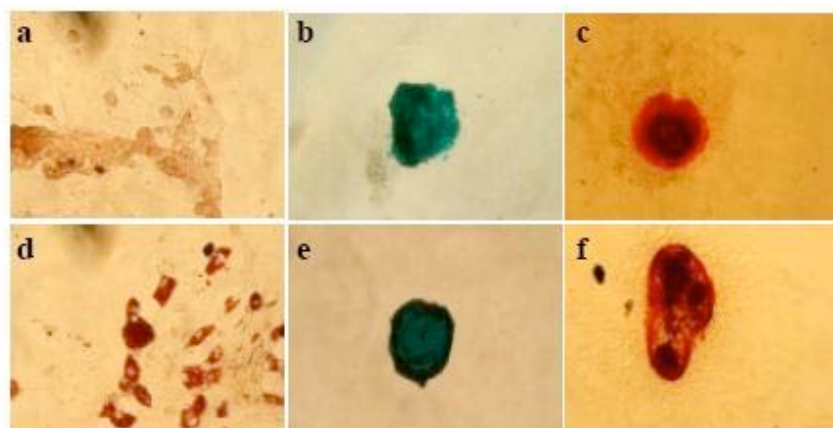


Figure 56. Multipotence des CSM porcines après une semaine d'expansion en flacons statiques (a)-(c) ou sur Cytodex 1 (d)-(f) ; différenciation adipogénique (a) et (d), chondrogénique (b) et (e), et ostéogénique (c) et (f)

Parmi les cinq microporteurs testés sur le comportement des CSM porcines, le choix s'est donc porté sur Cytodex 1, qui a été utilisé pour la suite de nos travaux. Jusqu'à maintenant dans nos études, les CSM porcines sur microporteurs avaient été comptées par la méthode manuelle au cristal violet. La prochaine

étape de nos travaux étant d'étudier l'influence de nombreux paramètres opérationnels sur le comportement de ces cellules en spinner, il était nécessaire de développer une méthode de comptage automatisée. Pour cela, une étude des différentes méthodes de comptage adaptées aux CSM sur microporteurs a été réalisée.

4.2. Étude des méthodes de comptage des CSM cultivées sur Cytodex 1

Les méthodes de comptage des cellules animales adhérentes peuvent être directes ou indirectes. Les méthodes directes impliquent le comptage de la cellule ou de l'un de ses éléments, tel que le noyau cellulaire, et nécessitent donc un détachement préalable des cellules ou l'extraction de l'élément à compter. Les méthodes indirectes reposent sur le dosage d'un composé produit ou consommé par les cellules, ou d'une activité enzymatique intracellulaire. Elles nécessitent de réaliser un étalonnage afin de rapporter la quantification du composé à un nombre de cellules. Malheureusement, l'utilisation non standardisée de ces nombreuses méthodes rend souvent délicat, d'une part, l'automatisation du comptage des cellules adhérentes sur microporteur, et d'autre part, la comparaison entre les travaux de la littérature. C'est pourquoi, dans cette partie, une nouvelle méthode de comptage des noyaux cellulaires par cytométrie en flux a été évaluée pour faciliter son automatisation. Puis, les méthodes de comptage utilisées dans la littérature ont été recensées, et leurs caractéristiques ont été précisées. Enfin, l'ensemble de ces méthodes ont été comparées pour le suivi d'une culture en spinner de CSM porcines adhérentes sur Cytodex 1, microporteur choisi dans la partie précédente pour son intérêt.

4.2.1. Méthode innovante de comptage des noyaux cellulaires par cytométrie

Jusqu'à maintenant, le comptage des CSM porcines était effectué manuellement par la coloration des noyaux cellulaires par le cristal violet, méthode utilisée classiquement pour les lignées cellulaires adhérentes. Par ailleurs, une méthode de comptage est actuellement proposée pour des cellules non adhérentes, tel que le système Guava®. Elle nécessite un détachement préalable des cellules par action de la trypsine, puis un marquage avec un réactif contenant deux marqueurs fluorescents (Viacount®), dont l'iodure de propidium qui s'intercale dans l'ADN. Nous nous sommes donc intéressés à la transposition de cette méthode au cas des CSM porcines. Cependant, la trypsination des CSM adhérentes sur Cytodex 1 reste délicate, n'est pas toujours homogène, et peut induire des biais dans le comptage. La libération des noyaux cellulaires est en revanche beaucoup plus aisée, car elle ne nécessite qu'une lyse cellulaire par de l'acide

citrique. Une nouvelle méthode de comptage des CSM sur microporteurs peut donc se baser sur le marquage des noyaux avec le réactif Viacount®, suivi de leur numération par cytométrie. C'est cette nouvelle méthode qui a été comparée à la méthode manuelle classique utilisant le marquage des noyaux par le cristal violet (Figure 57). Cette comparaison a été réalisée au cours d'une culture en spinner agité à 25 rpm, les CSM proliférant sur Cytodex 1. Les cinétiques d'évolution de la croissance cellulaire apparaissent très similaires pour les deux méthodes, avec un écart type moyen de 12 %. Ainsi, cette nouvelle technique de comptage automatisé des noyaux cellulaires, beaucoup moins fastidieuse que le comptage manuel sur lame de microscope, présente un intérêt certain.

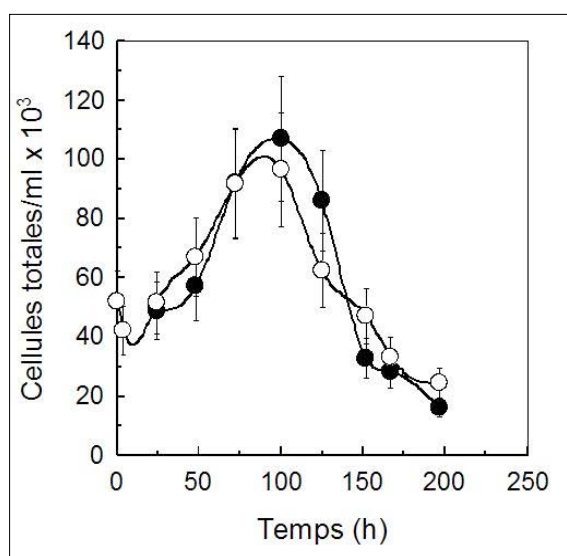


Figure 57. Comparaison entre le comptage manuel des noyaux marqués au cristal violet (O) et le comptage automatique par cytométrie des noyaux marqués à l'iodure de propidium (●) lors d'une culture de CSM porcines réalisée en spinner (200 mL) avec les cellules adhérentes sur Cytodex 1 sous agitation (25 rpm)

Par la suite, cette nouvelle méthode a été comparée avec d'autres méthodes de comptage rapportées dans la littérature, afin d'en tester la robustesse, et d'estimer les différences existant entre toutes les méthodes.

4.2.2. Caractéristiques et comparaisons des différentes méthodes de comptage de CSM sur microporteurs

Les études rapportées dans la littérature qui sont dédiées à l'expansion de CSM sur microporteurs utilisent des méthodes de comptage cellulaire variées, ce qui rend difficile leur comparaison. Parmi ces méthodes, les méthodes indirectes sont basées, soit sur l'activité respiratoire quantifiée par le MTT (diméthyle-thiozole-2-yl-2,5-diphényl-tétrazolium bromide) ou l'Alamar Blue (Yang et al., 2007; Frauenschuh et al., 2007; Schop et al., 2008, 2010; Han et al., 2009; Boo et al., 2011), soit sur la consommation du glucose (Higuera et al.,

2009). Les méthodes directes nécessitent, soit la trypsination des cellules suivie d'un marquage du cytoplasme (Sart et al., 2009, 2010; Yu et al., 2009; Sun et al., 2010), soit le marquage des noyaux après lyse des cellules (Weber et al., 2010; Hewitt et al., 2011). Afin de comparer ces différentes méthodes de comptage à notre nouvelle méthode automatisée, une culture de CSM porcines adhérentes sur Cytodex 1 a été mise en œuvre sous agitation (25 rpm) en spinner (200 mL). Les prélèvements ont été effectués quotidiennement au même moment, et les échantillons ont été traités selon les différentes méthodes. La consommation de glucose a été calculée en mole/jour à partir de l'évolution de sa concentration dans le milieu. Une valeur moyenne de la vitesse spécifique de consommation de glucose de 5,2 pmol/cellule/jour a été utilisée pour en déduire la concentration de cellule. Les caractéristiques et conditions opératoires utilisées pour chaque méthode sont résumées dans le Tableau 17. Les suivis cinétiques des CSM porcines cultivées sur Cytodex 1 avec les différentes méthodes sont rapportés dans la Figure 58.

Tableau 17. Caractéristiques et conditions opératoires utilisées pour les différentes méthodes de comptage de CSM sur microporteur

Méthode de comptage	Paramètre quantifié	Population cellulaire comptabilisée	Conditions opératoires
Marquage du cytoplasme avec le Viacount®	Perméabilité de la membrane cellulaire	Cellules adhérentes, viables ou nécrosées	Les cellules sont trypsinées, marquées au Viacount®, puis quantifiées par cytométrie
Marquage des noyaux avec le Viacount® (Nouvelle méthode)	Noyaux cellulaires	Cellules adhérentes et en suspension	Les cellules sont lysées, marquées au Viacount®, puis les noyaux sont quantifiés par cytométrie
MTT	Activité respiratoire cellulaire	Cellules ayant une activité respiratoire	Les cellules sont incubées avec 10 % de MTT pendant 1 h à 37 °C
Glucose	Consommation de glucose	Cellules ayant un métabolisme actif	Le surnageant des cultures est analysé par un kit enzymatique après centrifugation

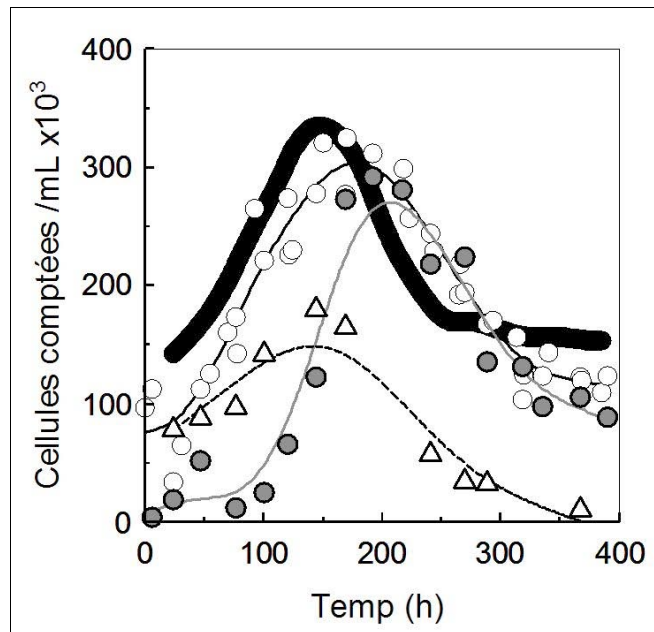


Figure 58. Comparaison des différentes méthodes de comptage lors d'une même culture de CSM porcines réalisée en spinner (200 mL) sur Cytodex 1 (25 rpm). Les différentes méthodes sont : (●) le comptage par marquage du cytoplasme au Viacount®, (○) le comptage par marquage des noyaux au Viacount® (nouvelle méthode), (△) le comptage par le MTT, et (●) le comptage par la consommation de glucose

Les résultats montrent des différences plus ou moins significatives entre chaque méthode de comptage. Une tendance similaire est ainsi observée entre le comptage des noyaux et le suivi de la consommation de glucose. Cependant, la concentration cellulaire maximale semble être atteinte un peu plus rapidement par la mesure de la consommation de glucose. Ceci peut être dû à la consommation non homogène de glucose par les CSM porcines en cours de culture, et donc induire un biais dans l'estimation de la population cellulaire. En revanche, le comptage par le MTT donne des concentrations cellulaires très inférieures aux comptages des noyaux, avec un écart de 57 % en moyenne par rapport à la méthode initiale. Enfin, le comptage par marquage du cytoplasme des cellules fournit des concentrations cellulaires très basses en début de culture, qui ne deviennent comparables aux valeurs issues des comptages des noyaux qu'après 250 h de culture.

Les différences observées peuvent provenir des biais introduits par chaque méthode. Tout d'abord, nous avons observé que l'efficacité de la trypsination des cellules n'était pas homogène en cours de culture, étant souvent plus faible au début. Ainsi, l'adhérence des cellules semble plus forte en début de culture, et diminue ensuite, probablement en raison de l'agitation et du manque de surface disponible sur les microporteurs (cf. Chapitre 5). De plus, il a été rapporté dans la littérature que l'activité respiratoire des CSM dépendait du taux d'oxygène et de leur état de différenciation (Chen et al., 2010). Or, nos conditions d'étalonnage du comptage par le MTT, réalisées en flacons statiques, sont différentes des conditions de

culture en spinner agité (taux d'oxygène, état des cellules, etc.). Une étude de Chiba et al. (1998) rapporte que le comptage par le MTT peut être aussi perturbé par la présence d'agents réducteurs, le pH du milieu ou la concentration de glucose. Enfin, nous avons montré précédemment que la vitesse spécifique de consommation de glucose varie en cours de culture, avec des valeurs plus élevées en phase exponentielle de croissance, de même qu'en fonction du nombre de passages des CSM porcines (cf. Chapitre 3). En revanche, le comptage des noyaux permet de s'affranchir de toutes les étapes intermédiaires, telles que l'étape de trypsination, l'utilisation d'étalon, ou les variations en cours de culture, et peut être automatisé. Cette méthode ne dénombre cependant que les cellules totales, sans quantification de la mortalité cellulaire.

Notre nouvelle méthode de comptage automatisée, qui présente donc plus d'avantages par rapport aux autres méthodes rapportée dans la littérature, est appliquée dans la suite de nos travaux, en parallèle d'un suivi de la mortalité cellulaire (activité de la LDH extracellulaire, apoptose). Le développement des méthodes de comptage des cellules souches s'oriente aussi vers des méthodes de mesure en ligne, telles que la mesure de la conductivité par spectroscopie diélectrique, comme le montre les premiers travaux rapportés dans la littérature (Justice et al., 2011).

Conclusion du Chapitre 4

Dans un premier temps, cette partie a abordé l'étude de plusieurs modes d'expansion de CSM porcines (Figure 59). Tandis que les cultures de cellules en suspension ou sous forme d'agrégats n'ont pas permis une croissance cellulaire effective, les cultures avec les cellules adhérentes sur cinq types de microporteurs ont abouti à une prolifération cellulaire significative. Trois des cinq microporteurs testés ont permis d'atteindre une vitesse spécifique de croissance supérieure à celle observée en flacon statique. Le microporteur Cytodex 1 apparaît comme celui présentant le plus d'avantages, notamment en raison de l'absence de composés d'origine animale, et de la récolte rapide des cellules après expansion. Par ailleurs, une méthode de comptage innovante a été proposée pour le dénombrement automatique des cellules cultivées sur Cytodex 1 sans étape de trypsination. Une comparaison des cinétiques de croissance avec différentes méthodes de comptage a démontré l'intérêt de cette nouvelle technique, ainsi que les erreurs d'estimation pouvant être induite par les méthodes classiquement rencontrées dans la littérature. Il importe donc de considérer avec prudence les résultats publiés en tenant compte des propriétés cellulaires mesurées.

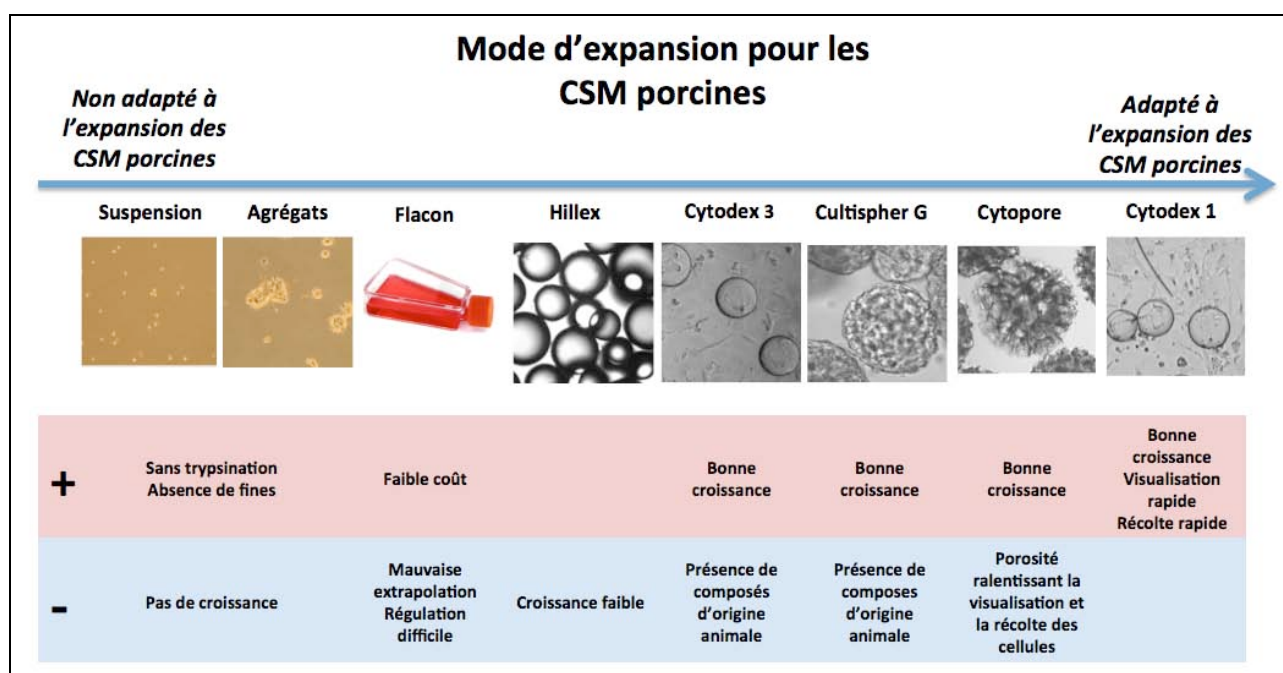


Figure 59. Résumé du Chapitre 4 sur les modes d'expansion adaptés aux CSM porcines

En conclusion, la culture des CSM porcines sur Cytodex 1 répond aux attentes requises pour l'expansion de CSM à usage thérapeutique. La vitesse spécifique de croissance cellulaire étant élevée, un grand nombre de cellules peut être obtenu en peu de temps. De plus, les conditions de culture en mode agité permettent d'envisager le contrôle des paramètres opératoires de culture, ainsi que son extrapolation. Après l'expansion des cellules, leur multipotence a été vérifiée et la récolte par trypsination est plus aisée sur un microporteur microporeux. Le microporteur Cytodex 1 permet également une visualisation rapide des cellules, ce qui représente un avantage pour contrôler la morphologie cellulaire en cours de culture.

L'objectif suivant de mes travaux de thèse était de prolonger l'expansion des CSM, sans perdre la multipotence des cellules. L'agrégation cellulaire observée après plusieurs jours d'expansion, concomitante avec la baisse apparente de la concentration cellulaire, pourrait être un facteur limitant à l'expansion. Différents paramètres opératoires de culture ont donc été étudiés pour mieux comprendre les limitations de la prolifération cellulaire. Ces paramètres de culture comprennent, entre autres, la fréquence d'agitation et l'ajout de microporteurs en cours de culture.

Chapitre 5. Influence des conditions opératoires sur la réponse des CSM porcines cultivées sur microporteurs

5.1. Influence de la fréquence d'agitation et de l'ajout de microporteurs sur la croissance, l'agrégation et la multipotence des CSM porcines	142
5.1.1. Stratégies de limitation de l'agrégation cellulaire en culture agitée	142
5.1.2. Influence d'ajouts répétés de microporteurs en cours de culture agitée	152
5.2. Influence de l'agitation sur la mort et le métabolisme des CSM porcines	153
5.2.1. Influence de l'agitation sur la mortalité des CSM porcines	154
5.2.1.1. Influence de l'agitation sur la viabilité cellulaire et l'activité extracellulaire de la LDH	155
5.2.1.2. Influence de l'agitation sur l'apoptose cellulaire.....	156
5.2.2. Influence de l'agitation sur le métabolisme des CSM	158
Conclusion du chapitre 5	160

Introduction du Chapitre 5

Les stratégies pour prolonger la croissance des cellules animales lors de procédés d'expansion sont multiples. La mise en place d'une perfusion du milieu de culture pour un apport continu des nutriments et un soutirage des métabolites en est l'une d'elles. L'augmentation de la vitesse d'agitation afin d'améliorer le transfert nutritionnel et l'aération, ou son abaissement pour diminuer les contraintes hydrodynamiques, font également partie de ces stratégies. Concernant les CSM, des études de la littérature ont rapporté la possibilité de prolonger la croissance des cellules par l'ajout de microporteurs en cours de culture (Frauensschuh et al., 2007; Schop et al., 2008), par la modification de la fréquence des changements de milieu (Schop et al., 2010), ou par l'augmentation de l'aération du milieu de culture (Sart et al., 2010). Les stratégies actuelles d'amélioration des procédés d'expansion des CSM sont cependant encore peu nombreuses. De plus, aucune étude concernant l'influence de la vitesse d'agitation sur la réponse des CSM n'a pour l'instant été rapportée.

Ainsi, afin de prolonger la croissance des CSM porcines sur microporteurs en conditions agitées, l'influence de deux paramètres opératoires de culture sur la réponse physiologique des CSM est étudiée dans ce chapitre. Il s'agit de la fréquence d'agitation, d'une part, et de l'ajout de microporteurs en cours de culture, d'autre part. Dans un premier temps, l'influence d'ajouts de microporteurs ponctuels ou répétés en cours de culture sur le comportement des CSM a été étudiée. Dans un deuxième temps, l'influence de la fréquence d'agitation a été analysée sur la mortalité et le métabolisme des CSM porcines. La fréquence d'agitation des microporteurs représente en effet une contrainte sur la réponse physiologique des CSM porcines, principalement au niveau de l'agrégation cellulaire et de la mortalité. Les études cinétiques permettent de suivre la mortalité cellulaire, dont en particulier l'apoptose, ainsi que le métabolisme cellulaire avec les vitesses spécifiques de consommation de glucose et de production de lactate.

5.1. Influence de la fréquence d'agitation et de l'ajout de microporteurs sur la croissance, l'agrégation et la multipotence des CSM porcines

Dans les études précédentes, il avait été observé que les CSM porcines s'agrégeaient à la surface des microporteurs Cytodex 1 après 100 h de culture, de manière concomitante à une baisse apparente de la concentration cellulaire. Un détachement des agrégats des microporteurs et une absence de croissance de ces agrégats en suspension étaient également observés. L'agrégation n'est donc pas souhaitable lors de la phase d'expansion des CSM sur microporteurs, et sa formation doit être réduite ou retardée. Cette agrégation cellulaire étant inexistante lors de cultures en flacon statique, l'agitation peut en être l'une des causes directes ou indirectes, tout comme le matériau des supports (polystyrène pour les flacons, Dextrane-DEAE pour les Cytodex 1). Dans la littérature, ce phénomène d'agrégation est peu décrit lors de procédés d'expansion de CSM. Schop et al. (2010) l'observent après plus de 14 jours de culture sur Cytodex 1, et limitent leur formation par l'ajout de microporteurs en cours de culture.

Afin de mieux comprendre le phénomène d'agrégation des CSM porcines sur Cytodex 1, et dans le but de prolonger la croissance des cellules, l'influence de plusieurs paramètres opératoires a été évaluée sur le comportement des CSM porcines. Ces paramètres sont la fréquence d'agitation, et l'ajout de microporteurs en cours de culture.

5.1.1. Stratégies de limitation de l'agrégation cellulaire en culture agitée

Les premiers travaux proposant des stratégies de culture pour limiter l'agrégation des CSM en culture agitée sont présentés sous la forme d'un article intitulé "Limiting Cell Aggregation during Mesenchymal Stem Cell Expansion on Microcarriers", publiés dans le journal *Biotechnology Progress* (Ferrari et al., 2012).

Limiting Cell Aggregation During Mesenchymal Stem Cell Expansion on Microcarriers

Caroline Ferrari, Frédérique Balandras, Emmanuel Guedon, Eric Olmos, Isabelle Chevalot and Annie Marc

Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, UPR-CNRS 3349, INPL-ENSAIA, 2 avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandœuvre-lès-Nancy, France

DOI 10.1002/btpr.1527

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

Mesenchymal stem cells (MSC) are known to be a valuable cell source for tissue engineering and regenerative medicine. However, one of the main limiting steps in their clinical use is the amplification step. MSC expansion on microcarriers has emerged during the last few years, fulfilling the lack of classical T-flasks expansion. Even if the therapeutic potential of MSC as aggregates has been recently highlighted, cell aggregation during expansion has to be avoided. Thus, MSC culture on microcarriers has still to be improved, notably concerning cell aggregation prevention. The aim of this study was to limit cell aggregation during MSC expansion on Cytodex-1[®], by evaluating the impact of several culture parameters. First, MSC cultures were performed at different agitation rates (0, 25, and 75 rpm) and different initial cell densities (25 and 50 × 10⁶ cell g⁻¹ Cytodex-1[®]). Then, the MSC aggregates were put into contact with additional available surfaces (T-flask, fresh and used Cytodex-1[®]) at different times (before and after cell aggregation). The results showed that cell aggregation was partly induced by agitation and prevented in static cultures. Moreover, cell aggregation was dependent on cell density and correlated with a decrease in the total cell number. It was however shown that the aggregated organization could be dissociated when in contact with additional surfaces such as T-flasks or fresh Cytodex-1[®] carriers. Finally, cell aggregation could be successfully limited in spinner flask by adding fresh Cytodex-1[®] carriers before its onset. Those results indicated that MSC expansion on agitated Cytodex-1[®] microcarriers could be performed without cell aggregation, avoiding a decrease in total cell number. © 2012 American Institute of Chemical Engineers Biotechnol. Prog., 000: 000–000, 2012

Keywords: mesenchymal stem cells, microcarriers, aggregation

Introduction

Mesenchymal stem cells (MSC) are self-renewable adult stem cells with great therapeutic potential for cell and tissue engineering, due to their differentiation and immunoregulation properties,¹ as well as in regenerative medicine for their cytokine secretion.² However, one of the main limiting steps for clinical use or biotechnological purposes remains their in vitro expansion, as MSC are present in small amount in adult tissues.³

MSC expansion is classically performed in T-flasks. However, this culture system has many drawbacks, such as poor scale-up ability, contamination risks from frequent cell passaging and a lack of pH and oxygen control. Recently, new techniques have emerged for MSC expansion, especially with cells attached on microcarriers in stirred culture systems. These microcarriers have been successfully used for more than 40 years for the cultivation of adherent-dependent industrial cell lines. Compared with T-flasks, the main advantage of microcarrier-based culture is the high ratio of

adhesion surface to medium volume, enabling the attainment of high cell densities. However, microcarrier-based culture can also potentially induce cell aggregation.⁴ Several recent studies have reported the successful expansion of MSC on various types of microcarriers,^{5–12} and indeed, aggregation of MSC has been observed in some of them.^{5,6,11} While MSC aggregates may present a high therapeutic potential^{13,14} and serve as good cell-delivery vehicles for transfusion,^{15,16} the occurrence of cell aggregates during in vitro microcarrier culture could result in cell populations with unwanted heterogeneity. Furthermore, a controversy remains on the proliferation potential of aggregated MSC.^{17–19} Therefore, to improve the in vitro MSC expansion on microcarriers, it may be appropriate either to avoid their aggregation or to delay this phenomenon until a sufficient amount of cells is available. To our knowledge, very few studies have already proposed a method to delay these aggregates on microcarriers.⁶ The influence of culture parameters on the aggregation of MSC expanded on microcarriers remains poorly understood.

Thus, the aim of this study was to improve the expansion of MSC attached on microcarriers by avoiding cell aggregation occurrence. To achieve this goal, the impact of several

Correspondence concerning this article should be addressed to E. Guedon at emmanuel.guedon@ensaia.inpl-nancy.fr.

operating parameters such as agitation rate, cell density, and addition of carriers were evaluated on the expansion of porcine MSC adhered on dextran Cytodex-1[®] microcarriers.

Materials and Methods

Primary culture of MSC

Bone marrow was extracted from the iliac crest of 3-month-old pigs and seeded in 175 cm² T-flasks. Culture medium was α -MEM (Sigma M0984) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen, 26140), 1% antibiotics (penicillin G, streptomycin, amphotericin B, Fisher W3473M), 2 mM glutamine (Eurobio, CSTGLU00-0P), 1 ng mL⁻¹ FGF2 (Millipore, GF003), and 0.1 mM β -mercaptoethanol (Sigma M7522). After a week, the medium was changed twice a week. Two weeks later, the remaining adherent cells were trypsinized and seeded at a density of 0.5×10^4 cells cm⁻² in 175 cm² T-flasks. After two passages, porcine MSC were pooled and cryopreserved in culture medium containing 10% DMSO for cell banking in liquid nitrogen at 10^7 cells mL⁻¹. For further studies, cells were thawed from the bank at a density of 0.5×10^4 cells cm⁻² in T-flask, before their use in spinner flasks at Passage 4.

MSC expansion on microcarriers

Cytodex-1[®] carriers (GE healthcare) were hydrated and rinsed several times in phosphate buffer saline (PBS) without Ca²⁺ and Mg²⁺, autoclaved and rinsed in culture medium before use. The medium for cell expansion was the same as the one used for primary cell cultures. All cultures were performed inside an incubator controlled at 37°C and 5% CO₂. Cells were seeded in 500-mL siliconized spinner flasks (Techne). The seeding volume of culture medium was 100 mL with a cell concentration of 6×10^4 cell mL⁻¹. The microcarrier concentration was 1.2 g L⁻¹, corresponding to a surface of 1,000 cm² and a concentration of 0.6×10^3 cell cm⁻² of carriers (representing six cells/bead and 2.5×10^7 cells g⁻¹ Cytodex 1[®]). A double seeding cell concentration was also used. After 24 h without agitation, the medium volume was adjusted to 200 mL, the initial cell concentration thus being 3×10^4 cells mL⁻¹. From there, the agitation rate was either fixed at a constant value of 25 or 75 rpm, or no agitation was applied during the culture, except when samples were taken. From the third day, 50% of culture medium volume was changed every 2 days. When applied, microcarriers were added in spinner flask to double their concentration. The carrier addition was followed by a static period of 24 h.

Preparation of agarose-coated T-flasks and used microcarriers

A solution of 2% agarose in distilled water was prepared and autoclaved before being poured under sterile conditions in 25-cm² T-flasks to form thick layers. The T-flasks were cooled for 24 h before cell seeding. MSC were seeded at 3×10^4 cell mL⁻¹ in 5 mL of culture medium in the coated flasks, corresponding to 0.6×10^4 cell cm⁻². Used Cytodex-1[®] microcarriers were prepared by expanding MSC for several days on the carrier surface. The cells were then trypsinized, and the carriers washed two times in fresh culture medium before use.

MSC growth analyses

For cell growth analyses in T-flasks, three T-flasks were counted each day. Medium was discarded and cells rinsed with PBS. A solution of 0.1 M citric acid was added, and the T-flasks were placed at 37°C under agitation (100 rpm) during 1 h. Citric acid led to the disruption of cell membrane and nuclei release. The supernatant of the flasks were collected and filtered (40 μ m) to remove cell debris, and a solution of propidium iodide (Guava Viacount[®], Millipore, 4000-0041) was added (10%, v/v). After 5 min of incubation, the cell nuclei were counted with a flow cytometer (Guava, Millipore, EasyCyte).

For cell-growth analyses on microcarriers, culture samples were taken from spinner flasks twice a day, centrifuged, and supernatants were removed. As for T-flasks cultures, a solution of 0.1 M citric acid was added and samples placed at 37°C under agitation (100 rpm) during 1 h. The samples were then filtered (40 μ m) to remove carriers and a solution of propidium iodide was added (10%, v/v). After 5 min of incubation, the cell nuclei were counted with the flow cytometer.

The maximal error of cell counting was about 20%, based on the difference observed on two different samples. The specific growth rate was calculated during the active growth phase between 24 and 50 h of culture.

Microscopic MSC observation

For the observation of cells on Cytodex-1[®] using optical microscopy ($\times 40$), samples were collected and a solution of 1% methyl blue (Fluka 66721) was added for 5 min at 37°C. Cells were rinsed twice in PBS and fixed in 2.5% glutaraldehyde (Sigma G6275) before observation.

MSC multipotency characterization

Cell multipotency was assayed by using differentiation kits in 96-well plates. Adipogenesis (Fisher, Stempro[®] adipogenesis differentiation kit W59599) was tested by seeding 10^4 cells cm⁻² in adipogenic differentiation medium, which was changed twice a week. After 2 weeks, cells were rinsed in PBS, fixed in glutaraldehyde and stained with the specific marker of lipids, Oil-red O. Chondrogenesis (Fisher, Stempro[®] chondrogenesis differentiation kit W59972) was tested by generating a 5 μ L drop of cell solution at 1.6×10^7 cells mL⁻¹ in the center of a well. Two hours later, the chondrogenic differentiation medium was added and then changed twice a week. After 3 weeks, cells were rinsed in PBS, fixed in glutaraldehyde, and stained with the specific marker of proteoglycans, Alcian blue. Osteogenesis (Fisher, Stempro[®] osteogenesis differentiation kit W5959A) was tested by seeding MSC at 5×10^3 cells cm⁻² in osteogenic differentiation medium changed twice a week. After 3 weeks, cells were rinsed in PBS, fixed in glutaraldehyde, and stained with the specific marker of deposited calcium, Alizarin red. The MSC multipotency was successfully evaluated at Passage 4, before spinner flask seeding, and during the expansion phase on microcarriers.

Calculation of maximal shear stresses in spinner flasks

To calculate the maximal shear stresses in spinner flask at an agitation rate N (s⁻¹) of 25 rpm (0.42 s⁻¹) and 75 rpm (1.25 s⁻¹), Reynolds numbers Re were first calculated using

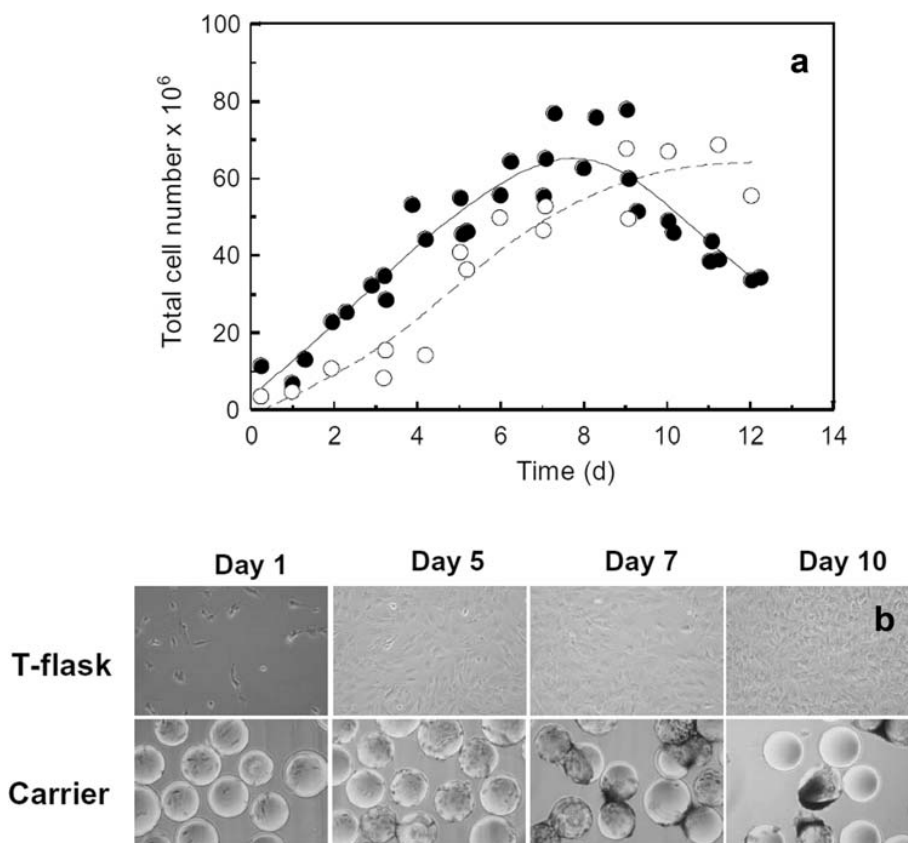


Figure 1. (a) Comparison of MSC growth kinetics in static and stirred conditions.

(○) 40 T-flasks of 25 cm² and (●) one spinner flask stirred at 25 rpm with cells attached on 1.2 g L⁻¹ Cytodex-1[®] carriers. Both systems exhibiting an adhesion surface of 1,000 cm². (b) Cells cultivated in T-flask and on microcarriers, as observed after 1, 5, 7, and 10 days of culture (×40).

the following formula: $Re = \rho ND^2/\mu$, where D is the diameter of the orbital impeller (7.2 cm), the viscosity μ (Pa s), and the density ρ (kg m⁻³) being similar to water at a temperature of 37°C. Reynolds numbers were thus 3,100 at 25 rpm and 9,200 at 75 rpm, indicating that flow regime was not fully turbulent.²⁰ Shear stress σ (Pa) was calculated using the shear rate G (s⁻¹), the dynamic viscosity μ (Pa s) and supposing that laminar shear was predominant: $\sigma = \mu G$. As the gap between the rotating sphere and flask bottom e was 5 mm, it could be assumed that for an agitation rate N (s⁻¹), the maximal shear stress was $\sigma_{\max} = \mu(\pi ND/e)$.

Results and Discussion

MSC expansion in T-flask and on Cytodex-1[®]

To compare static and stirred culture conditions, MSC cultures were performed in T-flasks and in spinner flasks containing Cytodex-1[®] stirred at 25 rpm. The same adhesion surface of 1,000 cm² was obtained by using either 40 T-flasks of 25 cm² or 1.2 g L⁻¹ of dry carriers. The initial cell density was 0.6×10^4 cells cm⁻², corresponding to a total of 6×10^6 cells. The kinetics of cell growth is presented in Figure 1. Cells initially grew slightly faster on Cytodex-1[®] than in the T-flask. While the cell expansion duration was as long as 10 days in T-flasks, the MSC concentration reached a maximal value of $66 \pm 13 \times 10^6$ total cells in spinner flasks after 8 days. Then, the total cell number progressively decreased. Simultaneously, the microscopic

observations revealed that cell-cell aggregation occurred after 7 days of expansion on Cytodex-1[®], while cells remained in monolayer in T-flasks. As no apparent nutrient limitation was detected in the culture supernatants (data not shown), it could be hypothesized that the decrease in total cell number may be due to a low viability in the core of the aggregates, leading to possible nuclei degradation. Further studies on the viability within aggregates should be performed to confirm this hypothesis.

Our results demonstrated that MSC expansion was very similar during the first 8 days when spinner flask or 40 T-flasks were used. After this period, aggregation occurred when using spinner flask. This phenomenon could result from various operating parameters such as agitation rate, seeding cell density, or adhesion surface.

MSC expansion and aggregation are dependent on agitation rate

To evaluate the impact of stirred conditions on cell aggregation, MSC cultures were performed in spinner flasks at different agitation rates (0, 25, and 75 rpm; see Figure 2). The cell growth rates calculated during the active growth phase were very similar, with values of 0.010, 0.009, and 0.009 h⁻¹ for agitation rates of 0, 25, and 75 rpm, respectively. Therefore, the magnitude of agitation rates did not seem to influence MSC growth rate in spinner flasks. For all cultures, the maximal cell numbers were also similar with $72 \pm 14 \times 10^6$, $66 \pm 13 \times 10^6$, and $60 \pm 12 \times 10^6$ cells

for 0, 25, and 75 rpm, respectively. However, when cultures were stirred at 25 and 75 rpm, a decrease in cell population appeared after 8 days. On the contrary, no decrease in total cell number was observed in culture performed without agitation for at least 14 days, allowing a longer stationary phase.

Microscopic observations of cells were performed throughout MSC culture kinetics (Figure 3). When cultivated under agitation (25 or 75 rpm), cells began to form cell–cell aggregates after 7 days of culture. Then, most of the aggregates left the carrier and stayed in suspension. Interestingly,

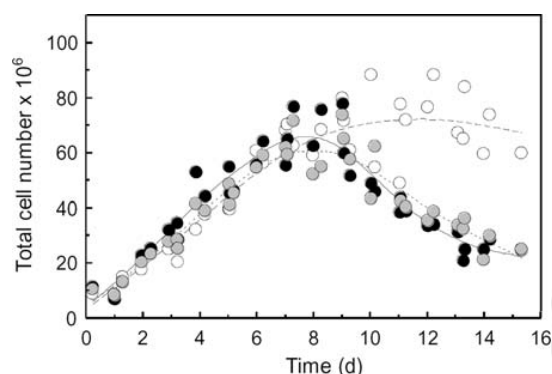


Figure 2. Comparison of MSC growth kinetics in spinner flasks at different stirring rates: (○) 0 rpm, (●) 25 rpm, and (●) 75 rpm.

no cell detachment from carriers was noticed in the culture performed without agitation. However, large compact structures of cell–carrier aggregates were observed after 10 days of culture under this condition, with cell–cell adhesions connecting several carriers (Figure 3j). The different cell kinetics observed after 8 days of cultures between static and agitated cultures could thus result from the various cell organizations on microcarriers due to agitation. Therefore, it can be concluded that isolated aggregates only composed of cells appeared under stirred conditions, while stable cell–carrier structures were observed in static cultures.

A low efficiency of DEAE-Dextran Cytodex-1[®] carrier for cell adhesion could explain the aggregation formation. Such a hypothesis is supported by several studies reported in the literature. When goat MSC were expanded on Cytodex-1[®] carriers at 30 rpm, a rounded cell morphology was observed, indicating a nonoptimal surface for cell adhesion.⁶ Moreover, epithelial cells spread less on DEAE-dextran than on gelatin coated polystyrene. Furthermore, it was found that cells produced less extracellular matrix, such as fibronectin or laminin, on DEAE-dextran leading to low adhesion.²¹ Aggregates of murine embryonic stem cells were observed at the surface of Cytodex-1[®] when cultured under agitation, but no aggregation was observed when the carriers were coated with fibronectin.²² Thus, the strength of cell adhesion on the microcarriers could partly explain the cell detachment and aggregation when they are subjected to agitation stress.

Agitation in microcarrier culture system led to hydrodynamic forces that could limit MSC adhesion on DEAE-

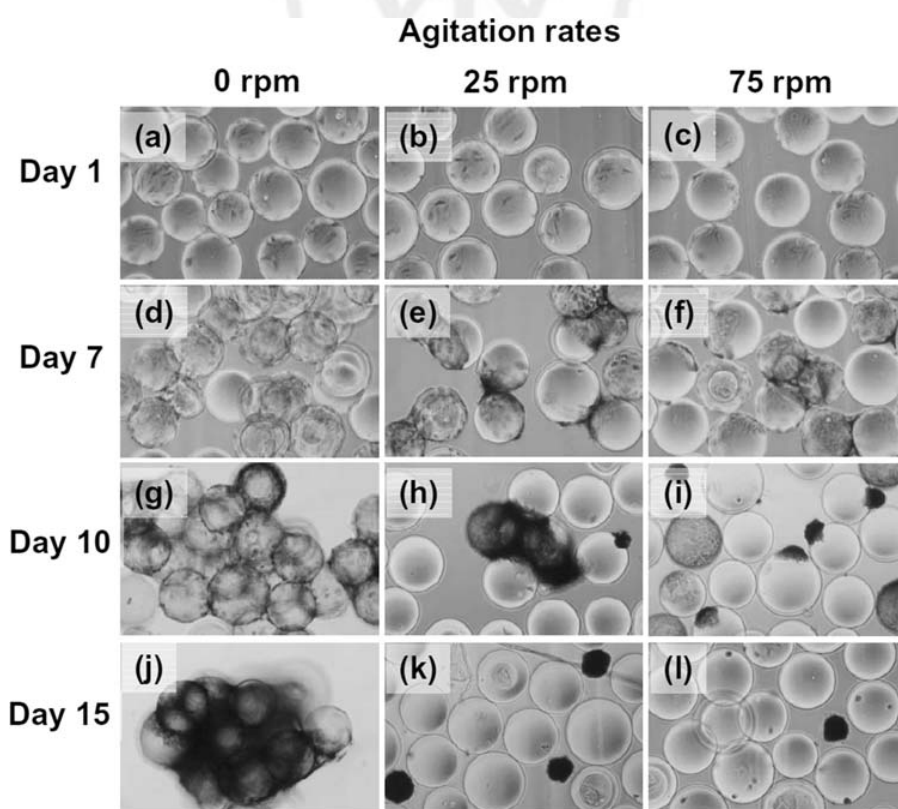


Figure 3. MSC cultured at different stirring rates after methyl blue staining ($\times 40$).

0 rpm: (a), (d), (g), and (j); 25 rpm: (b), (e), (h), and (k); and 75 rpm: (c), (f), (i), and (l). Cells were observed at Day 1: (a)–(c), Day 7: (d)–(f), Day 10: (g)–(i), and Day 15: (j)–(l).

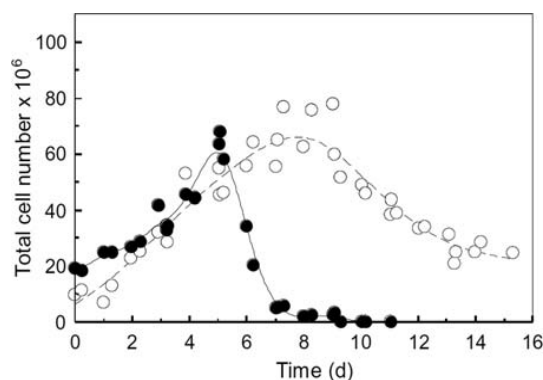


Figure 4. MSC growth kinetics in spinner flasks at two different cell seeding densities: (○) 25×10^6 and (●) 50×10^6 cells g^{-1} Cytodex-1[®].

dextran carriers or disrupt cell-carrier links. Indeed, when the hydrodynamic forces are higher than the cell adhesion, the cells may detach from the carrier surface.^{23–25} For example, it has been reported that fibroblasts were detached from their support when exposed during 10 min to a shear stress of 2.1 Pa on polymethylmethacrylate and 0.5 Pa on polycarbonate, two materials commonly used for biomedical applications.²⁴ The maximal shear stresses generated in spinner flask containing 1.2 g L^{-1} Cytodex-1[®] carriers have been estimated at 0.013 and 0.04 Pa for agitation rates of 25 and 75 rpm, respectively. These values were lower than those reported in the literature for fibroblasts detachment²⁴ but may be enough to detach MSC from Cytodex-1[®] carriers.

Cell aggregation under agitation is dependent on cell density

Besides agitation, cell density is another operating parameter that could influence cell aggregation in microcarrier cultures. Indeed, cell aggregation in previous stirred cultures mainly occurred when cells reached confluence on the carrier surface, after 7 days of culture. To determine if cell aggregation could be related to cell density, cultures were performed at 25 rpm with various initial ratio of cells per gram of carriers. Beside the control culture performed with 25×10^6 cells g^{-1} (six cells per bead), a double cell density of 50×10^6 cells g^{-1} (12 cells per bead) was used. The cell kinetics shown in Figure 4 exhibit similar maximal cell quantities for both cultures, with $60 \pm 12 \times 10^6$ and $66 \pm 13 \times 10^6$ total cells attained for initial cell densities of 50×10^6 and 25×10^6 cells g^{-1} , respectively. However, for the culture performed with the highest seeding density (50×10^6 cells g^{-1}), the cell concentration dropped rapidly after 5 days and microscopic observations revealed that cell aggregation occurred concomitantly (data not shown). Such aggregation appeared only after 7 days in cultures seeded with the control.

These results confirmed the hypothesis that the occurrence of aggregation was also related to cell density. A higher initial cell density per carrier accelerated the cell aggregation phenomenon. Indeed, the maximal cell density was reached sooner at the higher seeding density. It was assumed that cell proximity favors their aggregation, as cell-cell adhesion depends on the probability that the cells come into contact with each other.²⁶ Such an assumption was illustrated in the hanging drop technique, where cells were packed in a single

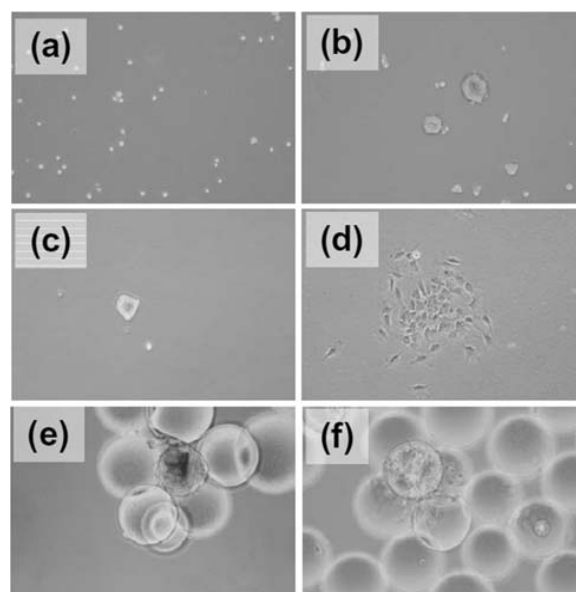


Figure 5. MSC aggregation and dissociation on nonadhesive and adhesive surfaces ($\times 40$).

(a) MSC seeded on nonadhesive surface. (b) After 24 h, the cells aggregated. (c) Those aggregates were placed on an adhesive surface. (d) After 24 h, they dissociated. (e) The same aggregates were put in contact with fresh Cytodex-1[®] carriers. (f) After 24 h, they dissociated.

drop to promote their aggregation.^{14,27} However, seeding densities per carrier should not be lowered below a critical value that could affect cell growth.

Cell aggregates can be dissociated in the presence of new surfaces

Dissociation of cell aggregates in small-scale systems. Besides agitation and cell density, the availability of adhesion surface could also influence the aggregation of MSC. Indeed, based on the previous experiment, it appeared that aggregates started to accumulate in agitated cultures after 7 days when cells reached confluence. In this condition, aggregate formation could be prevented, or aggregates could be dissociated, by adding new surfaces.

To verify this hypothesis, MSC were first forced to generate aggregates on nonadhesive surfaces (agarose-coated T-flasks; see Figure 5a). After 24 h, the cells formed aggregates (Figure 5b). Then, when transferred to an adhesive surface (noncoated T-flasks; see Figure 5c), the aggregates adhered to the surface and the cells spread while aggregates disappeared after 24 h (Figure 5d). Moreover, when Cytodex-1[®] carriers were added to the nonadhesive surface after cell aggregation (Figure 5e), the aggregates adhered to the carriers and then the cells spread on the carrier surface before resuming their proliferation (Figure 5f).

Interestingly, the same experiment was performed with cell aggregates formed during MSC expansion in a stirred spinner flask on Cytodex-1[®] carriers (25 rpm). When seeded on adhesive surfaces, the aggregates adhered to the surface and the cells spread in 24 h (data not shown).

In this study, cell aggregation occurred within 24 h after seeding on nonadhesive surfaces. Tzoneva et al. (2007) also reported that epithelial cells aggregated on nonadhesive surfaces.²⁸ This property of aggregation on agarose is used

in the “slow aggregation assay” to study cell–cell adhesion complexes.^{26,29} Disaggregation of cell aggregates within 24 h has also been reported in several studies. Indeed, transformed fibroblast aggregates were able to spread on adhesive surfaces,³⁰ as well as carcinoma aggregates on collagen surfaces³¹ or mouse MSC aggregates on skeletal muscles.¹⁵

At the molecular level, cell–surface and cell–cell adhesion are due to different adhesion proteins. Cell–surface adhesion is mainly mediated by integrin, while cadherin creates adherent junctions in cell–cell adhesion.^{32,33} Depending in the pre-eminence of integrin or cadherin, the cell adhesion mechanism could result in different structure organization.²⁸ For example, integrin mRNA expression has been reported to be down regulated in squamous carcinoma spheroids,³⁴ while inhibition of cadherin function has been reported by integrin engagement.³⁵ MSC aggregates may be promoted by cadherin expression on non-adhesive surfaces, whereas disaggregation could occur on adhesive surfaces by integrin engagement. Cell–carrier adhesion was promoted by low cell

density and static conditions, whereas cell–cell adhesion was promoted by high cell density and stirred conditions. This resulted in a competition between cell–carrier and cell–cell adhesions.

These results demonstrated that MSC aggregates resulting from spinner flask conditions could spread and colonize additional surfaces, either in T-flask or on spherical microcarriers. Thus, cell–cell aggregation is a reversible phenomenon when adhesion surfaces are available.

Dissociation of cell aggregates in stirred culture systems

Based on previous results, the cell aggregate dissociation was tested directly in spinner flasks, during a culture performed with the control conditions. The cell number reached a maximal value of $40 \pm 4 \times 10^6$ cells after 5 days, before decreasing rapidly down to $14 \pm 3 \times 10^6$ cells after 8 days, concomitantly to cell aggregation (Figure 6). When most of MSC formed aggregates after 10 days, 1.2 g L^{-1} fresh Cytodex-1® carriers were added. After a static period of 24 h that allowed for added carriers to come into contact with cell aggregates, the number of cells started to increase again. The specific growth rate calculated between Day 11 and Day 12 (0.40 day^{-1}) was similar to the one calculated between Day 1 and Day 2 (0.46 day^{-1}). Moreover, compared to Day 5, the maximum cell number reached at Day 13 ($52 \pm 5 \times 10^6$ cells) was 30% higher. Microscopic observations indicated that cell aggregates started to dissociate after 24 h of contact with the fresh carriers (Figure 6).

Through this experiment, it was evident that cell aggregates decreased and cells colonized the carriers in a manner similar to that observed in the agarose-coated T-flask (Figure 5f). The cell aggregation phenomenon could therefore be reversed during in vitro MSC expansion on microcarriers in spinner flasks. Moreover, the MSC multipotency was tested after 12 days of culture. The cells successfully differentiated in adipocytes, chondrocytes, and osteocytes, indicating that they maintained their stemness properties throughout the expansion phase (Figure 7).

Therefore, MSC aggregates occurring during cultures in spinner flask can be dissociated by adding fresh microcarriers while retaining the cell multipotency.

Early addition of fresh carriers improves MSC expansion in stirred cultures

The previous results showed that the phenomenon of cell aggregation in spinner flasks could be reversed by the addition of fresh carriers after 10 days. However, it was hypothesized that aggregation could be avoided or delayed by adding new carriers early in the time course of the culture.

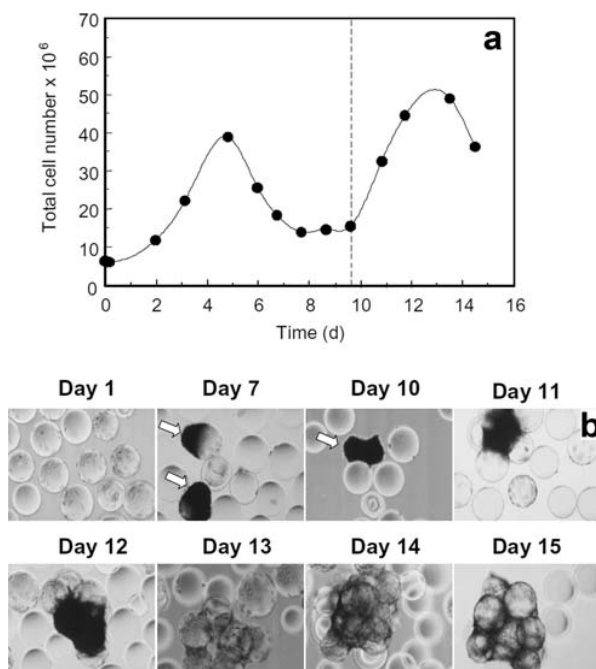


Figure 6. MSC growth kinetics in spinner flask with addition of carriers at Day 10.

(a) Total cells, dashed line represent addition of carriers. (b) Cells observed before (Days 1, 7, and 10) and after addition of fresh carriers (Days 11, 12, 13, 14, 15) ($\times 40$). White arrows indicate the aggregates.

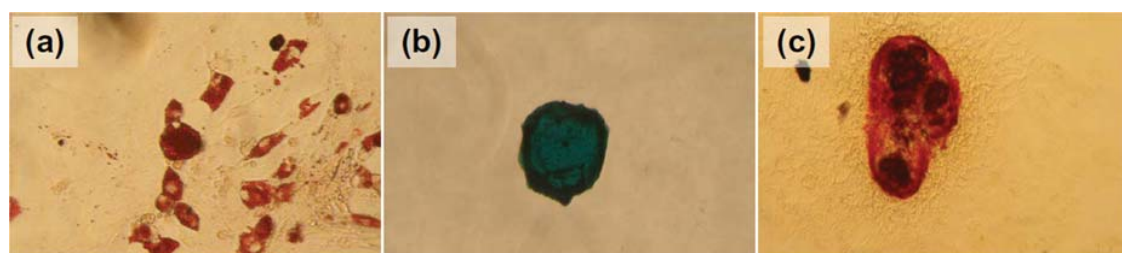


Figure 7. MSC multipotency tested after the addition of fresh carriers (Day 12, Figure 6) ($\times 10$).

Cells were differentiated along the adipogenic (a), chondrogenic (b), and osteogenic (c) pathways.

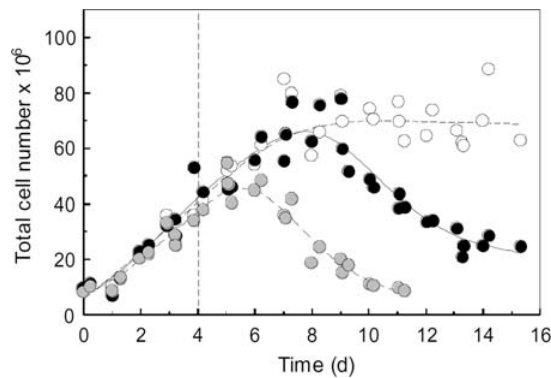


Figure 8. MSC growth kinetics in spinner flasks with or without addition of carriers: (○) addition of fresh carriers, (●) no addition, (◐) addition of recycled carriers.

Dashed line represents addition of carriers.

To verify this hypothesis, three cultures were performed in parallel. The control culture was performed without receiving new carriers during the culture. In a second and third culture, 1.2 g L^{-1} of fresh or used carriers were added after 4 days, respectively, resulting in a doubling of the carrier concentration. Addition of fresh or used carriers was followed by a 24-h static period. The time course of total cell number in each culture is presented in Figure 8. The maximum cell number was similar between the culture with new carriers' addition and the control culture, with $70 \pm 14 \times 10^6$ and $66 \pm 13 \times 10^6$ total cells, respectively. Furthermore, while the total cell number decreased in the control culture after 8 days, no decrease was observed for the culture with freshly added carrier until 15 days. While in the control culture, cell aggregation started from Day 7, no aggregation occurred when fresh carriers were added early. Those results suggested that cell aggregation could be successfully avoided by adding fresh Cytodex-1[®] earlier in the culture, and before any aggregate formation.

On the contrary, the maximum cell number was lower for the culture supplemented with used carriers ($46 \pm 9 \times 10^6$ cells). In this case, total cell number rapidly decreased and cell aggregation occurred at Day 8 (data not shown). Therefore, the cell aggregation phenomenon could not be delayed with the addition of used carriers, contrary to what was observed with fresh carriers.

This prevention of MSC adhesion with used Cytodex-1[®] carriers was not consistent with the results reported in the literature. Indeed, it was demonstrated that Vero cells kept their ability to adhere and to grow on used Cytodex-3[®] carriers, a gelatin-coated dextran bead.³⁶ However, used Cytodex-1[®] could have lost their charge density necessary to cell adhesion, for example by serum protein adsorption or due to the trypsinization step.^{37,38}

Concerning bone marrow MSC expansion on Cytodex-1[®], several studies have already been reported in the literature. The absence of rat MSC adhesion on fibronectin-coated Cytodex-1[®] was reported, with the hypothesis that the coating may have decreased the charge density of the carriers.¹² In another work, the use of intermittent agitation and the addition of fresh carriers at Day 14 limited cell–cell aggregates of porcine MSC, without avoiding large cell–carrier aggregates, reaching a 4.5-multiplication factor of the initial cell number in 28 days.⁵ When feeding the cultures with

fresh carriers every 3 days, under continuous agitation, absence of cell–cell or cell–carrier aggregations of goat MSC was observed, and the initial cell number was multiplied by 7 in 15 days.⁶ Finally, more recently, the absence of cell–cell or cell–carrier aggregation of rabbit MSC was reported, reaching a multiplication of the total cell number by 5 in 14 days, but with a lower agitation rate of 15 rpm than in the present study.¹⁰

Compared with the empiric approaches generally carried out in those different studies, the results in the present study added some insight in the extension of MSC growth on Cytodex-1[®]. To avoid aggregation, carriers should be added only when cells start to aggregate, without increasing the carrier concentration unnecessarily. Indeed, it has been shown that above a carrier concentration of 5 g L^{-1} , the main cause of cell damage is bead–bead collision.³⁹ Therefore, fresh carriers should be rather added before cell confluence, resulting in a delay of aggregation formation and a prolongation of cell growth. It enabled to reach a multiplication ratio of 11.6 in 9 days, with no decrease of total cell numbers. The early addition of fresh carriers at Day 4 followed by a 24-h static period, as proposed in this study, enabled to maintain the viable cells without any cell aggregation for 15 days. The choice of the appropriate time of carrier addition seemed to be essential for delaying cell aggregation during mass expansion of MSC in stirred culture systems.

Conclusions

In this study, it was observed that MSC cultivated in spinner flask using Cytodex-1[®] formed cell aggregates after 7 days of culture in stirred mode (25 or 75 rpm). However, in static mode, no cell aggregation was observed and the cells rather formed large structures of cell–carrier aggregates. In addition, cell aggregation seemed to be promoted by high cell density. By placing aggregated MSC in contact with T-flask surfaces or fresh carriers, it was possible to dissociate the cell aggregates in 24 h. Moreover, cell aggregation could be delayed by adding fresh Cytodex-1[®] carriers during the culture, while the addition of used carriers did not allow cell aggregate dissociation. This study thus allowed us to improve the process of MSC expansion on Cytodex-1[®], by limiting the cell aggregation phenomenon. Mass expansion of MSC could benefit from an aggregate-free expansion process, as cell growth would be prolonged. Further studies could focus on the final aggregation step of MSC to test its advantages for therapeutic purposes.

Acknowledgments

Funding for this project was supported by the French National Research Agency (ANR) and C. Ferrari received a grant from the Ministry of Research and National Education (MREN). We thank N. Tran from the Laboratory of Surgery for generously donating the porcine MSC.

Literature Cited

- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007;25:2739–2749.
- Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol*. 2007;213:341–347.

3. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol.* 2009;217:318–324.
4. Borys MC, Papoutsakis ET. Formation of bridges and large cellular clumps in CHO-cell microcarrier cultures: effects of agitation dimethyl sulfoxide and calf serum. *Cytotechnology.* 1992;8:237–248.
5. Frauenschuh S, Reichmann E, Ibold Y, Goetz PM, Sittlinger M, Ringe J. A microcarrier-based cultivation system for expansion of primary mesenchymal stem cells. *Biotechnol Prog.* 2007;23:187–193.
6. Schop D, Janssen FW, Borgart E, de Bruijn JD, van Dijkhuizen-Radersma R. Expansion of mesenchymal stem cells using a microcarrier-based cultivation system: growth and metabolism. *J Tissue Eng Regen Med.* 2008;2:126–135.
7. Schop D, Van Dijkhuizen-Radersma R, Borgart E, Janssen FW, Rozemuller H, Prins HJ, De Bruijn JD. Expansion of human mesenchymal stromal cells on microcarriers: growth and metabolism. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010;4:131–140.
8. Sart S, Schneider YJ, Agathos SN. Ear mesenchymal stem cells: an efficient adult multipotent cell population fit for rapid and scalable expansion. *J Biotechnol.* 2009;139:291–299.
9. Sart S, Schneider YJ, Agathos SN. Influence of culture parameters on ear mesenchymal stem cells expanded on microcarriers. *J Biotechnol.* 2010;150:149–160.
10. Boo L, Selvaratnam L, Tai CC, Ahmad TS, Kamarul T. Expansion and preservation of multipotentiality of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells in dextran-based microcarrier spin culture. *J Mater Sci: Mater Med.* 2011;22:1343–1356.
11. Eibes G, dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MMA, da Silva CL, Cabral JMS. Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred culture system. *J Biotechnol.* 2010;146:194–197.
12. Yang Y, Rossi FMV, Putnins EE. Ex vivo expansion of rat bone marrow mesenchymal stromal cells on microcarrier beads in spin culture. *Biomaterials.* 2007;28:3110–3120.
13. Wang W, Itaka K, Ohba S, Nishiyama N, Chung UI, Yamasaki Y, Kataoka K. 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2009;30:2705–2715.
14. Bartosh TJ, Ylostalo JH, Mohammadipour A, Bazhanov N, Coble K., Claypool K, Lee RH, Choi H, Prockop DJ. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:13724–13729.
15. Lee WY, Chang YH, Yeh YC, Chen CH, Lin KM, Huang CC, Chang Y, Sung HW. The use of injectable spherically symmetric cell aggregates self-assembled in a thermo-responsive hydrogel for enhanced cell transplantation. *Biomaterials.* 2009;30:5505–5513.
16. Wang CC, Chen CH, Hwang SM, Lin WW, Huang CH, Lee WY, Chang Y, Sung HW. Spherically symmetric mesenchymal stromal cell bodies inherent with endogenous extracellular matrices for cellular cardiomyoplasty. *Stem Cells.* 2009;27:724–732.
17. Baksh D, Davies JE, Zandstra PW. Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. *Exp Hematol.* 2003;31:723–732.
18. Subramanian K, Park Y, Verfaillie CM, Hu WS. Scalable expansion of multipotent adult progenitor cells as three-dimensional cell aggregates. *Biotechnol Bioeng.* 2010;108:364–375.
19. Frith JE, Thomson B, Genever PG. Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential. *Tissue Eng Part C.* 2010;16:735–749.
20. Hewitt CJ, Lee K, Nienow AW, Thomas RJ, Smith M, Thomas CR. Expansion of human mesenchymal stem cells on microcarriers. *Biotechnol Lett.* 2011;33:2325–2335.
21. Varani J, Fligiel SEG, Inman DR, Beals TF, Hillegas WJ. Modulation of adhesive properties of DEAE-dextran with laminin. *J Biomed Mater Res.* 1995;29:993–997.
22. Burg M, Quel G, Ruediger M, Zweigerdt R. Expansion of murine embryonic stem cells on microcarriers-functional characteristics and scale-up potential. In: Gødía F, Fussenegger M, editors. *Animal Cell Technology meets Genomics.* The Netherlands: Springer; 2005:237–240.
23. Major R, Bruckert F, Lackner JM, Waldhauser W, Pietrzyk M, Major B. Kinetics of eukaryote cells adhesion under shear flow detachment on the PLD deposited surfaces. *Bull Pol Acad Sci: Tech Sci.* 2008;56:223–228.
24. Rocha A, Hahn M, Liang H. Critical fluid shear stress analysis for cell-polymer adhesion. *J Mater Sci.* 2010;45:811–817.
25. Lee JH, Lee SJ, Khang G, Lee HB. The effect of fluid shear stress on endothelial cell adhesiveness to polymer surfaces with wettability gradient. *J Colloid Interface Sci.* 2000;230:84–90.
26. Debruyne D, Mareel M, Vanhoecke B, Bracke M. Cell aggregation on agar as an indicator for cell-matrix adhesion: effects of opioids. *In Vitro Cell. Dev Biol—Animal.* 2009;45:473–482.
27. Banerjee M, Bhonde RR. Application of hanging drop technique for stem cell differentiation and cytotoxicity studies. *Cytotechnology.* 2006;51:1–5.
28. Tzoneva R, Fauchaux N, Groth T. Wettability of substrata controls cell-substrate and cell-cell adhesions. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1770:1538–1547.
29. Boterberg T, Bracke ME, Bruyneel EA, Mareel MM. Cell aggregation assays. In: Brooks SA, Schumacher U, editors. *Methods in Molecular Medicine.* Totowa: Humana; 2001:33–45.
30. Ryan PL, Foty RA, Kohn J, Steinberg MS. Tissue spreading on implantable substrates is a competitive outcome of cell-cell vs. cell-substratum adhesivity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:4323–4327.
31. Bursleson KM, Hansen LK, Skubitz APN. Ovarian carcinoma spheroids disaggregate on type I collagen and invade live human mesothelial cell monolayers. *Clin Exp Metastas.* 2005; 21:685–697.
32. Levenberg S, Katz BZ, Yamada KM, Geiger B. Long-range and selective autoregulation of cell-cell or cell-matrix adhesions by cadherin or integrin ligands. *J Cell Sci.* 1998;111:347–357.
33. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther.* 2007;9:204.
34. Waleh NS, Gallo J, Grant TD, Murphy BJ, Kramer RH, Sutherland RM. Selective down-regulation of integrin receptors in spheroids of squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 1994;54: 838–843.
35. Tsai J, Kam L. Rigidity-dependent cross talk between integrin and cadherin signaling. *Biophys J.* 2009;96:L39–L41.
36. Wang Y, Ouyang F. Bead-to-bead-transfer of vero cells in microcarrier culture. *Bioprocess Eng.* 1999;21:211–213.
37. Kim BS, Choi YH, Choi CY, Kim BG. Mammalian cell cultivation on serum-coated microcarriers. *Biotechnol Tech.* 1992;6: 347–352.
38. Mukhopadhyay A, Mukhopadhyay SN, Talwar GP. Influence of serum proteins on the kinetics of attachment of Vero cells to Cytodex microcarriers. *J Chem Technol Biotechnol.* 1993;56: 369–374.
39. Croughan MS, Hamel JF, Wang DIC. Hydrodynamic effects on animal cells grown in microcarrier cultures. *Biotechnol Bioeng.* 2000;67:841–852.

Manuscript received Oct. 13, 2011, and revision received Jan. 30, 2012.

Principales contributions de la publication

Les travaux rapportés dans cette publication ont permis de limiter l'agrégation des CSM porcines à la surface de Cytodex 1. Les agrégats cellulaires sont composés d'une multitude de cellules, dans une configuration compactée (Figure 60). Les résultats ont montré que l'agrégation cellulaire entraînait une baisse apparente de la concentration cellulaire. De plus, ce phénomène d'agrégation entre cellules semblait amplifié par l'agitation, car il n'était pas observé dans les cultures statiques. En effet, en cultures statiques, seules des agrégations entre microporteurs sont observées, ce qui n'induit pas une diminution de la concentration cellulaire. L'agrégation cellulaire est également dépendante de la densité cellulaire, car elle survient plus rapidement à une densité cellulaire plus forte. Il est intéressant de constater que les agrégats de CSM se dissocient lorsqu'ils sontensemencés sur de nouvelles surfaces, telles que des flacons et des microporteurs frais. De plus, les cellules au sein des agrégats peuvent migrer sur des microporteurs frais ajoutés en cours de culture. De ce fait, l'agrégation peut être retardée en ajoutant des microporteurs. En revanche, l'ajout de microporteurs usagés en cours de culture ne permet pas aux cellules de migrer sur leur surface. L'adsorption de molécules de la matrice extracellulaire ou de protéines du sérum pourrait expliquer cet effet, en bloquant les charges nécessaires à l'adhérence des cellules. De ce fait, des microporteurs vides, non colonisés par les cellules, sont observés en cours de culture, tandis que les cellules retrouvent leur propension à s'agréger entre elles.

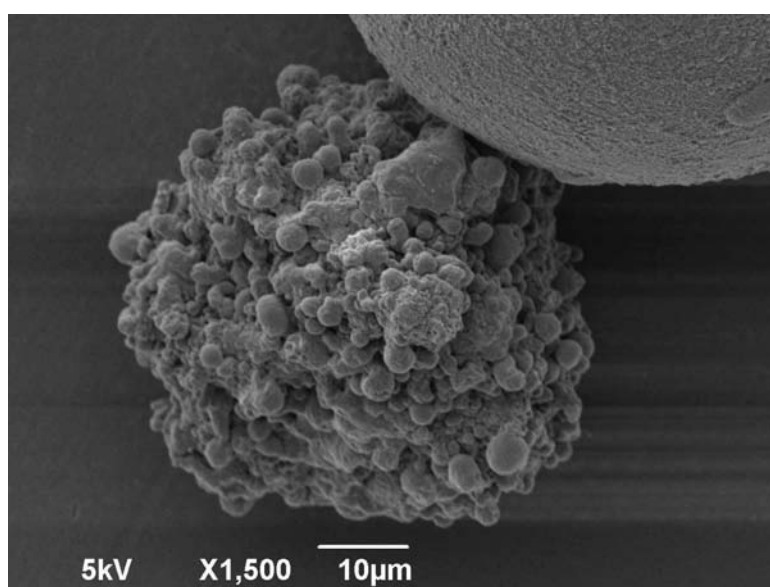


Figure 60. Agrégat de CSM porcines après 8 jours de culture sur Cytodex 1 en conditions agitées (25 rpm) en spinner (200 mL). Observation par microscopie électronique à balayage (x 1500)

En résumé, deux stratégies sont envisageables pour faciliter l'expansion des CSM porcines en spinner : l'ajout de microporteurs frais avant l'apparition d'agrégats en conditions agitées, ou l'absence d'agitation.

La multipotence des cellules a été vérifiée après 12 jours de culture en conditions statiques sur Cytodex 1. Les résultats montrent que les cellules sont encore capables de se différencier en ostéocytes et en chondrocytes après 12 jours d'expansion sur microporteurs (Figure 61).

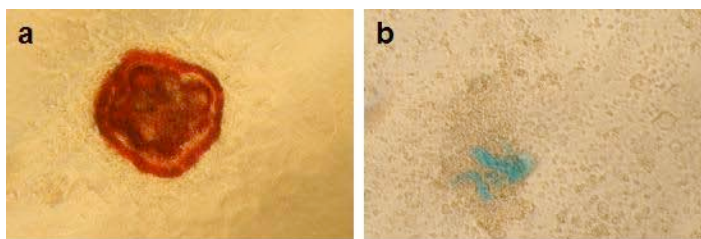


Figure 61. Multipotence des CSM porcines cultivées pendant 12 jours sur Cytodex 1 en spinner non agité. (a) Différenciation ostéogénique et (b) différenciation chondrogénique

Ainsi, l'étude des conditions opératoires sur la croissance des CSM porcines a permis de trouver des conditions plus favorables pour améliorer les performances du procédé d'expansion. Pour compléter les résultats obtenus avec un ajout ponctuel de microporteurs, des essais avec des ajouts répétés de microporteurs ont été réalisés.

5.1.2. Influence d'ajouts répétés de microporteurs en cours de culture agitée

Afin de déterminer l'influence d'ajouts répétés de microporteurs sur la réponse des CSM, trois cultures ont été réalisées avec un ajout de microporteurs frais (à 96 h de culture), deux ajouts (à 96 et 192 h) ou trois ajouts (à 96, 192 et 288 h). Ces cultures ont été effectuées avec une fréquence d'agitation de 25 rpm en spinner (200 mL). La concentration de microporteurs a été doublée à chaque ajout, atteignant ainsi 2,4 g/L après 96 h de culture, 4,8 g/L après 192 h de culture, et 9,6 g/L après 288 h de culture. Les résultats rapportés dans la Figure 62A montrent que l'ajout de microporteurs toutes les 96 heures pendant plus de 300 h de culture permet d'obtenir 2,7 fois plus de cellules qu'un seul ajout de microporteurs. De plus, aucune agrégation cellulaire n'est observée tout au long des 300 h de culture lorsque les microporteurs sont ajoutés successivement (Figure 62B).

La colonisation des microporteurs frais par les cellules permet donc de prolonger l'expansion cellulaire tout en évitant l'agrégation. Une étude rapportée dans la littérature décrit également l'ajout multiple de microporteurs en cours de culture (Schop et al., 2010), qui a permis de limiter l'agrégation et de prolonger la prolifération de CSM humainesensemencées à 8×10^4 cellules/mL (4000 cellules/cm²) sur Cytodex 1 (4,5 g/L).

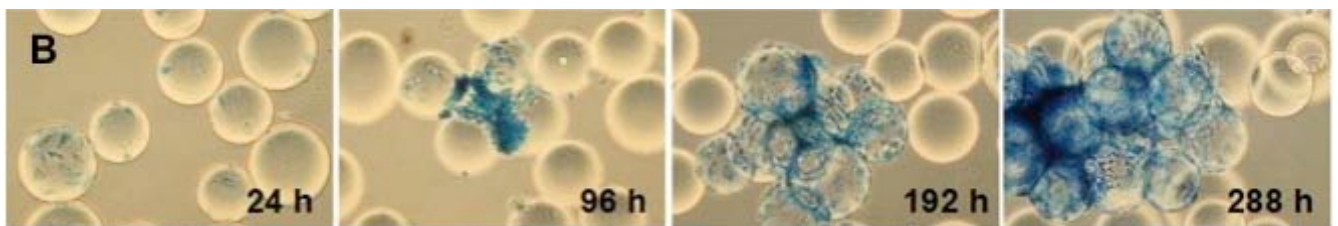
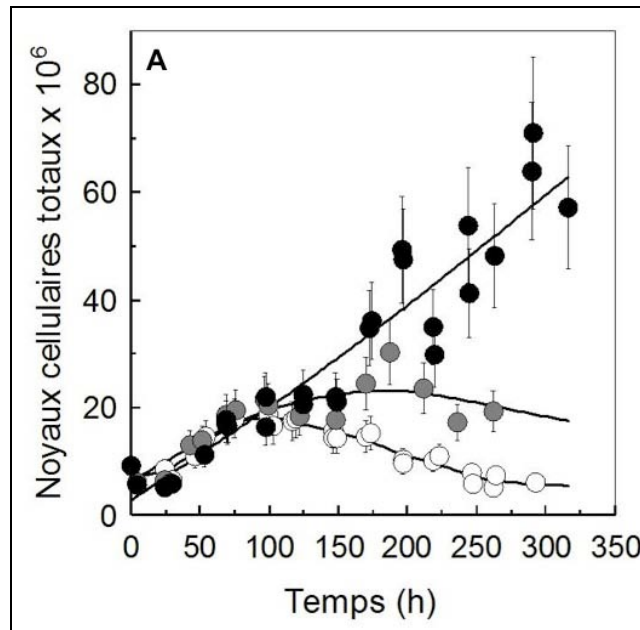


Figure 62. A : Influence de divers modes d'ajout de microporteurs sur la croissance des CSM porcines cultivées en spinner sur Cytodex 1 (25 rpm, 200 mL). Ajout après (○) 96 h, après (●) 96 h et 192 h, et après (●) 96 h, 192 h, 288 h. B : Observation par microscopie optique des CSM porcines cultivées en spinner sur Cytodex 1 (25 rpm, 200 mL) à 24 h, 96 h, 192 h et 288 h de culture après trois ajouts de microporteurs à 96 h, 192 h et 288 h

5.2. Influence de l'agitation sur la mort et le métabolisme des CSM porcines

L'agitation du milieu de culture offre de nombreux avantages, tels que d'assurer l'homogénéité de la culture et permettre d'accroître le rapport entre la surface d'adhérence et le volume de milieu de culture. Cependant, les cellules souches répondent aux forces mécaniques, induites par l'agitation, par des mécanismes de mécanotransduction qui peuvent modifier leur comportement (Chiquet et al., 2009). Les forces hydrodynamiques sont ainsi connues pour induire la différenciation des CSM (Riddle et al., 2006; Wang et al., 2008), une modification de leur expression génique (Glossop et al., 2008) et protéique (Yi et al., 2010), ou une apoptose cellulaire (Kearney et al., 2008). Cependant, ces études de la littérature ont été

effectuées en petit volume et sur des courtes périodes de temps. De ce fait, peu de données sont disponibles sur les effets de l'agitation sur les CSM pendant tout le procédé d'expansion, notamment concernant leur mortalité et leur métabolisme. Des données ont par contre été rapportées pour des lignées cellulaires continues (Pertersen et al., 1988; Shiragami et al., 1994), et soulignent effectivement un effet de l'agitation sur la viabilité et le métabolisme de ces cellules.

C'est pourquoi, nous avons étudié plus précisément l'influence de l'agitation sur la réponse physiologique des CSM porcines, en comparant des cultures de CSM adhérentes sur Cytodex 1 et cultivées en conditions statiques (0 rpm) ou agitées (25 et 75 rpm). Les cinétiques de croissance de ces cultures sont données dans la partie « 5.1.1. Stratégies de limitation de l'agrégation cellulaire en culture agitée ».

5.2.1. Influence de l'agitation sur la mortalité des CSM porcines

L'étude de l'influence de l'agitation sur la mortalité des CSM porcines est réalisée à l'aide de différentes méthodes de comptage cellulaire. Le chapitre 4 a comparé plusieurs de ces méthodes, et les résultats ont montré que la méthode présentant le moins de biais était le comptage des noyaux cellulaires par cytométrie. Le dénombrement des noyaux a donc été utilisé comme méthode principale de comptage des cellules dans cette étude. Il faut cependant noter que cette méthode ne permet pas de dénombrer les cellules mortes, ce qui doit être réalisé en parallèle par d'autres techniques. Parmi les techniques disponibles se trouve la quantification de la viabilité et de l'apoptose des cellules par cytométrie en flux après trypsination des cellules. Un inconvénient majeur est que l'efficacité de la trypsination varie en cours de culture et influence la quantification. Une autre méthode consiste à quantifier l'ensemble de la mortalité cellulaire (cellules nécrosées, en apoptose, lysées) par la mesure de l'activité extracellulaire de la LDH en cours de culture. Cependant, la quantité de cellules mortes déterminée à partir de l'activité de la LDH intracellulaire est très faible par rapport à la baisse apparente de la concentration cellulaire après plusieurs jours de culture.

Ces deux méthodes de quantification de la mortalité cellulaire (cytométrie ou LDH) ne peuvent donc pas être utilisées pour des analyses quantitatives en valeurs absolues. En revanche, elles peuvent être utilisées pour des études relatives et comparatives, telles que les travaux suivants comparant des cultures à différentes fréquences d'agitation.

5.2.1.1. Influence de l'agitation sur la viabilité cellulaire et l'activité extracellulaire de la LDH

Les résultats sur la viabilité des CSM porcines déterminée par cytométrie montrent que celle-ci n'est pas uniforme lors de cultures effectuées à 0, 25 et 75 rpm (Figure 63A). La quantité de cellules viables est similaire entre les cultures jusqu'à 250 h de culture, puis, alors qu'elle décroît lors des cultures en conditions agitées (25 et 75 rpm), elle continue d'augmenter lors de la culture en conditions statiques. Cela correspond au moment où les CSM s'agrègent sous l'effet de l'agitation. La baisse de la viabilité cellulaire est donc directement liée à l'aggrégation cellulaire, et peut en être la cause ou la conséquence.

Dans le cas de l'activité de la LDH extracellulaire, elle est similaire jusqu'à 150 h de culture quelle que soit la fréquence d'agitation (Figure 63B). Puis, elle augmente rapidement à 0 rpm pour atteindre 181 U/L en fin de culture. Les cultures agitées n'atteignent en fin de culture qu'une activité de LDH de 64 U/L à 25 rpm et de 40 U/L à 75 rpm. Cette mortalité cellulaire supérieure en conditions statiques par rapport aux conditions agitées est paradoxale. En effet, dans la littérature, les études avec des lignées cellulaires continues rapportent une mortalité cellulaire souvent accrue lors de cultures sous agitation, en particulier avec les cellules sur microporteurs, car des interactions entre les cellules et les billes ou les tourbillons de fluide peuvent être dommageables (Lakhotia et Papoutsakis, 1991). Cette mortalité cellulaire dépend du type de lignée cellulaire (Wu, 1999) et peut survenir très tôt. Par exemple, pour des hybridomes, elle intervient après une exposition de 10 minutes à une force de cisaillement de 5 Pa (Pertersen et al., 1988), ou après 12 heures à 0,5 Pa (Shiragami et al., 1994). La mortalité cellulaire observée sans agitation pourrait donc être induite par les prélèvements effectués deux fois par jour. En effet, ces prélèvements qui nécessitent une agitation brève et intense, pourraient induire une nécrose des cellules. En revanche, les cellules sous agitation constante (25 et 75 rpm) se seraient « adaptées », et ne présenteraient pas de nécrose massive lors des prélèvements. Leur organisation en agrégats pourrait aussi les protéger des contraintes hydrodynamiques (Moreira et al., 1995).

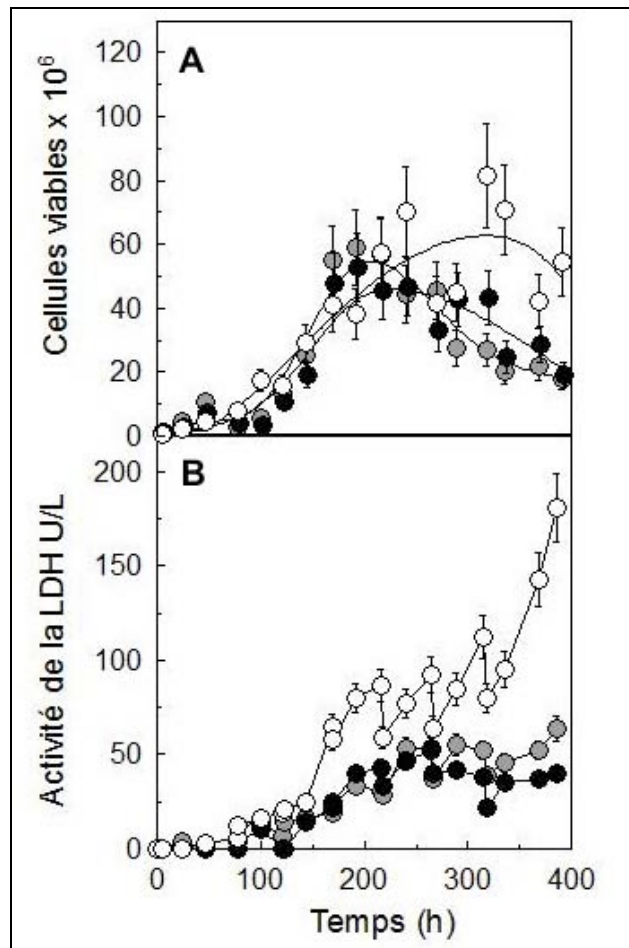


Figure 63. Influence de l'agitation sur les cellules viables (A) et sur l'activité extracellulaire de la LDH (B) lors de culture de CSM porcines cultivées sur Cytodex 1 à (○) 0 rpm, (●) 25 rpm et (●) 75 rpm (Changement de milieu toutes les 48 heures à partir de 72 h de culture)

5.2.1.2. Influence de l'agitation sur l'apoptose cellulaire

En ce qui concerne l'influence de l'agitation sur l'apoptose précoce des cellules, en conditions non agitées, le pourcentage de cellules apoptotiques ne dépassait pas 10 % des cellules totales (Figure 64A). En revanche, pour les cellules cultivées à 25 et 75 rpm, ce pourcentage augmentait à partir de 150 h, pour atteindre 42 % et 34 % des cellules totales, respectivement. Le pourcentage de cellules en apoptose tardive ou en nécrose oscille entre 10 et 20 % de cellules totales pour les cellules cultivées en absence d'agitation, alors que pour les cellules cultivées à 25 et 75 rpm, celui-ci atteignait 40 % à 75 h de culture, avant de diminuer en dessous de 20 % (Figure 64B). Ce pic à 75 h de culture peut correspondre à une réponse cellulaire suite à la mise en place de l'agitation, débutée après 24 h de culture.

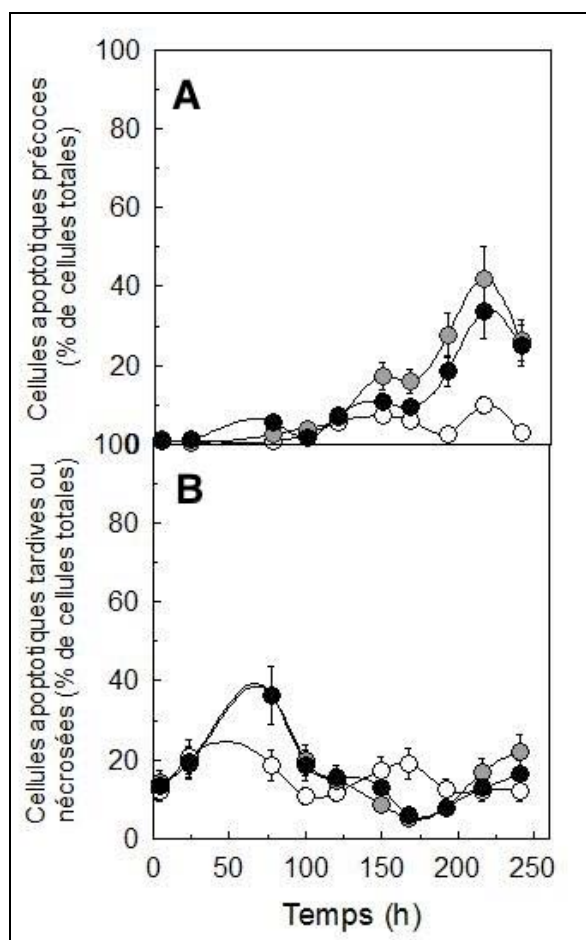


Figure 64. A : Influence de l'agitation sur l'apoptose précoce (A) et sur l'apoptose tardive ou nécrose (B) des CSM porcines cultivées sur Cytodex 1 à (○) 0 rpm, (●) 25 rpm et (●) 75 rpm

Dans la littérature, la majorité des études concernant les effets des contraintes hydrodynamiques sur les CSM ont été réalisées en systèmes de petite taille et sur des durées d'exposition courtes, de 1 h à 24 h. Les résultats obtenus sont hétérogènes, tels qu'une augmentation de la prolifération cellulaire (Riddle et al., 2006), une différenciation endothéliale (Wang et al., 2008), une augmentation de l'expression de 10 types de protéines (Glossop et al., 2008), une modification de l'expression de plus de 400 gènes (Yi et al., 2010), et une apoptose des cellules (Kearney et al., 2008). Les protéines principalement surexprimées lorsque les cellules sont soumises à des contraintes hydrodynamiques sont la GAPDH et l'annexin A2, ayant toutes deux un vaste champ d'action dans la cellule (différenciation, métabolisme, apoptose) (Yi et al., 2010). Concernant la surexpression des gènes des cellules soumises à des contraintes hydrodynamiques, il s'agit de gènes principalement liés à la voie signalétique MAPK, également impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires (croissance, différenciation, apoptose) (Glossop et al., 2008).

Dans notre étude, en revanche, les cellules ont été soumises à des contraintes hydrodynamiques pendant plus de 300 h. Notre étude présente donc ici une nouveauté, car les effets de l'agitation ont été observés à plus long terme, sur des périodes de temps proches de celles des cultures à grande échelle. Une adaptation des CSM à l'agitation est également une hypothèse envisageable.

Afin de protéger les cultures de lignées cellulaires des contraintes de cisaillement, des surfactants tels que le pluronic F68 sont classiquement utilisés (Gigout et al., 2008). Du pluronic F68 a ainsi été ajouté dans les cultures de CSM porcines, en vue de les protéger de l'agitation. Nos résultats ont montré que les cellules restaient alors en suspension sans adhérer sur les Cytodex 1 lorsque 0,2 % de pluronic était ajouté au milieu de culture. Etant donné que l'ajout de pluronic dans les cultures de CSM n'a jamais été rapporté dans la littérature, cet effet peut être dû soit à une toxicité de ce produit, soit à une baisse de l'adhérence des cellules sur les microporteurs. Ghebeh et al. (2002) ayant montré que le pluronic F68 pouvait diminuer l'adhérence entre cellules CHO, il pourrait donc également être susceptible d'empêcher les CSM d'adhérer sur les Cytodex 1. D'autres méthodes existent afin de protéger les cellules des contraintes hydrodynamiques. Des surfactants tels que l'alcool de polyvinyle (PVA) limitent la mortalité de cellules Vero (Wu, 1999). L'augmentation de la viscosité peut également diminuer les contraintes de cisaillement lors de cultures de lignées BEK (Lakhotia et Papoutsakis, 1991). Ces méthodes n'ont toutefois pas encore été testées sur les CSM.

5.2.2. Influence de l'agitation sur le métabolisme des CSM

Le métabolisme des CSM porcines, dont en particulier la consommation de glucose et la production de lactate, a été analysé lors des mêmes cultures réalisées à 0, 25 et 75 rpm. Les vitesses spécifiques de consommation et de production ont été calculées et sont présentées dans la Figure 65. Concernant la vitesse spécifique de consommation de glucose, il n'y a pas de différence visible jusqu'à environ 220 h de culture (Figure 65A) quelle que soit la vitesse d'agitation. Les vitesses spécifiques maximales de consommation de glucose sont de 10,1; 9,0 et 10,0 pmol/cellule/jour pour les CSM cultivées à 0, 25 et 75 rpm, respectivement. Sans agitation, la vitesse spécifique de consommation de glucose diminue progressivement jusqu'à 2,3 pmol/cellule/jour. A 25 rpm, celle-ci diminue jusqu'à 3,4 pmol/cellule/jour (234 h) puis remonte jusqu'à 6,4 pmol/cellule/jour. De même à 75 rpm, elle diminue jusqu'à 3,0 pmol/cellule/jour (253 h) puis remonte jusqu'à 7,1 pmol/cellule/jour. Cette remontée de la vitesse spécifique de consommation de glucose en fin de culture correspond à l'apparition des CSM organisées sous forme d'agrégats. Elle peut s'expliquer, soit par le comptage qui sous-estime le nombre de cellules dans les agrégats, soit par une consommation de glucose plus élevée par les cellules au sein des agrégats. Des deux hypothèses, la première est privilégiée car il a été montré qu'il était difficile de quantifier les cellules sous forme d'agrégats.

Concernant la production de lactate, quelques différences sont visibles entre les cultures de CSM réalisées

à 0, 25 et 75 rpm (Figure 65B). La culture de CSM réalisée à 0 rpm atteint une vitesse spécifique de production de lactate maximum de 11,8 pmol/cellule/jour après 123 h, pour diminuer progressivement jusqu'à 5,3 pmol/cellule/jour. À 25 rpm, elle débute à 12,5 pmol/cellule/jour et diminue à 9,5 pmol/cellule/jour. La culture à 75 rpm débute à 13,1 pmol/cellule/jour pour aboutir à 5,6 pmol/cellule/jour (248 h). Le rendement molaire lactate/glucose est de 2,2, de 2,0 et de 1,9 mole/mole pour les cultures réalisées à 0, 25 et 75 rpm, respectivement.

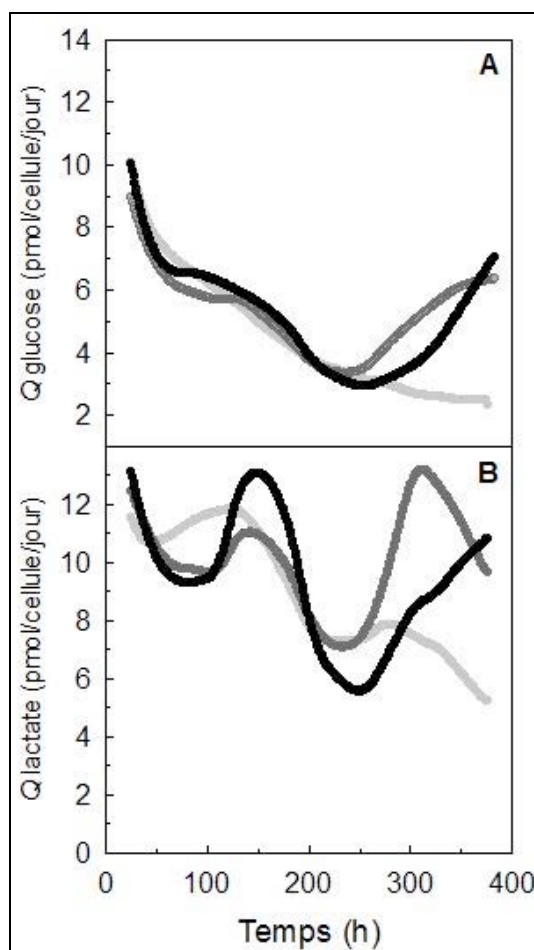


Figure 65. Vitesses spécifiques de consommation de glucose (A), et de production de lactate (B) des CSM porcines cultivées sur Cytodex 1 à (○) 0 rpm, (●) 25 rpm et (●) 75 rpm

Dans la littérature, quelques études établissent un lien entre agitation et métabolisme. Ainsi, Lu et al. (1992) montrent que le métabolisme pourrait être modifié par l'agitation. Les vitesses spécifiques de consommation et de production de métabolites seraient même augmentées sous agitation, afin d'alimenter les mécanismes de réparation cellulaire (Al-Rubeai et al., 1990). Enfin, une étude du métabolisme des cellules CHO a montré une augmentation de la vitesse de consommation de glucose et une baisse de la vitesse de production de lactate des cellules sous agitation (Keane et al., 2003).

Ainsi, nos résultats indiquent que, en plus d'une influence sur la prolifération et l'organisation cellulaire des

CSM porcines, l'agitation a une influence sur leur mortalité et leur métabolisme. Elle induit en particulier l'apparition du phénomène d'apoptose.

Conclusion du chapitre 5

Dans ce chapitre, nous avons mis en évidence les effets d'une mise en œuvre de systèmes agités sur l'expansion des CSM porcines sur microporteurs (Figure 66). Plus précisément, nous avons ciblé notre étude sur l'influence de l'agitation et de l'ajout de microporteurs. En comparaison d'une culture des CSM sur microporteurs sans agitation, une agrégation des cellules et une baisse apparente de la concentration cellulaire ont été observées à 25 et 75 rpm. De plus, alors que l'agitation entraîne une augmentation de l'apoptose des cellules, une accumulation de LDH extracellulaire, paramètre directement lié à la mort cellulaire, n'est pas observée. Par ailleurs, l'ajout de microporteurs en cours de culture permet de prolonger la prolifération cellulaire en évitant l'agrégation. En effet, alors que les cellules s'agrègent par manque de surface d'adhérence, elles colonisent les microporteurs frais ajoutés dans la culture.

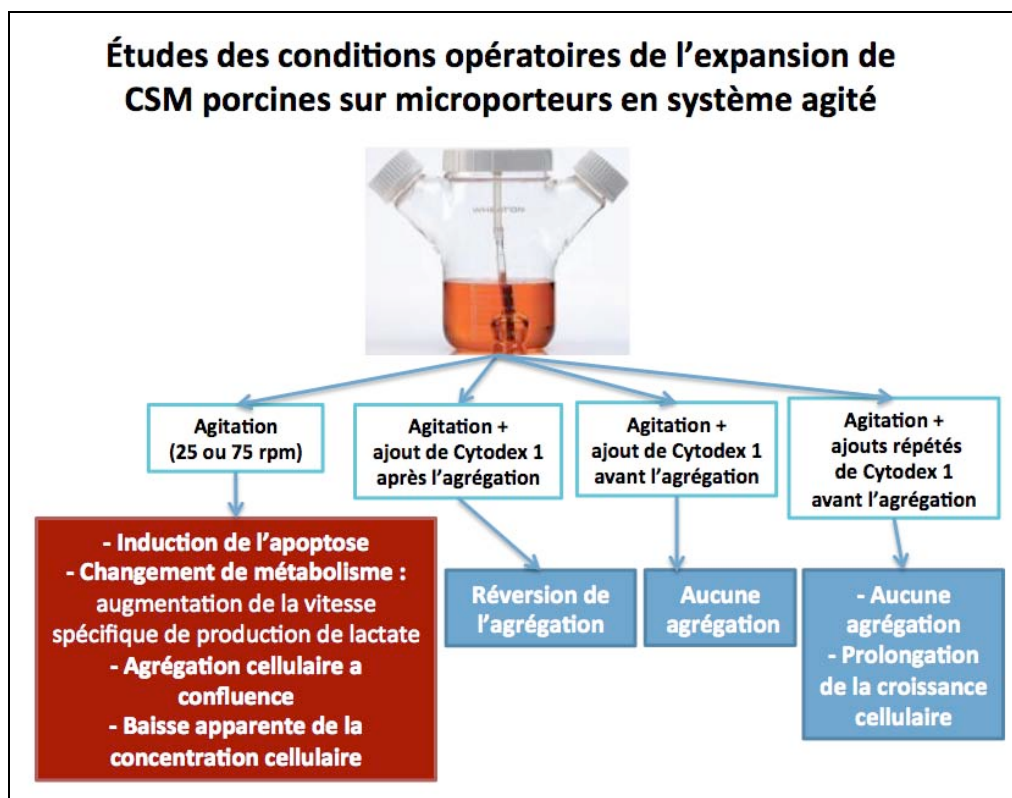


Figure 66. Schéma résumant le Chapitre 5 sur les conditions opératoires nécessaires aux CSM porcines cultivées sur microporteurs

L'étude de l'influence de ces deux paramètres opératoires sur la réponse des CSM porcines a donc permis de mieux comprendre la diminution apparente de la concentration cellulaire observée après plusieurs jours de culture en mode agité. De plus, nous avons proposé deux stratégies pour limiter le phénomène d'agrégation entre cellules ; une réduction de l'agitation des microporteurs dans le spinner, et un ajout de microporteurs frais en cours de culture. Cette capacité des CSM porcines à coloniser de nouveaux porteurs en cours de culture permet de prolonger leur prolifération et d'augmenter la quantité de cellules produites, sans compromettre leur multipotence. Cependant, la réduction de l'agitation peut conduire à des problèmes d'hétérogénéité, tels que des gradients de concentration de microporteurs, de substrats ou encore d'oxygène.

Conclusion générale

Les objectifs majeurs de ce travail concernaient l'étude de l'influence des paramètres de culture, des modes d'expansion et des conditions opératoires sur la réponse des CSM porcines. Nos résultats ont permis d'établir les conditions d'un procédé adapté à l'expansion de ces cellules. De nombreuses questions scientifiques ont été abordées et les contributions les plus significatives sont rappelées de façon synthétique ci-dessous :

Quelle est l'influence des paramètres de culture sur le comportement des CSM porcines ?

- Les paramètres de culture influencent la croissance des CSM

Les concentrations d'ensemencement des CSM influencent leur croissance. Ainsi, en mode statique, une latence est observée lorsque les cellules sont ensemencées à une concentration inférieure à 1500 cellules/cm². En revanche, lors de cultures en mode agité sur microporteurs (Cultispher G), le facteur de multiplication des cellules est plus élevé lors d'un ensemencement de 6 cellules par microporteurs comparativement à 12 cellules par microporteurs. Par contre, un ensemencement de 3 cellules par microporteurs n'augmente pas significativement le facteur de multiplication des cellules, mais retarde la baisse de la concentration cellulaire. Un autre paramètre de culture est la siliconisation des spinners. Un traitement au silicone des flacons réalisé juste avant la culture permet d'augmenter les concentrations maximales des CSM, comparé à des cultures dans des flacons traités non récemment. Enfin, un dernier paramètre de culture est l'âge des cellules, entraînant une diminution de la concentration maximale des CSM au fur et à mesure des passages. En effet, une sénescence répliquative touche les CSM en culture *in vitro*, et diminue significativement leur potentiel de croissance entre le passage 4 et le passage 6.

- Les paramètres de culture influence le métabolisme des CSM

L'âge des CSM influence également leur métabolisme. Entre le passage 4 et le passage 6, la vitesse spécifique de consommation du glucose augmente fortement alors que la vitesse spécifique de production de lactate n'augmente que moyennement. En revanche, il n'y a pas d'effet significatif sur les vitesses spécifiques de consommation de glutamine et de production d'ions ammonium. Ce changement de métabolisme aurait un lien avec les mécanismes d'apoptose et de sénescence.

Les paramètres de culture doivent donc être soigneusement choisis, et deux cultures ne peuvent pas être comparées si elles ne sont pas réalisées avec des paramètres de cultures similaires. Il faut ainsi trouver la

bonne concentration d'ensemencement cellulaire, ni trop faible pour ne pas induire de latence, ni trop forte pour ne pas diminuer les surfaces d'adhérence disponibles. De plus, étant donné que les cellules ont une durée d'utilisation assez faible comparée aux lignées continues, le procédé d'expansion doit être le plus court possible.

Quels sont les besoins biochimiques spécifiques des CSM porcines ?

- Dans le milieu basal IMDM, les CSM porcines requièrent au moins 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) pour proliférer

Lorsque les CSM sont cultivées en mode statique sans ajout de SVF, aucune prolifération n'est observée et le nombre de cellules diminue au cours du temps. Avec une concentration de 5 % de SVF, la concentration cellulaire reste stable avec des cellules qui présentent une phase de latence. Une prolifération cellulaire sans latence n'est ainsi observée qu'à partir de 10 % de SVF ajouté.

- Les CSM porcines prolifèrent mieux dans le milieu basal α MEM

La croissance des CSM porcines est meilleure dans le milieu α MEM que dans les milieux DMEM ou IMDM. Cette différence provient principalement de la combinaison des paramètres suivants : une faible concentration en glucose, la présence de glutamine, et la présence d'antioxydants dans l' α MEM comparé aux autres milieux de base.

- Les CSM porcines prolifèrent mieux avec une faible concentration en glucose

La croissance des CSM porcines ralentit lorsque la concentration en glucose est augmentée de 5,5 mM à 13,5 mM et à 25 mM dans le milieu basal α MEM. Cela pourrait provenir d'une plus forte production de lactate en présence de concentrations plus élevées de glucose.

- Les CSM porcines consomment peu de glutamine

En absence d'ajout de glutamine dans le milieu basal α MEM avec 10 % de SVF, les CSM porcines prolifèrent sans latence (présence de glutamine à une concentration d'environ 0,05 mM provenant du SVF). Un ajout de 2 mM de glutamine augmente la concentration maximale des cellules de 25 %. En revanche, un ajout de 4 ou 6 mM de glutamine n'a pas d'effet significatif sur la croissance des CSM par rapport à l'ajout de 2 mM.

- Les CSM porcines sont sensibles à la nature et à la concentration d'antioxydant

La présence d'acide thiocétique (1 μ M) entraîne une augmentation de la concentration maximale des CSM de 40 %. L'ajout de β -mercaptoéthanol ou de sélénite de sodium dans un milieu contenant déjà de l'acide

thioctique n'a pas d'effet sur les cinétiques de croissance. En revanche, une concentration élevée en β -mercaptoéthanol (1 mM) ou en sélénite de sodium (0,1 mM) a un effet négatif sur la croissance des CSM.

- Les CSM porcines sont sensibles à la nature et à la concentration de facteurs de croissance humains

La concentration maximale des CSM porcines augmente de façon proportionnelle à la concentration de FGF2 humain ajouté dans le milieu de culture, avec une augmentation de 40 % de la concentration maximale de CSM à 1 ng/mL de FGF2. En revanche, la prolifération des cellules n'est pas modifiée par l'ajout de HFG humain à différentes concentrations (de 0,5 à 10 ng/mL).

Les CSM porcines présentent donc des besoins biochimiques particulier, sans toutefois avoir un métabolisme significativement différent des CSM humaines ou murines. Les CSM porcines sont sensibles à la nature des composés biochimiques présents dans leur milieu de culture, mais également aux concentrations de ces composés. Une trop forte concentration de glucose ou d'antioxydant peut ainsi diminuer leur croissance. Il semblerait que ces composés doivent être apportés préférentiellement par petite quantité en cours de culture. Ceci pourrait également s'appliquer à la glutamine et aux facteurs de croissance, deux composés qui se dégradent rapidement dans les conditions de culture des CSM porcines.

Quelle est la méthode d'expansion la mieux adaptée aux CSM porcines ?

- Les CSM porcines prolifèrent en plaques micropuits ou en flacons statiques

Les CSM porcines adhèrent et se multiplient sur le polystyrène modifié des flacons de culture. Ces systèmes de culture ne sont cependant pas adaptés à une extrapolation de l'expansion, ni à la culture en conditions agitées.

- La culture de CSM porcines sans support d'adhérence ne permet pas de croissance apparente

La culture de CSM porcines en suspension unicellulaire ou sous forme d'agrégats conduit au même résultat : une agrégation massive au bout de 24 h de culture agitée à 25 rpm. Même si les cellules restent métaboliquement actives, aucune croissance apparente n'est observée.

- La culture de CSM porcines sur microporteurs permet une croissance cellulaire

Les cellules adhèrent de façon similaire pendant les 24 premières heures de culture sur les différentes surfaces des flacons et des microporteurs (polystyrène modifié, gélatine, dextrane-DEAE, cellulose-DEAE). La croissance des cellules est cependant différente selon le type de microporteur utilisé. Par rapport à la vitesse spécifique de croissance des CSM porcines en flacon statique ($0,31 \text{ j}^{-1}$), elle est plus faible sur Hillex ($0,25 \text{ j}^{-1}$), mais est plus élevée sur Cytodex 1 ($0,54 \text{ j}^{-1}$), Cytodex 3 ($0,38 \text{ j}^{-1}$), Cultispher G ($0,46 \text{ j}^{-1}$), et Cytopore

(0,48 j⁻¹). La culture sur certains microporteurs induit une mortalité cellulaire plus importante que sur d'autres, tels que les microporteurs Cultispher G (112 U/L) et Hillex (114 U/L) avec lesquels la concentration extracellulaire finale en LDH est plus élevée qu'avec les cultures en flacon statique (36 U/L), sur Cytodex 1 (68 U/L), Cytodex 3 (54 U/L) et sur Cytopore (51 U/L). En revanche, il n'y a pas de différences significatives du métabolisme des CSM porcines lorsqu'elles sont cultivées en mode statique (flacon) ou en mode agité sur les différents microporteurs.

- Le meilleur choix pour l'expansion de CSM porcines est le microporteur Cytodex 1

Dans le but d'extrapoler le procédé de culture, le mode d'expansion le mieux adapté est la culture sur microporteurs, du fait de la vitesse spécifique de croissance cellulaire supérieure à celle obtenue en flacon statique. Le choix se situe donc entre Cytodex 1, Cultispher G et Cytopore. Cultispher G est composé de gélatine de porc, ce qui pourrait être un inconvénient majeur dans le cadre de thérapie cellulaire humaine. Par contre, Cytopore n'est pas constitué de molécules d'origine animale, mais comporte des pores de 30 µm de diamètre en moyenne. Les cellules sont donc plus difficiles à observer et à récolter. Le choix s'est ainsi porté sur Cytodex 1, sans composé d'origine animale et présentant une surface non macroporeuse. De plus, la multipotence des CSM est conservée après leur expansion pendant 12 jours sur les microporteurs Cytodex 1 agités à 25 rpm.

Par rapport à la culture classique en flacons statiques, la culture des CSM sur microporteurs offrent la possibilité de cultiver les cellules dans des conditions à la fois adhérentes et agitées, et de monter plus facilement en échelle. Les CSM se comportent différemment selon la nature du microporteur utilisé, au niveau de leur croissance et de leur mortalité, sans toutefois modifier leur métabolisme. Certains microporteurs permettent ainsi une vitesse spécifique de croissance supérieure à celle observée en flacon statique. Les cultures en suspension unicellulaire et sous forme d'agrégats sont favorables aux lignées continues mais nécessitent d'être adaptées aux CSM porcines en limitant l'agrégation cellulaire.

Quelle est la méthode de comptage la plus fiable pour les CSM sur microporteurs ?

- Il existe différentes méthodes de comptage rapportées dans la littérature

Jusqu'à maintenant, aucune standardisation des méthodes de comptages des CSM n'a été validée. Les études sur l'expansion de CSM sur microporteurs rapportées dans la littérature utilisent des méthodes de comptage soit directes par marquage du cytoplasme ou des noyaux cellulaires, soit indirectes, par la mesure de la respiration cellulaire ou de la consommation de glucose.

- Une nouvelle méthode automatisée de comptage des noyaux a été mise en place

En comparant les différentes méthodes de comptage, celle dénombant les noyaux cellulaires semble la plus adaptée aux CSM sur microporteurs, car elle ne nécessite pas d'étape de trypsination, et ne varie pas en cours de culture. Cette méthode a pu être transposée sur un cytomètre en flux, les noyaux étant préalablement marqués avec une sonde fluorescente. Cette innovation permet un comptage fiable et automatisé des CSM sur microporteurs.

L'étude des différentes méthodes de comptage de CSM montre qu'il est difficile de comparer les études rapportées dans la littérature sur l'expansion de CSM. En plus de l'influence des paramètres de culture, de la composition du milieu de culture, et du mode d'expansion, la méthode de comptage des cellules influence les résultats des cinétiques de croissance. Pour comparer différentes études, il serait donc préférable de se baser sur les facteurs de multiplication obtenus, plutôt que sur les concentrations cellulaires atteintes.

Quelle est l'influence de l'agitation sur le comportement des CSM ?

- L'agitation n'influence pas la vitesse spécifique de croissance des CSM

La croissance des CSM ne semble pas être influencée par la fréquence d'agitation. En effet, les cultures sur microporteurs statiques ou agités à 25 et 75 rpm présentent les mêmes vitesses spécifiques de croissance, et les mêmes concentrations cellulaires maximales.

- L'agitation induit une agrégation des CSM à confluence

Les cultures sur microporteurs agités à 25 et 75 rpm tendent à fragiliser l'adhérence des cellules à confluence sur les microporteurs, conduisant à la formation d'agrégats cellulaires après 200 h de culture. Cette agrégation est concomitante avec une baisse apparente de la concentration cellulaire.

- L'agitation induit une apoptose des CSM

Les cultures sur microporteurs agités à 25 et 75 rpm augmentent le pourcentage de cellules en apoptose tardive ou nécrosées après une durée de culture variable, allant de 50 à 100 h, par rapport aux cultures sur microporteurs en mode statique. Cette apoptose peut concerner jusqu'à près de 40 % des cellules. De plus, le pourcentage de cellules en apoptose précoce augmente à partir de 125 h de culture lors de cultures agitées, atteignant jusqu'à 40 % des cellules, alors qu'il reste inférieur à 10 % lors des cultures sans agitation.

- L'agitation influence le métabolisme des CSM

Les cellules cultivées sur microporteurs agités à 25 et 75 rpm ont pour conséquence une augmentation de la vitesse spécifique de production de lactate par rapport aux cultures sur microporteurs statiques. En revanche, il n'y a pas d'effet de l'agitation sur la vitesse spécifique de consommation de glucose.

Les résultats concernant l'agitation montre l'importance de cette condition opératoire sur l'expansion des CSM. L'agitation de la culture en garantit l'homogénéité, tout en facilitant les régulations des paramètres physico-chimiques et la montée en échelle. Cependant, l'agitation favorise l'apoptose et l'agrégation cellulaire. Il est donc nécessaire de trouver un compromis entre le type et la durée d'agitation que peuvent supporter les cellules, d'une part, et le seuil nécessaire pour éviter les gradients de concentration, d'autre part.

Quels sont les moyens pour prolonger la croissance des CSM à grande échelle ?

- La concentration cellulaire maximale est maintenue lors de cultures sur microporteurs statiques

Contrairement aux cultures sur microporteurs agités à 25 et 75 rpm, la concentration cellulaire maximale ne diminue pas après 200 h de culture en condition statique. Au contraire, la concentration cellulaire atteint un plateau et reste stationnaire jusqu'à la fin de la culture (360 h de culture).

- L'ajout de microporteurs après l'agrégation cellulaire permet d'inverser le processus d'agrégation

Lorsque des microporteurs frais sont ajoutés après l'agrégation cellulaire survenue lors des cultures agitées (ajout à 240 h de culture), les cellules des agrégats sont capables de migrer et de coloniser les nouveaux microporteurs au bout de 24 h. La concentration cellulaire revient alors à sa valeur maximale observée avant l'agrégation.

- L'ajout de microporteurs avant l'agrégation cellulaire permet de maintenir la croissance des cellules

Lorsque des microporteurs frais sont ajoutés avant que l'agrégation cellulaire n'intervienne lors des cultures agitées (ajout à 96 h de culture), cette agrégation est évitée jusqu'à la fin de la culture (360 h de culture). Dans ce cas, la concentration cellulaire ne présente pas de baisse et se stabilise. En revanche, lorsque des microporteurs usagés sont ajoutés avant l'agrégation, l'agrégation ne peut être évitée et une diminution de la concentration cellulaire est alors observée. Les cellules des agrégats de CSM porcines ne sont donc pas capables d'adhérer sur des microporteurs ayant été colonisés au préalable.

- Des ajouts répétés de microporteurs avant l'agrégation cellulaire permettent d'augmenter la concentration cellulaire

Lorsque des microporteurs frais sont ajoutés toutes les 96 h de culture, la concentration cellulaire augmente après chaque ajout, sans qu'aucune agrégation cellulaire n'apparaisse. Cette procédure permet ainsi de prolonger l'expansion des CSM dans le même système de culture sans nécessiter une étape de trypsination.

En flacon statique, la prolongation de la croissance cellulaire nécessite le détachement des cellules et leur ensemencement dans de nouveaux flacons. Lors de cultures sur microporteurs, la prolongation de la croissance cellulaire doit être favorisée en limitant l'agrégation due à l'agitation. Le microporteur Cytodex 1 devient malheureusement non apte à être colonisé par les cellules s'il a déjà été utilisé antérieurement. Au contraire, l'ajout de microporteurs frais avant le phénomène d'agrégation permet aux cellules d'adhérer aux nouveaux supports, ce qui limite les interactions cellules-cellules et la génération d'agrégats cellulaires. Les ajouts répétés de microporteurs sont ainsi un moyen d'amplifier les CSM porcines avec un taux d'expansion élevé, et ce, sans nécessiter d'étape intermédiaire de détachement des cellules.

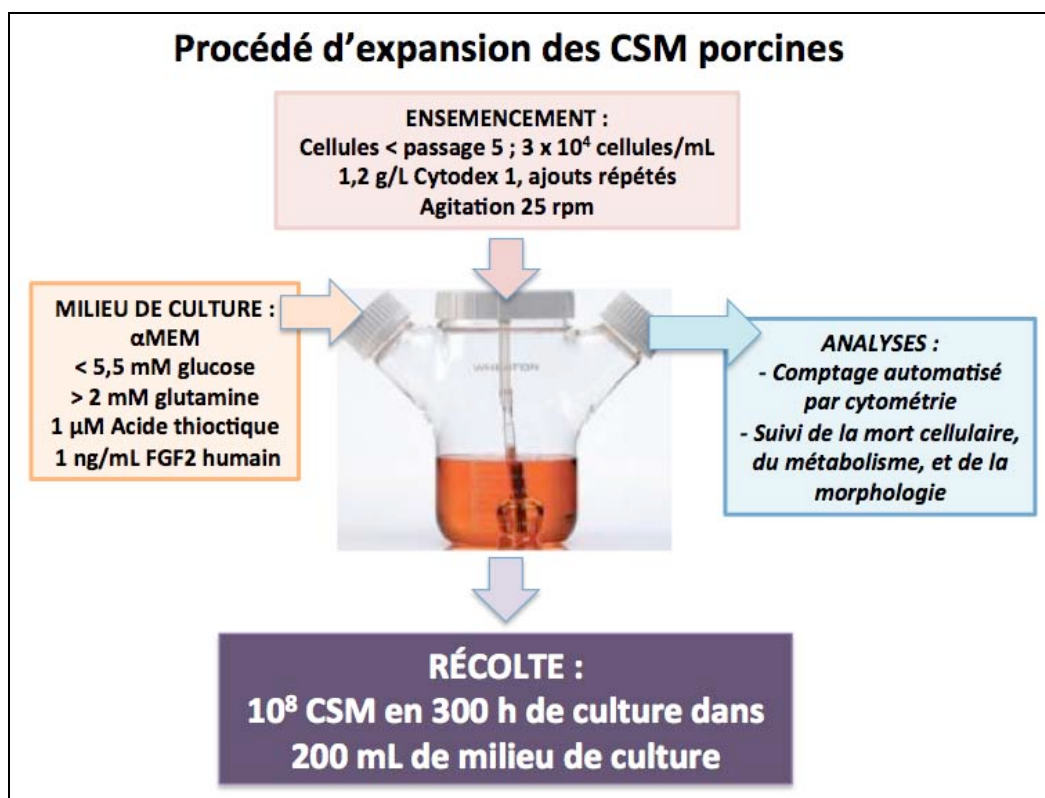


Figure 67. Résumé de la conclusion générale

Un procédé d'expansion efficace pour les CSM porcines a pu être mis en place grâce aux résultats de l'influence des paramètres environnementaux sur leur comportement. Ce procédé répond aux objectifs de maintien de la multipotence des cellules, de rapidité de croissance cellulaire, et de possibilité de montée en échelle. Ainsi, la multipotence des CSM porcines est maintenue après sept jours de culture en flacon statique dans le milieu de culture adapté. La multipotence est également conservée lors de l'expansion pendant 12 jours sur microporteurs Cytodex 1 avec une agitation à 25 rpm ou sans agitation. Enfin, la montée en échelle du procédé d'expansion est rendue possible grâce aux conditions agitées. En effet, ces conditions de culture sur Cytodex 1 permettent d'envisager sa mise en œuvre en bioréacteur contrôlé à plus grande échelle. Concernant les conditions opératoires, l'ajout de microporteurs frais en cours de culture permet de prolonger la croissance cellulaire sans nécessiter d'étape de trypsination. En parallèle, la méthode proposée pour le comptage des noyaux cellulaires par cytométrie assure un comptage automatisé des CSM sur microporteurs sans trypsination préalable.

Perspectives

Plusieurs perspectives ont été soulignées au cours de nos études sur les procédés d'expansion des CSM porcines. Ces principales pistes de recherches concernent l'utilisation de milieux sans sérum, l'étude des antioxydants, le développement de cultures en systèmes agités et sans support d'adhérence, ainsi que la mise en œuvre de cultures en bioréacteurs contrôlés dans le but d'améliorer encore l'expansion des CSM.

Utilisation de milieux sans sérum pour l'expansion de CSM

L'utilisation de CSM en médecine régénératrice incite à les cultiver dans des milieux exempts de composés d'origine animale. De ce fait, le sérum doit pouvoir être remplacé par d'autres composés. Il existe plusieurs milieux de culture sans sérum sur le marché, qui sont cependant très coûteux, et dont la composition reste confidentielle. Il serait donc intéressant de mettre au point, par nous même, un milieu sans sérum adapté aux CSM porcines. Là encore, les méthodes utilisées pour les lignées continues peuvent être transférées aux cas des CSM. Les milieux de culture sans sérum des lignées continues contiennent souvent diverses molécules recombinantes telles que l'insuline, l'albumine, ou encore la transferrine. En utilisant le Cellscreen®, l'influence de ces composés pourrait être évaluée en plaque-96 puits dans le milieu de base α MEM, supplémenté par le FGF2. L'utilisation d'un plan d'expériences serait pertinente pour réaliser une telle étude et tester un grand nombre de formulations.

Effet des antioxydants sur la croissance des CSM

L'intérêt d'étudier de façon plus approfondie les effets des antioxydants sur la croissance des CSM porcines réside dans l'espoir d'améliorer les procédés d'expansion des cellules. En effet, l'une des causes majeures de la baisse de prolifération cellulaire provient de la sénescence répliquative qui augmente avec le temps de culture. Or, les stress oxydatifs sont les principaux responsables de cette sénescence, et sont également impliqués dans la différenciation cellulaire (Kanda et al., 2011). Une maîtrise de ces stress oxydatifs pourrait donc améliorer la croissance des CSM et mieux contrôler le maintien de leur multipotence.

De plus, mes travaux ont montré que la croissance des CSM était influencée par la nature et la concentration de l'antioxydant ajouté au milieu de culture. En effet, la concentration cellulaire maximale augmente lorsque l'acide thiocétique (1 μ M) est présent dans le milieu de culture. Cependant, en présence de sélénite de sodium ou de β -mercaptoéthanol, cette concentration n'est pas améliorée, voire même

diminuée à fortes concentrations de ces antioxydants. Les mécanismes d'action de ces différents antioxydants, acide thiocétique, sélénite de sodium et β -mercaptoéthanol, empruntent probablement différentes voies de signalisation. Pour mieux comprendre l'influence d'antioxydants sur la croissance des CSM porcines, des mesures des stress oxydatifs intracellulaires et extracellulaires pourraient être mises en place. Une sonde redox placée dans le milieu de culture permettrait la mesure en ligne du potentiel redox extracellulaire, alors qu'un test en plaques 96-puits (Wang et al., 1999) ou par cytométrie (Stolzing et al., 2006) pourrait mesurer les stress oxydatifs intracellulaires. Ainsi, en cultivant les cellules en spinner en présence de différents antioxydants et à différentes concentrations, des études cinétiques de la formation des stress oxydants pourraient être réalisées et comparées avec les cinétiques de croissance.

Amélioration des cultures des CSM sur microporteurs en systèmes agités

La culture sur microporteurs a été choisie comme la plus adaptée aux CSM porcines, en particulier dans le cas du microporteur Cytodex 1. Cependant, des améliorations pourraient être apportées à ce système de culture. Tout d'abord, la protection des cellules contre les effets de l'agitation pourrait être favorisée, par exemple, par l'encapsulation des cellules adhérentes sur les microporteurs (Serra et al., 2011). D'autres techniques à évaluer pour diminuer les contraintes hydrodynamiques seraient l'augmentation de la viscosité du milieu de culture, ou encore l'ajout de surfactant (autre que le pluronic F68, ou à de plus faibles concentrations).

Par ailleurs, la surface des microporteurs Cytodex 1 pourrait être modifiée afin de limiter l'agrégation des CSM porcines. Etant donné que les surfaces chargées positivement diminuent la production de matrice extracellulaire par les cellules (Varani et al., 1995), une surface chargée négativement pourrait être envisagée pour éviter le détachement précoce des cellules.

Un autre inconvénient à l'utilisation de microporteurs est la difficulté pour récolter les cellules en fin de procédé d'expansion. En effet, la trypsination des cellules conduit souvent à une perte de cellules, due soit à des cellules qui ne se détachent pas, soit à des cellules endommagées par l'exposition à la trypsine. Afin de faciliter cette récolte cellulaire, des microporteurs capables de se dissoudre par modification du pH compatible à la survie cellulaire, ou encore, des microporteurs dont la surface devient hydrophobe lors d'un changement de température (surfaces UpCell® de Nunc®) pourraient être utilisés.

Enfin, la fonctionnalisation des microporteurs avec le facteur de croissance FGF2 permettrait sa libération ciblée, et une réduction des coûts. De tels microporteurs fonctionnalisés existent déjà avec d'autres molécules, et sont appelés PAM (Pharmacologically Active Microcarriers) (Tatard et al., 2004). Des progrès

notables peuvent donc être encore attendus dans l'expansion des CSM en conditions agitées et sur microporteurs.

Développement de cultures des CSM sans support d'adhérence en systèmes agités

Notre étude sur les procédés d'expansion en conditions agitées a montré que les CSM porcines s'agrégeaient massivement lors d'une agitation à 25 rpm en suspension unicellulaire. De même, les CSM porcines ensemencées sous formes d'agrégats de petites tailles s'agrégeaient massivement à 25 rpm. Aucune prolifération cellulaire apparente n'était visible dans ces conditions. Dans un premier temps, un meilleur contrôle de l'agrégation des CSM pourrait être réalisé en inhibant l'adhérence intercellulaire ou en limitant la taille des agrégats. Dans un second temps, une induction de la prolifération des cellules en suspension ou sous forme d'agrégats pourrait être réalisé. En parallèle, l'état physiologique des cellules à l'intérieur des agrégats devrait être étudiée par immunohistochimie ou par microscopie confocale. Cela permettrait de mieux observer la viabilité des cellules, l'apparition de cellules nécrosées au cœur de l'agrégat et son évolution en cours de culture, et surtout, la prolifération éventuelle des cellules en périphérie.

La limitation de la croissance des CSM en absence de support d'adhérence provient du phénomène d'anoïkis, une forme d'apoptose induite lorsque les cellules ne sont pas adhérentes (Valentijn et al., 2004). Une piste de recherche réside dans l'étude de Benoit et al. (2007) qui cible une molécule faisant le lien entre l'adhérence et la survie/prolifération des CSM, l'enzyme ILK (Integrin-Linked Kinase). L'activation de cette enzyme par transfection permet la survie et la prolifération des CSM sans aucune adhérence. Une seconde étude de Feng et al. (2007) cible une autre molécule impliquée dans l'anoïkis, la caspase 3. L'ajout d'un inhibiteur de la caspase 3 permet aux CSM de survivre dans des conditions non adhérentes. Ces deux études, réalisées en petits systèmes statiques, pourraient être transposées à des systèmes de culture agités. La sélection clonale de CSM survivant au mode de culture en suspension pourrait aussi être envisagée. Cette technique a été appliquée à la culture des CSM sur boîtes de Pétri, en récoltant les cellules non adhérentes à chaque passage (Zhang et al., 2009). En effet, une sous-population de CSM non adhérentes est généralement observée, cette existence étant appuyée par le fait que les CSM sont présentes dans la circulation sanguine (Roufosse et al., 2004). D'autre part, l'état adhérent des CSM dans la moelle osseuse reste toujours à démontrer (Zhang et al., 2009).

Concernant la culture de CSM sous forme d'agrégats, le principal problème réside dans le contrôle de la taille de ces agrégats. La technique la plus classique est la dissociation mécanique (Frith et al., 2010). Certains composés sont également connus pour limiter l'agrégation des cellules, tels que la trypsine et

l'EDTA (Li et al., 2011), ou les molécules contenant des sulfates (Dee et al., 1997), telles que le dextrane sulfate, la suramine (Nakata, 2004) et l'héparine (Li et al., 2011). Une technique utilisée pour les cellules souches embryonnaires (CSE) est l'inactivation de la protéine E-cadhérine, responsable des liaisons cellules-cellules. Cette inactivation peut être réalisée en enlevant le gène (knockout *Ecad*^{-/-}), ou en neutralisant la protéine avec un anticorps (*EcadAb*) (Mohamet et al., 2010). De cette manière, la culture de CSE en conditions agitées tout en limitant l'agrégation cellulaire a été rendue possible.

La culture de CSM porcines sans support d'adhérence présente plusieurs avantages. Parmi ceux-ci, une suppression des collisions entre porteurs et des résidus de particules issues des microporteurs, et une augmentation de l'homogénéité des cultures sont attendues. De plus, l'organisation cellulaire sous forme d'agrégats diminuerait la sensibilité aux contraintes hydrodynamiques et nécessiterait moins d'ajout de facteurs de croissance. Enfin, les procédés d'expansion seraient simplifiés au niveau des phases d'ensemencement et de récolte des cellules, ainsi que des étapes d'extrapolation.

Développement de culture de CSM en bioréacteurs contrôlés

La culture en bioréacteurs contrôlés présente de nombreux avantages par rapport aux cultures en spinner. En effet, les cultures en spinner rendent difficile le contrôle du pH et du taux d'oxygène dissous. Les spinners étant placés dans des incubateurs, l'étude de l'influence de ces paramètres physico-chimiques ne peut pas être précise. La géométrie des spinners est également un frein à la montée en échelle des cultures. De plus, les changements de milieu réalisés manuellement peuvent représenter un stress pour les cellules, et augmenter les risques de contaminations.

Le procédé d'expansion des CSM porcines sur Cytodex 1 pourrait donc être transposé du spinner au bioréacteur contrôlé. Pour cela, les bioréacteurs utilisés pour la culture de lignées continues pourraient être adaptés aux CSM. L'utilisation de sondes permettrait une mesure et un contrôle en ligne des paramètres physico-chimiques. La FDA (Food and Drug Administration) a d'ailleurs lancé en 2004 l'initiative PAT (Process Analytical Technology), destinée à améliorer les suivis en ligne des bioprocédés. L'un des nouveaux outils de suivi en ligne déjà utilisé pour les lignées cellulaires est la spectrométrie diélectrique, qui permet de déterminer la concentration en cellules vivantes par mesure de la permittivité. Cet outil a été testé récemment avec des CSM immortalisées et amplifiées sur microporteurs (Justice et al., 2011). D'autres stratégies concernent l'alimentation du milieu de culture. La mise en place de la perfusion du milieu de culture est déjà utilisée à grande échelle pour les lignées continues. Les cultures de CSM en conditions agitées pourraient bénéficier de ce mode perfusé, qui grâce à une stabilisation diminuerait le stress lié aux changements ponctuels de milieu. De plus, le régime de perfusion pourrait être contrôlé pour

assurer une modification du métabolisme induisant une production moindre de lactate et d'ions ammonium.

Afin de réduire les contraintes hydrodynamiques pouvant induire des différenciations cellulaires indésirables, diverses autres géométries et types d'agitation des bioréacteurs pourraient être évalués. Ainsi, certains bioréacteurs déjà utilisés pour la différenciation des CSM pourraient être adaptés à l'expansion. En effet, les premières cultures de CSM sur microporteurs ont été réalisées pour induire une différenciation ostéogénique en bioréacteur à rotation axiale (Qiu et al., 1998), et pour étudier l'effet de la microgravité en réacteur couette (Meyers et al., 2005). Ces réacteurs présentent des conditions de contraintes hydrodynamiques faibles. Un autre type de bioréacteur à faibles contraintes hydrodynamiques est le type Wave, déjà utilisé pour des lignées cellulaires telles que les cellules MDCK (Genzel et al., 2006).

La culture des CSM porcines en bioréacteur contrôlé permettrait d'étudier de façon plus précise et plus approfondie l'influence des paramètres physico-chimiques tels que le pH, l'oxygène dissous, la température et le potentiel redox sur la réponse cellulaire. En particulier, l'oxygène est un paramètre de culture dont l'influence sur le comportement des CSM est rapportée dans la littérature, notamment l'augmentation de la croissance des CSM à faible concentration d'oxygène dissous (Fehrer et al., 2007 ; Dos Santos et al., 2010 ; Schop, 2010). Des cultures en bioréacteur contrôlés permettraient ainsi d'étudier l'influence de l'hypoxie sur le métabolisme, l'agrégation, et l'apoptose de CSM porcines.

Les résultats présentés dans ce mémoire contribuent à une meilleure compréhension de l'influence des paramètres environnementaux de culture sur la réponse des CSM porcines. Un procédé d'expansion a été mis au point en conditions agitées pour amplifier les cellules rapidement, tout en maintenant leur multipotence et en limitant leur agrégation. L'expansion en masse des CSM n'en est cependant qu'à ses débuts. Il est certain que l'essor de la médecine régénératrice va provoquer une augmentation des besoins en CSM, imposant la maîtrise de procédés de culture à grande échelle.

Références Bibliographiques

A

- Ahn HJ, Lee WJ, Kwack K, Kwon YD (2009) FGF2 stimulates the proliferation of human mesenchymal stem cells through the transient activation of JNK signalling. *FEBS Letters* 583:2922-2926
- Akino K, Mineda T, Fukui M, Fujii T, Akita S (2003) Bone morphogenetic protein-2 regulates proliferation of human mesenchymal stem cells. *Wound Rep Reg* 11:354-360
- Alfred R, Radford J, Fan J, Boon K, Krawetz R, Rancourt D, Kallos MS (2010) Serum-Free Scaled Up Expansion and Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells to Osteoblasts in Suspension Bioreactors. *Biotechnol Prog* 106:829-840
- Al-Rubeai M, Oh SKW, Musaheb R, Emery AN (1990) Modified cellular metabolism in hybridomas subjected to hydrodynamic and other stresses. *Biotechnol Lett* 12:323-328
- Altman GH, Lu HH, Horan RL, Calabro T, Ryder D, Kaplan DL, Stark P, Martin I, Richmond JC, Vunjak-Novakovic G (2002) Advanced Bioreactor with Controlled Application of Multi-Dimensional Strain For Tissue Engineering. *J Biomech Eng* 124:742-749
- Amma H, Naruse K, Ishiguro N, Sokabe M (2005) Involvement of reactive oxygen species in cyclic stretch-induced NF- κ B activation in human fibroblast cells. *Br J Pharmacol* 145: 364–373
- Andrade-Zaldivar H, Santos L, De Leon Rodriguez A (2008) Expansion of human hematopoietic stem cells for transplantation: trends and perspectives. *Cytotechnology* 56:151-160
- Apel A, Groth A, Schlesinger S, Bruns H, Schemmer P, Büchler MW, Herr I (2009) Suitability of human mesenchymal stem cells for gene therapy depends on the expansion medium. *Exp Cell Res* 315:498-507
- Arii K, Kobayashi H, Kai T, Kokuba Y (1999) Degradation kinetics of L-glutamine in aqueous solution. *Eur J Pharm Sci* 9:75-78

B

- Baetz AL, Hubbert WT, Graham CK (1975) Developmental changes of free amino acids in bovine fetal fluids with gestational age and the interrelationships between the amino acid concentrations in the fluid compartments. *J Reprod Fert* 44:437-444
- Baksh D, Davies JE, Zandstra PW (2003) Adult human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells are capable of adhesion-independent survival and expansion. *Exp Hematol* 31:723-732
- Baksh D, Davies JE, Zandstra PW (2005) Soluble factor cross-talk between human bone marrow-derived hematopoietic and mesenchymal cells enhances in vitro CFU-F and CFU-O growth and reveals heterogeneity in the mesenchymal progenitor cell compartment. *Blood* 106:3012-3019
- Baksh D, Zandstra PW, Davies JE (2007) A Non-Contact Suspension Culture Approach to the Culture of Osteogenic Cells Derived from a CD49e^{low} Subpopulation of Human Bone Marrow-Derived Cells. *Biotechnol Bioeng* 98:1195-1208
- Banerjee M, Bhonde RR (2006) Application of hanging drop technique for stem cell differentiation and cytotoxicity studies. *Cytotechnology* 51:1-5

- Banes AJ, Lee G, Graff R, Otey C, Archambault J, Tsuzaki M, Elfervig M, Qi J (2001) Mechanical forces and signaling in connective tissue cells: cellular mechanisms of detection, transduction, and responses to mechanical deformation. *Curr Opin Orthop* 12:389-396
- Bartmann C, Rohde E, Schallmoser K, Pürstner P, Lanzer G, Linkesch W, Strunk D (2007) Two steps to functional mesenchymal stromal cells for clinical application. *Transfusion* 47:1426-1435
- Bartosh TJ, Ylostalo JH, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, Lee RH, Choi H, Prockop DJ (2010) Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:13724-13729
- Batorsky A, Liao J, Lund AW, Plopper GE, Stegemann JP (2005) Encapsulation of adult human mesenchymal stem cells within collagen-agarose microenvironments. *Biotechnol Bioeng* 92:492-500
- Bauwens CL, Peerani R, Niebruegge S, Woodhouse KA, Kumacheva E, Husain M, Zandstra PW (2008) Development of a Perfusion Fed Bioreactor for Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocyte Generation: Oxygen-Mediated Enhancement of Cardiomyocyte Output. *Stem Cells* 26:2300-2310
- Baghbaderani BA, Behie LA, Mukhida K, Hong M, Mendez I (2011) New Bioengineering Insights into Human Neural Precursor Cell Expansion in Culture. *Biotechnol Prog* 27:776-787
- Benoit DSW, Tripodi MC, Blanchette JO, Langer SJ, Leinwand L. A., Anseth, K. S. (2007) Integrin-linked kinase production prevents anoikis in human mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res* 81A:259-268
- Benoit DSW, Durney AR, Anseth KS (2007) The effect of heparinfunctionalized PEG hydrogels on three-dimensional human mesenchymal stem cell osteogenic differentiation. *Biomaterials* 28:66-77
- Bernardo ME, Avanzini MA, Perotti C, Cometa AM, Moretta A, Lenta E, Del Fante C, Novara F, De Silvestri A, Amendola G, Zuffardi O, Maccario R, Locatelli F (2006) Optimization of In Vitro Expansion of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells for Cell-Therapy Approaches: Further Insights in the Search for a Fetal Calf Serum Substitute. *J Cell Physiol* 211:121-130
- Bernardo ME, Cometa AM, Pagliara D, Vinti L, Rossi F, Cristantielli R, Palumbo G, Locatelli F (2011) Ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells. *Best Pract Res Clin Ha* 24:73-81
- Berrier AL, Yamada KM (2007) Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* 213:565-573
- Berthold A, Cremer K, Kreuter J (1998) Collagen microparticles: carriers for glucocorticosteroids. *Eur J Pharm Biopharm* 45:23-29
- Bisbal C, Lambert K, Avignon A (2010) Antioxidants and glucose metabolism disorders. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 13:439-446
- Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, Quarto R (2003) Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res* 287:98-105
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG (2001) Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. *Stem Cells* 19:180-192
- Bonab MM, Alimoghaddam K, Talebian F, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Nikbin B (2006) Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biology* 7:14 doi:10.1186/1471-2121-7-14
- Boo L, Selvaratnam L, Tai CC, Ahmad TS, Kamarul T (2011) Expansion and preservation of multipotentiality of rabbit bone-marrow derived mesenchymal stem cells in dextran-based microcarrier spin culture. *J Mater Sci: Mater Med* 22:1343-1356
- Borys MC, Papoutsakis ET (1992) Formation of bridges and large cellular clumps in CHO-cell microcarrier cultures: Effects of agitation dimethyl sulfoxide and calf serum. *Cytotechnology* 8:237-248

Bosch P, Pratt SL, Stice SL (2006) Isolation, characterization, gene modification, and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells. *Biol Reprod* 74:46-57

Boterberg T, Bracke ME, Bruyneel EA, Mareel MM. Cell aggregation assays. In: Brooks SA, Schumacher U. *Methods in molecular medicine*. Totowa: Humana, 2001:33-45.

Bourin P, Gadelorge M (2007) Les espoirs des cellules souches mésenchymateuses en médecine réparatrice. *Transfusion Clinique et Biologique* 14:120–126

Bouyer D, Coufort C, Line A, Do-Quang Z (2005) Experimental analysis of floc size distributions in a 1-L jar under different hydrodynamics and physicochemical conditions. *J Colloid Interface Sci* 292:413-428

Brinkmann M, Lütkemeyer D, Gudermann F, Lehmann J (2002) New technologies for automated cell counting based on optical image analysis 'the Cellscreen'. *Cytotechnology* 38:119-127

Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE (1997) Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64:278-294

Burg M, Quel G, Ruediger M, Zweigerdt R (2005) Expansion of murine embryonic stem cells on microcarriers-functional characteristics and scale-up potential. In: Gòdia F, Fussenegger M. *Animal Cell Technology meets Genomics*. The Netherlands: Springer, 2005:237-240.

Burleson KM, Hansen LK, Skubitz APN (2005) Ovarian carcinoma spheroids disaggregate on type I collagen and invade live human mesothelial cell monolayers. *Clin Exp Metastas* 21:685-697

Burns DM, Richter JD (2008) CPEB regulation of human cellular senescence, energy metabolism, and p53 mRNA translation. *Genes Dev* 22:3449-3460

C

Caplan AI, Bruder SP (2001) Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Medi* 7:259-264

Caplan AI, Dennis JE (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 98:1076-1084

Caplan AI (2007) Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 213:341-347

Caplan AI (2009) Why are MSCs therapeutic? New data: New insight. *J Pathol* 217:318-324

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J (2007) Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25:2739-2749

Chao KC, Yang HT, Chen MW (2011) Human umbilical cord mesenchymal stem cells suppress breast cancer tumorigenesis through direct cell-cell contact and internalization. *J Cell Mol Med* doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01459.x

Chen LB, Jiang XB, Yang L (2004) Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J Gastroenterol* 10:3016-3020

Chen X, Xu H, Wan C, McCaigue M, Li G (2006) Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:2052-2059

- Chen T, Zhou Y, Tan WS (2008) Influence of lactic acid on the proliferation, metabolism, and differentiation of rabbit mesenchymal stem cells. *Cell Biol Toxicol* doi 10.1007/s10565-008-9113-7
- Chen C-T, Shih Y-RV, Kuo TK, Lee OK, Wei Y-H (2008) Coordinated Changes of Mitochondrial Biogenesis and Antioxidant Enzymes During Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 26:960-968
- Chen J, Baydoun A, Xu R, Deng L, Liu X, Zhu W, Shi L, Cong X, Hu S, Chen X (2008) Lysophosphatidic Acid Protects Mesenchymal Stem Cells Against Hypoxia and Serum Deprivation-Induced Apoptosis. *Stem Cells* 26 :135-145
- Chen CT, Hsu SH, Wei YH (2010) Upregulation of mitochondrial function and antioxidant defence in the differentiation of stem cells. *Biochim Biophys Acta* 1800:257-263
- Chen AKL, Chen X, Choo ABH, Reuveny S, Oh SKW (2011) Critical microcarrier properties affecting the expansion of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cell Res* 7:97-111
- Chiba K, Kawakami K, Tohyama K (1998) Simultaneous Evaluation of Cell Viability by Neutral Red, MTT and Crystal Violet Staining Assays of the Same Cells. *Toxicology in Vitro* 12:251-258
- Chiquet M, Gelman L, Lutz R, Maier S (2009) From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* 1793:911-920
- Choi KM, Seo YK, Yoon HH, Song KY, Kwon SY, Lee HS, Park JK (2008) Effect of ascorbic acid on bone marrow derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *J Biosci Bioeng* 105:586-594
- Clark JM, Sidles JA (1990) The interrelation of fiber bundles in the anterior cruciate ligament. *J Orthop Res* 8:180-188
- Cohen M, Joester D, Geiger B, Addadi L (2004) Spatial and Temporal Sequence of Events in Cell Adhesion: From Molecular Recognition to Focal Adhesion Assembly. *ChemBioChem* 5:1393 – 1399 doi: 10.1002/cbic.200400162
- Cohen S, Samadikuchaksaraei A, Polak JM, Bishop AE (2006) Antibiotics reduce the growth rate and differentiation of embryonic stem cell cultures. *Tissue Eng* 12:2025-2030
- Colleoni S, Bottani E, Tessaro I, Mari G, Merlo B, Romagnoli N, Spadari A, Galli C, Lazzari G (2009) Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. *Vet Res Commun* doi: 10.1007/s11259-009-9229-0
- Comite P, Cobiainchi L, Avanzini MA, Zonta S, Mantelli M, Achille V, De Martino M, Cansolino L, Ferrari C, Alessiani M, Maccario R, Gandolfo GM, Dionigi P, Locatelli F, Bernardo ME (2010) Isolation and Ex Vivo Expansion of Bone Marrow-Derived Porcine Mesenchymal Stromal Cells: Potential for Application in an Experimental Model of Solid Organ Transplantation in Large Animals. *Transplant P* 42:1341-1343
- Coulombel L (2003) Cellules souches tissulaires adultes: seing is not being. *Médecine Science* 19:683-694
- Croughan MS, Hamel JF, Wang DIC (2000) Hydrodynamic effects on animal cells grown in microcarrier cultures. *Biotechnol Bioeng* 67:841-852
- Curran JM, Chen R, Hunt JA (2006) The guidance of human mesenchymal stem cell differentiation in vitro by controlled modifications to the cell substrate. *Biomaterials* 27:4783-4793

D

- da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119:2204-2213
- Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I (2006) The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev* 20:161-171

Debruyne D, Mareel M, Vanhoecke B, Bracke M (2009) Cell aggregation on agar as an indicator for cellmatrix adhesion: Effects of opioids. *In Vitro Cell Dev Biol Animal* 45:473-482

Dee K, Shuler ML, Wood HA (1997) Inducing single cell suspension of BTI-TN5B1-4 insect cells: I. The use of sulfated polyanions to prevent cell aggregation and enhance recombinant protein production. *Biotechnol Bioeng* 54:191–205

Deorosan B, Nauman EA (2011) The role of glucose, serum, and three-dimensional cell culture on the metabolism of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Int* doi:10.4061/2011/429187

Deuse T, Peter C, Fedak PWM, Doyle T, Reichenspurner H, Zimmermann WH, Eschenhagen T, Stein W, Wu JC, Robbins RC, Schrepfer S (2009) Hepatocyte growth factor or vascular endothelial growth factor gene transfer maximizes mesenchymal stem cell-based myocardial salvage after acute myocardial infarction. *Circulation* 120:S247-S254

Dingli D, Traulsen A, Michor F (2007) (A) Symmetric stem cell replication and cancer. *PLoS Comput Biol* 3(3): e53

Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noël D, Jorgensen C (2003) Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102:3837-3844

Docheva D, Popov C, Mutschler W, Schieker M (2007) Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J Cell Mol Med* 11:21-38

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop D J, Horwitz EM (2006) Cytotherapy 8:315-317

Dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MM, Da Silva CL, Cabral JMS (2010) Ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells: A more effective cell proliferation kinetics and metabolism under hypoxia. *J Cell Physiol* 223:27-35

Doucet C, Ernou I, Zhang Y, Llense J-R, Begot L, Holy X, Lataillade J-J (2005) Platelet Lysates Promote Mesenchymal Stem Cell Expansion: A Safety Substitute for Animal Serum in Cell-Based Therapy Applications. *J Cell Physiol* 205:228–236

Doverskog M, Ljunggren J, Öhman L, Häggström (1997) Physiology of cultured animal cells. *J Biotechnol* 59:103-115

Duelwellhenke N, Krut O, Eysel P (2007) Influence on Mitochondria and Cytotoxicity of Different Antibiotics Administered in High Concentrations on Primary Human Osteoblasts and Cell Lines. *Antimicrob Agents Chemother* 51:54-63

Durrieu MC (2005) Conception, élaboration et caractérisation de matériaux bioactifs. *ITBM-RBM* 26:229-237

E

Eagle H (1959) Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science* 130:432-437

Ebert R, Ulmer M, Zeck S, Meissner-Weigl J, Schneider D, Stopper H, Schupp N, Kassem M, Jakob F (2006) Selenium supplementation restores the antioxidative capacity and prevents cell damage in bone marrow stromal cells in vitro. *Stem Cells* 24:1226-1235

Eibes G, Dos Santos F, Andrade PZ, Boura JS, Abecasis MMA, da Silva CL, Cabral JMS (2010) Maximizing the ex vivo expansion of human mesenchymal stem cells using a microcarrier-based stirred culture system. *J Biotechnol* 146:194-197

Ellis SJ, Tanentzapf G (2010) Integrin-mediated adhesion and stem-cell-niche interactions. *Cell Tissue Res* 339:121-130

Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE (2006) Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* 126:677-689

Estrada JC, Albo C, Benguría A, Dopazo A, López-Romero P, Carrera-Quintanar L, Roche E, Clemente EP, Enríquez JA, Bernad A, Samper E (2011) Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death & Differentiation* doi:10.1038/cdd.2011.172

F

Fehrer C, Brunauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reitingner S, Kloss F, Güllly C, Gassner R, Lepperdinger G (2007) Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell* 6:745-757

Feng J, Yang S, Xu L, Tian H, Sun L, Tang X (2007) Role of Caspase-3 Inhibitor in Induced Anoikis of Mesenchymal Stem Cells *In Vitro*. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 27:183-185

Ferrari C, Balandras F, Guedon E, Olmos E, Chevalot I, Marc A. (2012) Limiting cell aggregation during mesenchymal stem cell expansion on microcarriers. *Biotechnol Prog* 28:3 780-787

Filipak M, Estervig DN, Tzen C-Y, Minoo P, Hoerl BJ, Maercklein PB, Zschunke MA, Edens M, Scott RE (1989) Integrated Control of Proliferation and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Environ Health Perspect* 80:117-125

Fok EYL, Zandstra PW (2005) Shear-controlled single-step mouse embryonic stem cell expansion and embryoid body-based differentiation. *Stem Cells* 23:1333-1342

Forte G, Minieri M, Cossa P, Antenucci D, Sala M, Gnocchi V, Fiaccavento R, Carotenuto F, De Vito P, Baldini PM, Prat M, Di Nardo P (2006) Hepatocyte growth factor effects on mesenchymal stem cells: Proliferation, migration, and differentiation. *Stem Cells* 24:23-33

Frauenschuh S, Reichmann E, Ibold Y, Goetz PM, Sittlinger M, Ringe J (2007) A microcarrier-based cultivation system for expansion of primary mesenchymal stem cells. *Biotechnol Prog* 23:187-193

Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP (1968) Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplant* 6:230–247

Freimark D, Pino-Grace P, Pohl S, Weber C, Wallrapp C, Geigle P, Pörtner R, Czermak P (2010) Use of Encapsulated Stem Cells to Overcome the Bottleneck of Cell Availability for Cell Therapy Approaches. *Transfus Med Hemother* 37:66–73

Friedl G, Schmidt H, Rehak I, Kostner G, Schauenstein K, Windhager R (2007) Undifferentiated human mesenchymal stem cells (hMSCs) are highly sensitive to mechanical strain: transcriptionally controlled early osteo-chondrogenic response in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 15:1293-1300

Frith JE, Thomson B, Genever PG (2010) Dynamic three-dimensional culture methods enhance mesenchymal stem cell properties and increase therapeutic potential. *Tissue Eng Part C* 16:735-749

G

Gandolfi F, Vanelli A, Pennarossa G, Rahaman M, Acocella F, Brevini TA (2011) Large animal models for cardiac stem cell therapies. *Theriogenology* 75:1416-1425

Garcia-Olmo D, García-Arranz M, Herreros D, Pascual I, Peiro C, Rodríguez-Montes JA (2005) A Phase I Clinical Trial of the Treatment of Crohn's Fistula by Adipose Mesenchymal Stem Cell Transplantation. *Dis Colon Rectum* 48:1416-1423

- Genzel Y, Olmer RM, Schäfer B, Reichl U (2006) Wave microcarrier cultivation of MDCK cells for influenza virus production in serum containing and serum-free media. *Vaccine* 24:6074-87
- Ghebeh H, Gillis J, Butler M (2002) Measurement of hydrophobic interactions of mammalian cells grown in culture. *J Biotechnol* 95:39-48
- Gigout A, Buschmann M, Jolicoeur M (2008) The fate of Pluronic F-68 in Chondrocytes and CHO cells. *Biotechnol Bioeng* 100:975-987
- Gilbertson JA, Sen A, Behie LA, Kallos MS (2006) Scaled-up production of mammalian neural precursor cell aggregates in computer-controlled suspension bioreactors. *Biotechnol Bioeng* 94:783-792
- Glantzounis GK, Tsimoyiannis EC, Kappas AM, Galaris DA (2005) Uric Acid and Oxidative Stress. *Curr Pharm Des* 11:4145-4151
- Glossop JR, Cartmell SH (2008) Effect of fluid flow-induced shear stress on human mesenchymal stem cell gene expression. *Eur Cells Mater* 16:29
- Godara P, Nordon RE, McFarland CD (2008) Design of bioreactors for mesenchymal stem cell tissue engineering. *J Chem Technol Biotechnol* 83:408-420
- Goetghebeur S, Hu WS (1990) Cultivation of anchorage-dependent animal cells in microsphere-induced aggregate culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 34:735-741
- Goldstein S (1990) Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science* 249:1129-1133
- Gonzalez-Perez O, Gonzalez-Castaneda RE (2006) Therapeutic perspectives on the combination of α -lipoic acid and vitamin E. *Nutr Res* 26:1-5
- Gourlay CW, Ayscough KR (2005) The actin cytoskeleton in ageing and apoptosis. *FEMS Yeast Res* 5:1193-1198
- Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T (2007) Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358:948-953
- Grayson WL, Martens TP, Eng GM, Radisic M, Vunjak-Novakovic G (2009) Biomimetic Approach to Tissue Engineering. *Semin Cell Dev Biol* 20:665-673
- Grenier B (1998) Normal blood-glucose concentration which range for what? *Diabetes Metab* 24:68-74
- Griffiths B (2001) Scale-Up of Suspension and Anchorage-Dependent Animal Cells. *Mol Biotechnol* 17:225-238
- Gurkan UA, Akkus O (2008) The Mechanical Environment of Bone Marrow: A Review. *Ann Biomed Eng* 36:1978-1991

H

- Han BS, Shen BY, Zhang R, Wang ZH, Du ZY, Cheng DF, Shi MM, Li HW, Peng CH (2009) Microcarrier cytodex 3 culture technique for amplification of a large amount of adult bone marrow mesenchymal stem cells. *J Clin Rehabil Tissue Eng Res* 13:1996-2000
- Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, and Dazzi F (2009) Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica* 94:258-263
- Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI (1996) Cytokine Expression by Human Marrow-Derived Mesenchymal - Progenitor Cells In Vitro: Effects of Dexamethasone and 11-1 a. *J Cell Physiol* 166:585-592

- Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585-621
- Hewitt CJ, Lee K, Nienow AW, Thomas RJ, Smith M, Thomas CR (2011) Expansion of human mesenchymal stem cells on microcarriers *Biotechnol Lett* 33:2325-2335
- Higuera G, Schop D, Janssen F, van Dijkhuizen-Radersma R, van Bortel T, van Blitterswijk CA. (2009) Quantifying in vitro growth and metabolism kinetics of human mesenchymal stem cells using a mathematical model. *Tissue Eng Part A* 15:2653-2663
- Hiyama E, Hiyama K (2007) Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer* 96:1020-1024
- Hong JH, Yaffe MB (2006) A beta-Catenin-Like Molecule That Regulates Mesenchymal Stem Cell Differentiation. *Cell Cycle* 5:176-179
- Huang AH, Farell MJ, Mauck RL (2010) Mechanics and Mechanobiology of Mesenchymal Stem Cell-Based Engineered Cartilage. *J Biomech* 43:128 doi:10.1016/j.jbiomech.2009.09.018
- Hui JHP, Ouyang HW, Hutmacher DW, Goh JCH, Lee EH (2005) Mesenchymal Stem Cells in Musculoskeletal Tissue Engineering: A Review of Recent Advances in National University of Singapore. *Ann Acad Med Singapore* 34:206-212
- I
- Inui K, Oreffo ROC, Triffitt JT (1997) Effects of beta mercaptoethanol on the proliferation and differentiation of human osteoprogenitor cells. *Cell Biol Int* 21:419-425
- Iyer S, Rojas M (2008) Anti-inflammatory effects of mesenchymal stem cells: novel concept for future therapies. *Expert Opin Biol Ther* 8:569-581
- Izadpanah R, Kaushal D, Kriedt C, Tsien F, Patel B, Dufour J, Bunnell BA (2008) Long-term In vitro Expansion Alters the Biology of Adult Mesenchymal Stem Cells. *Cancer Res* 68:4229-4238
- J
- Javazon EH, Colter DC, Schwarz EJ, Prockop DJ (2001) Rat marrow stromal cells are more sensitive to plating density and expand more rapidly from single-cell-derived colonies than human marrow stromal cells. *Stem Cells* 19:219-225
- Jeon ES, Moon HJ, Lee MJ, Song HY, Kim YM, Bae YC, Jung JS, Kim JH (2006) Sphingosylphosphorylcholine induces differentiation of human mesenchymal stem cells into smoothmuscle-like cells through a TGF-beta-dependent mechanism. *J Cell Sci* 119:4994-5005
- Jin Y, Kato T, Furu M, Nasu A, Kajita Y, Mitsui H, Ueda M, Aoyama T, Nakayama T, Nakamura T, Toguchida J (2007) Mesenchymal stem cells cultured under hypoxia escape from senescence via down-regulation of p16 and extracellular signal regulated kinase. *Biochem Bioph Res Co* 391:1471-1476
- Jones E, McGonagle D (2008) Human bone marrow mesenchymal stem cells *in vivo*. *Rheumatology* 38:1653-1664
- Jorgensen C, Gordeladze J, Noël D (2004) Tissue engineering through autologous mesenchymal stem cells. *Curr Opin Biotech* 15:406-410
- Joyce N, Annett G, Wirthlin L, Olson S, Bauer G, Nolta JA (2010) Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease. *Regen Med* 5:933-946
- Jung MR, Min YL, Seung PY, Ho JH (2010) High glucose regulates cyclin D1/E of human mesenchymal stem cells through TGF- β 1 expression via Ca²⁺/PKC/MAPKs and PI3K/Akt/mTOR signal pathways. *J Cell Physiol* 224:59-70

Justice C, Leber J, Freimark D, Pino Grace P, Kraume M, Czermak P (2011) Online- and offline-monitoring of stem cell expansion on microcarrier. *Cytotechnology* doi 10.1007/s10616-011-9359-4

K

Kahn CJ, Vaquette C, Rahouadj R, Wang X (2008) A novel bioreactor for ligament tissue engineering. *Biomed Mater Eng* 18:283-287

Kallos MS, Sen A, Behie LA (2003) Large-scale expansion of mammalian neural stem cells: a review *Med Biol Eng Comput* 41:271-282

Kan I, Melamed E, Offen D (2005) Integral Therapeutic Potential of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Curr Drug Targets* 6:31-41

Kan I, Melamed E, Offen D, Green P (2007) Docosahexaenoic acid and arachidonic acid are fundamental supplements for the induction of neuronal differentiation. *J Lipid Res* 48:513-517

Kanda Y, Hinata T, Kang SW, Watanabe Y (2011) Reactive oxygen species mediate adipocyte differentiation in mesenchymal stem cells. *Life Sci* 89:250-258

Karlsen TA, Mirtaheri P, Shahdadfar A, Fløisand Y, Brinchmann JE (2011) Effect of Three-Dimensional Culture and Incubator Gas Concentration on Phenotype and Differentiation Capability of Human Mesenchymal Stem Cells. *Journal Cell Biochem* 112:684–693

Kasper G, Mao L, Geissler S, Draycheva A, Trippens J, Kühnisch J, Tschirschmann M, Kaspar K, Perka C, Duda GN, Klose J (2009) Insights into Mesenchymal Stem Cell Aging: Involvement of Antioxidant Defense and Actin Cytoskeleton. *Stem Cells* 27:1288-1297

Kasten P, Beyen I, Egermann M, Suda AJ, Moghaddam AA, Zimmermann G, Luginbühl R (2008) Instant stem cell therapy: Characterization and concentration of human mesenchymal stem cells in vitro. *Eur Cells Mater* 16:47-55

Keane JT, Ryan D, Gray PP (2003) Effect of shear stress on expression of a recombinant protein by Chinese hamster ovary cells. *Biotechnol Bioeng* 81:211-220

Kearney EM, Prendergast PJ, Campbell VA (2008) Mechanisms of strain-mediated mesenchymal stem cell apoptosis. *J Biomech Eng* 130 doi: 10.1115/1.2979870

Keenan J, Pearson D, Clynes M (2006) The role of recombinant proteins in the development of serum-free media. *Cytotechnology* 50:49-56

Khaw K-T, Woodhouse P (1995) Interrelation of vitamin C, infection, haemostatic factors, and cardiovascular disease. *BMJ* 310:1559-63

Kim BS, Choi YH, Choi CY, Kim BG (1992) Mammalian cell cultivation on serum-coated microcarriers. *Biotechnol Tech* 6:347-352

Kim BS, Lee CCI, Christensen JE, Huser TR, Chan JW, Tarantal AF (2008) Growth, Differentiation, and Biochemical Signatures of Rhesus Monkey Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev* 17:185-198

Kim J, Kang JW, Park JH, Choi Y, Choi KS, Park KD, Baek DH, Seong SK, Min H-K, Kim HS (2008) Biological Characterization of Long-term Cultured Human Mesenchymal Stem Cells. *Arch Pharm Res* 32:117-126

Kinnaird T, Burnett ES, Shou M, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE (2004) Local Delivery of Marrow-Derived Stromal Cells Augments Collateral Perfusion Through Paracrine Mechanisms. *Circulation* 109:1543-1549

Kino-oka M, Taya M (2009) Recent developments in processing systems for cell and tissue cultures toward therapeutic application. *J Biosci Bioeng* 108:267-276

Kocaoemer A, Kern S, Klüter H, Bieback K (2007) Human AB Serum and Thrombin-Activated Platelet-Rich Plasma Are Suitable Alternatives to Fetal Calf Serum for the Expansion of Mesenchymal Stem Cells from Adipose Tissue. *Stem Cells* 25:1270-1278

Kohn DH, Sarmadi M, Helman JI, Krebsbach PH (2002) Effects of pH on human bone marrow stromal cells in vitro: Implications for tissue engineering of bone. *J Biomed Mater Res* 60:292-299

Kolf CM, Cho E, Tuan RS (2007) Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis Res Ther* 9:204

Korn C, Schwarz US (2006) Efficiency of Initiating Cell Adhesion in Hydrodynamic Flow. *Physical Review Letter* 97:138103 doi: 10.1103/PhysRevLett.97.138103

Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Izawa Y, Kanematsu Y, Tamaki T (2004) Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases. *Acta Pharmacol Sin* 25:977-985

L

Lai Y, Xie C, Zhang Z, Lu W, Ding J (2010) Design and synthesis of a potent peptide containing both specific and non-specific cell-adhesion motifs. *Biomaterials* 31:4809-4817

Lakhotia S, Papoutsakis E (1991) Agitation induced cell injury in microcarrier cultures. Protective effect of viscosity is agitation intensity dependent: Experiment and modeling. *Biotechnol Bioeng* 39:95-107

Lange C, Cakiroglu F, Spiess A-N, Cappalo-Obermann H, Dierlamm J, Zander AR (2007) Accelerated and Safe Expansion of Human Mesenchymal Stromal Cells in Animal Serum-Free Medium for Transplantation and Regenerative Medicine. *J Cell Physiol* 213:18-26

Lee JH, Lee SJ, Khang G, Lee HB (2000) The effect of fluid shear stress on endothelial cell adhesiveness to polymer surfaces with wettability gradient. *J Colloid Interface Sci* 230:84-90

Lee WY, Chang YH, Yeh YC, Chen CH, Lin KM, Huang CC, Chang Y, Sung HW (2009) The use of injectable spherically symmetric cell aggregates self-assembled in a thermo-responsive hydrogel for enhanced cell transplantation. *Biomaterials* 30:5505-5513

Lehoux S, Tedgui A (2004) Bases cellulaires de la mécanotransduction dans la cellule endothéliale. *Médecine Sciences* 20:551-556

Levenberg S, Katz BZ, Yamada KM, Geiger B (1998) Long-range and selective autoregulation of cell-cell or cell-matrix adhesions by cadherin or integrin ligands. *J Cell Sci* 111:347-357

Li YM, Schilling T, Benisch P, Zeck S, Meissner-Weigl J, Schneider D, Limbert C, Seufert J, Kassem M, Schütze N, Jakob F, Ebert R (2007) Effects of high glucose on mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. *Biochem Bioph Res Co* 363:209-215

Li L, Qin J, Feng Q, Tang H, Liu R, Xu L, Chen Z (2011) Heparin Promotes Suspension Adaptation Process of CHO-TS28 Cells by Eliminating Cell Aggregation. *Mol Biotechnol* 47:9-17

Lim HS, Kim JH (1995) Chemical Modification of Macroporous Gelatin Microcarriers and Characterization of Cell Growth and Attachment. *J Microbiol Biotechnol* 5:163-166

Liu H, Liu X-M, Wu B-C, Ye L-L, Ni X-P, Wang Q-W, Chen Z-L (2006) Effects of Hydrodynamics on Aggregates Formation, Growth and Metabolism of HEK 293 Cells in Suspension Culture. *Chin J Biotechnol* 22:101-106

Liu C-H, Wu M-L, Hwang S-M (2007) Optimization of serum free medium for cord blood mesenchymal stem cells. *Biochem Eng J* 33:1-9

Liu L, Rando TA (2011) Manifestations and mechanisms of stem cell aging. *J Cell Biol* 193:257-266

Lu GZ, Thompson BG, Gray MR (1992) Physical Modeling of Animal Cell Damage by Hydrodynamic Forces in Suspension Cultures. *Biotechnol Bioeng* 40:1277-1281

Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, Cenacchi A, Del Vento AM, Meotti C, Bertoja AZ, Giardino R, Fornasari PM, Mercuri M, Picci P (2003) Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 24:3095-3100

M

Mahajan A, Stahl CH (2009) Dihydroxy-cholecalciferol stimulates adipocytic differentiation of porcine mesenchymal stem cells. *J Nutr Biochem* 20:512-520

Major R, Bruckert F, Lackner JM, Waldhauser W, Pietrzyk M, Major B (2008) Kinetics of eukaryote cells adhesion under shear flow detachment on the PLD deposited surfaces. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences: Technical Sciences* 56:223-228

Malafaya PB, Silva GA, Reis RL (2007) Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv Drug Deliv Rev* 59:207-233

Martin Y, Eldardiri M, Lawrence-Watt DJ, Sharpe JR (2011) Microcarriers and their potential in tissue regeneration. *Tissue Eng B Rev* 17:71-80

Mason C, Dunnill P (2008) A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med* 3:1-5

McBeath R, Pirone DM, Nelson CM, Bhadriraju K, Chen CS (2004) Cell Shape, Cytoskeletal Tension, and RhoA Regulate Stem Cell Lineage Commitment. *Developmental Cell* 6:483-495

Meister A, Anderson ME (1983) Glutathione. *Ann Rev Biochem* 52:711-760

Meyers V, Zayzafoon M, Douglas JT, McDonald JM (2005) RhoA and Cytoskeletal Disruption Mediate Reduced Osteoblastogenesis and Enhanced Adipogenesis of Human Mesenchymal Stem Cells in Modeled Microgravity. *J Bone Miner Res* 20:1858-1866

Mohamet L, Lea ML, Ward CM (2010) Abrogation of E-cadherin-mediated cellular aggregation allows proliferation of pluripotent mouse embryonic stem cells in shake flask bioreactors. *PLoS ONE* 5:e12921 doi:10.1371/journal.pone.0012921

Molchanova EA, Payushina OV, Starostin VI (2008) Effects of growth factors on multipotent bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biol Bull* 35:555-570

Moreira JL, Santana PC, Feliciano AS, Cruz PE, Racher AJ, Griffiths JB, Carrondo MJT (1995) Effect of Viscosity upon Hydrodynamically Controlled Natural Aggregates of Animal Cells Grown in Stirred Vessels. *Biotechnol Prog* 11:575-583

Morrison JA, Jacobsen DW, Sprecher DL, Robinson K, Khoury P, Daniels SR (1999) Serum glutathione in adolescent males predicts parental coronary heart disease. *Circulation* 100:2244-2247

Mukhopadhyay A, Mukhopadhyay, SN, Talwar GP (1993) Influence of serum proteins on the kinetics of attachment of Vero cells to Cytodex microcarriers. *J Chem Technol Biotechnol* 56:369-374

Mylotte LA, Duffy AM, Murphy M, O'Brien T, Samali A, Barry F, Szegezdi E (2008) Metabolic flexibility permits mesenchymal stem cell survival in an ischemic environment. *Stem Cells* 26:1325-1336

N

- Nakata H (2004) Stimulation of extracellular signal-regulated kinase pathway by suramin with concomitant activation of DNA synthesis in cultured cells. *J Pharmacol Exp Ther* 308:744-753
- Neuhuber B, Swanger SA, Howard L, Mackay A, Fischer I (2008) Effects of plating density and culture time on bone marrow stromal cell characteristics. *Exp Hematol* 36:1176-1185
- Ng YL, Chase HA (2008) Novel bioreactors for the culture and expansion of aggregative neural stem cells. *Bioprocess Biosyst Eng* 31:393-400
- Nie Y, Bergendahl V, Hei DJ, Jones JM, Palecek SP (2009) Scalable culture and cryopreservation of human embryonic stem cells on microcarriers. *Biotechnol Prog* 25:20-31

O

- Ohnishi S, Yasuda T, Kitamura S, Nagaya N (2007) Effect of Hypoxia on Gene Expression of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Mononuclear Cells. *Stem Cells* 25:1166-1177

P

- Papoutsakis ET (2009) From CHO-Cell to Stem-Cell Biotechnology, Oxygenation, and Mixing in Animal-Cell Culture: Bioreactors, Bubbles, and Cell Injury. *Biotechnol Bioeng* 102:977-979
- Park JS, Chu JSF, Cheng C, Chen F, Chen D, Li S (2004) Differential Effects of Equiaxial and Uniaxial Strain on Mesenchymal Stem Cells. *Wiley InterScience* doi: 10.1002/bit.20250
- Petersen J, McIntire L, Papoutsakis E (1988) Shear sensitivity of cultured hybridoma cells (CRL-8018) depends on mode of growth, culture age and metabolite concentration. *J Biotechnol* 7:229-246
- Phinney DG, Prockop DJ (2007) Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem cells* 25:2896-2902
- Placzek MR, Chung I-M, Macedo HM, Ismail S, Blanco TM, Lim M, Cha JM, Fauzi I, Kang Y, Yeo DCL, Ma CYJ, Polak JM, Panoskaltsis N, Mantalaris A (2009) *J R Soc Interface* 6:209-232
- Pochampally RR, Smith JR, Ylostalo J, Prockop DJ (2004) Serum deprivation of human marrow stromal cells (hMSCs) selects for a subpopulation of early progenitor cells with enhanced expression of *OCT-4* and other embryonic genes. *Blood* 103:1647-1652
- Potapova IA, Gaudette GR, Brink PR, Robinson RB, Rosen MR, Cohen IS, Doronin SV (2007) Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. *Stem Cells* 25:1761-1768
- Potapova IA, Brink PR, Cohen IS, Doronin SV (2008) Culturing of human mesenchymal stem cells as three-dimensional aggregates induces functional expression of CXCR4 that regulates adhesion to endothelial cells. *J Biol Chem* 283:13100-13107
- Pountos I, Corscadden D, Emery P, Giannoudis PV (2007) Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application. *Injury, Int J Care Injured* 38S4:S23-S33

Q

Qiu Q, Ducheyne P, Gao H, Ayyaswamy P (1998) Formation and differentiation of three-dimensional rat marrow stromal cell culture on microcarriers in a rotating-wall vessel. *Tissue Eng* 4:19-34

R

Ratajczak MZ, Kucia M, Majka M, Reza R, Ratajczak J (2004) Heterogeneous populations of bone marrow stem cells-are we spotting on the same cells from the different angles? *Folia Histochemica et Cytobiologica* 42:139-146

Reddig PJ, Juliano RL (2005) Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metast Rev* 24:425-439

Riddle RC, Taylor AF, Genetos DC, Donahue HJ (2006) MAP kinase and calcium signaling mediate fluid flow-induced human mesenchymal stem cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol* 290:C776-C784

Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Büscher K, Bartel J, Smolian H, Schultz O, Burmester GR, Häupl T, Sittering M (2002) Porcine mesenchymal stem cells: Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res* 307:312-327

Rocha A, Hahn M, Liang H (2010) Critical fluid shear stress analysis for cell-polymer adhesion. *J Mater Sci* 45:811-817

Rocheffort GY, Delorme B, Lopez A, Héroult O, Bonnet P, Charbord P, Eder V, Domenech J (2006) Multipotential Mesenchymal Stem Cells Are Mobilized into Peripheral Blood by Hypoxia. *Stem Cells* 24:2202-2208

Rosenbaum AJ, Grande DA, Dines JS (2008) The use of mesenchymal stem cells in tissue engineering. *Organogenesis* 4:23-27

Roth E (2008) Nonnutritive effects of glutamine. *J Nutr* 138:2025S-2031S

Roufosse CA, Direkze NC, Otto WR, Wright NA (2004) Circulating mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36:585-597

Rourou S, van der Ark A, van der Velden T, Kallel H (2007) A microcarrier cell culture process for propagating rabies virus in Vero cells grown in a stirred bioreactor under fully animal component free conditions. *Vaccine* 25 :3879-3889

Rubio D, Garcia S, Paz MF, De la Cueva T, Lopez-Fernandez LA, Lloyd AC, Garcia-Castro J, Bernad A (2008) Molecular characterization of spontaneous mesenchymal stem cell transformation. *PLoS ONE* 3(1): e1398

Ryan PL, Foty RA, Kohn J, Steinberg MS (2001) Tissue spreading on implantable substrates is a competitive outcome of cell-cell vs. cell-substratum adhesivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:4323-4327

S

Sahin E, Depinho RA (2010) Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature* 464:520-528

Safaralizadeh R, Kardar GA, Pourpak Z, Moin M, Zare A, Teimourian S (2005) Serum concentration of Selenium in healthy individuals living in Tehran. *Nutr J* 4:32 doi: 10.1186/1475-2891-4-32

Saleh FA, Genever PG (2011) Turning round: multipotent stromal cells, a three-dimensional revolution? *Cytotherapy* doi:10.3109/14653249.2011.586998

Santos FD, Andrade PZ, Abecasis MM, Gimble JM, Chase LG, Campbell AM, Boucher S, Vemuri MC, Silva CLD, Cabral JMS (2011) Toward a clinical-grade expansion of mesenchymal stem cells from human sources: A microcarrier-based culture system under xeno-free conditions. *Tissue Eng Part C* 17:1201-1210

- Sanz C, Vazquez P, Blazquez C, Barrio PA, Alvarez MM, Blazquez (2010) Signaling and biological effects of glucagon-like peptide 1 on the differentiation of mesenchymal stem cells from human bone marrow. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298: E634–E643
- Sarugaser R, Hanoun L, Keating A, Stanford WL, Davies JE (2009) Human mesenchymal stem cells self-renew and differentiate according to a deterministic hierarchy. *PLoS ONE* 4:8
- Sart S, Schneider YJ, Agathos SN (2009) Ear mesenchymal stem cells: An efficient adult multipotent cell population fit for rapid and scalable expansion. *J Biotechnol* 139:291-299
- Sart S, Schneider YJ, Agathos SN (2010) Influence of culture parameters on ear mesenchymal stem cells expanded on microcarriers. *J Biotechnol* 150:149-160
- Scaglione S, Wendt D, Miggino S, Papadimitropoulos A, Fato M, Quarto R, Martin I (2008) Effects of fluid flow and calcium phosphate coating on human bone marrow stromal cells cultured in a defined 2D model system. *J Biomed Mater Res A* 86:411-419
- Schop D (2010) Growth and metabolism of mesenchymal stem cells cultivated on microcarriers. Thèse Régénération tissulaire. Université de Twente, Pays-Bas. <http://dx.doi.org/10.3990/1.9789036530187>
- Schop D, Janssen FW, Borgart E, de Bruijn JD, van Dijkhuizen-Radersma R (2008) Expansion of mesenchymal stem cells using a microcarrier-based cultivation system: growth and metabolism. *J Tissue Eng Regen Med* 2:126-135
- Schop D, Janssen FW, Van Rijn LDS, Fernandes H, Bloem RM, De Bruijn JD, Van Dijkhuizen-Radersma R (2009) Growth, metabolism, and growth inhibitors of mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 15:1877-1886
- Schop D, Van Dijkhuizen-Radersma R, Borgart E, Janssen FW, Rozemuller H, Prins HJ, De Bruijn JD (2010) Expansion of human mesenchymal stromal cells on microcarriers: Growth and metabolism. *J Tissue Eng Regen Med* 4:131-140
- Seib FP, Prewitz M, Werner C, Bornhäuser M (2009) Matrix elasticity regulates the secretory profile of human bone marrow-derived multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) *Biochem Biophys Res Commun* 389:663–667
- Sekiya I, Larson BL, Smith JR, Pochampally R, Cui J-G, Prockop DJ (2002) Expansion of Human Adult Stem Cells from Bone Marrow Stroma: Conditions that Maximize the Yields of Early Progenitors and Evaluate Their Quality. *Stem Cells* 6:530-541
- Seluanov A, Gorbunova V, Falcovitz A, Sigal A, Milyavsky M, Zurer I, Shohat G, Goldfinger N, Rotter V (2001) Change of the Death Pathway in Senescent Human Fibroblasts in Response to DNA Damage Is Caused by an Inability To Stabilize p53. *Mol Cell Biol* 21:1552-1564
- Serra M, Brito C, Leite SB, Gorjup E, von Briesen H, Carrondo MJT, Alves PM (2009) Stirred bioreactors for the expansion of adult pancreatic stem cells *Ann Anat* 191:104-115
- Serra M, Correia C, Malpique R, Brito C, Jensen J, Bjorquist P, Carrondo MJ, Alves PM (2011) Microencapsulation technology: a powerful tool for integrating expansion and cryopreservation of human embryonic stem cells. *PLoS One* 6(8):e23212
- Sethe S, Scutt A, Stolzing A (2006) Aging of mesenchymal stem cells. *Ageing Res Rev* 5:91-116
- Shahdadfar A, Fronsdal K, Haug T, Reinholt FP, Brinchmann JE (2005) In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: Choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells* 23:1357-1366
- Sharpless NE, DePinho RA (2004) Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *J Clin Invest* 113:160-168

- Shay KP, Moreau RF, Smith EJ, Smith AR, Hagen TM (2009) Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta* 1790: 1149-1160
- Shaw R (2010) Industrializing stem cell production. *Bioprocess International* October 2010:10-15
- Sherley JL (2002) Asymmetric Cell Kinetics Genes: The Key to Expansion of Adult Stem Cells in Culture. *Stem cells* 20:561-572
- Shipitsin M, Polyak K (2008) The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance. *Laboratory Investigation* 88:459-463
- Shiragami N, Hakoda M, Enomoto A, Hoshino T (1997) Hydrodynamic effect on cell attachment to microcarriers at initial stage of microcarrier culture. *Bioprocess Eng* 16:399-401
- Short B, Brouard N, Occhiodoro-Scott T, Ramakrishnan A, Simmons PJ (2003) Mesenchymal stem cells. *Arch Med Res* 34:565-571
- Solchaga LA, Penick K, Porter JD, Goldberg VM, Caplan AI, Welter JF (2005) FGF-2 enhances the mitotic and chondrogenic potentials of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 203:398-409
- Song G, Ju Y, Soyama H (2008) Growth and proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells affected by type I collagen, fibronectin and bFGF. *Mater Sci Eng C* 28:1467-1471
- Song H, Cha M-J, Song B-W, Kim I-K, Chang W, Lim S, Choi EJ, Ham O, Lee S-Y, Chung N, Jang Y, Hwang K-C (2010) Reactive Oxygen Species Inhibit Adhesion of Mesenchymal Stem Cells Implanted into Ischemic Myocardium via Interference of Focal Adhesion Complex. *Stem Cells* 28:555-563
- Song H, Chang W, Song B-W, Hwang K-C (2012) Specific differentiation of mesenchymal stem cells by small molecules. *Am J Stem Cell* 1:22-30
- Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, Baxevanis CN, Papamichail M (2006) Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:462-471
- Stolzing A, Coleman N, Scutt A (2006) Glucose-induced replicative senescence in mesenchymal stem cells. *Rejuven Res* 9:31-35
- Styner M, Sen B, Xie Z, Case N, Rubin J (2010) Indomethacin promotes adipogenesis of mesenchymal stem cells through a cyclooxygenase independent mechanism. *J Cell Biochem* 111:1042–1050
- Subramanian K, Park Y, Verfaillie CM, Hu WS (2010) Scalable expansion of multipotent adult progenitor cells as three-dimensional cell aggregates. *Biotechnol Bioeng* 108:364-375
- Suh JH, Shenvi SV, Dixon BM, Liu H, Jaiswal AK, Liu RM, Hagen TM (2004) Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3381-3386
- Sun L-Y, Hsieh D-K, Syu W-S, Li Y-S, Chiu H-T, Chiou T-W (2010) Cell proliferation of human bone marrow mesenchymal stem cells on biodegradable microcarriers enhances in vitro differentiation potential. *Cell Prolif* 43:445-456
- Sun L-Y, Lin S-Z, Li Y-S, Harn H-J, Chiou T-W (2011) Functional Cells Cultured on Microcarriers for Use in Regenerative Medicine Research. *Cell Transplant* 20:49-62
- Sundar IK, Caito S, Yao H, Rahman I (2010) Oxidative stress, thiol redox signaling methods in epigenetics. *Methods Enzymol* 474:213-44

T

Tamama K, Fan VH, Griffith LG, Blair HC, Wells A (2006) Epidermal Growth Factor as a Candidate for Ex Vivo Expansion of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells* 24:686-695

Tatard VM, Venier-Julienne MC, Benoit JP, Menei P, Montero-Menei CN (2004) *In vivo* evaluation of pharmacologically active microcarriers releasing nerve growth factor and conveying PC12 cells. *Cell Transplant* 13:573-83

Teichert J, Preiss R (1992) HPLC-methods for determination of lipoic acid and its reduced form in human plasma. *Int J Clin Pharmacol Ther Tox* 30:511-512

Tharmalingam T, Sunley K, Spearman M, Butler M (2010) Enhanced Production of Human Recombinant Proteins from CHO cells Grown to High Densities in Macroporous Microcarriers. *Mol Biotechnol* doi 10.1007/s12033-011-9401-y

Tozer S, Duprez D (2005) Tendon and ligament: Development, repair and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 75:226-236

Trounson A, Thakar RG, Lomax G, Gibbons D (2011) Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Medecine* 9:52

Tsai J, Kam L (2009) Rigidity-dependent cross talk between integrin and cadherin signaling. *Biophys J* 96:L39-L41

Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, Takagishi K, Kato Y (2001) Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Bioph Res Co* 288:413-419

Tzoneva R, Faucheux N, Groth T (2007) Wettability of substrata controls cell-substrate and cell-cell adhesions. *Biochim Biophys Acta* 1770:1538-1547

V

Vacanti V, Kong E, Suzuki G, Sato K, Canty JM, Lee T (2005) Phenotypic changes of adult porcine mesenchymal stem cells induced by prolonged passaging in culture. *J Cell Physiol* 205:194-201

Valentijn AJ, Zouq N, Gilmore AP (2004) Anoikis. *Biochem Soc Trans* 32:421-425

Valle-Prieto A, Conget PA (2010) Human Mesenchymal Stem Cells efficiently manage oxidative stress. *Stem Cells Dev* 19:1885-1893

van Donkelaar CC, Schulz RM (2008) Review on Patents for Mechanical Stimulation of Articular Cartilage Tissue Engineering. *Recent Pat Biomed Eng* 1:1-12

van Wezel AL (1976) The large-scale cultivation of diploid cell strains in microcarrier culture. Improvement of microcarriers. *Dev Biol Stand* 37:143-147

Varani J, Fligiel SEG, Inman DR, Beals TF, Hillegas WJ (1995) Modulation of adhesive properties of DEAE-dextran with laminin. *J Biomed Mater Res* 29:993-997

Viebahn CS, Tirnitz-Parker JEE, Olynyk JK, Yeoh GCT (2006) Evaluation of the "Cellscreen" system for proliferation studies on liver progenitor cells. *Eur J Cell Biol* 85:1265-1274

W

Wagner A, Marc A, Engasser JM, Einsele A (1992) The use of lactate dehydrogenase (LDH) release kinetics for the evaluation of death and growth of mammalian cells in perfusion reactors. *Biotechnol Bioeng* 39:320-326

- Wagner W, Horn P, Castoldi M, Diehlmann A, Bork S, Saffrich R, Benes V, Blake J, Pfister S, Eckstein V, Ho AD (2008) Replicative senescence of mesenchymal stem cells: A continuous and organized process. *PLoS ONE* 3:5
- Waleh NS, Gallo J, Grant TD, Murphy BJ, Kramer RH, Sutherland RM (1994) Selective down-regulation of integrin receptors in spheroids of squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 54:838-843
- Wang H, Joseph JA (1999) Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Bio Med* 27:612-616
- Wang Y, Ouyang F (1999) Bead-to-bead-transfer of vero cells in microcarrier culture. *Bioprocess Eng* 21:211-213
- Wang H, Li M, Lin PH, Yao Q, Chen C (2008) Fluid Shear Stress Regulates the Expression of TGF- 1 and Its Signaling Molecules in Mouse Embryo Mesenchymal Progenitor Cells. *J Surg Res* 150:266-270
- Wang W, Itaka K, Ohba S, Nishiyama N, Chung UI, Yamasaki Y, Kataoka K (2009) 3D spheroid culture system on micropatterned substrates for improved differentiation efficiency of multipotent mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 30:2705-2715
- Wang CC, Chen CH, Hwang SM, Lin WW, Huang CH, Lee WY, Chang Y, Sung HW (2009) Spherically symmetric mesenchymal stromal cell bodies inherent with endogenous extracellular matrices for cellular cardiomyoplasty. *Stem Cells* 27:724-732
- Weber C, Freimark D, Pörtner R, Pino-Grace P, Pohl S, Wallrapp C, Geigle P, Czermak P (2010) Expansion of human mesenchymal stem cells in a fixed-bed bioreactor system based on non-porous glass carrier - Part B: Modeling and scale-up of the system. *Int J Artif Organs* 33:782-795
- Wu S-C (1999) Influence of hydrodynamic shear stress on microcarrier-attached cell growth: Cell line dependency and surfactant protection. *Bioprocess Eng* 21:201-206
- Wuertz K, Godburn K, Iatridis JC (2009) MSC response to pH levels found in degenerating intervertebral discs. *Biochem Biophys Res Commun* 379:824-829

Y

- Yang Y, Rossi FMV, Putnins EE (2007) Ex vivo expansion of rat bone marrow mesenchymal stromal cells on microcarrier beads in spin culture. *Biomaterials* 28:3110-3120
- Yen LB, Yen M-L (2008) Mesenchymal Stem Cells and Cancer — for Better or for Worse? *J Cancer Mol* 4:5-9
- Yi W, Sun Y, Wei X, Gu C, Dong X, Kang X, Guo S, Dou K (2010) Proteomic profiling of human bone marrow mesenchymal stem cells under shear stress. *Mol Cell Biochem* 341:9-16
- Yokomizo AY, Antoniazzi MM, Galdino PL, Azambuja N Jr, Jorge SAC, Pereira CA (2004) Rabies Virus Production in High Vero Cell Density Cultures on Macroporous Microcarriers. *Biotechnol Bioeng* 85:506-515
- Youn BS, Sen A, Kallos MS, Behie LA, Girgis-Gabardo A, Kurpios N, Barcelon M, Hassell JA (2005) Large-Scale Expansion of Mammary Epithelial Stem Cell Aggregates in Suspension Bioreactors. *Biotechnol Prog* 21:984-993
- Yu Y, Li K, Bao C, Liu T, Jin Y, Ren H, Yun W (2009) Ex Vitro Expansion of Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells in Stirred Bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol* doi 10.1007/s12010-009-8556-5

Z

- Zahir N, Weaver VM (2004) Death in the third dimension: apoptosis regulation and tissue architecture. *Curr Opin Genet Dev* 14:71-80

- Zandstra PW, Eaves CJ, Piret JM (1994) Expansion of hematopoietic progenitor cell populations in stirred suspension bioreactors of normal human bone marrow cells. *Biotechnol Bioeng* 12:909-914
- Zhang Z, Li G, Shi B (2006) Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. *J Soc Leather Technol Chem* 90:23-28
- Zhang ZL, Tong J, Lu RN, Scutt AM, Golzman D, Miao DS (2009) Therapeutic potential of non-adherent BM-derived mesenchymal stem cells in tissue regeneration. *Bone Marrow Transplant* 43:69–81
- Zhao F, Ma T (2005) Perfusion Bioreactor System for Human Mesenchymal Stem Cell Tissue Engineering: Dynamic Cell Seeding and Construct Development. *Biotech Bioeng* 91:482-493
- Zhao F, Chella R, Ma T (2006) Effects of Shear Stress on 3-D Human Mesenchymal Stem Cell Construct Development in a Perfusion Bioreactor System: Experiments and Hydrodynamic Modeling. *Biotechnol Bioeng* 96:584-595
- Zhao F, Grayson WL, Ma T, Irsigler A (2009) Perfusion affects the tissue developmental patterns of human mesenchymal stem cells in 3D scaffolds. *J Cell Physiol* 219:421-429
- Zhu W, Chen J, Cong X, Hu S, Chen X (2006) Hypoxia and serum deprivation-induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24:416-425
- Zou X, Li H, Chen L, Baatrup A, Bünger C, Lind M (2004) Stimulation of porcine bone marrow stromal cells by hyaluronan, dexamethasone and rhBMP-2. *Biomaterials* 25:5375-5385
- Zwerschke W, Mazurek S, Stöckl P, Hütter E, Eigenbrodt E, Jansen-Dürr P (2003) Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence. *Biochem J* 376:403-411

RÉSUMÉ

Études cinétiques de procédés d'expansion de cellules souches mésenchymateuses cultivées sur microporteurs en systèmes agités

L'utilisation grandissante des cellules souches mésenchymateuses (CSM) en ingénierie tissulaire augmente la nécessité d'améliorer leur expansion. Ces travaux ont concerné l'étude d'un procédé performant d'expansion de CSM porcines en mode agité. Tout d'abord, un milieu de culture a été adapté aux CSM porcines multipotentes. Puis, différents modes d'expansion en conditions agitées ont été évalués avec les cellules fixées sur des microporteurs. La culture sur le microporteur Cytodex 1 a permis d'atteindre une vitesse spécifique de croissance de $0,54 \text{ j}^{-1}$, supérieure à celle observée en flacon statique ($0,31 \text{ j}^{-1}$), avec les mêmes conditions de culture. En parallèle, une méthode de comptage innovante a été proposée pour le dénombrement automatique des cellules cultivées sur Cytodex 1, sans passer par une étape de trypsination. Enfin, les conditions opératoires du procédé d'expansion ont été étudiées. En comparaison d'une culture de CSM sur Cytodex 1 sans agitation, une agrégation des cellules et une baisse apparente de la concentration cellulaire ont été observées à 25 et 75 rpm. Par ailleurs, l'ajout de microporteurs au cours d'une culture de 300 h, réalisée dans un système de culture agité à 25 rpm et dans un volume de 200 mL, a permis de prolonger la prolifération cellulaire en évitant l'agrégation tout en maintenant la multipotence des CSM. Une concentration cellulaire de 3×10^5 cellules/mL a été obtenue, au lieu de $1,2 \times 10^5$ cellules/mL en flacons statiques avec les mêmes conditions de culture. Un procédé performant d'expansion de CSM porcines en conditions agitées a ainsi pu être proposé.

MOTS CLÉS : Cellules souches mésenchymateuses ; Procédé ; Expansion ; Milieu de culture ; Microporteurs

SUMMARY

Kinetic studies of expansion processes of mesenchymal stem cells cultivated on microcarriers in agitated systems

The extensive use of mesenchymal stem cells (MSC) in tissue engineering increases the necessity to improve the expansion performance. This work aimed at studying an efficient expansion process for porcine MSC in agitated mode. First, a culture medium was adapted to the multipotent porcine MSC. Then, various expansion modes and agitation conditions were evaluated with the cells fixed on microcarriers. Cultures on the Cytodex 1 microcarrier enabled to reach a specific growth rate of 0.54 d^{-1} , which was higher than the one observed in static T-flasks (0.31 d^{-1}), with the same culture conditions. In parallel, an innovative counting method was proposed for the automatic enumeration of cells cultivated on Cytodex 1, without passing by a trypsination step. Finally, the operating conditions of the expansion process were studied. Compared to a culture of MSC on non-agitated Cytodex 1 microcarriers, cell aggregation occurred and an apparent decrease in the cell concentration was observed at an agitation rate of 25 and 75 rpm. Moreover, the addition of microcarriers during a 300 h culture, performed in an agitated culture at 25 rpm and in a volume of 200 mL enabled to prolong the cell proliferation without any aggregation, while maintaining the multipotency of the cells. A cell concentration of 3×10^5 cells/mL was obtained, instead of the 1.2×10^5 cells/mL in static flasks with the same culture conditions. An efficient expansion process for porcine MSC under agitated conditions has therefore been proposed.

KEY WORDS: Mesenchymal stem cells ; Process ; Expansion ; Culture medium ; Microcarriers