



HAL
open science

Les cellules souches issues de la gelée de Wharton, culture dynamique et contrôle qualité

Anaïs Laborde

► **To cite this version:**

Anaïs Laborde. Les cellules souches issues de la gelée de Wharton, culture dynamique et contrôle qualité. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. dumas-03160848

HAL Id: dumas-03160848

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03160848v1>

Submitted on 5 Mar 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

U.F.R. DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2021

Thèse n°18

THESE POUR L'OBTENTION DU
DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par LABORDE Anaïs

Née le 21 juillet 1993 à BORDEAUX

Le 04 février 2021

**LES CELLULES SOUCHES ISSUES DE LA GELÉE
DE WHARTON, CULTURE DYNAMIQUE ET
CONTRÔLE QUALITÉ**

Sous la direction de : Eric OLMOS

Membres du jury :

Mme DUFOURCQ Pascale	Professeur des Universités	Président
M. OLMOS Eric	Professeur des Universités	Directeur
M. COURTOIS Arnaud	Docteur en Pharmacie	Juge
Mme WINKEL Eva	Docteur en Pharmacie	Juge

Remerciements

A Monsieur Eric Olmos,

Je tiens à te remercier d'avoir accepté de diriger ma thèse, de m'avoir accompagnée, orientée et conseillée tout au long de sa rédaction.

À Madame Pascale Dufourcq,

Vous me faites l'honneur de présider ce jury. Je vous remercie de bien avoir accepté d'apprécier ce travail, ainsi que pour vos enseignements dispensés au cours de ces années de pharmacie.

À Monsieur Arnaud Courtois et à Madame Eva Winkel

Vous avez accepté de faire partie de ce jury et de juger ce travail, et je vous en remercie sincèrement.

À ma famille, et plus particulièrement à ma maman, à ma sœur Pauline, à ma grand-mère, pour leur soutien indéfectible tout au long de ces années d'étude. Vous m'avez encouragée, avez toujours cru en moi et en mes choix, même dans les moments difficiles.

À mes amis.

Table des matières

Table des matières	3
Liste des figures	5
Liste des tableaux	8
Liste des abréviations	9
Introduction	11
I. CARACTERISTIQUES DES CELLULES SOUCHES	13
A. Historique de découverte	13
B. Description des cellules souches	15
C. Les différents types de cellules souches	20
1. Cellules souches totipotentes	20
2. Cellules souches pluripotentes	20
a. Cellules souches embryonnaires	21
b. Cellules souches pluripotentes induites	22
3. Cellules souches multipotentes	23
a. Les cellules souches mésenchymateuses	24
b. Cellules souches hématopoïétiques.....	30
4. Cellules souches unipotentes	31
II. LES CELLULES SOUCHES ISSUES DE LA GELEE DE WHARTON	31
A. La gelée de Wharton	31
B. Intérêt des cellules souches issues de la gelée de Wharton	33
1. Les marqueurs de surface des CSM de la gelée de Wharton	34
2. Les marqueurs de pluripotence des CSM de la gelée de Wharton	38
3. Les propriétés immunomodulatrices des CSM de la gelée de Wharton.....	39
4. Croissance et différenciation des CSM-GW	41
C. La thérapie cellulaire	44
D. Ingénierie tissulaire	52

III.	CULTURE ET PRODUCTION DES CSM DE LA GELEE DE WHARTON ..	58
A.	Production des médicaments à base de cellules souches	58
B.	Upstream Process	63
5.	Isolement des CSM-GW	63
6.	Culture cellulaire	66
a.	Culture monocouche	67
b.	Culture tridimensionnelle.....	68
7.	Milieu de culture et paramètres contrôlés.....	76
C.	Downstream Process	80
IV.	ATTRIBUTS QUALITE CRITIQUES DES CELLULES SOUCHES ISSUES DE LA GELEE DE WHARTON CULTIVEES SUR MICROPORTEURS	85
A.	Test d'identité	89
B.	Tests de différenciation	92
1.	Protocoles de différenciation	93
a.	Ostéocytes	93
b.	Adipocytes.....	93
c.	Chondrocytes	94
2.	Résultats.....	95
C.	Capacités d'auto-renouvellement	96
D.	Tests de fonctionnalité	97
E.	Sécretome	100
F.	Test de viabilité.....	101
G.	Tests complémentaires.....	103
1.	Test de pureté.....	103
2.	Test de stérilité	104
Conclusion		107
Bibliographie.....		110

Liste des figures

Figure 1 : Propriétés des cellules souches.	17
Figure 2 : Hiérarchie fonctionnelle et développementale des cellules souches.....	19
Figure 3 : Protocole de génération de cellules souches pluripotentes induites (CSPi).	23
Figure 4 : Multipotence des cellules souches mésenchymateuses (CSM).....	25
Figure 5 : Composants d'une niche de cellules souches.....	26
Figure 6 : Effets des CSM sur les cellules de l'immunité adaptative.	29
Figure 7 : Effets des CSM sur les cellules de l'immunité innée.	29
Figure 8 : Schéma en coupe d'un cordon ombilical humain	32
Figure 9 : Effets immunomodulateurs des CSM-GW sur l'immunité innée et adaptative.	41
Figure 10 : Comparaison des propriétés de prolifération entre CSM-MO et CSM-GW (a) nombre de jours pour le doublement de population après chaque passage (b) Résultats de densité optique indiquant le nombre de cellules métaboliquement actives.....	42
Figure 11 : Potentiel de différenciation des CSM-GW comparé à d'autres sources de CSM.....	44
Figure 12 : Mécanismes d'action et rôle potentiel des CSM.....	46
Figure 13 : Nombre d'essais cliniques en fonction des indications thérapeutiques...	49
Figure 14 : Nombre d'essais cliniques en fonction de la phase dans laquelle ils se trouvent.....	50
Figure 15 : Nombre d'essais cliniques en fonction de leur localisation.....	50
Figure 16 : A) Modèle classique de l'ingénierie tissulaire, B) Approche de l'ingénierie tissulaire pour le développement de modèles in vitro, d'après.	55
Figure 17 : Nombre d'essais cliniques utilisant les CSM en ingénierie tissulaire.	57
Figure 18 : Production de produits de thérapie cellulaire autologue et allogénique.	62

Figure 19 : Méthodes d'isolement de CSM-GW.	64
Figure 20 : Temps de doublement de population des CSM-GW isolées par méthode enzymatique et des explants.	65
Figure 21 : Classification des systèmes de culture monocouche.	68
Figure 22 : Illustration d'une courbe en S de performance relative entre plusieurs technologies de thérapie cellulaire.....	69
Figure 23 : Bioréacteurs adaptés à l'expansion des CSM	70
Figure 24 : Distribution du nombre de donneurs nécessaires pour produire 10000 doses par an avec plusieurs technologies.	76
Figure 25 : A) Courbes de croissance des CSM-GW sous hypoxie et normoxie, B) Analyse du temps moyen de doublement de population en heure des CSM-GW C) Doublement de population cumulatif par passage en conditions normoxique et hypoxique.....	79
Figure 26 : Concentration cellulaire discontinue (A) ou continue (B).....	83
Figure 27 : Profils de concentration cellulaire et de caractérisation des CSM après TFF.	83
Figure 28 : Traitements potentiels et modes d'action supposés des cellules souches mésenchymateuses, et tests cellulaires spécifiques associés en vue de leur utilisation. Issu d'essais cliniques ciblant plusieurs pathologies, adapté de.	87
Figure 29 : Expression des collagènes de type I et II par les CSM-GW à J9 et J30 de la différenciation chondrocytaire	90
Figure 30 : Analyse en cytométrie en flux de CSM-GW	91
Figure 31 : Pourcentage d'expression des marqueurs de surface de CSM-GW	91
Figure 32 : Profil des marqueurs de surface des CSM-GW après culture 2D et 3D..	92
Figure 33 : (A) Différenciation adipocytaire, coloration à l'oil red O, (B) Différenciation ostéocytaire, coloration au red alizarine, (C) Différenciation chondrocytaire, coloration au bleu alcyan.....	95
Figure 34 : Nombre de colonies totales et simple clone de CSM-GW.....	97

Figure 35 : Résumé des différentes propriétés thérapeutiques et mécanismes d'actions des CSM-GW dans le diabète sucré.....	98
Figure 36 : Test de fonctionnalité basé sur l'utilisation des CSM comme signal et capteur lors de leur interaction avec des cellules mononuclées du sang périphérique	99
Figure 37 : Comparaison des méthodes AO/PI et trypan bleu	102

Liste des tableaux

Tableau 1 : Comparaison des cellules souches issues de la gelée de Wharton avec celles de moelle osseuse et du tissu adipeux.....	34
Tableau 2 : Tissus représentatifs source de CSM et leurs marqueurs de surface exprimés.	35
Tableau 3 : Influence de la méthode d'isolement des CSM-GW sur l'expression des marqueurs de surface.	37
Tableau 4 : Expression des marqueurs de pluripotence des cellules souches de cordon ombilical.	39
Tableau 5 : Avantages et inconvénients des différents types de greffe de CSM.....	46
Tableau 6 : Propriétés idéales des scaffolds utilisés en ingénierie tissulaire.	53
Tableau 7 : Médicaments à base de CSM actuellement commercialisés.....	60
Tableau 8 : Caractéristiques des microporteurs commercialisés pouvant être utilisés dans l'expansion des CSM.	73
Tableau 9 : Caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses foetales détachées par trypsine, trypLE et collagénase de Cytodex-3.....	81

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AO : Acridine orange

BPC : Bonnes pratiques cliniques

BPF : Bonnes pratiques de fabrication

CD : Cluster de différenciation

CFU-F : Colony-forming unit fibroblast

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CQA : Critical Quality Attributes

CSE : Cellule souche embryonnaire

CSH : Cellule souche hématopoïétique

CSM-GW : Cellule souche mésenchymateuse issue de la gelée de Wharton

CSM-MO : Cellule souche mésenchymateuse issue de la moelle osseuse

CSM-TA : Cellule souche mésenchymateuse issu du tissu adipeux

DMEM : Milieu minimum essentiel de Eagle

DSP : Downstream process

EMA : European Medicines Agency / Agence européenne des médicaments

FDA : Food and Drug Administration

GvHD : Graft-versus-host Disease / Maladie du greffon contre l'hôte

GVL : Graft versus Leukemia

CSPi : Cellule souche pluripotente induite

ISCT : International Society for Cell & Gene Therapy

LAL : Lysat d'amoébocytes de limules

LCST : Température de solution critique inférieure

LDH : Lactate déshydrogénase

MCB : Master cell bank

MEC : Matrice extracellulaire

NK : Natural Killer

OMS : Organisation mondiale de la santé

PBMC : Cellule mononuclée sanguine périphérique

PBS : Tampon phosphate salin

PI : Iodure de propidium

SBF: Sérum bovin f etal

TFF : Tangential Flow Filtration

USP : Upstream process

WCB : Working Cell Bank

Introduction

Depuis plusieurs années, la recherche se tourne vers la médecine régénératrice. L'objectif n'est plus de simplement guérir ou atténuer les symptômes à l'aide de molécules pharmaceutiques, mais de chercher à réparer en utilisant directement les éléments du vivant. Parmi les différents constituants du corps humain, la cellule souche présente un intérêt majeur en thérapeutique. En effet, il s'agit d'une cellule pouvant être retrouvée à tous les stades de la vie, de l'embryon à l'âge adulte. De plus, selon le stade ou son origine, elle peut évoluer différemment, ouvrant la voie à une médecine personnalisée.

Ces nouvelles thérapies ont pour objectifs de traiter des pathologies diverses comme les cancers, les maladies auto-immunes, les maladies dégénératives ou encore les traumatismes. Les cellules souches mésenchymateuses sont, entre autres, envisagées pour ces applications, que ce soit en thérapie cellulaire ou en ingénierie tissulaire. Bien que les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse soient actuellement les plus utilisées, les cellules souches issues de la gelée de Wharton sont actuellement envisagées pour différentes raisons détaillées dans ce travail.

Au vu du nombre croissant d'essais cliniques, l'optimisation des méthodes de culture ouvre la voie à des traitements à grande échelle. Outre les questions quant à l'industrialisation de leur production, se pose celle de la libération du lot et des critères à remplir en vue d'assurer sécurité, qualité et efficacité des traitements.

Dans une première partie de ce travail seront décrits les différents types de cellules souches et leurs caractéristiques respectives. Leur présence à différents stades du développement permet d'expliquer leur potentiel en termes de régénération cellulaire et tissulaire, mais également leurs limites qu'elles soient physiologiques ou éthiques. La seconde partie se concentrera plus précisément sur les cellules souches issues de la gelée de Wharton, afin de justifier l'intérêt récent porté à cette catégorie

de cellules. L'objectif final étant d'utiliser ces cellules dans un but thérapeutique, les étapes d'une production industrielle permettant d'aboutir à un lot commercial sont abordées dans une troisième partie. La production des cellules souches, et leur utilisation potentielle sur l'homme nécessitant une qualité irréprochable, les paramètres à contrôler ainsi que les essais associés seront détaillés dans une quatrième et dernière partie.

I. CARACTERISTIQUES DES CELLULES SOUCHES

A. Historique de découverte

Le concept de cellules souches remonte au milieu des années 1800. Ernst Haeckel (1834 - 1919), professeur en zoologie soutenant les travaux de Darwin, a qualifié les organismes unicellulaires et les protozoaires de « Stamzellen » (cellules souches). En effet, il considérait ces espèces comme étant les ancêtres phylogénétiques des organismes pluricellulaires. L'étymologie de ce mot dérive de « Stammbaum », l'arbre généalogique, et du terme biologique « Stam », lignée. Il a en 1877, appliqué cette notion à l'ontogénie décrivant l'ovule fécondé comme étant la cellule à l'origine de toutes les cellules d'un organisme humain ou animal. Les caractéristiques essentielles d'une cellule souche ont été décrites par Theodor Boveri (1862 - 1915) au début des années 1900, et dès lors, admises dans le domaine de l'embryogénie et de la cytologie. Elle est alors clairement définie par sa capacité d'auto-renouvellement, ainsi que sa différenciation en cellules somatiques ou cellules germinales. Ce concept a été élargi à l'hématologie peu de temps après, en admettant que le précurseur commun des globules rouges et blancs est la cellule souche ; cette notion a ouvert des perspectives quant à la recherche sur les différentes formes de leucémies, étant désormais admis que les myélocytes et les lymphocytes provenaient d'une unique « cellule souche lymphomyéloblastique » (1).

La recherche sur les cellules souches s'est accélérée après la seconde guerre mondiale lorsque les chercheurs se sont penchés sur les effets de la radiation sur le corps humain, notamment suite aux bombardements atomiques d'Hiroshima et de Nagasaki. En effet, mêmes exposés à de faibles doses de radioactivité, les survivants ont développé une anémie, puis une leucémie quelques années plus tard. La recherche s'est alors concentrée sur la capacité de régénération du tissu hématopoïétique. Ce renouvellement des cellules sanguines a été constaté en 1955 après irradiation de souris dont la rate avait été protégée (chez la souris, cet organe

joue un rôle dans l'hématopoïèse, comme chez l'homme en période fœtale). Ce phénomène a également été observé en réponse à l'injection de cellules provenant de la moelle osseuse, ouvrant des perspectives dans le traitement des hémopathies malignes (2). A la fin des années cinquante, les premières tentatives de greffes de cellules issues de la moelle hématopoïétique, prélevées chez des donneurs volontaires vivants, ont été réalisées par l'équipe de Georges Mathé, et visaient des patients atteints d'aplasie médullaire ; ces procédures ont ouvert la porte au traitement des hémopathies sévères, notamment cancéreuses (3).

En 1961, Ernest McCulloch (1926 - 2011) et James Till (1931 -) ont mis en évidence pour la première fois la présence de cellules souches dans la moelle osseuse en étudiant les effets des rayonnements sur l'hématopoïèse dans la moelle osseuse de souris. La corrélation entre le nombre de cellules de moelle reçues et le nombre de nodules dans la rate a permis de confirmer la théorie de l'hématopoïèse admise jusqu'alors : toutes les cellules du sang, globules rouges, globules blanc et plaquettes proviennent d'une cellule souche unique, la cellule souche hématopoïétique localisée essentiellement dans la moelle osseuse (1).

Vingt-cinq ans après les expériences de Till et McCulloch, l'équipe d'Irving Weissman a identifié chez la souris plusieurs marqueurs spécifiques des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes, permettant de les isoler spécifiquement. Pour cela, des techniques de purification cellulaire, basées sur des anticorps monoclonaux se liant aux antigènes de surface cellulaire, spécifiques de cette population, ont été employées (4). Baum et ses collègues ont montré en 1992 que les humains possèdent des cellules souches hématopoïétiques similaires ayant les mêmes capacités caractéristiques des cellules souches. Lui et d'autres scientifiques ont, depuis, isolé des cellules souches humaines dans la peau, les neurones et plusieurs autres tissus (5).

Des cellules souches pluripotentes ont par la suite été isolées et cultivées à partir de cellules embryonnaires de souris en 1981 par Martin Evans et Matthew H.

Kauffman ; cela représente une avancée dans la recherche sur les cellules souches embryonnaires, les cellules souches pluripotentes pouvant être cultivées désormais à partir de blastocystes et non plus à partir de lignées cellulaires issues de tératocarcinomes. Il a, par la suite, fallu attendre 1998, avant de savoir isoler et cultiver des cellules embryonnaires humaines (1).

En 2006, une avancée majeure a été réalisée avec la reprogrammation génétique de certaines cellules adultes afin d'approcher un état semblable à celui des cellules souches. Ces cellules sont nommées cellules souches pluripotentes induites (CSPi) (6).

La recherche sur les cellules souches continue de faire progresser les connaissances sur la façon dont un organisme se développe à partir d'une cellule et sur la manière dont les cellules saines remplacent les cellules endommagées dans les organismes adultes. Comme de nombreux domaines scientifiques en pleine expansion, la recherche sur les cellules souches soulève des questions aussi rapidement qu'elle génère de nouvelles découvertes.

B. Description des cellules souches

Un organisme pluricellulaire est principalement composé de cellules spécialisées ; celles-ci sont réparties de manière ordonnée afin de constituer le sang, les tissus et les organes. Ces cellules expriment des gènes uniques leur permettant d'accomplir des fonctions spécifiques. Elles sont cependant issues de populations non spécialisées : les cellules souches. Ces cellules, immatures et indifférenciées, sont d'une importance cruciale dans l'organisme pour plusieurs raisons. Au sein de l'embryon de trois à cinq jours, appelé blastocyste, les cellules internes sont à l'origine de l'ensemble de l'organisme, et donc des nombreux types de cellules et organes spécialisés le constituant, tels que le cœur, les poumons, la peau, et autres tissus. Certains tissus adultes, ainsi que des régions particulières d'organes, tels que la moelle osseuse, les muscles et le cerveau, comprennent également des populations

distinctes de cellules souches adultes. Elles participent, entre autres, au remplacement de cellules mortes du fait de blessures ou de maladies, ou simplement assurent le renouvellement cellulaire naturel (un globule rouge a, par exemple, une durée de vie d'environ cent vingt jours).

Deux caractéristiques des cellules souches sont l'auto-renouvellement et leur capacité de différenciation (Figure 1) (7).

La différenciation cellulaire confère à une cellule souche, non spécialisée, l'acquisition de différentes caractéristiques spécifiques ; elle peut alors engendrer des cellules ou des tissus spécialisés, voire même un organisme entier. Par exemple une cellule souche sanguine permettra de donner l'ensemble des cellules sanguines, dont entre autres les globules rouges, les globules blancs ou les plaquettes. Une cellule souche pourra également se différencier en hépatocyte, produisant des facteurs de coagulation, en cellule pancréatique, produisant de l'insuline ou encore en cellule nerveuse fournissant une activité électrique. Les organes n'en sont cependant pas tous pourvus, tels que le cœur ou le pancréas. Ainsi, les cellules souches ne sont pas toutes identiques, et n'ont pas la capacité de donner uniformément les mêmes cellules ; cela définit la potentialité de la cellule souche. Ces propriétés diffèrent notamment en fonction de leur provenance, ainsi que de l'âge de l'organisme.

L'auto-renouvellement constitue le processus au cours duquel la division d'une cellule souche, par le biais de la mitose, permet de redonner au moins une cellule souche identique à la cellule mère. Si cette division donne une nouvelle cellule souche, ainsi qu'un progéniteur doté de la capacité de différenciation, la division est dite asymétrique. On parle de division symétrique si une cellule souche donne naissance à deux autres cellules souches, identiques à la cellule mère. Cette propriété permet de maintenir ou d'élargir le stock de cellules souches tout au long de la vie d'un individu en fonction des besoins.

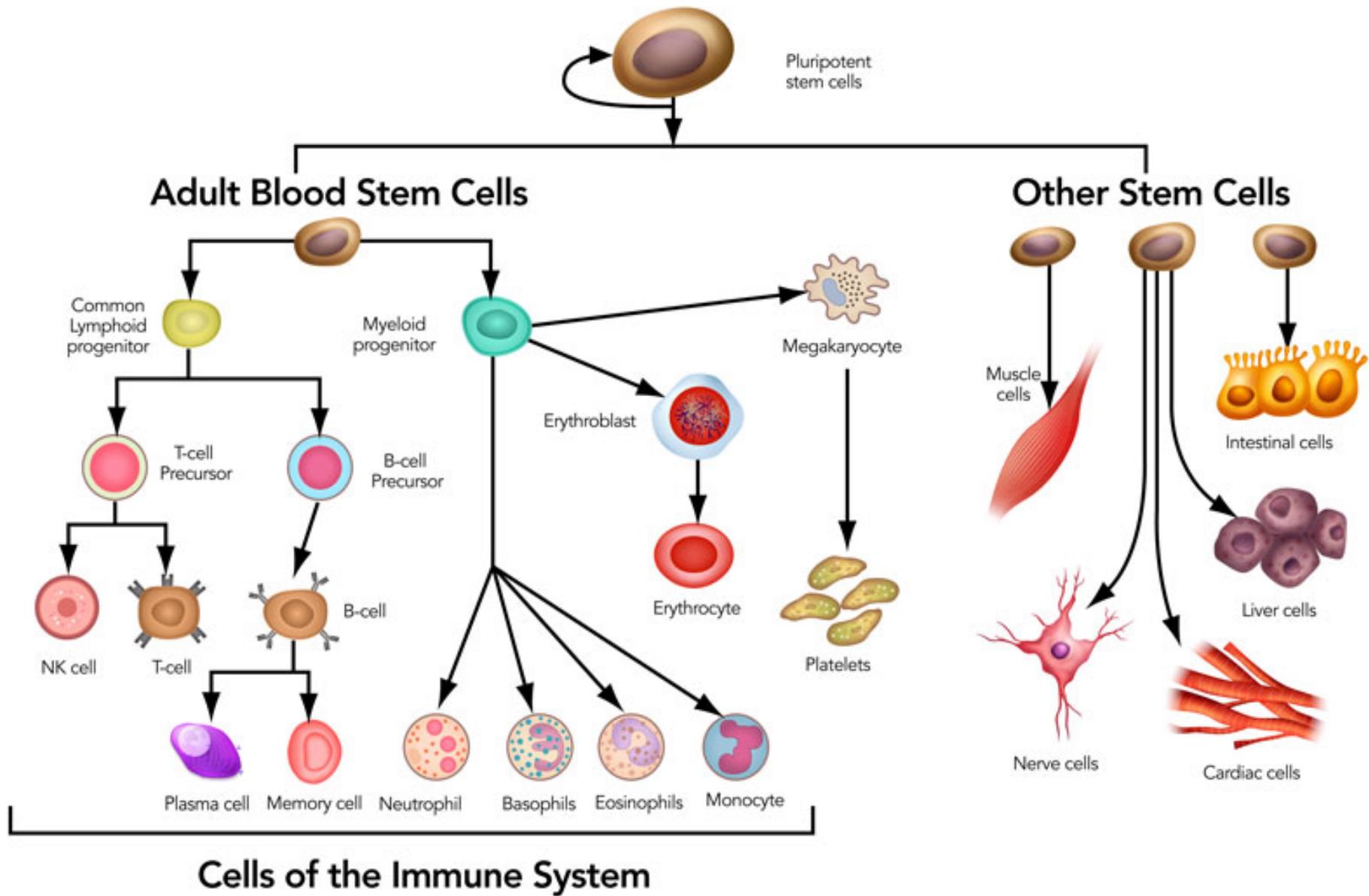


Figure 1 : Propriétés des cellules souches (8).

Les cellules souches peuvent être classées de deux manières différentes. Tout d'abord la classification chronologique : on distingue ainsi les cellules souches embryonnaires, fœtales, amniotiques et adultes. Une autre classification existe, suivant le potentiel de différenciation de la cellule souche : cellules souches totipotentes, pluripotentes, multipotentes, unipotentes. Ces hiérarchisations sont cependant dépendantes l'une de l'autre (Figure 2) :

- Les cellules souches totipotentes sont retrouvées exclusivement chez le zygote et dans les tout premiers stades embryonnaires.
- Les cellules souches pluripotentes sont présentes au niveau de la masse interne du blastocyste (embryon préimplantatoire), qui sont des cellules embryonnaires.
- Les cellules souches multipotentes, plus avancées dans le processus de différenciation, sont retrouvées à la fois dans les cellules fœtales et parmi les cellules adultes, mais seulement dans certaines structures du corps humain.
- Les cellules souches unipotentes correspondent à l'ultime stade de différenciation des cellules souches et sont rencontrées dans le corps humain dès le stade du nouveau-né.

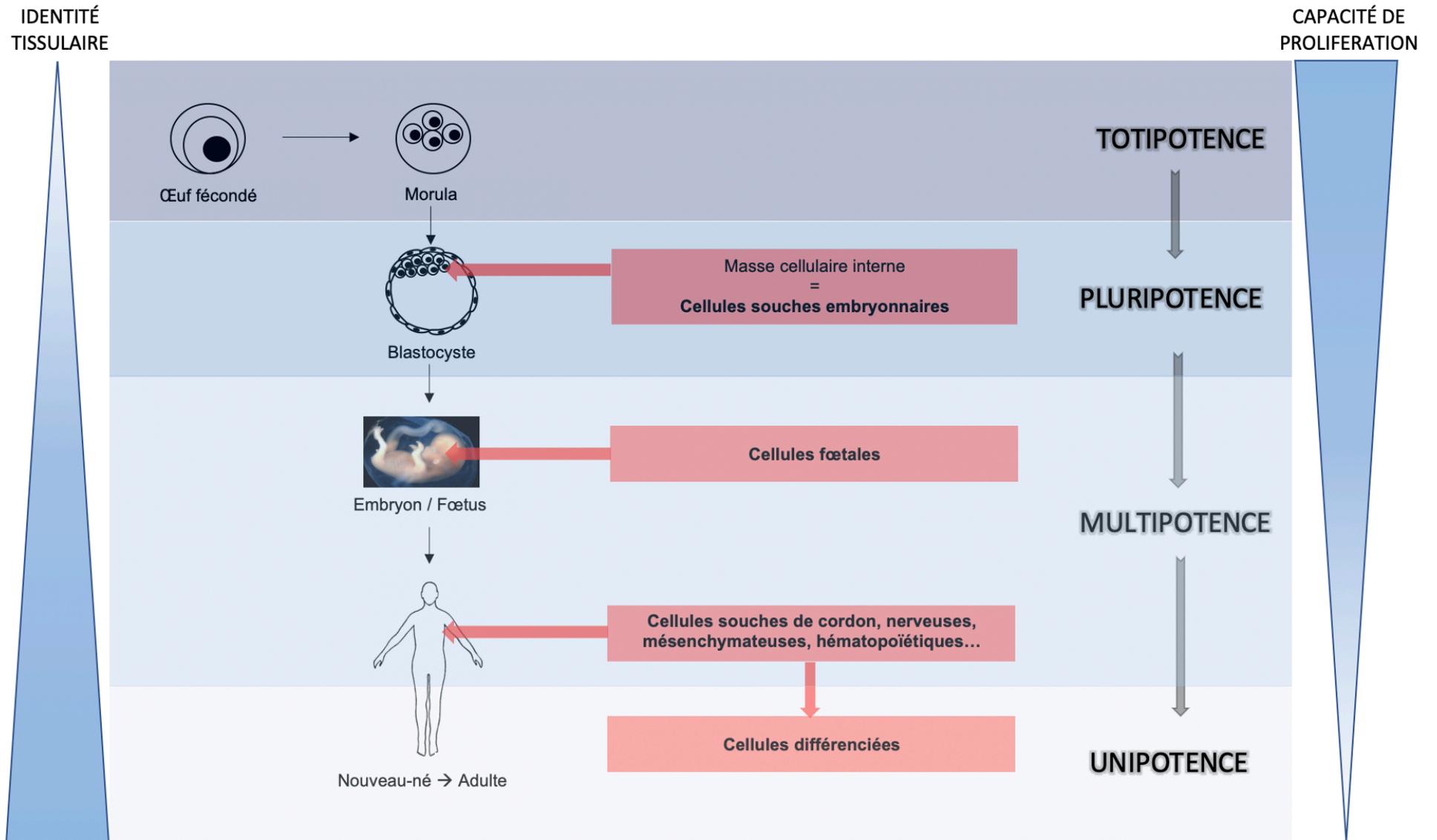


Figure 2 : Hiérarchie fonctionnelle et développementale des cellules souches.

C. Les différents types de cellules souches

1. Cellules souches totipotentes

Les cellules souches totipotentes ont le potentiel de générer n'importe quelle cellule du corps humain. Elles proviennent d'un ovule fécondé issu de la fusion d'un ovocyte et d'un spermatozoïde, qui donne un zygote. On ne peut parler de totipotence que durant les 4 premiers jours de division cellulaire, soit au stade de 8 cellules dénommées à ce moment du développement des blastomères. Ces cellules permettent d'engendrer l'ensemble des tissus embryonnaires mais également les tissus extra-embryonnaires (notamment le placenta, la membrane vitelline ou le cordon ombilical). Les chercheurs parviennent cependant depuis quelques années à induire un état proche de la totipotence en jouant notamment sur la condensation de l'ADN, ayant constaté qu'il est moins condensé que pour les cellules souches pluripotentes (9). Par ailleurs, depuis 2017, certaines équipes parviennent à extraire et conserver dans un état totipotent des cellules issues d'embryons de souris, grâce à un milieu de culture bloquant les voies de signalisation liées à la différenciation en cellules pluripotentes (10). Il est maintenant aussi possible de revenir à un état totipotent à partir de cellules embryonnaires porcines et humaines, ouvrant la voie à la compréhension du développement biologique et des maladies affectant l'implantation des embryons et du placenta (11). Il serait ainsi possible d'utiliser ces cellules en thérapeutique afin de régénérer par exemple des organes, ou pour le criblage de molécules potentiellement thérapeutiques. Ces applications sont à ce jour hypothétiques, leur potentiel de développement n'ayant pas à ce jour été constaté *in vitro*. Leur utilisation pose par ailleurs un problème éthique, avec le risque notamment de dévier sur le clonage reproductif.

2. Cellules souches pluripotentes

L'ensemble des types cellulaires d'un organisme, issus des 3 feuillets embryonnaires (ectoderme, endoderme, mésoderme), à l'exception des annexes embryonnaires, proviennent des cellules souches pluripotentes. Elles peuvent

générer plus de deux cents types de cellules spécialisées, et ainsi un organisme entier. Il s'agit des cellules filles des cellules souches totipotentes. Il est important de comprendre que les cellules souches totipotentes et pluripotentes ne sont pas vouées à exister de façon pérenne dans l'organisme, cela irait à l'encontre du développement embryonnaire. Cependant, en condition *in vitro*, l'objectif est justement de maintenir les cellules dans l'état de pluripotence afin d'exploiter leurs propriétés en thérapeutique. On distinguera les cellules souches embryonnaires, des cellules souches pluripotentes induites. (12)

a. Cellules souches embryonnaires

Ces cellules sont prélevées directement dans la masse interne du blastocyste, dans une fenêtre allant uniquement du cinquième au septième jour de vie embryonnaire, le développement embryonnaire induisant la spécialisation cellulaire. Dans des conditions appropriées, elles peuvent s'auto-renouveler de manière illimitée, tout en conservant leur état indifférencié. Les taux élevés de cytokine Leukemia Inhibitory Factor (LIF) permettent le maintien de cet état pluripotent en inhibant la différenciation cellulaire (13).

Elles sont également caractérisées par leur capacité de différenciation. *In vitro*, elles peuvent se différencier en cellules d'origine mésodermique (muscles, squelette, vaisseaux sanguins), ectodermique (épiderme, système nerveux), ou endodermique (tube digestif et glandes annexes) selon les milieux de culture utilisés. Ces propriétés offrent des perspectives en médecine régénératrice ou pour le traitement de maladies génétiques. Les essais cliniques menés actuellement concernent notamment la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), le diabète de type I ou l'insuffisance cardiaque sévère.

Cependant, ces cellules doivent répondre à des normes strictes de qualité avant de pouvoir être utilisées en thérapeutique, et les essais doivent être agréés par les autorités de santé. Des considérations éthiques sont de plus à prendre en compte, un embryon ne pouvant pas être conçu à des fins de recherche ; il doit être issu d'un

embryon surnuméraire obtenu par fécondation *in vitro*, faisant l'objet d'un projet parental ayant été abandonné, sous réserve du consentement informé du couple (14). Pour des questions morales ou religieuses, leur utilisation peut poser problème à certains qui considèrent qu'il s'agit d'une atteinte à l'intégrité d'un embryon. Un autre obstacle à leur utilisation repose sur la capacité à former spontanément des tératomes bénins ou malins du fait de leur prolifération importante et de leur capacité de différenciation poussée (15).

b. Cellules souches pluripotentes induites

Les cellules souches pluripotentes induites (CSPi) sont issues de la reprogrammation de cellules différenciées. Leur utilisation permet de s'affranchir du problème éthique lié au sacrifice d'un embryon. La mise au point de ces cellules remonte à 2006 et a été présentée par l'équipe de Yamanaka, qui a reçu le prix Nobel en 2012 pour sa découverte. Elles sont issues de la reprogrammation de cellules somatiques avec la surexpression de quatre facteurs de transcription permettant la réactivation des signaux d'immaturité et de prolifération, par l'utilisation de vecteurs viraux : Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc. Ces modifications leur confèrent un auto-renouvellement illimité ainsi qu'une capacité de différenciation vers l'ensemble des lignées cellulaires.

La facilité d'obtention de ces cellules ainsi que l'utilisation autologue de ces cellules ouvrent des perspectives thérapeutiques importantes en thérapie cellulaire ou en médecine régénératrice dans le traitement entre autres de la DMLA, de la drépanocytose ou de maladies neurodégénératives (16). À partir de cellules somatiques d'un malade, la reprogrammation *in vitro* en CSPi permettrait de corriger le défaut génétique à l'origine de la pathologie, avant de les redifférencier pour enfin les réinjecter au donneur (7). Cependant, les coûts et le temps de production de ces thérapeutiques, qui sont destinées à un patient à la fois, sont importants. Des banques de CSPi allogéniques, utilisant des donneurs dont l'immunité est compatible avec la majorité de la population, ont été créées. Les principales indications concernent, entre

autres, la maladie de Parkinson, la réaction du greffon contre l'hôte, ou l'insuffisance cardiaque. L'utilisation de ces cellules présente néanmoins des inconvénients. Elle ne prend pas en compte la diversité tissulaire du tissu, ce qui peut être un frein à la régénération d'un organe. Par ailleurs, la reprogrammation des cellules peut entraîner des mutations et des aberrations chromosomiques au cours de leur culture. Cette technique étant récente, on cherche actuellement à améliorer le protocole de reprogrammation, définir les types cellulaires pouvant être utilisés, ou encore les conditions de culture (Figure 3) (17).

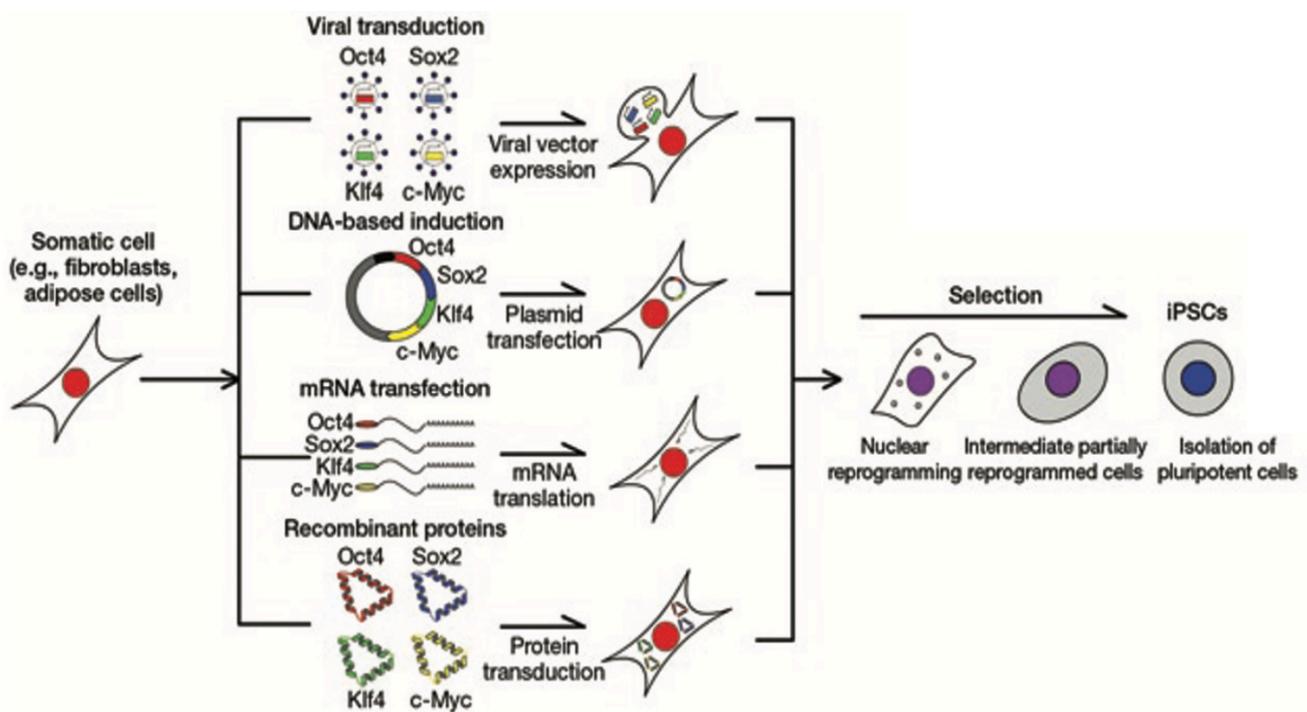


Figure 3 : Protocole de génération de cellules souches pluripotentes induites (CSPi) (18).

3. Cellules souches multipotentes

Les cellules souches multipotentes sont dites « déterminées » et sont d'origine soit fœtale, soit adulte. Elles sont déjà engagées vers une lignée cellulaire et permettent de générer des cellules spécialisées issues du feuillet embryonnaire correspondant (ectodermique, endodermique ou mésodermique). Leur capacité de différenciation est donc plus limitée que les cellules souches décrites précédemment,

mais elles gardent la propriété d'auto-renouvellement. Par exemple, les cellules hématopoïétiques se différencient en différents types de cellules sanguines, mais ne génèrent pas de cellules nerveuses. A ce jour, plusieurs types de cellules répondant à ces critères ont été identifiés chez l'homme, parmi lesquelles les cellules souches hématopoïétiques et les cellules souches mésenchymateuses.

Ces cellules participent au renouvellement cellulaire tout au long de la vie d'un individu et sont présentes dans la majorité des tissus de l'organisme, comme le pancréas, le tissu adipeux, le placenta ou le muscle squelettique mais sont retrouvées en majorité dans la moelle osseuse et le cordon ombilical. Elles permettent de remplacer les cellules mortes, âgées ou non fonctionnelles. Ces cellules peuvent être directement isolées à partir de différents tissus d'un donneur, évitant ainsi le débat éthique lié aux cellules souches issus des tissus fœtaux. Un autre avantage est immunologique par la possibilité d'utiliser les cellules du patient lui-même et s'affranchir ainsi des rejets.

a. Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses, autrement connues sous le nom de cellules stromales mésenchymateuses, sont des cellules multipotentes ayant la capacité de générer cartilage, os, muscles, tendons, ou encore ligaments. En 1867, Cohnheim a mis en évidence des cellules souches non-hématopoïétiques dans la moelle osseuse, sources de fibroblastes impliqués dans le processus de réparation des lésions. Friedenstein, en 1971, après avoir isolé et mis en culture ces cellules souches issues de la moelle osseuse de rats, a découvert une population de cellules, morphologiquement similaires aux fibroblastes, qui adhéraient au plastique des flacons de culture. Ces cellules sont par la suite qualifiées de « Colony-Forming Unit Fibroblast » (CFU-F), introduisant le concept de potentiel clonogénique, soit la capacité à former des clones de cellules *in vitro*. En 1988, Owen a proposé le concept de cellules souches stromales, car elles permettent le maintien du tissu de soutien (cartilage et os). En 1991, Caplan a introduit le terme de cellule souche

mésenchymateuse pour caractériser cette population de cellules à l'origine notamment du stroma médullaire, de l'os, du cartilage et des fibroblastes (19). De plus en plus de données indiquent que les CSM sont capables de se différencier vers d'autres tissus non mésodermiques (Figure 4) tels que le tissu ectodermique (cellules épithéliales rénales par exemple) (20), neuro-ectodermique (21) ou endodermique (hépatocytes par exemple).

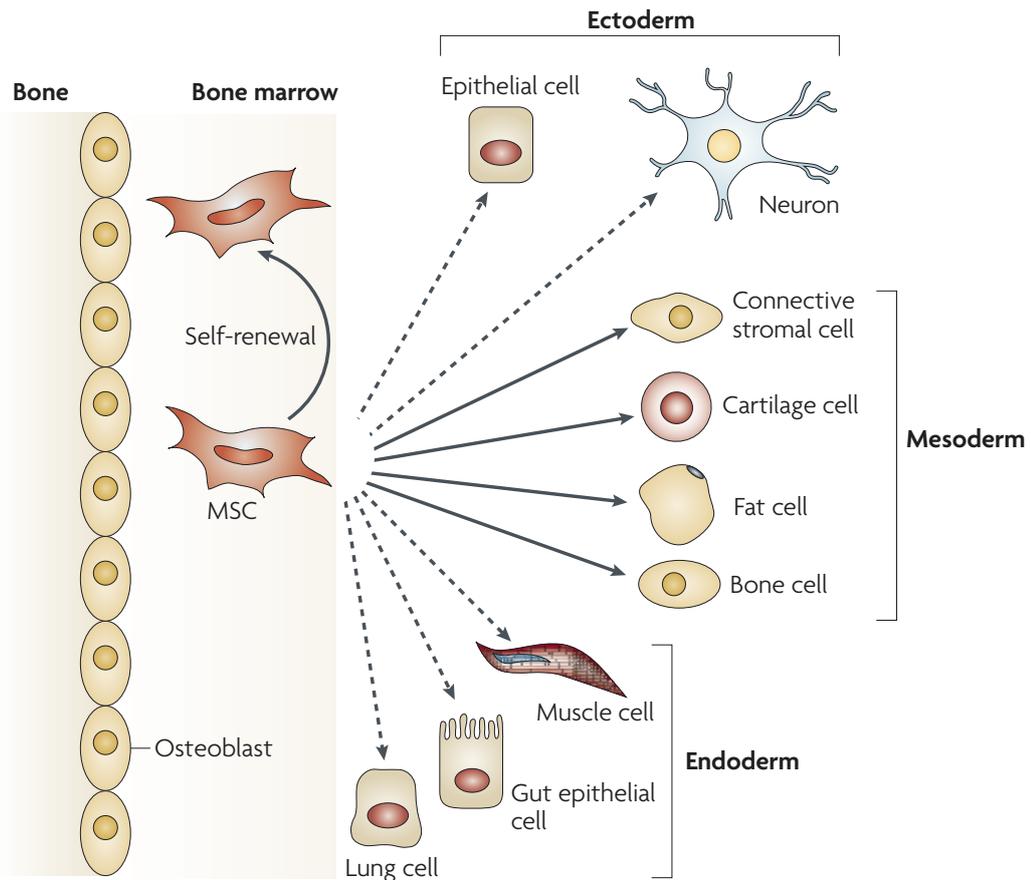


Figure 4 : Multipotence des cellules souches mésenchymateuses (CSM) (22).

Dans l'organisme, les CSM sont hébergées dans des tissus de soutien autrement connus sous le nom de niches (Figure 5). Ces microenvironnements permettent d'assurer l'homéostasie cellulaire par le maintien des cellules souches dans leur état indifférencié. Ils garantissent un équilibre entre quiescence, différenciation, auto-renouvellement et mobilisation des cellules souches. La niche constitue un support physique et nutritif, contient des cellules issues de la matrice extracellulaire et des cellules de soutien qui communiquent avec les cellules souches par l'intermédiaire de facteurs moléculaires solubles, comme entre autres WNT (23).

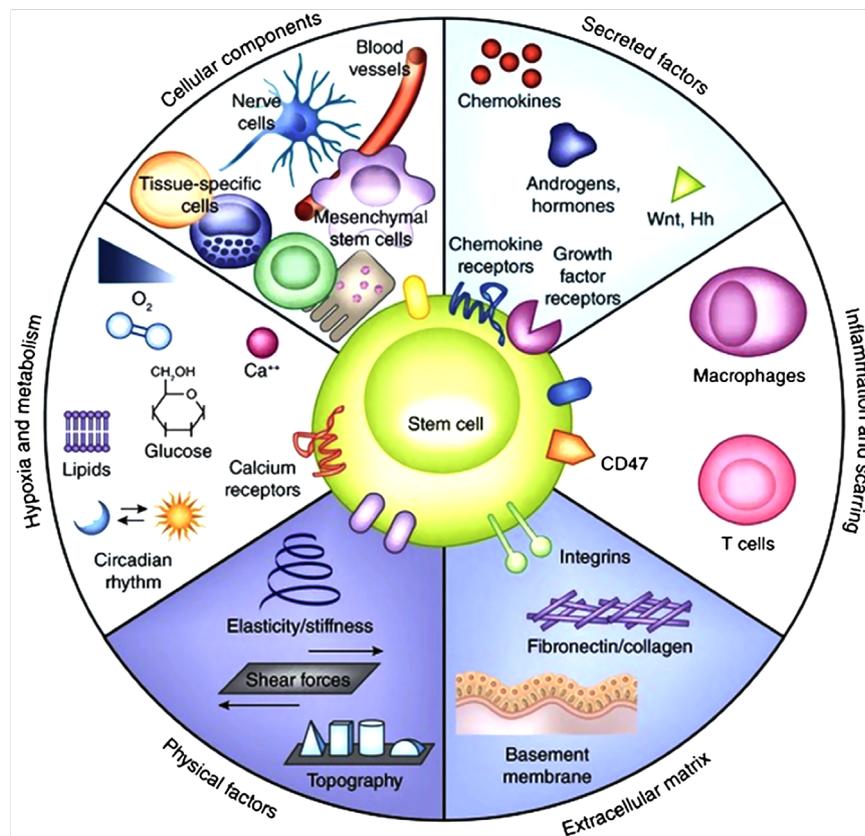


Figure 5 : Composants d'une niche de cellules souches (24).

A ce jour, les CSM provenant de la moelle osseuse (CSM-MO) sont considérées comme le « gold standard » parmi les CSM identifiées. Elles sont aisément isolables, avec un taux proche de 100% en termes d'efficacité. Leur mise en culture permet d'obtenir un bon rendement, avec un temps d'atteinte de la confluence plus faible que pour les autres sources de CSM (25). Plusieurs inconvénients ont cependant été identifiés au fil des années. Les CSM-MO représentent seulement 0,001% à 0,01% de la fraction cellulaire mononucléée totale, quantité pouvant être un frein à leur utilisation

en thérapie autologue. De plus, elles sont récoltées par une procédure invasive effectuée sous anesthésie, douloureuse pour le donneur. Plusieurs études ont mis en évidence l'influence de l'âge du donneur sur les caractéristiques des cellules souches ; il a été ainsi mis en évidence que les capacités de régénération d'un tissu, de différenciation déclinent avec l'âge (26,27).

Les CSM ont initialement été identifiées au sein de la moelle osseuse, mais elles peuvent désormais être isolées depuis d'autres sources adultes comme le tissu adipeux (26), la pulpe dentaire, la membrane synoviale (28) ainsi que depuis des sources périnatales parmi lesquelles le sang de cordon (29), la gelée de Wharton, le liquide amniotique (30) ou le placenta (31).

Même s'il n'existe actuellement pas de critères universels, la société internationale de thérapie cellulaire (ISCT) a défini une série de standards permettant de décrire les CSM. Cette démarche a pour but d'uniformiser les critères dans le cadre de la recherche scientifique en laboratoire, mais également pour les études précliniques. Les critères minimums à atteindre sont ainsi les suivants (32) :

- Adhérence au plastique dans les conditions standards de culture.
- Expression à plus de 95% des marqueurs de surface CD105, CD73, CD90.
- Absence d'expression (moins de 2%) des marqueurs de surface CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19, HLA-DR.
- Différenciation *in vitro* vers 3 lignées mésodermiques : ostéoblastique, adipocytaire, chondrocytaire

Ces dernières décennies, le potentiel thérapeutique des CSM a été étudié sur de nombreuses maladies par le biais d'essais cliniques. Ces derniers ont été rendus possibles suite aux récentes études qui ont démontré la capacité unique des CSM d'exercer des effets suppressifs et régulateurs sur l'immunité adaptative et innée, que la thérapie soit autologue ou allogénique. Une étape essentielle dans la greffe de cellules souches est d'éviter la réaction potentielle du greffon contre l'hôte, qui est un facteur limitant dans le succès de la greffe. Les CSM pouvant survivre au rejet immunitaire de l'hôte, elles présentent un grand intérêt en thérapeutique. Cette

propriété provient de leur importante capacité de différenciation, mais également de leurs propriétés immunologiques leur permettant de moduler le système immunitaire de l'hôte. Les thérapies à base de CSM sont ainsi en cours de développement afin de traiter de nombreuses maladies, dont les troubles immunitaires. En outre, au cours des dernières années, les CSM ont été modifiées génétiquement pour traiter et parfois même guérir certaines maladies, et l'utilisation de CSM pour la thérapie cellulaire ouvre de nouvelles perspectives pour surmonter le rejet des tissus (33).

Les CSM permettent tout d'abord de moduler le système immunitaire inné (Figure 7). Ils régulent activement les macrophages, les neutrophiles, les cellules dendritiques et les cellules Natural Killer (NK), jouant ainsi sur la première ligne de défense. Les CSM régulent également le système immunitaire adaptatif (Figure 6), c'est-à-dire les lymphocytes B et T. Dans le cas des lymphocytes T, les CSM favorisent principalement l'activation des lymphocytes T régulateurs. De plus, les CSM inhibent la prolifération des cellules B, la différenciation des cellules plasmiques et la production d'anticorps, tout cela en étroite liaison avec les lymphocytes T. À ce jour, il a été démontré que les CSM régulent principalement les réponses immunitaires innées et adaptatives d'une manière dépendante des cytokines par la sécrétion du transforming growth factor-beta ($TGF\beta$), de l'interféron gamma ($IFN\gamma$), de la prostaglandine E2 (PGE_2), de l'interleukine 10 ($IL-10$) et le facteur de nécrose tumorale alpha ($TNF\alpha$) (34).

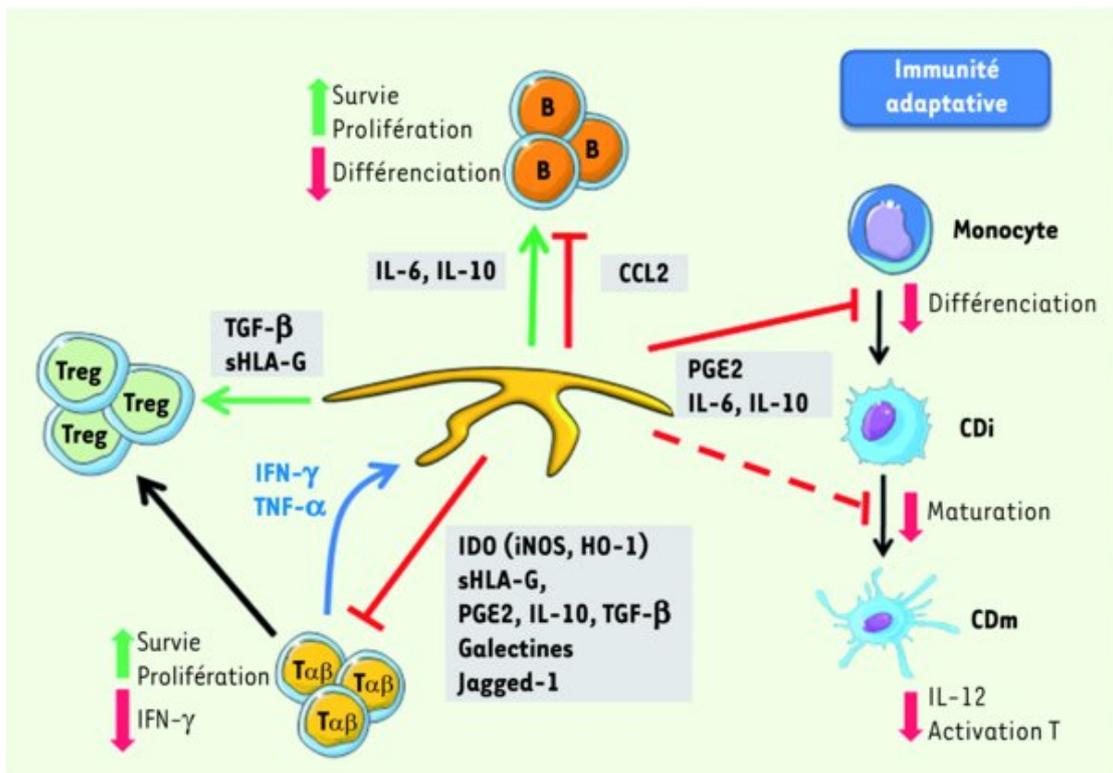


Figure 6 : Effets des CSM sur les cellules de l'immunité adaptative (31).

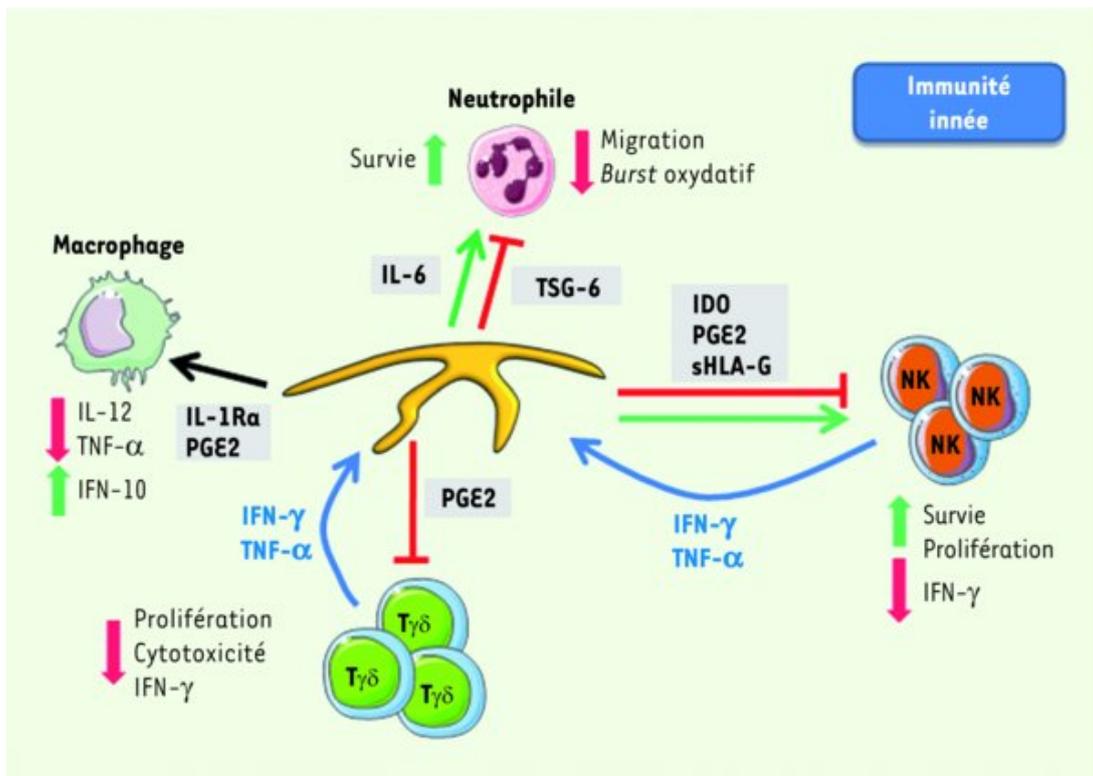


Figure 7 : Effets des CSM sur les cellules de l'immunité innée (31).

b. Cellules souches hématopoïétiques

Toutes les cellules composant le sang sont natives d'une même cellule hématopoïétique. Peu nombreuses (elles représentent environ 0,01% de la fraction médullaire), elles sont localisées principalement dans la moelle osseuse. Elles sont caractérisées par leur auto-renouvellement, qui garantit l'hématopoïèse pendant toute la vie d'un individu et ainsi assure l'homéostasie du tissu sanguin. Les cellules souches hématopoïétiques sont retrouvées majoritairement à l'état de quiescence et ne sont pas identifiables morphologiquement. La cascade hématopoïétique se compose à l'origine de progéniteurs, puis de précurseurs lymphoïdes et myéloïdes pour finir par donner les cellules différenciées qui composent le sang : érythrocytes, plaquettes, polynucléaires, macrophages et lymphocytes. Ainsi la production médullaire quotidienne s'élève à environ 200×10^9 globules rouges, 100×10^9 plaquettes et 50×10^9 polynucléaires neutrophiles (35).

L'intérêt clinique des cellules souches hématopoïétiques réside dans leur capacité à reconstituer à long terme une hématopoïèse complète après myéloablation. La transplantation de cellules souches hématopoïétiques a plusieurs indications thérapeutiques : hémopathies bénignes ou malignes, troubles métaboliques ou immunitaires. Deux caractéristiques sont à noter en vue de leur utilisation en thérapie cellulaire. Dans un premier temps, les cellules sont capables de migrer dans la circulation sanguine, après mobilisation par des facteurs de croissance. Ainsi, la collection du sang périphérique par cytophérèse est moins douloureuse par rapport à celle de moelle osseuse. De plus, ces cellules résistent à une congélation à -196°C , ce qui permet de constituer des banques cellulaires. Cette donnée est particulièrement intéressante, du fait que des CSH sont également retrouvées dans le sang du cordon ombilical. En effet, le recueil de ces cellules à partir du sang foeto-placentaire est non invasif. Par ailleurs, leur immaturité rend moins importants les rejets dirigés vers l'hôte, principaux risques de la transplantation. Leur capacité de prolifération est également plus importante par rapport au CSH d'un donneur adulte (36).

4. Cellules souches unipotentes

Issues des tissus adultes, les cellules souches unipotentes sont celles présentant le potentiel de différenciation le plus faible : elles ne se différencient que vers un seul type de cellule ou tissu, tout en conservant les caractéristiques d'une cellule souche. Ainsi leur capacité d'auto-renouvellement en fait des candidats à un usage thérapeutique. Elles permettent alors le renouvellement permanent des cellules du tissu où elles se trouvent. On distingue par exemple les hépatocytes dans le foie, les myocytes dans les muscles ou les kératinocytes dans l'épithélium de la peau (37). Il est ainsi possible de mettre en culture des kératinocytes prélevées sur une zone saine, afin de les amplifier et de transplanter ces couches d'épithélium chez des patients gravement brûlés (38).

II. LES CELLULES SOUCHES ISSUES DE LA GELEE DE WHARTON

A. La gelée de Wharton

Durant la grossesse, le fœtus et le placenta sont connectés par un cordon ombilical élastique. Il empêche la compression et la torsion des vaisseaux tout en assurant de manière bidirectionnelle l'apport d'oxygène, de glucose et des aminoacides nécessaires au bon développement du fœtus. Il permet en même temps d'évacuer entre autres, du dioxyde de carbone. Ce cordon se développe à partir du sac vitellin et de l'allantoïde après cinq semaines de fécondation, et atteint une moyenne de cinquante centimètres. Anatomiquement, le cordon ombilical est constitué de deux artères ombilicales et d'une veine ombilicale, intégrées dans une matrice plus connue sous le nom de gelée de Wharton, qui permet de protéger ces vaisseaux ombilicaux des pressions éventuelles (Figure 8). Le tout est entouré d'un épithélium amniotique. On distingue ainsi trois sections au sein de la gelée de Wharton : péri-vasculaire, inter-vasculaire et le subamnios (sous l'épithélium amniotique) (39).

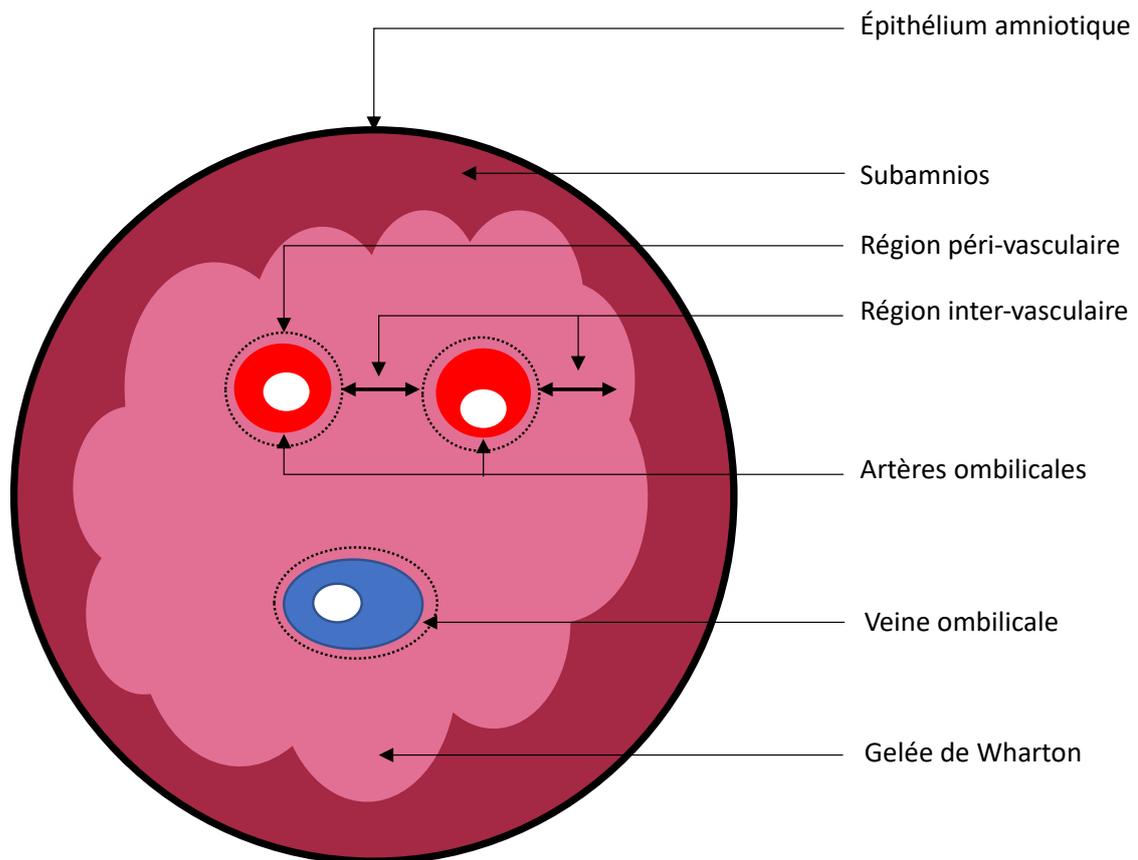


Figure 8 : Schéma en coupe d'un cordon ombilical humain

La gelée de Wharton, substance gélatineuse, a été mise en évidence en 1656 par Thomas Wharton (1614-1673), un physicien et anatomiste anglais. Il s'agit d'un tissu conjonctif se composant principalement de glycosaminoglycanes, plus particulièrement d'acide hyaluronique et de chondroïtine sulfate, mais aussi de plusieurs isoformes du collagène (39).

En 1974, le sang de cordon ombilical a été identifié comme étant source de cellules souches hématopoïétiques, le reste du cordon ombilical étant alors réduit à un déchet opératoire. Cela a été remis en cause en 1991, quand l'équipe de McElreavey a isolé et caractérisé des cellules de type fibroblaste dans la gelée de Wharton. En 2004, il a été démontré que ces cellules étaient des cellules souches qui exprimaient les marqueurs de surface CD29, CD44, CD51, CD73 et CD105, n'exprimaient pas CD34 et CD45, et étaient capables de se différencier vers les lignées adipocytaire et

ostéocytaire. Il a été mis en évidence que l'ensemble des sections du cordon ombilical, excepté le sang de cordon et l'épithélium amniotique, contient des cellules souches mésenchymateuses (39).

Plusieurs hypothèses ont été évoquées afin d'expliquer la présence de ces cellules souches dans la gelée de Wharton. La première évoque une migration de cellules tôt dans l'embryogenèse. Ainsi, des cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques auraient migré du sac vitellin et du mésonéphros vers le foie fœtal et la moelle osseuse à travers le cordon ombilical. Suite à ce transfert de cellules, certaines seraient restées piégées dans la gelée de Wharton et y demeureraient durant toute la période de gestation (40). Une seconde hypothèse a depuis vu le jour, expliquant que les cellules souches identifiées dans la gelée de Wharton proviendraient de CSM primitives, issues du mésenchyme et seraient présentes dans la matrice du cordon depuis le début de sa formation (41).

B. Intérêt des cellules souches issues de la gelée de Wharton

La moelle osseuse est la source privilégiée dans l'isolation des CSM, car les CSM-MO sont les plus étudiées, et donc les mieux documentées. Cependant, leur mode d'obtention présente des désavantages (Tableau 1). Tout d'abord, ces cellules sont récupérées par le biais d'une procédure invasive ne permettant l'isolement que d'une faible fraction de CSM (42). Il en est de même avec les cellules stromales mésenchymateuses issues du tissu adipeux. De plus, le nombre, la capacité de différenciation et la durée de vie des CSM-MO diminuent avec l'âge du donneur. Avec le vieillissement, il est également plus difficile de trouver dans la moelle osseuse des cellules souches en nombre suffisant, car le tissu graisseux devient plus important (43). Il existe par ailleurs un risque important d'infection virale intervenant lors du recueil des CSM-MO (44). Des alternatives à cette source de CSM ont vu le jour, parmi lesquelles figure le cordon ombilical. Cet organe est une source de cellules non controversée et accessible, qui peut être aisément récupéré après la naissance du nouveau-né. Il est estimé que le nombre de cellules isolées à partir du cordon ombilical

lors de l'accouchement est plus important lorsqu'il est effectué par voie basse que par césarienne (45). Avec environ 130 millions de naissances estimées par an, il constitue une ressource importante de cellules souches.

Tableau 1 : Comparaison des cellules souches issues de la gelée de Wharton avec celles de moelle osseuse et du tissu adipeux (39)

	CSM-GW	CSM-MO	CSM-TA
<i>Recueil</i>	Non-invasif	Invasif	Invasif
<i>Douleur Induite</i>	Sans douleur	Procédure douloureuse	Faible à modérée
<i>Risque encouru</i>	Pas de risque	Modéré	Faible à modéré
<i>Source</i>	Fœtale	Adulte	Adulte
<i>Expansion in vitro</i>	Importante	Modérée	Modérée
<i>Croissance in vitro</i>	Rapide	Faible	Faible

Il n'y a, à ce jour, pas de consensus sur la dose thérapeutique de cellules souches à administrer aux patients. Il est cependant connu que l'injection de CSM pratiquée au cours des essais cliniques, terminés ou en cours, nécessite un nombre de cellules élevé, généralement de l'ordre de quelques millions de cellules par kilogramme de poids corporel. Au vu du nombre de cellules à isoler, il est donc crucial d'établir des systèmes de culture permettant un isolement et une expansion efficaces tout en conservant leurs capacités thérapeutiques (46).

1. Les marqueurs de surface des CSM de la gelée de Wharton

Certaines protéines sont exprimées à la surface des cellules, dénommées clusters de différenciation (CD). Différents en fonction des cellules, ils peuvent servir de marqueurs en vue de leur identification cellulaire. Un ou plusieurs antigènes peuvent néanmoins être exprimés par différents types cellulaires, ce qui rend l'analyse plus complexe. Ils ont, entre autres, un rôle dans la différenciation cellulaire mais également dans la réponse immunitaire engagée.

L'identification des cellules issues de la gelée de Wharton passe tout d'abord par leur identification en qualité de cellules souches mésenchymateuses. D'un point de vue morphologique, elles ne sont en aucun cas différentes des CSM issues d'autres organes, ayant un aspect fibroblastique. Afin de les distinguer, il est recherché dans un premier temps, en général par cytométrie en flux, l'expression des marqueurs décrits par l'ISCT. Il n'existe pas à proprement dit de marqueurs spécifiques des CSM-GW, cependant l'association de tous les facteurs connus pour d'autres types cellulaires permet d'orienter leur identification (Tableau 2). Ainsi, par exemple, l'absence de marqueurs CD14, CD34, CD38, CD45 et HLA-DR permet d'exclure leur origine hématopoïétique, de même que l'absence d'expression de CD31 exclut l'origine endothéliale. De même l'antigène de surface CD44 agit comme un récepteur de l'acide hyaluronique, substance présente en forte teneur dans la matrice extracellulaire du cordon ombilical.

Tableau 2 : Tissus représentatifs source de CSM et leurs marqueurs de surface exprimés (47).

MARQUEURS		CSM-GW	CSM-MO
CD10	Neutral endopeptidase	+	+
CD11b	Integrin alpha-M	-	-
CD13	Aminopeptidase N	+	+
CD14	LPS receptor	-	-
CD26	Dipeptidylpeptidase 4		+
CD29	Integrin β 1	+	+
CD31	PECAM-1	-	-
CD33	Sialic acid binding Ig-like lectin 3	-	-
CD34	Sialoprotein	-	-
CD38	ADP-ribosyl cyclase 1	-	-
CD40	Tumor-necrosis factor receptor superfamily 5	-	+
CD44	Hyaluronan receptor	+	+

CD45	Pan-leucocyte antigen	-	-
CD49a	Integrine α 1	-	+
CD49b	Integrin α 2	+	+
CD49c	Integrin α 4	+	+
CD49d	Integrin α 3	+	-
CD49e	Intergrin α 5	+	+
CD50	ICAM-3 (Intercellular adhesion molecule-1)	-	-
CD51	Integrin α V	+	+
CD53	Tetraspanin-25	-	-
CD54	ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 3)	- ou +	+
CD56	NCAM-1 (neural cell adhesion molecule)	-	-
CD58	LFA-3 (lymphocyte function-associated antigen 3)	+	+
CD71	Transferin receptor	-	+
CD73	Ecto-5 nucleotidase	+	+
CD80	CD28 ligand	-	-
CD86	Activation B7-2 antigen	-	-
CD90	Thy-1	+	+
CD105	TGF- β RIII (transforming growth factor- β receptor III)	+	+
CD106	VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1)	- ou +	+
CD117	C-kit receptor	- ou +	-
CD133	AC133 (prominin)	-	-
CD140 α	PDGF-R α (platelet-derived growth factor receptor α)	-	+
CD140 β	PDGF-R β (platelet-derived growth factor receptor β)	ND	+
CD144	VE-cadherin	- ou +	-

CD146	ME1-CAM (melanoma-cell adhesion molecule)	- ou +	+
CD166	ALCAM (activated lymphocyte cell adhesion molecule)	+	+
CD235 α	Glycophorin		-
CD325	N-cadherin	+	+
HLA-I		+	+
HLA-II		-	-

L'expression des marqueurs, et donc les caractéristiques des CSM, peuvent malgré tout être influencées par la méthode d'extraction des cellules souches de la gelée de Wharton. En effet l'équipe de Salehinejad a comparé les profils d'expression des marqueurs indispensables à la caractérisation des CSM en utilisant trois méthodes d'isolement différentes : méthode des explants et méthode enzymatique avec plusieurs cocktails d'enzymes (collagénase/trypsine/hyaluronidase et collagénase/trypsine) (Tableau 3).

Tableau 3 : Influence de la méthode d'isolement des CSM-GW sur l'expression des marqueurs de surface.

C/T : collagénase seule ; C/H/T : collagénase, hyaluronidase, trypsine ; NT : Non testé

	C/T (48)	C/H/T (48)	Explants (48)	Explants (49)
<i>CD34</i>	5,79 \pm 0,21	13,61 \pm 3,22	5,4 \pm 2,57	0,72
<i>CD45</i>	7,08 \pm 1,85	15,84 \pm 0,58	10,38 \pm 0,08	NT
<i>CD44</i>	97,69 \pm 0,94	93,54 \pm 0,92	93,01 \pm 7,92	83,11
<i>CD73</i>	67,32 \pm 3,28	13,33 \pm 5,02	74,47 \pm 0,67	NT
<i>CD90</i>	72,23 \pm 3,64	28,53 \pm 1,81	55,79 \pm 5,95	99,30
<i>CD105</i>	90,30 \pm 8,16	74,19 \pm 0,19	83,06 \pm 2,73	96,37

Il a ainsi été mis en évidence que les pics d'expression pour CD73 et CD 90 variaient. Le traitement utilisant la collagénase et la hyaluronidase diminue

significativement les taux d'expression de ces marqueurs, quand ils sont comparés à la méthode des explants et à une autre méthode enzymatique (collagénase seule). Schugar a également étudié les profils d'expression et rapporté ceux de CD105, CD73, CD44, et CD90 à des taux de 35%, 42%, 48% et 67% respectivement, après digestion à la collagénase seule (50). Il a été rapporté que la méthode enzymatique collagénase / hyaluronidase / trypsine donne des profils d'expression à 96% pour CD44 et 91 % pour CD90 (51). Entre les différentes études publiées à ce jour, les résultats pour les marqueurs étudiés donnent les mêmes tendances, avec cependant des pourcentages variés, dont les causes ne sont pour l'instant élucidées. Plusieurs pistes sont cependant évoquées : les méthodes de culture, le tissu de provenance des cellules souches ou encore la sécrétion de facteurs durant les premiers passages.

2. Les marqueurs de pluripotence des CSM de la gelée de Wharton

Les CSM-GW sont considérées comme multipotentes, mais elles expriment malgré tout des marqueurs de pluripotence à de faibles taux, nettement inférieurs à ceux présents dans les cellules souches embryonnaires. Ces facteurs que sont Nanog, Oct-4 et Sox-2, sont impliqués dans l'auto-renouvellement, la différenciation et la prolifération. Oct-4 participe à l'initiation du développement embryonnaire des mammifères. Il est essentiel à la formation et au maintien de la masse cellulaire interne. Sox-2 régule l'expression d'Oct-4 et maintient l'état pluripotent des cellules souches embryonnaires, alors que Nanog est requis pour le maintien d'un état non différencié et l'auto-renouvellement des cellules souches. L'absence ou le faible niveau d'expression de ces marqueurs par rapport aux CSE explique pourquoi les CSM-GW ne produisent pas de tératomes, comme démontré chez des souris immunodéficientes (52).

Il n'y a cependant pas de consensus sur les marqueurs de pluripotence spécifiques des CSM-GW, les résultats étant contradictoires selon les publications. L'expression de ces marqueurs peut varier selon le passage auquel elle est mesurée, le milieu de culture, ou la concentration en O₂. Ainsi, par exemple, pour ce dernier

facteur, une diminution de la concentration en oxygène de 21% à 5% dans la phase gazeuse augmente l'expression des gènes codant pour ces marqueurs (39).

Tableau 4 : Expression des marqueurs de pluripotence des cellules souches de cordon ombilical (39,52).

Marqueurs positifs	Données contradictoires
REX-2	STRO-1
GD2	Oct-4
SOX-2	SSEA-4
NANOG	Tra-1-60
Tra-1-81	
SSEA-1	
DNMT3B	
GABRB3	

3. Les propriétés immunomodulatrices des CSM de la gelée de Wharton

Au cours de ces dernières années, les cellules souches mésenchymateuses sont devenues des candidates envisageables en tant que modulateurs de la réponse immunitaire dans la maladie du greffon contre l'hôte, mais également dans le traitement des maladies auto-immunes. En effet, les CSM-GW sont caractérisées par leurs propriétés immunosuppressives. Elles sont capables de réprimer plusieurs fonctions, parmi lesquelles la prolifération, la production de facteurs solubles ou la cytotoxicité cellulaire exercée en temps normal par les lymphocytes T, B et les cellules Natural Killers. Cette propriété est médiée à la fois par les contacts cellulaires mais également par des signaux paracrines via des facteurs solubles. Ainsi, par exemple, les CSM de cordon n'expriment pas les antigènes de surface CD40, CD80 et CD86 qui participent à l'activation des lymphocytes T (39).

Ces cellules souches sont également protégées des mécanismes de défense immunologiques. Elles n'expriment pas le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, ce qui leur permet d'échapper à la reconnaissance par les cellules T CD4+ alloréactives, tout en exprimant les molécules du CMH de classe I. Cette expression leur permet d'échapper à la lyse par les cellules NK. De plus, les CSM-GW n'expriment pas les molécules de co-stimulation requises pour l'induction des cellules T effectrices. Même si les CSM-MO sont considérées comme la référence dans les traitements de thérapie cellulaire, elles présentent de nombreuses similitudes d'un point de vue immunologique avec les CSM issues de cordon ombilical. Les nouvelles données suggèrent cependant que les CSM-GW pourraient être moins immunogènes que les CSM-MO, ce qui en ferait de bonnes candidates pour la transplantation allogénique (53).

L'immunomodulation des CSM-GW provient de mécanismes paracrines. Ainsi les CSM-GW sécrètent entre-autres (39) :

- La prostaglandine E2 (PGE2) qui réprime la cytotoxicité d'origine des cellules NK.
- L'indolamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui inhibe la différenciation des lymphocytes T auxiliaires.
- La cytokine anti-inflammatoire IFN- α .

Cependant, l'impact des CSM-GW sur les lymphocytes B a été peu étudié. À ce jour, seules quelques études ont été rapportées (Figure 9) : en 2012, il a été rapporté que les CSM-GW, in vitro, sont capables d'inhiber la prolifération, la différenciation et la production d'anticorps des cellules B (54) ; d'autres auteurs, cependant, ont prouvé que les CSM-GW n'ont aucune influence sur l'activation des lymphocytes B (55). Des études plus approfondies sont nécessaires afin d'élucider l'impact réel sur ces lymphocytes.

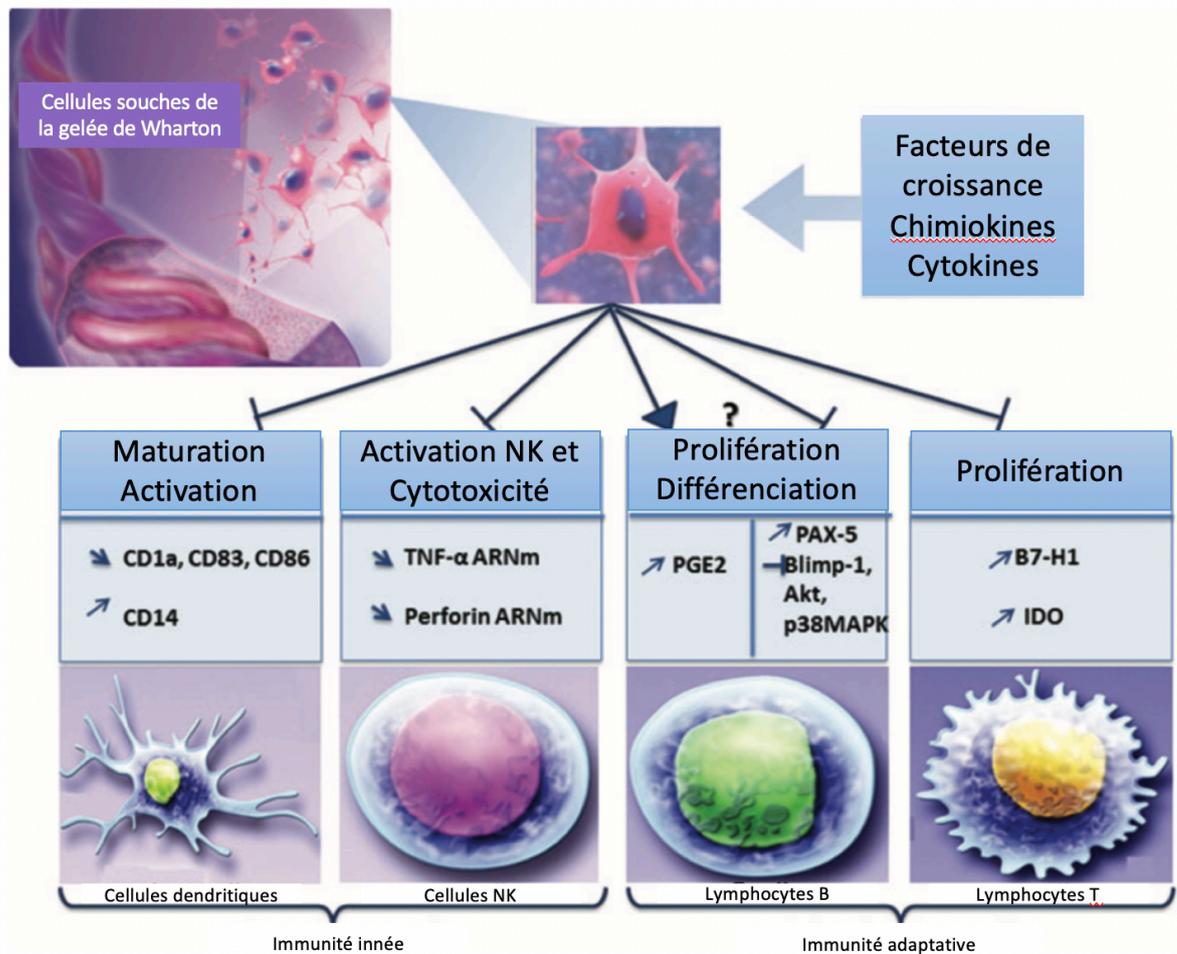


Figure 9 : Effets immunomodulateurs des CSM-GW sur l'immunité innée et adaptative, adapté de (53).

4. Croissance et différenciation des CSM-GW

Plusieurs études ont comparé les CSM de la gelée de Wharton, avec les CSM de moelle osseuse, quant à leur capacité de croissance et de différenciation. Il a ainsi été constaté que la croissance des CSM-GW était significativement plus rapide. Cette caractéristique a été démontrée par le temps de doublement de population à chaque passage, et par l'activité métabolique des cellules. Ainsi, tel que montré sur la Figure 10a, le nombre de jours nécessaires pour le doublement de population augmente plus rapidement pour les CSM-MO, atteignant onze jours, que pour les CSM-WJ (quatre jours au plus haut), ce qui atteste en faveur d'une croissance plus rapide. L'activité métabolique plus faible des CSM-MO par rapport aux CSM-WJ peut être une des

explications comme cela a été constaté sur une culture d'une période de vingt et un jours (Figure 10b).

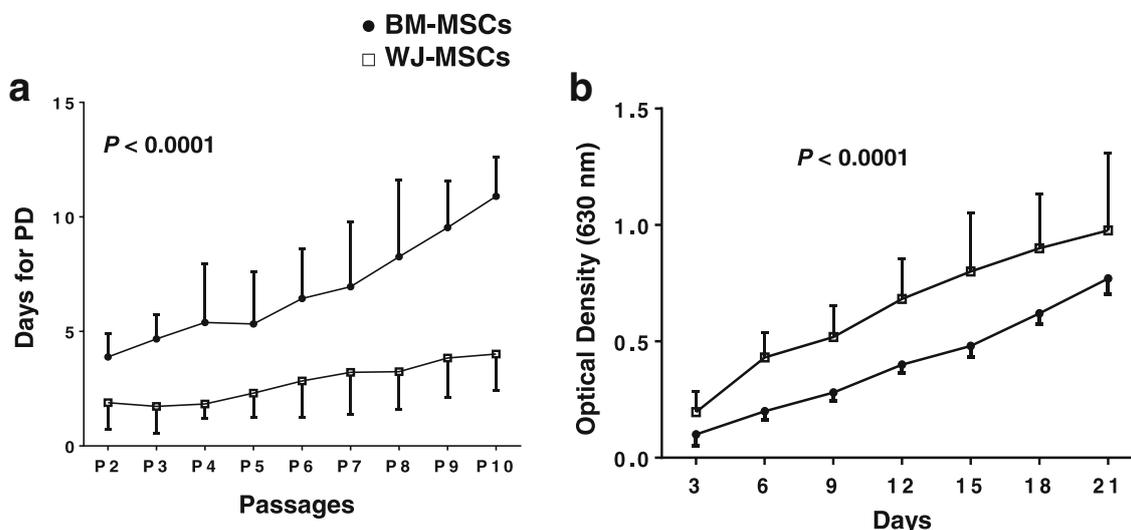


Figure 10 : Comparaison des propriétés de prolifération entre CSM-MO et CSM-GW (a) nombre de jours pour le doublement de population après chaque passage (b) Résultats de densité optique indiquant le nombre de cellules métaboliquement actives (56).

Il aurait pu être envisagé que cette croissance soit attribuée à un taux de cellules apoptotiques plus faible pour les CSM-WJ. Les taux sont cependant similaires quel que soit le passage et le type de cellules. La prolifération accrue retrouvée chez les CSM-GW est donc expliquée par d'autres facteurs, en partie intrinsèques à cette population. En effet, une proportion plus importante de CSM-GW que de CSM-MO se trouve en phase S et G2/M du cycle cellulaire, alors que l'on retrouve une plus grande quantité de CSM-MO en phase G0/G1. Cela est associé à des expressions différentes des gènes impliqués dans les transitions G1/S et G2/M. Plus spécifiquement, cette différence de croissance semble provenir (56) :

- D'une sur-activation de CCND2, CDC25A, CCNA2, CCNB1, CDC28, CKS2, CDC20 et AURKB pour les CSM-GW.
- D'une diminution de l'expression du gène anti-apoptotique BCL12 (impliqué dans le passage en phase S) et de CDKN1B (impliqué dans l'arrêt en phase G1) pour les CSM-MO.

La sénescence est également une cause de la différence de prolifération entre ces deux populations de cellules. Les CSM-MO entrent plus rapidement en sénescence que les CSM-GW. La longueur des télomères, inducteur le plus probant dans la sénescence n'est cependant pas impliquée ; la longueur n'est pas significativement différente entre les cellules. Plusieurs explications sont avancées. La première stipule qu'un gène, TP53 est régulé positivement. Ce gène est impliqué dans la sénescence, mais permet également d'inhiber le cycle cellulaire afin de permettre au génome de réparer les potentielles altérations causées à l'ADN. Par ailleurs, l'activité de l'enzyme β -galactosidase associée à la sénescence cellulaire (SA- β -gal) est plus importante pour les CSM-MO (56).

Les aberrations génétiques peuvent altérer les cellules et leur potentiel thérapeutique, et les CSM-MO peuvent en développer suite à une culture à long terme. Les résultats concernant les CSM-GW sont à ce jour contradictoires quant à la stabilité du génome. Les études les plus récentes démontrent cependant que ces aberrations interviennent à des taux comparables quel que soit la provenance des CSM (moelle osseuse ou gelée de Wharton), pourvu que les conditions de culture soient identiques. Néanmoins, l'analyse du caryotype pour les cellules mises en culture est indispensable avant toute application clinique.

De nombreuses études ont pu prouver les capacités de différenciation des CSM-GW vers les lignées oséocytaires, adipocytaires et chondrocytaires. Il a cependant été prouvé que les CSM-GW présentent une capacité de différenciation adipogénique et ostéogénique inférieure à celle des CSM-MO. L'implication des voies de signalisation WNT a été préalablement mise en évidence dans la différenciation car elles permettent de maintenir les cellules souches dans un état indifférencié. La différence entre les deux sources de CSM est probablement associée aux différences d'expression des molécules associées à cette voie de signalisation ; en effet vingt-cinq gènes sur quatre-vingt-quatre sont exprimés différemment entre les deux populations cellulaires (56).

Le potentiel de différenciation des CSM semble dépendre de l'origine tissulaire des CSM (Figure 11). Des chercheurs ont en effet démontré que les sources fœtales, amniotiques et placentaires permettent l'obtention de nombreuses CSM ayant un potentiel de différenciation plus poussé et un auto-renouvellement plus long que les cellules issues de la moelle osseuse d'un adulte par exemple (57).

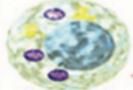
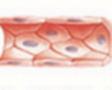
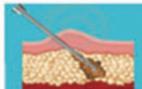
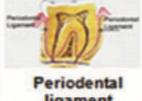
Cell Types / Sources	 Chondrocyte	 Osteocyte	 Adipocyte	 Endothelial cell	 Neuron	 Myocardial cell	 Pancreatic islet-like cell
 Bone Marrow	++	++	++	+++	++	++	++
 Adipose tissue	++	++	+++	ND	+++	++	++
 Dental pulp	+	++	+	ND	++	++	++
 Umbilical cord	++	++	+	+++	++	++	++
 Periodontal ligament	+++	+++	++	++	++	ND	ND
 Amniotic fluid	++	++	+	++	++	++	++

Figure 11 : Potentiel de différenciation des CSM-GW comparé à d'autres sources de CSM (53).

C. La thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire repose sur des techniques à but thérapeutique qui consistent à remplacer des cellules déficientes ou non présentes dans le corps humain

par des cellules saines. Il s'agit d'une greffe de cellules souches, qui peuvent être prélevées :

- Sur la personne malade. On parle alors d'autogreffe.
- Sur un autre individu. On parle alors d'allogreffe.

Les premières greffes cellulaires ont été pratiquées dans les années 1950 dans le cadre d'allogreffes suite à des irradiations accidentelles ou dans des traitements anticancéreux (par autogreffe et allogreffe). A la fin des années 1980, la première greffe est effectuée avec des cellules souches sanguines, puis en 1988, les cellules souches issues du sang de cordon sont utilisées. Il faut attendre 1995 et l'amélioration des techniques afin d'assister à la greffe de cellules amplifiées en culture.

Une fois le prélèvement effectué, les cellules passent par une étape de purification afin de ne conserver qu'un seul type cellulaire. Dans le cadre d'une maladie génétique, si les cellules proviennent d'une autogreffe, celles-ci nécessitent d'être reprogrammées, par transfert de gène ; cette opération associe donc thérapie génique et thérapie cellulaire. Les cellules souches sont ensuite amplifiées, il faut en effet des millions de cellules avant de pouvoir les réimplanter chez le malade au niveau du tissu ou du groupe de cellules non fonctionnel.

La greffe a deux vocations thérapeutiques potentielles :

- La **régénération** du tissu pathologique, avec la capacité de différenciation des cellules souches mais aussi par le biais de la sécrétion de cytokines, ou de facteurs de croissance. Les applications potentielles concernent l'infarctus du myocarde, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), la cirrhose, l'arthrose ou encore le diabète (Figure 12).
- **L'immunomodulation**, au cours de laquelle les cellules souches peuvent induire une réduction de l'inflammation et agir sur la réponse immunitaire. En effet, après injection, elles se dirigent préférentiellement vers le lieu de l'inflammation, et produisent des facteurs notamment IL-6, IL-10, PGE-2, TGF β , IFN γ afin d'y exercer une action immunomodulatrice. Ainsi, des maladies telles

que la réaction du greffon contre l'hôte (GvHD), la maladie de Crohn, la polyarthrite rhumatoïde ou la sclérose en plaques pourraient être traitées (Figure 12).

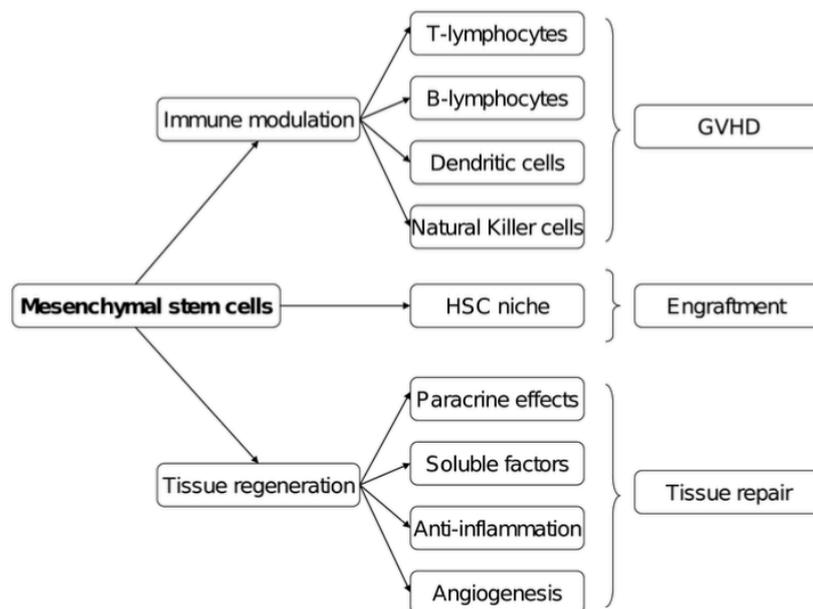


Figure 12 : Mécanismes d'action et rôle potentiel des CSM (58).

Tableau 5 : Avantages et inconvénients des différents types de greffe de CSM (59).

	Avantages	Inconvénients
<i>Autogreffe</i>	<ul style="list-style-type: none"> Absence de GvHD → Risque nul de rejet 	<ul style="list-style-type: none"> Nécessité de prélever un nombre suffisant de cellules
<i>Allogreffe</i>	<ul style="list-style-type: none"> Effet GVL¹ → Réaction du greffon contre la maladie Reformation d'un système immunitaire 	<ul style="list-style-type: none"> Immunogénicité Sécurité virale

Jusqu'à récemment, les cellules souches multipotentes, étaient étudiées afin de pallier différents types cellulaires déficients ou insuffisamment nombreux.

¹ Effet GVL (Graft versus Leukemia) : Effet positif lors d'une greffe, au cours duquel les lymphocytes, éliminent les cellules tumorales

L'amélioration des connaissances concernant ces cellules permet aujourd'hui d'envisager leur utilisation dans la modulation de la cicatrisation, de la réparation tissulaire, de la réponse immunitaire mais également de la mort cellulaire. Le phénomène de *homing*, soit la capacité de migrer vers le site défectueux a en effet été mis en évidence et est aujourd'hui exploité dans la recherche sur les thérapies cellulaires (60).

Afin d'étudier les applications cliniques potentielles des CSM-GW, de nombreux essais cliniques de thérapie cellulaire sont menés. Un essai clinique est une recherche biomédicale organisée en vue de l'évaluation d'une substance médicamenteuse chez l'Homme. L'objectif de ces essais est d'établir ou de vérifier certaines données pharmacocinétiques (modalités de l'adsorption, de la distribution, du métabolisme et de l'excrétion du médicament), pharmacodynamiques (mécanisme d'action), et thérapeutiques (efficacité et tolérance), d'une substance médicamenteuse nouvelle qui doit être plus efficace ou au moins aussi efficace qu'une autre. Afin de garantir l'authenticité et la qualité des informations recueillies, les essais cliniques doivent suivre les Bonnes Pratiques Cliniques (BPC), dont la dernière version du texte français date du 24 novembre 2006.

On distingue quatre phases :

- Phase I : Étude de la première administration chez l'homme, sain, permettant d'évaluer la tolérance humaine ou dose maximale tolérée.
- Phase II : Étude de l'efficacité pharmacologique sur une population malade, permettant la définition des modalités thérapeutiques, de la dose optimale (posologie, rythme, durée utilisée en phase III) ainsi que des symptômes traduisant l'effet thérapeutique et les effets indésirables.
- Phase III : Menée sur une population malade, étude de l'efficacité thérapeutique et de la tolérance du produit comparée à un placebo ou un médicament de référence traduisant le rapport bénéfice/risque du médicament considéré.
- Phase IV : Après la mise sur le marché, durant la période d'utilisation thérapeutique, cette phase permet d'approfondir les connaissances sur le

médicament, d'identifier les effets indésirables rares, ainsi que d'adapter les posologies aux cas particuliers non pris en compte durant les phases II ou III.

Avant le début de l'essai clinique, celui-ci doit être répertorié dans un registre public référencé par l'organisation mondiale de la santé (OMS), accessible gratuitement au public sur Internet notamment, sur le site américain www.clinicaltrials.gov ou le site européen www.clinicaltrialsregister.eu.

Une recherche sur le site www.clinicaltrials.gov (recherche des termes « wharton jelly mesenchymal » ou « umbilical cord mesenchymal » ou « wharton mesenchymal » après exclusion des essais utilisant du sang de cordon) a permis de dénombrer, au 8 avril 2020, 205 études cliniques portant sur le traitement du diabète et ses complications, de la dystrophie musculaire de Duchenne, de l'arthrose, de la cirrhose, de l'autisme, de maladies auto-immunes telles que le lupus, ou la sclérose en plaques entre autres (Figure 13). La plupart des essais cliniques sont en phase I, phase II ou à l'interface phase I/phase II (Figure 14). De nombreux pays conduisent aujourd'hui des essais cliniques basés sur l'utilisation des CSM-GW, soulignant le potentiel des cellules souches. La grande majorité de ces essais est menée en Chine (Figure 15).

La majorité des études concerne les pathologies neurologiques, pneumologiques, et endocrinologiques mais s'intéresse à d'autres domaines dont la cardiologie ou l'hématologie. Parmi les maladies les plus citées se trouvent le diabète et ses complications, la cirrhose, l'arthrose, le lupus, la maladie de Parkinson, ou l'infarctus du myocarde. La diversité des pathologies traitées souligne le fait que ces essais misent sur la variété des modalités d'action de ces cellules. Les essais s'appuient ainsi autant sur les propriétés immunomodulatrices, anti-inflammatoires des cellules souches, mais également sur leur capacité de différenciation vers les différentes lignées cellulaires. Une large majorité des essais porte sur des maladies dont les mécanismes sont connus et établis depuis de nombreuses années. Plusieurs essais se basent cependant uniquement sur les propriétés potentielles des CSM-GW, lorsque les mécanismes de la maladie sont peu ou partiellement élucidés, soulignant

ainsi le potentiel attendu de ces cellules. Ainsi, par exemple dans le cas du virus SARS-CoV-2, 12 essais cliniques peuvent être comptabilisés au 19 juin 2020, démarrés en moins de trois mois sur trois continents.

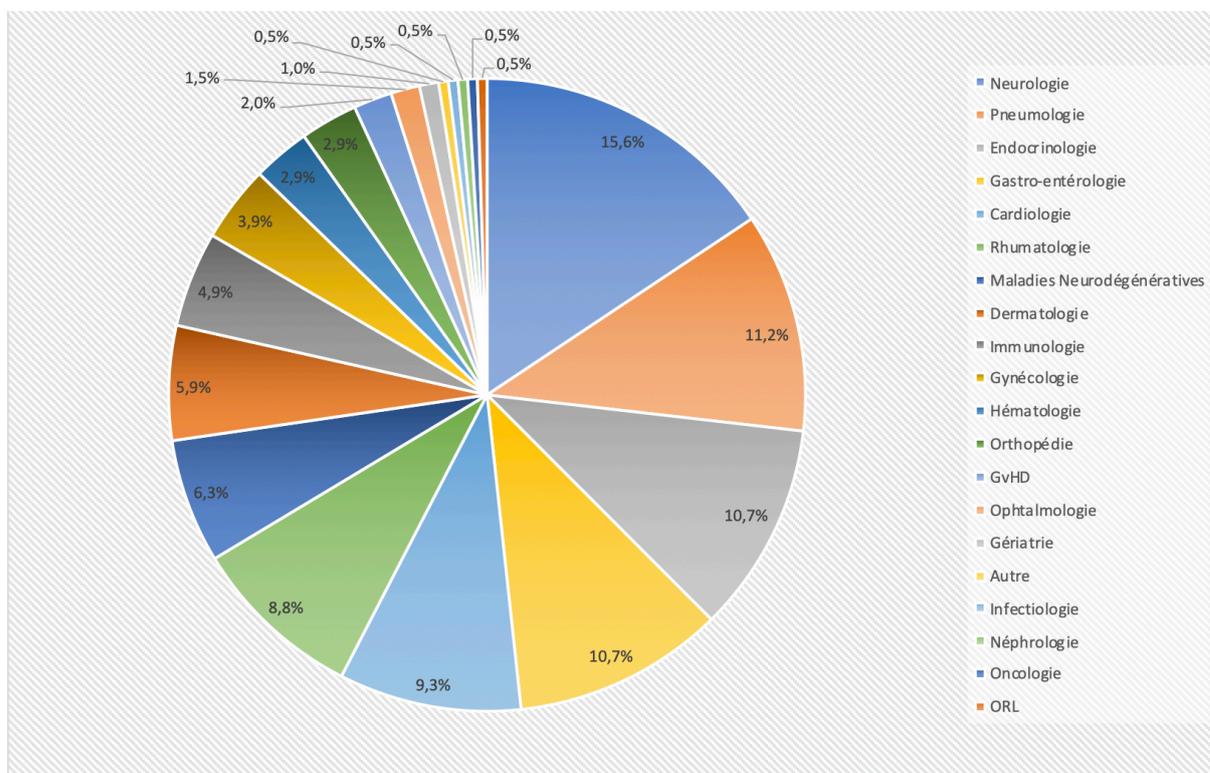


Figure 13 : Nombre d'essais cliniques en fonction des indications thérapeutiques (Source : www.clinicaltrials.gov, au 8 avril 2020).

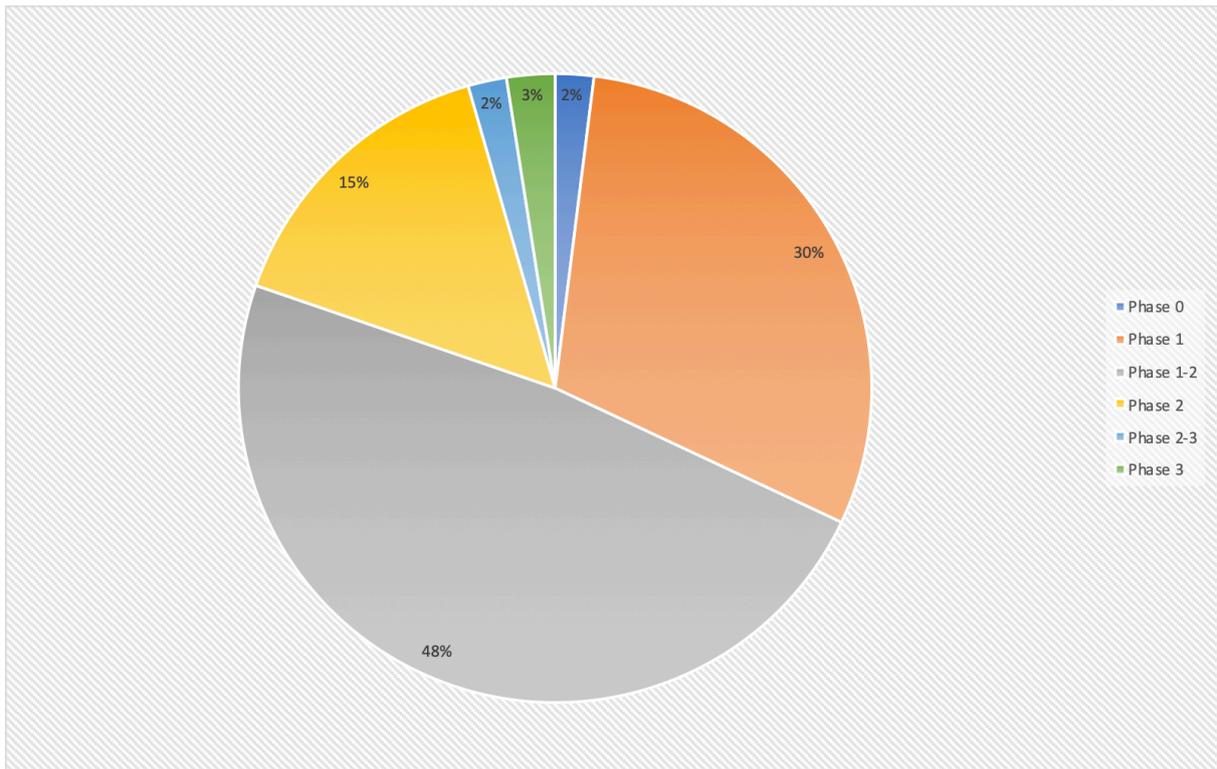


Figure 14 : Nombre d'essais cliniques en fonction de la phase dans laquelle ils se trouvent (Source : www.clinicaltrials.gov, au 8 avril 2020).

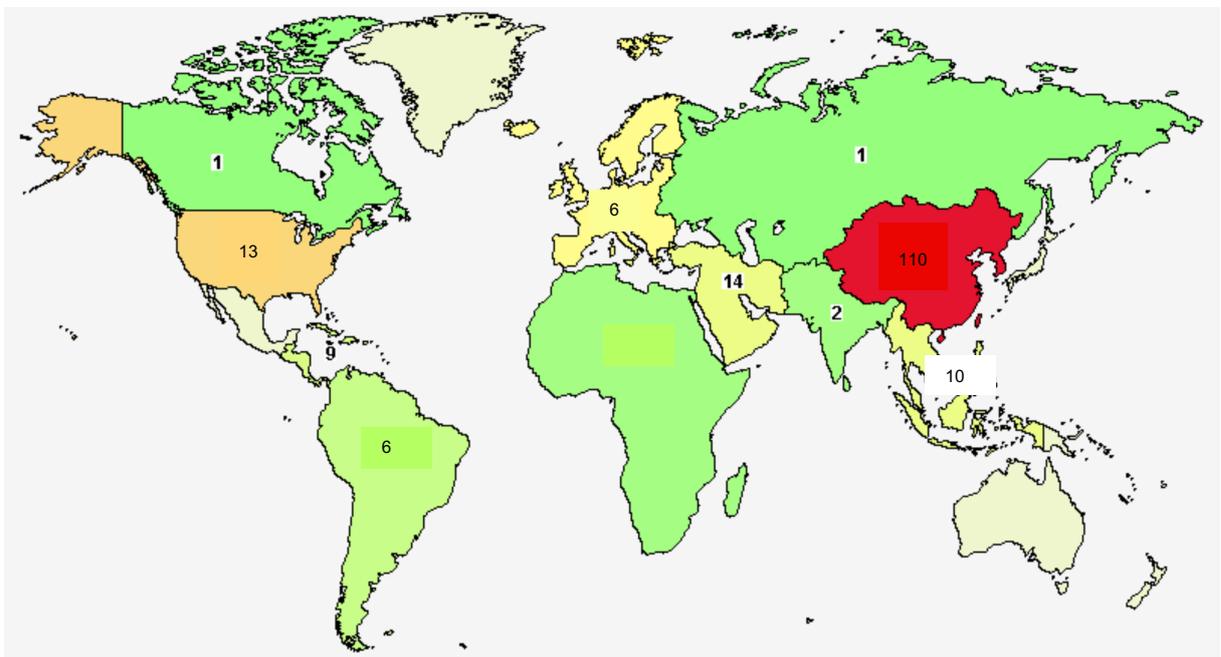


Figure 15 : Nombre d'essais cliniques en fonction de leur localisation (Source : www.clinicaltrials.gov, au 8 avril 2020).

À ce jour, seules quelques études ont publié leurs résultats concernant certaines applications thérapeutiques des CSM-GW.

Cirrhose et ses complications (59) : 110 patients présentant une cirrhose décompensée en lien avec le virus de l'hépatite B (VHB) ont reçu un traitement médical conventionnel combiné avec trois perfusions IV de CSM-GW à une dose de 0,5 à 1,0 x10⁶/kg, avec un intervalle de quatre semaines entre chaque cure. Le groupe contrôle recevait en parallèle un traitement médical conventionnel. Tous les participants ont été suivis durant quatre-vingt mois. Aucune complication, ni effet secondaire n'ont été constatés chez les patients traités avec les CSM-GW, et chez ce même groupe le taux de survie a été supérieur pendant la période de suivi. Il a été conclu au cours de cette étude que ces cellules pouvaient être envisagées comme une nouvelle approche dans le traitement de cette maladie.

Insuffisance cardiaque (61) : Durant cet essai randomisé de phase I/II en double aveugle, les patients présentant une insuffisance cardiaque ou une fraction d'éjection réduite ont reçu par voie IV une perfusion de CSM-GW ou de placebo. Ils ont par la suite été suivis sur douze mois. Les patients traités avec les CSM-GW n'ont pas présenté d'effets secondaires ni d'allo-anticorps dirigés vers les CSM-GW, indiquant qu'il n'y a pas de réponse immunitaire humorale. Ce traitement a significativement amélioré la fonction ventriculaire gauche ainsi que la qualité de vie des patients traités.

Sclérose en plaques (62) : Cet essai, mené sur une durée d'un an, a reposé sur l'injection intraveineuse de doses de 20x10⁶ CSM-GW sur sept jours et a compris vingt patients. Aucun effet secondaire sérieux n'a été constaté, seuls maux de tête et fatigue ont été relevés. L'amélioration des symptômes a été constaté après un mois sur la sclérose en plaques, mais également sur le dysfonctionnement de la vessie, des intestins, la marche, les fonctions motrices des membres supérieurs et plus généralement une amélioration de la qualité de vie. Une IRM du cerveau et de la moelle épinière cervicale a permis de mettre en évidence des lésions inactives chez 83,3% des sujets après un an.

D. Ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire est un domaine multidisciplinaire, qui associe les principes et les techniques de la biologie avec les sciences de l'ingénieur. Son objectif est de développer des substituts biologiques capables de restaurer, maintenir ou améliorer la fonction des tissus ou parties déficientes du corps pouvant être endommagés notamment par un trauma, une maladie congénitale ou un cancer. Cette discipline est ainsi associée à une forme de médecine régénératrice. Elle fournit des structures fonctionnelles pour la réparation tissulaire et l'étude du comportement des cellules souches, mais également des modèles pour l'étude de nombreuses maladies. Cette technologie repose sur l'association de cellules réparatrices, de biomatériaux développés par l'ingénierie des matériaux, ainsi que des molécules biologiquement actives telles les facteurs de croissance ou les protéines d'adhésion cellulaire (63).

Le principal inconvénient de la culture de cellules est qu'en dehors du corps, elles ne s'assemblent pas inévitablement en organe tridimensionnel. In vivo, l'environnement est plus complexe, car il repose sur de nombreux signaux d'origine chimique, mécanique ou électrique. Ces signaux émis entre cellules permettent la formation, le maintien ou la régénération des organes. Le challenge est donc de reproduire au plus près les conditions naturelles *in vitro*. La manière la plus proche de s'en approcher est d'élaborer un environnement tridimensionnel sous la forme d'une matrice (ou scaffold, signifiant échafaudage en anglais) poreux. L'association d'un scaffold, de facteurs de croissance et de cellules constitue la triade de l'ingénierie tissulaire. La cellule synthétise le tissu pendant que le scaffold fournit le microenvironnement adéquat à l'acquisition de fonctions cellulaires et à la prolifération.

Le scaffold consiste en une matrice extracellulaire artificielle utilisée pour accompagner la prolifération et la différenciation cellulaire. Il est donc primordial de mimer les fonctions physiologiques de la matrice extracellulaire biologique afin de préserver la capacité des cellules à se différencier vers différents phénotypes, mais également en vue de combler la lésion tissulaire. Ils sont synthétisés avec des matériaux synthétiques tels que l'acide poly-L-lactique (PLLA) ou l'acide polyglycolique

(PGA), mais également naturels comme des protéines (soie, collagène, gélatine...), des polysaccharides (cellulose, chitine...), ou des polynucléotides. Ils doivent répondre à des propriétés qui sont énumérées dans le tableau ci-dessous (Tableau 6) (64).

Tableau 6 : Propriétés idéales des scaffolds utilisés en ingénierie tissulaire (65,66).

<i>Biocompatibilité</i>	Permettre l'adhésion et l'activité cellulaire normale Doivent induire réponse immunitaire minimale
<i>Biodégradation</i>	Biodégradables afin de permettre aux cellules de produire leur propre matrice extra-cellulaire (MEC) Le produit de dégradation doit être non toxique et facilement éliminé par le corps La dégradation doit s'effectuer par des enzymes ou une réaction biologique du corps La dégradation doit être contrôlée : <ul style="list-style-type: none"> • Trop rapide : risque de rupture mécanique. • Trop lente : risque de réponse inflammatoire.
<i>Propriétés mécaniques</i>	Propriétés mécaniques compatibles avec le site anatomique dans lequel ils doivent être implantés. ⇒ Pour l'os par exemple, le biomatériau doit posséder un module de Young, une résistance à la compression et à la fatigue équivalents à ceux de l'os Suffisamment résistants afin de permettre une manipulation chirurgicale lors de l'implantation.
<i>Architecture</i>	Poreux afin d'assurer la diffusion interne des nutriments et des cellules au sein de la MEC, et externe des déchets ⇒ Macropores pour la croissance vasculaire et tissulaire ainsi que l'invasion du système vasculaire. ⇒ Micropores pour avoir une surface de contact suffisante et stimuler ainsi le contact entre les cellules et le biomatériau.

Dans un premier temps, en fonction de la lésion à réparer, il est nécessaire d'identifier la source de cellules qu'elle soit autologue ou allogénique avant d'effectuer le prélèvement. Ces cellules sont alors mises en culture afin qu'elles se multiplient et, ou se différencient vers la lignée souhaitée. Une fois le nombre de cellules suffisant, elles sont associées à une matrice, isolée ou synthétisée, qui constituera un système

ouvert si on souhaite une croissance cellulaire en son sein, ou fermé si elles sont directement intégrées telles quelles. Une fois uniformément associées au matériau, les cellules poursuivant leur prolifération cellulaire sont cultivées de manière dynamique dans un bioréacteur. Cela permet de faciliter la maturation des biomatériaux cellularisés par le biais d'échanges gazeux et d'ajouts de nutriments, et, éventuellement, de facteurs de croissance ou de différenciation. Le tissu peut alors être réimplanté chez le patient en lieu et place de celui à reconstruire (Figure 16).

Cette thérapie diffère des traitements classiques, qui reposent sur le remplacement définitif du tissu ou de l'organe lésé par une prothèse, sur une reconstruction chirurgicale, sur une transplantation ou sur un traitement médicamenteux. Les inconvénients qui incombent à ces thérapies plus conventionnelles expliquent l'essor de la recherche en ingénierie tissulaire. L'ingénierie tissulaire présente l'avantage de s'affranchir du manque de donneurs. Cela permet ainsi d'éviter les problèmes habituels liés aux greffes, en termes d'histocompatibilité, de fonctionnalité, ainsi que de rejet immunitaire. L'utilisation de cette approche permettrait d'offrir une solution durable à des problèmes cliniques variés.

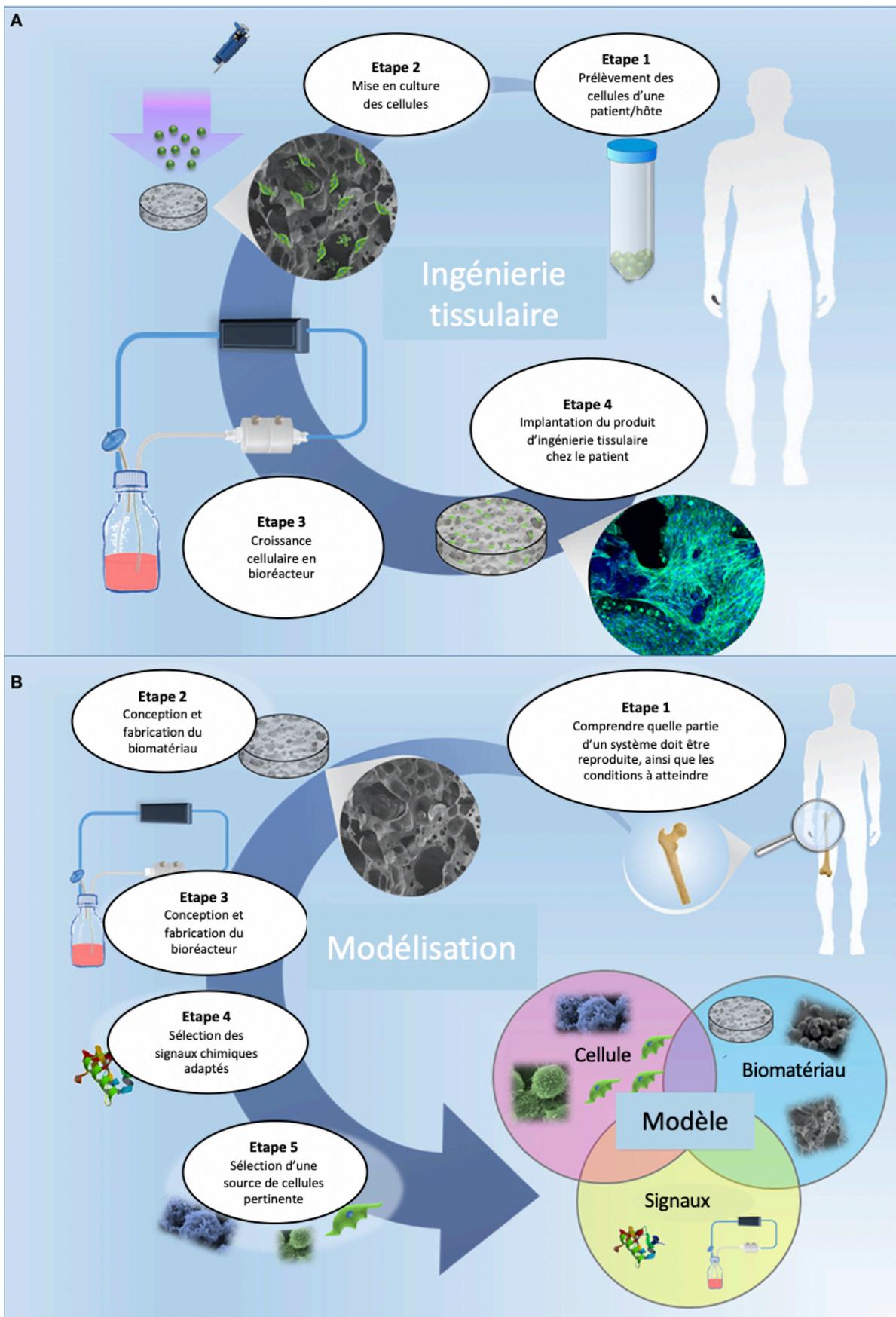


Figure 16 : A) Modèle classique de l'ingénierie tissulaire, B) Approche de l'ingénierie tissulaire pour le développement de modèles in vitro, d'après (67).

Technique développée depuis les années 1990, car tirant partie des avancées concomitantes en biologie par les spécialistes des biomatériaux et en génie des procédés, l'ingénierie tissulaire tend à se développer dans différents domaines. Les applications de cette technologie concernent de nombreux organes tels que la peau, le tissu neural, ophtalmique, le cœur, ainsi que l'os et le cartilage. On trouve aujourd'hui de nombreuses applications de ces techniques, dont les exemples suivants :

- Régénération tissulaire et greffe de peau en tant qu'alternative de traitement aux brûlures (66).
- Réalisation de cornées artificielles à base de collagène pour les personnes atteintes de cécité (68).
- Recherches sur la régénération du foie ou de la vessie (69).
- Réparation et régénération d'os endommagés ou malades (65).

La plupart de ces applications utilisent des cellules souches déjà engagées dans un processus de différenciation. Ces cellules natives du tissu ciblé sont simples d'utilisation notamment vis-à-vis du rejet immunitaire en cas de prélèvement autologue et sont capables pour la plupart de former une matrice propre au tissu. Cependant, certaines limites existent, notamment le souci du nombre de cellules disponibles que le prélèvement soit autologue ou allogénique (dû au manque de donneurs). Par ailleurs elles peuvent se dédifférencier au cours de leur culture et comme les chondrocytes, devenir fibroblastiques et perdre l'expression de protéines matricielles spécifiques (70). L'utilisation de cellules souches mésenchymateuses en ingénierie tissulaire est ainsi en pleine expansion. Ces cellules disponibles en grand nombre après culture, permettent de s'affranchir des problèmes éthiques par rapport à des cellules plus précoces, possèdent une faible immunogénicité et leur activité paracrine participe à la réparation tissulaire.

Des essais cliniques utilisant les CSM pour la régénération tissulaire sont actuellement menés dans différents domaines ; on dénombre ainsi, au 8 avril 2020, quarante-neuf essais cliniques enregistrés utilisant des cellules souches, dont quinze

utilisant des cellules souches issus de cordons ombilicaux. La majorité d'entre eux utilisent les cellules issues de moelle osseuse (Figure 17). On retrouve actuellement des recherches dans la régénération tissulaire car ces cellules sécrètent de nombreux facteurs de croissance nécessaires dans le processus de cicatrisation et grâce à leur capacité de différenciation en fibroblastes, cellules épithéliales et endothéliales (71). De la même manière, leur utilisation est envisagée dans la régénération du cartilage, car la capacité de différenciation en chondrocytes est favorable (72). Actuellement, cinq essais cliniques sont terminés et ont rendu des résultats encourageants ; l'un d'entre eux a été conduit sur des femmes souffrant d'infertilité lié à des adhérences utérines, au cours duquel des CSM-GW ont été associées à un scaffold de collagène (73).

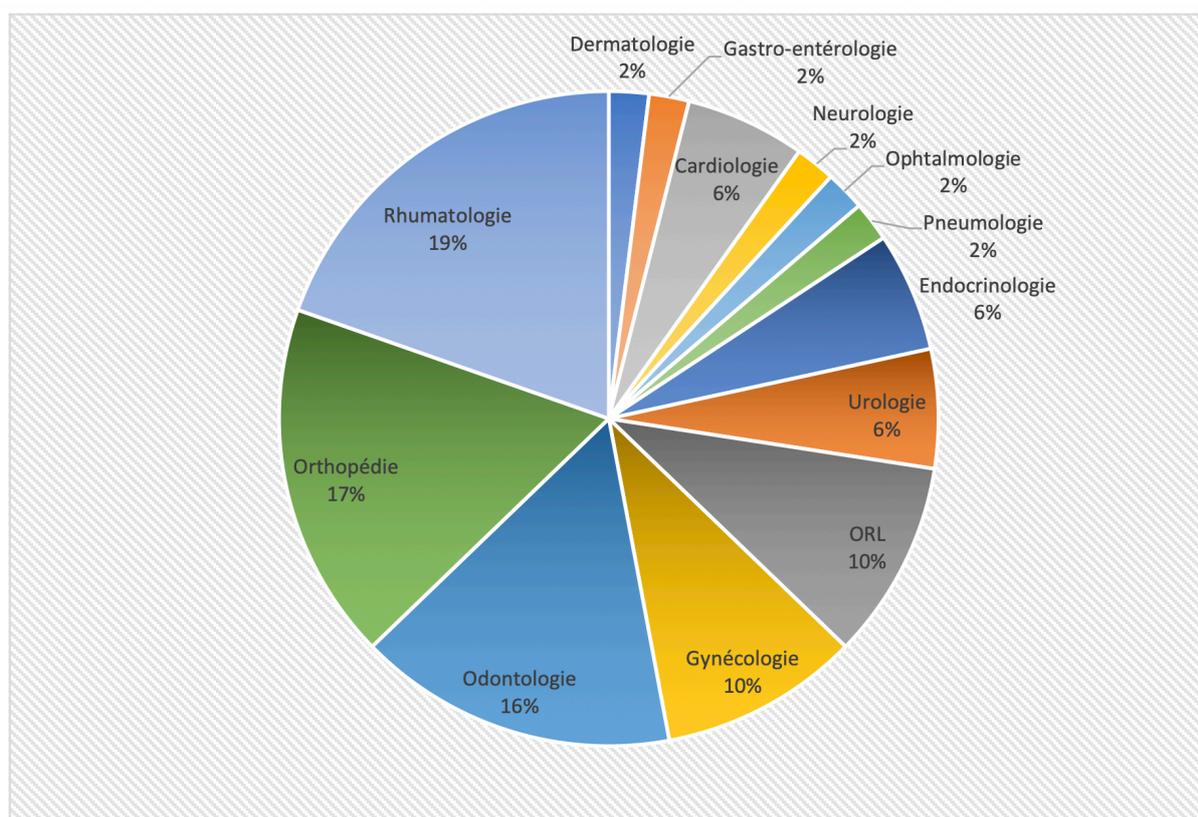


Figure 17 : Nombre d'essais cliniques utilisant les CSM en ingénierie tissulaire (Source : www.clinicaltrials.gov, au 8 avril 2020).

III. CULTURE ET PRODUCTION DES CSM DE LA GELEE DE WHARTON

A. Production des médicaments à base de cellules souches

Malgré le nombre important d'essais cliniques, seuls dix-sept médicaments à base de CSM sont sortis sur le marché à ce jour, dont onze sont des thérapies allogéniques, et six sont utilisés dans des thérapies autologues (Tableau 7). La majorité de ces traitements sont constitués de cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse humaine, ou encore par des cellules stromales mésenchymateuses du tissu adipeux. Cependant on assiste aujourd'hui à l'utilisation croissante de cellules dérivées du placenta ou du cordon ombilical dont la gelée de Wharton durant ces dernières années.

La production de ces traitements est confrontée actuellement à un défi de taille : le passage de la culture en laboratoire à la culture industrielle. Les systèmes de culture doivent en effet répondre à des intérêts économiques, à savoir être rentables tout en produisant des thérapeutiques de qualité. Ils doivent également satisfaire les exigences réglementaires et garantir la sécurité du patient. Leur simplicité d'utilisation pour les opérateurs est requise, de même que leur reproductibilité lot après lot. L'accent est, à ce jour, mis sur des cultures permettant des rendements cellulaires importants. Cependant une autre piste est explorée afin de réduire la taille des lots ainsi que les coûts, qui repose sur les capacités intrinsèques des cellules. En effet, avec une meilleure compréhension de leur mécanisme d'action, il serait possible d'orienter la production vers des cellules présentant les attributs qualité attendus, minimisant ainsi la quantité de cellules nécessaire dans une dose.

Les deux thérapies, autologue et allogénique, ont une approche similaire dans leur fabrication : un upstream process (USP), un downstream process (DSP), la formulation, et les opérations de conditionnement (Figure 18). Les opérations typiques d'USP comprennent notamment la création d'une Master Cell Bank (MCB) et d'une

Working Cell bank (WCB), l'ensemencement des cellules et leur expansion à plus grande échelle. Le DSP consiste à isoler et purifier le composant actif souhaité. Il comprend la récolte des cellules, le détachement des cellules de leur surface d'adhésion, leur séparation, leur lavage ainsi que les opérations de concentration et de changement de milieu.

Tableau 7 : Médicaments à base de CSM actuellement commercialisés.

Produit	Entreprise	Source de CSM	Pays d'autorisation de mise sur le marché	Indication
Allostem®	Allosource	Matrice osseuse déminéralisée avec CSM adipeuse, Allogénique	Etats-Unis	Réparation et régénération osseuse
Alofisel®	Takeda / TiGenix	CSM adipeuse, Allogénique	Union Européenne	Fistule périanale chez patients atteints de maladie de Crohn
BIO4®	Osiris Therapeutics	CSM-MO, Allogénique	Etats-Unis	Réparation et régénération osseuse
CardioRel®	Reliance Life Science	CSM et CMN-BM, Autologue	Inde	Infarctus du myocarde aigu
Cartistem®	Medipost	CSM issu du sang de cordon ombilical, Allogénique	Corée du Sud	Arthrite dégénérative
Cupistem®	Anterogen	CSM adipeuse, Autologue	Corée du Sud	Maladie de Crohn
Grafix®	Osiris Therapeutics	Membrane placentaire cryoconservée avec CSM placentaires	États-Unis	Plaies aiguës et chroniques
Hearticellgram®-AMI	FCB Pharmicell	CSM-MO, Autologue	Corée du Sud	Infarctus du myocarde aigu

Neuronata-R®	Corestem	CSM-MO, Autologue	Corée du Sud	Sclérose latérale amyotrophique
Ossron™	RMS	CSM-MO, Autologue	Corée du Sud	Régénération osseuse
Osteocel® Plus	NuVasive	CSM et cellules ostéoprogénitrices, Allogénique	États-Unis	Régénération osseuse de la colonne vertébrale
Prochymal™ / Temcell® HS	Mesoblast / JCR Pharmaceuticals	CSM-MO, Allogénique	Canada, Nouvelle-Zélande, Japon	GvHD
QueenCell®	Anterogen	CSM adipeuse, Autologue	Corée du Sud	Régénération du tissu adipeux sous-cutané
Stempeucel®	Stempeutics	CSM-MO, Allogénique	Inde	Ischémie critique des membres inférieurs dans la maladie de Buerger
Stravix®	Osiris Therapeutics	Tissu placentaire cryoconservé avec CSM-GW	États-Unis	Faciliter la réparation naturelle des plaies
Trinity Elite®	Orthofix	CSM-MO, Allogénique	États-Unis	Orthopédie
Trinity Evolution®	Orthofix	Matrice osseuse déminéralisée avec CSM, Allogénique	États-Unis	Déficiences musculosquelettique

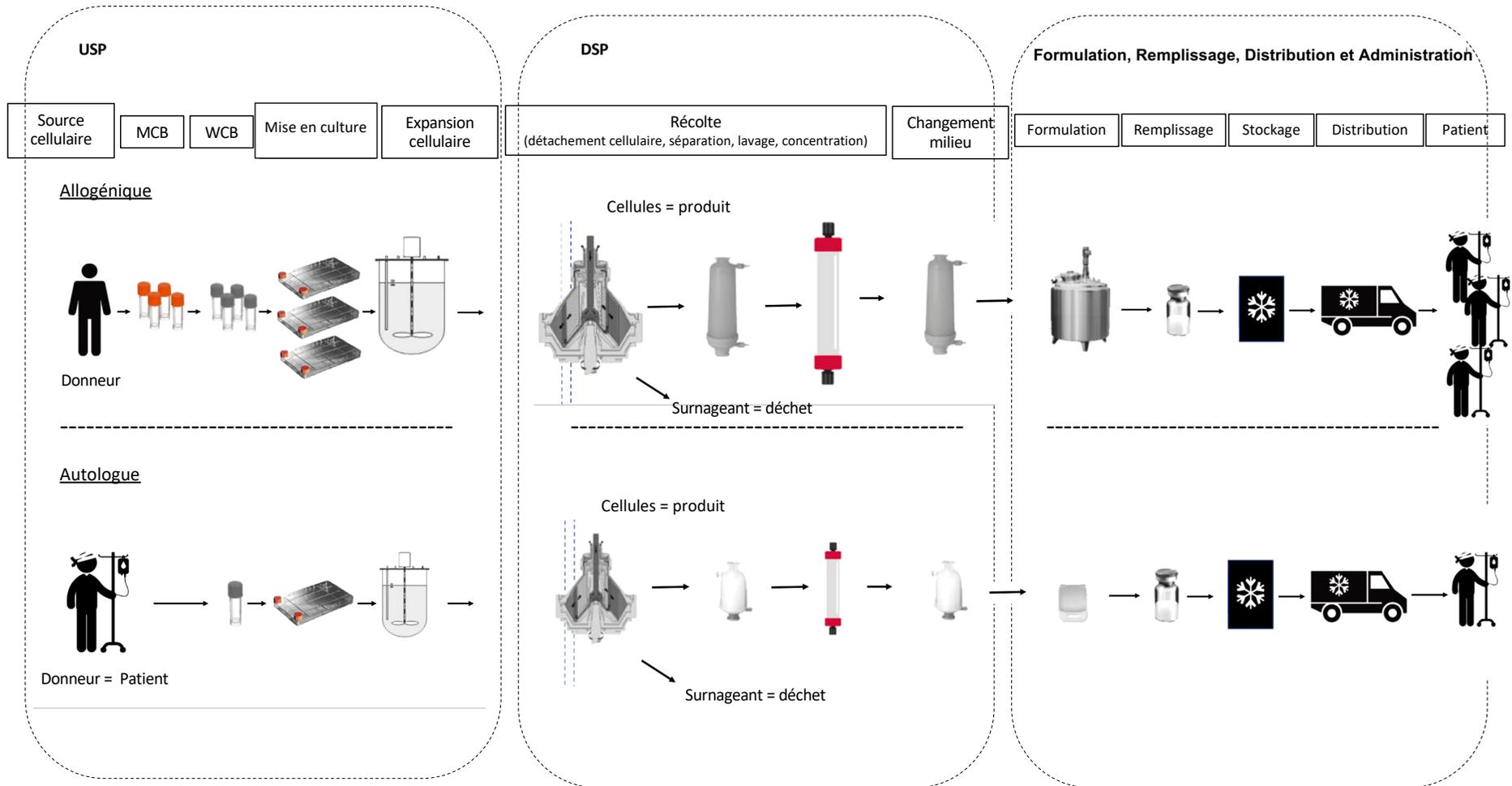


Figure 18 : Production de produits de thérapie cellulaire autologue et allogénique, d'après (74).

B. Upstream Process

5. Isolement des CSM-GW

Préalablement à la loi relative à la bioéthique du 7 juillet 2011, le cordon ombilical était considéré comme un « déchet opératoire ». L'article L-1241-1 du code de la santé publique spécifie depuis les conditions d'utilisation des cellules issues du cordon ombilical. Ainsi la femme doit donner son consentement écrit durant la grossesse en vue d'un don gratuit et anonyme, et être informée des finalités d'utilisation. Ce consentement peut être révoqué à tout moment tant que le prélèvement n'a pas eu lieu. Le don de cordon ne peut être effectué qu'à des fins thérapeutiques ou scientifiques. (75).

Il n'existe pas de protocole standard afin d'isoler les CSM-GW. Le cordon ombilical est généralement utilisé frais. Cependant, il a été démontré que, suite à sa congélation, il était également possible d'obtenir un nombre de cellules suffisant (76). Deux protocoles ont été décrits dans la littérature (Figure 19) :

- Méthode des explants (77)

Il s'agit d'une méthode non enzymatique reposant sur les capacités de migration des CSM-GW, ainsi que sur leur adhérence au plastique. Après retrait des vaisseaux, la gelée de Wharton est découpée en tronçons de 2 à 3 mm de diamètre qui sont placés dans une boîte de Pétri en présence d'un milieu de culture, supplémenté de 10% de sérum et d'antibiotiques. Les cellules migrent spontanément vers le fond de la boîte et commencent à se multiplier. Le milieu de culture est changé tous les deux jours, et la culture dure jusqu'à atteindre 80 à 90% de confluence. A l'issue de celle-ci, ces CSM constituent une population P0.

- Méthode enzymatique (78)

Cette méthode repose sur la digestion enzymatique de la gelée de Wharton à l'aide de la collagénase (type I, II ou B), pouvant être associée à la hyaluronidase et/ou à la trypsine. La collagénase est une enzyme isolée de *Clostridium histolyticum* et dégrade

le collagène. La trypsine est une enzyme protéolytique qui agit sur les protéines d'adhésion cellulaire. La hyaluronidase catalyse quant à elle l'hydrolyse des acides hyaluroniques, composants de la gelée de Wharton. La durée de mise en contact avec l'enzyme est un paramètre critique et, selon les protocoles, dure de 30min à 16h. Les débris tissulaires non souhaités sont ensuite séparés des cellules en faisant passer ces dernières à travers des filtres ayant des pores allant de 70 à 100µm. Les cellules souches récupérées constituent la population P0.

Il est également possible de combiner les deux méthodes avec un protocole de dissociation mécano-enzymatique (78).

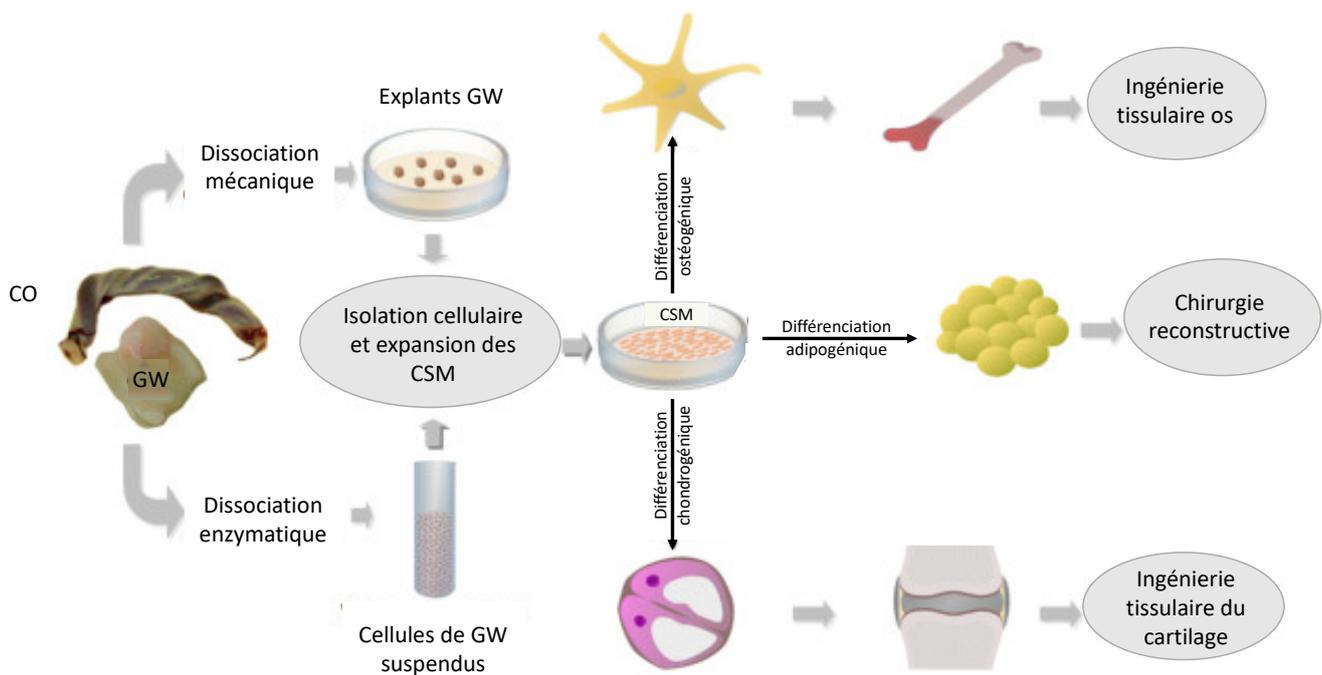


Figure 19 : Méthodes d'isolement de CSM-GW : Isolement et expansion de CSM, dérivées d'explants de gelée de Wharton ou dissociés par voie enzymatique, dans un milieu exempt de xéno-contaminants défini pour les CSM, suivis de leur caractérisation, notamment en recherchant leur capacité de différenciation endothéliale, ostéogénique, chondrogénique, pour une utilisation dans différents contextes cliniques de médecine régénérative et reconstructive, d'après (79).

Ces différentes méthodes permettent de récupérer entre 1 et 5×10^5 cellules en fonction des protocoles utilisés. Aucune technique d'isolation cellulaire n'est à ce jour considérée comme un standard, chacune permettant d'isoler des CSM de caractéristiques semblables. La méthode des explants présente néanmoins plusieurs avantages lorsqu'elle est comparée à la méthode enzymatique. Elle semble dans un

premier temps être la plus efficace en termes de rendement et de viabilité cellulaire, ce qui est un argument à prendre en compte pour la production à grande échelle, qui doit être la plus efficiente possible. L'expression plus importante de facteurs de croissance, notamment bFGF qui régule l'auto-renouvellement et la différenciation ostéogénique et chondrogénique, ainsi que de gènes liés au cycle cellulaire, est à l'origine de cette constatation (81). Le temps de doublement de population est significativement plus long pour la méthode enzymatique. Ceci est particulièrement vrai pour les premiers passages, comme constaté sur la Figure 20. Après P5, les temps de doublement de population ont tendance à être proches quelle que soit la méthode d'isolation. Il s'agit également du moment où cette durée a tendance à augmenter à chaque passage et correspond au déclin des capacités de prolifération des cellules (82). De plus l'utilisation d'enzymes peut entraîner des dommages cellulaires et diminuer la viabilité des CSM.

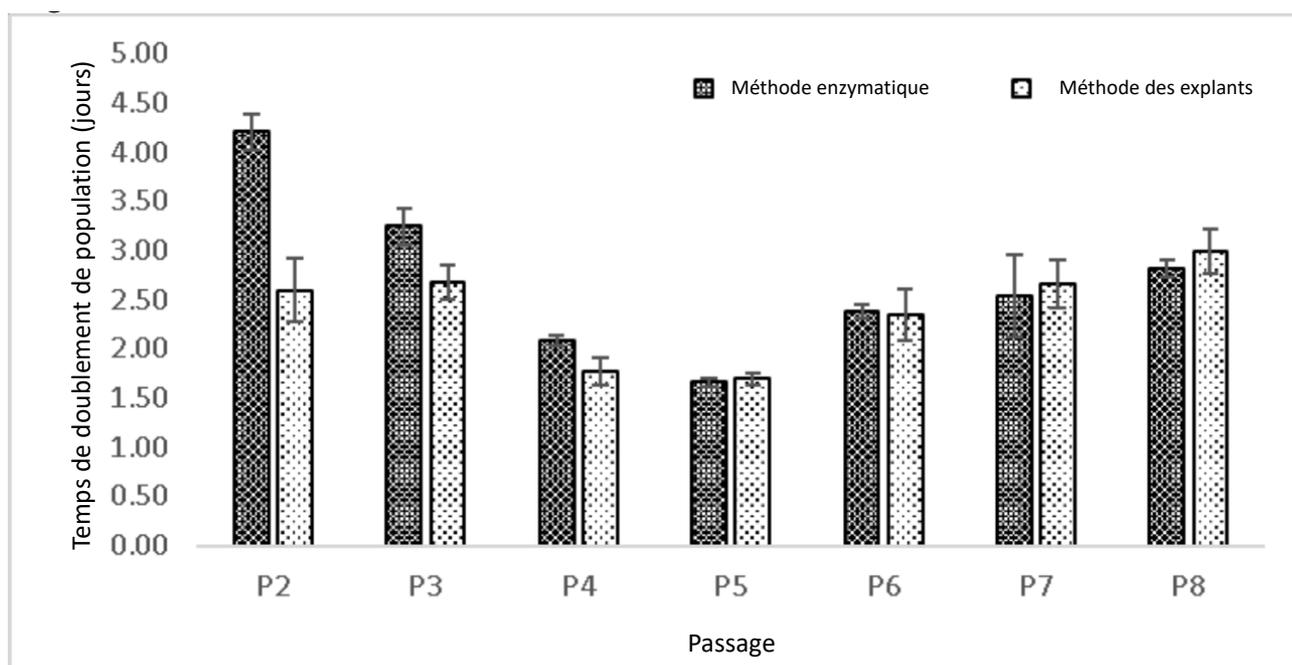


Figure 20 : Temps de doublement de population des CSM-GW isolées par méthode enzymatique et des explants (82).

L'utilisation clinique, notamment allogénique, des CSM-GW nécessite de pouvoir les stocker au sein de banques cellulaires à plus ou moins long terme, par le biais de la congélation. La composition du milieu cryoprotecteur, le protocole de

congélation et de décongélation, ainsi que la méthode d'isolement des cellules ne doivent cependant pas porter atteinte à la viabilité ainsi qu'aux fonctionnalités cellulaires. La majorité des protocoles utilisés emploient du DMSO comme principal cryoprotecteur ; il traverse la membrane plasmique et prévient la formation de cristaux de glace par la formation de liaisons hydrogènes stables avec les molécules d'eau. Ce composant est cependant hautement toxique et difficilement extrait après rinçage. À ce jour, de nouveaux milieux de congélation voient le jour à base de cryoprotecteurs non-pénétrants (par exemple glucose, saccharose), et de cryoprotecteurs intracellulaires (par exemple éthylène glycol, glycérol, méthanol) (83).

6. Culture cellulaire

La principale différence entre la production allogénique et autologue réside dans le nombre de doses générées dans chaque lot durant la phase d'expansion cellulaire, ce qui impacte le nombre de patients pouvant être traités. L'approche autologue génère plusieurs lots de petite taille, chacun permettant l'obtention d'une ou plusieurs doses pour un seul patient. Au contraire, l'approche allogénique permet la génération de nombreuses doses pouvant être administrées à plusieurs patients, celles-ci étant produites dans un seul lot de taille importante. La thérapie cellulaire allogénique semble être la plus rentable actuellement car elle permet d'atteindre un nombre de doses suffisant pour amortir les coûts liés aux consommables, ainsi que ceux liés au contrôle qualité. Plusieurs analyses technico-économiques ont démontré cependant que l'USP, et en particulier l'expansion des cellules souches constitue le coût principal de la production (84–86). La découverte chaque année de nouvelles propriétés laisse envisager des applications thérapeutiques de plus en plus poussées grâce aux cellules souches mésenchymateuses. La production de ces traitements requiert néanmoins une quantité importante de cellules répondant à des critères qualité spécifiques. Cela nécessite une expansion à grande échelle de ces cellules, ces dernières devant pouvoir se différencier de manière efficace tout en restant fonctionnelles.

a. Culture monocouche

Les méthodes d'expansion et de maintien des cellules souches reposent depuis leur mise en évidence sur des techniques de culture en deux dimensions ou monocouche, utilisant des boîtes en matière plastique dédiées à la culture cellulaire. Cette culture exige un « repiquage » régulier afin d'assurer l'auto-renouvellement des cellules. L'espace nécessaire pour produire un nombre suffisant de cellules pour constituer une dose thérapeutique est par conséquent difficilement compatible avec la culture à grande échelle, et en particulier pour la thérapie allogénique.

Les systèmes de culture en 2D ont été perfectionnés au fur et à mesure des avancements de la recherche (Figure 21). L'absence de monitoring en cours de culture est leur principale limite. Les plus basiques consistent en des boîtes de Pétri ou flacons de culture, de par leur simplicité d'utilisation et leur faible coût. Cependant, le nombre de cellules récupéré est faible et le risque de contamination à chaque changement de milieu est élevé. Afin de pallier ces inconvénients, des systèmes plus perfectionnés ont vu le jour et consistent en des récipients multicouches. Ceux-ci permettent de réduire le rapport volume sur ratio et ainsi d'optimiser le rendement cellulaire. Certains récipients sont développés en système fermé, limitant ainsi le risque de contamination à chaque passage. Leur encombrement à grande échelle, et le temps qu'il faut consacrer à l'entretien des cultures peut néanmoins être un frein à leur utilisation ou nécessiter une automatisation (87).

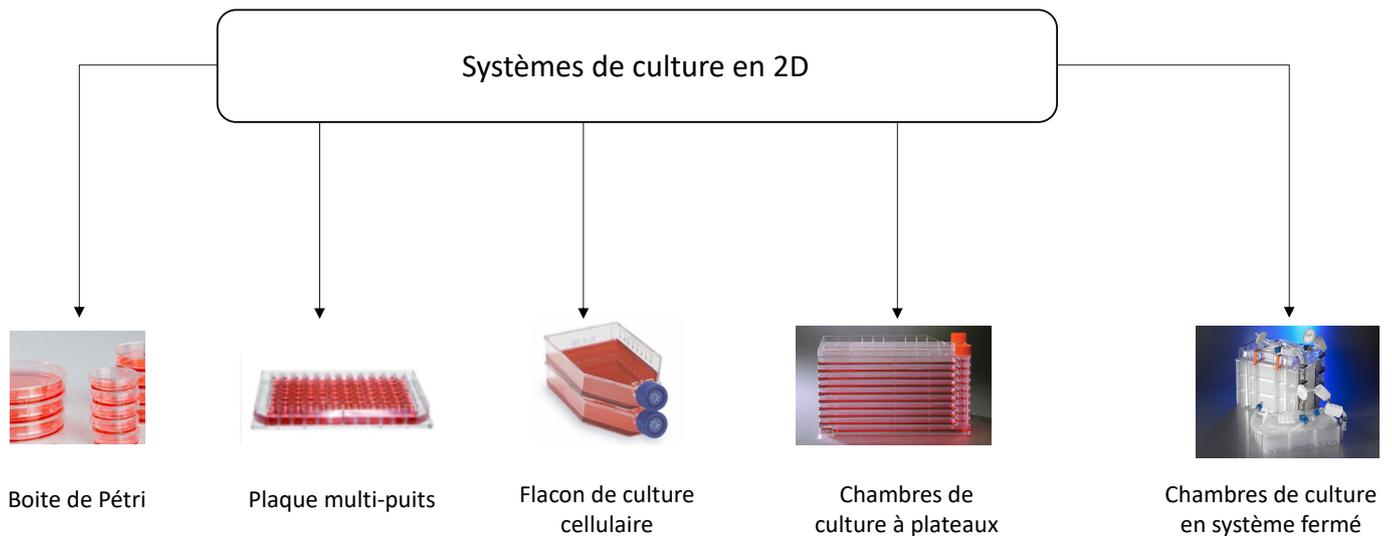


Figure 21 : Classification des systèmes de culture monocouche.

b. Culture tridimensionnelle

Afin d'atteindre le nombre de cellules requis dans un lot de production pour thérapie allogénique, il est nécessaire de se concentrer sur l'optimisation des cultures cellulaires, et plus particulièrement sur les alternatives à la culture en monocouche. Il est estimé que certaines indications nécessiteraient jusqu'à 10^9 cellules par dose. Afin d'atteindre les demandes commerciales pour ces thérapies à haute dose, un lot doit représenter 10^{12} à 10^{13} cellules. Cela représente entre 10 000 et 100 000 chambres de culture à 10 plateaux, alors que l'on évalue de 50 à 100 chambres du même type pouvant être gérées en même temps au maximum (85). Le nombre de cellules obtenu à l'issue d'une culture est conditionné par la densité cellulaire à la récolte ainsi que par la surface occupée par les cellules. Il faut donc maximiser ces deux paramètres lorsque l'échelle est augmentée. Des bioréacteurs à plateaux ou contenant des microporteurs sont des alternatives envisageables pour une production industrielle (Figure 22).

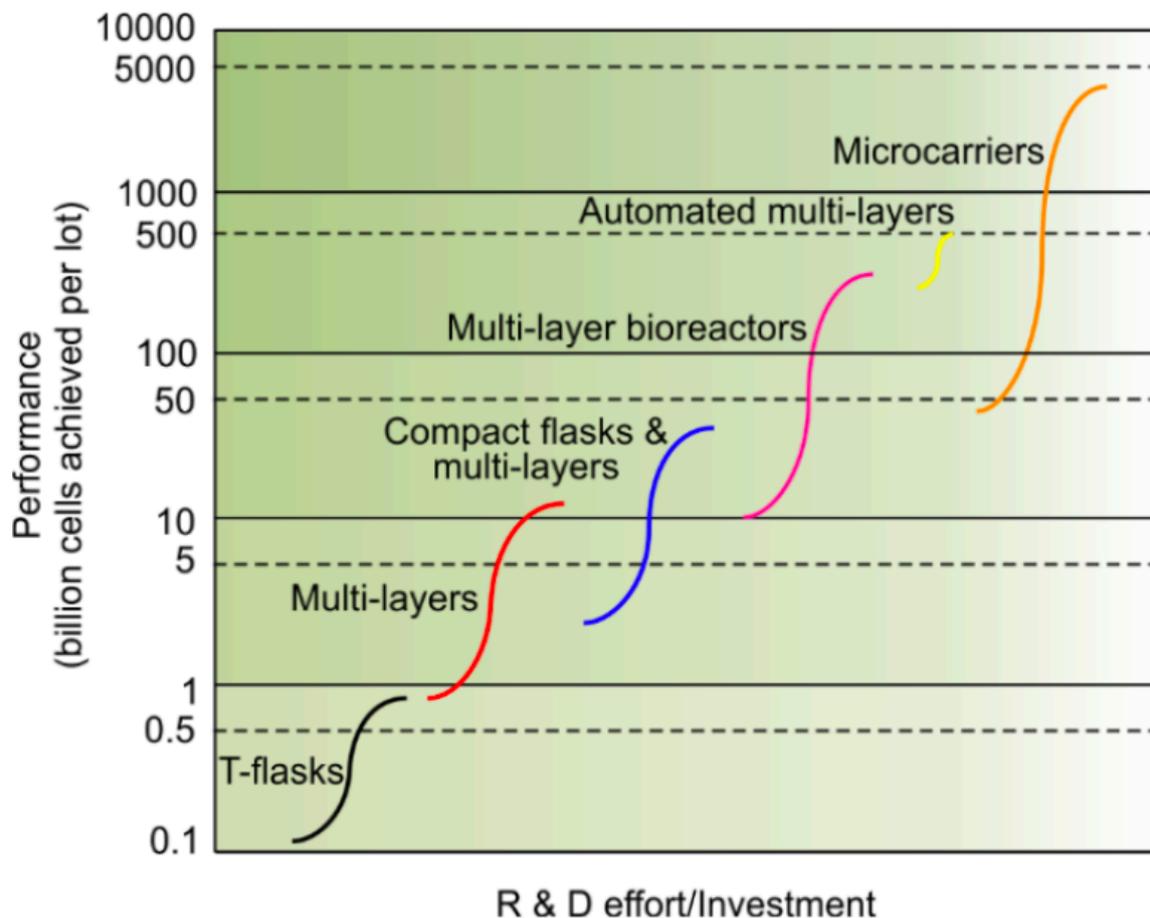


Figure 22 : Illustration d'une courbe en S de performance relative entre plusieurs technologies de thérapie cellulaire. Les limites de chaque courbe en S correspondent à la quantité de cellules atteinte par la plus petite et la plus grande taille de chaque technologie, par l'utilisation du nombre maximum d'unités (80 pour les planaires et 8 pour les microsoutports). L'axe des X représente qualitativement l'effort de R&D d'une entreprise utilisant actuellement des flacons de culture cellulaire, pour passer à d'autres technologies d'expansion cellulaire (85).

La mise à l'échelle du laboratoire à l'industrie se tourne, entre autres, vers l'utilisation de bioréacteurs mettant en suspension des microporteurs ou des agrégats ; il s'agit de la culture tridimensionnelle (Figure 23). Celle-ci permet l'obtention d'un plus grand nombre de cellules dû à une densité de culture plus importante, réduisant ainsi le coût des consommables. L'utilisation de bioréacteurs permet un contrôle en cours de culture car il est possible de récupérer des échantillons à tout moment. Le suivi du processus d'expansion est ainsi analysé hors ligne par cytométrie en flux. Les caractéristiques fonctionnelles des CSM devant être conservées, le temps de

doublément de population est attentivement surveillé, et le nombre de passages est minimisé (87). L'utilisation de 60 récipients de culture monocouche, chacun ayant 10 étages permet de récupérer un volume de 30 L et d'envisager 200 doses de 50 millions de cellules. À titre de comparaison, un bioréacteur de 250 L permet d'obtenir une densité cellulaire de 1 million de cellule par millilitre, soit 5000 doses de 50 millions de cellules (88).

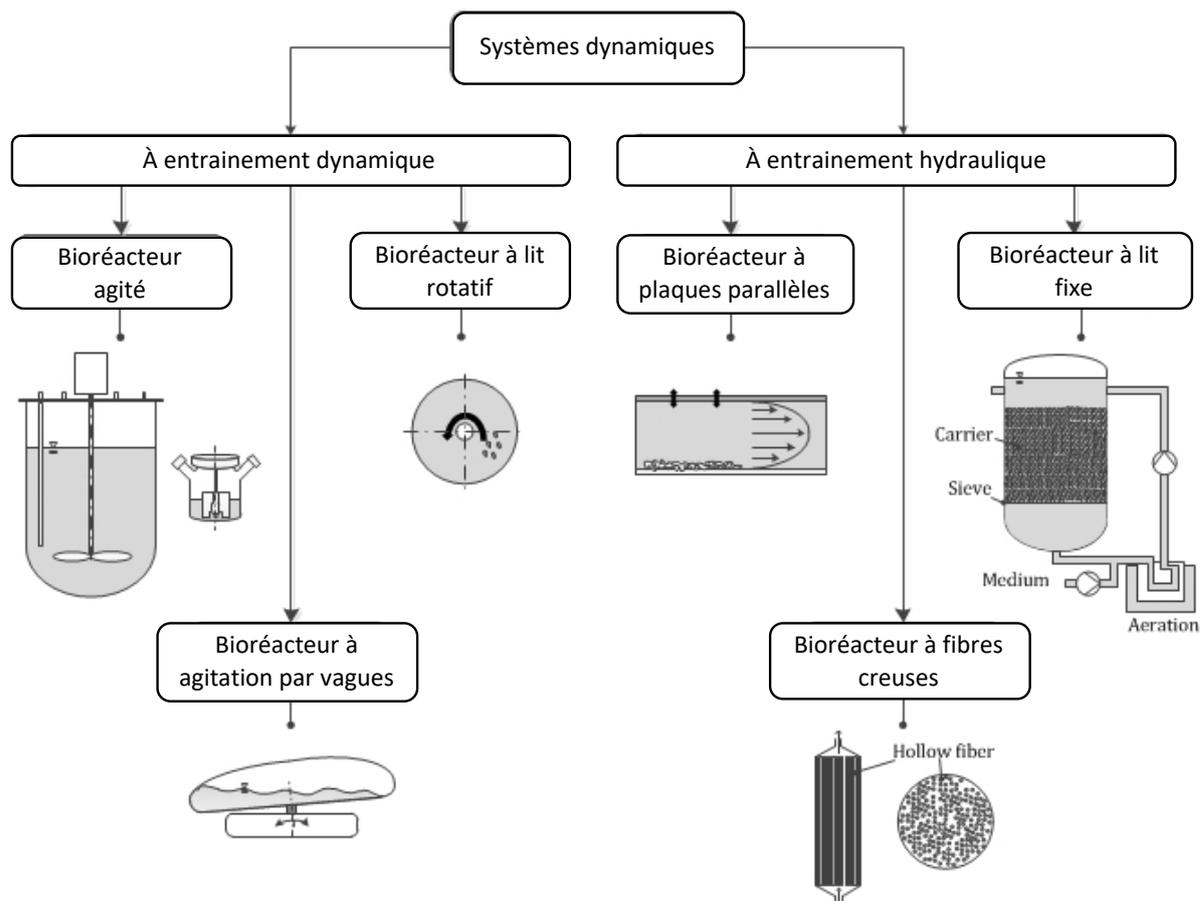


Figure 23 : Bioréacteurs adaptés à l'expansion des CSM (89)

La culture opérée sur microporteurs dans des bioréacteurs agités régulés en continu constitue une alternative prometteuse aux cultures en deux dimensions. Il s'agit d'une opération unitaire qui réunit culture en simple couche et culture en suspension. En effet, la surface du microporteur permet la croissance cellulaire de la même manière qu'en condition stationnaire. Leur mobilité au sein du milieu de culture permet également d'assurer l'homogénéité du système et de mimer l'environnement *in vivo*. La sélection du microporteur adapté, ainsi que les conditions opératoires

optimales doivent être estimées au mieux afin de pouvoir les utiliser dans la production de cellules souches.

Les microporteurs, généralement sphériques, fournissent une surface de contact importante par rapport au volume disponible, dans le cadre d'un procédé d'expansion cellulaire réalisé dans un bioréacteur contrôlé. Ainsi, par exemple, 3 mg/ml de microporteurs de type Cytodex 1 fournissent une surface de $1.32 \times 10^4 \text{ cm}^2$ dans un litre, ce qui est équivalent à 176 boîtes de culture de 75 cm^2 (46). Ces systèmes permettent un gain de place ainsi qu'une diminution du nombre de manipulations des cellules, réduisant ainsi les coûts de main d'œuvre et les risques de contamination. La culture agitée permet par ailleurs le contrôle des paramètres environnementaux, importante en vue d'assurer la reproductibilité des cultures cellulaires.

Depuis leur première utilisation en 1967, différents types de microporteurs ont été développés. Ce type joue un rôle important dans le processus d'expansion cellulaire au cours duquel il est important que les attributs qualité critiques (CQA) ne varient pas. En effet leurs propriétés peuvent influencer la fixation, la multiplication, la croissance et la différenciation des cellules. De nombreux microporteurs sont disponibles sur le marché et ont été testés avec des types de cellules souches différents. Leur taille varie de 90 à 380 microns. Ils sont également caractérisés par différents matériaux de base (polystyrène modifié, cellulose, dextrane, gélatine), et surfaces de contact (collagène, fibronectine, diethylaminoéthyle, triethylammonium). Ces caractéristiques influencent non seulement la croissance cellulaire, mais ont également un retentissement sur la vitesse requise permettant de maintenir les microporteurs en suspension et garantir ainsi un transfert de matière suffisant. En effet, la vitesse a un impact important sur l'adhérence cellulaire, la croissance cellulaire, la consommation de glucose, ainsi que sur la production de métabolites (lactate, ammoniac) en fonction du microporteur utilisé (74). En outre, le type d'agitation, la vitesse et la méthode de délivrance de l'oxygène doivent être optimisés pour éviter le détachement des cellules et minimiser les contraintes de cisaillement sur les cellules.

La matrice du microporteur doit être suffisamment rigide pour supporter la croissance cellulaire et résister aux forces mécaniques rencontrées lors de la culture cellulaire. De plus, la distribution en taille des microporteurs sphériques doit être faible ($\pm 25 \mu\text{m}$) afin d'éviter une distribution inégale des cellules sur les microporteurs. Sa densité doit être légèrement supérieure à 1 (1,02 à 1,05 g/ml), soit proche de celle de l'eau, afin de maintenir les microporteurs en suspension à une vitesse d'agitation minimale (46).

Actuellement plusieurs types de microporteurs sont disponibles sur le marché (Tableau 8) et peuvent être classés en fonction de leurs propriétés respectives (46) :

- Les microporteurs non poreux ou microporeux chargés possédant des charges positives, favorisent l'attachement des cellules, elles-mêmes chargées négativement, par le biais de charges électrostatiques. Les pores sont trop petits pour que les cellules puissent s'y infiltrer, mais permettent la diffusion des nutriments et des métabolites.
- Les microporteurs chimiquement couplés avec du collagène, ont un revêtement qui facilite le détachement cellulaire.
- Les microporteurs recouverts de protéines issues de la MEC et notamment de fibronectine, ont initialement été conçus pour la culture de cellules sensibles sans utilisation de sérum.
- Les microporteurs non chargés, ont des propriétés similaires au niveau de leur surface avec celles de la culture planaire.
- Les microporteurs macroporeux, dont les pores ont une taille allant de 10 à 70 μm , offrent une surface de contact supérieure, ainsi qu'une protection contre les contraintes de cisaillement. Les pores permettent un attachement cellulaire facilité.

Des microporteurs plus spécifiques ont été développés ces dernières années afin de répondre à certaines contraintes liées à la culture cellulaire, tels que des microporteurs transparents, biodégradables ou encore thermosensibles.

Tableau 8 : Caractéristiques des microporteurs commercialisés pouvant être utilisés dans l'expansion des CSM.

Microporteurs	Fournisseur	Diamètre (µm)	Matrice	Densité moyenne	Coating	Charge en surface	Porosité
Microporteurs ayant un revêtement à base de protéines de mammifères							
Collagen	SoloHill Eng. Inc.	125-212	Polystyrène	1,02	Collagène de type I porcin	/	Non poreux
Cultispher-G®	PerCell-Biolytica	130-380	Gélatine porcine de type I	1,04	-	/	Macroporeux (50%, taille des pores de 10 à 30 µm)
Cytodex 3™	GE Healthcare	141-211	Dextrane	1,04	Collagène de type I porcin	/	Non poreux
FACT III	SoloHill Eng. Inc.	125-212	Polystyrène	1,02	Collagène de type I cationique porcin	+	Non poreux
Microporteurs ayant un revêtement à base de protéines recombinantes							
ProNectin® F	SoloHill Eng. Inc.	125-212	Polystyrène	1,02	Fibronectine recombinante	/	Non poreux

Microporteurs sans xéno-contaminant

Cytodex 1™	GE Healthcare	147-248	Dextrane	1,03	DEAE	+	Non poreux
Enhanced Attachment	Corning	125-212	Polystyrène	1,02	CellBIND®	/	Non poreux
Hillex®	SoloHill Eng. Inc.	160-180	Dextrane	1,11	Trimethyl ammonium cationique	+	Non poreux
MicroHex™	Nunc	125	Polystyrène	1,05	Nunclon™	Non spécifié	Non poreux
Plastic	SoloHill Eng. Inc.	125-212	Polystyrène	1,02	-	/	Non poreux
Plastic Plus	SoloHill Eng. Inc.	125-212	Polystyrène	1,02	-	+	Non poreux
PVA	Loughborough University	100-220	PVA	1,03	-	/	Non poreux
Synthemax II®	Corning	125-212	Polystyrène	1,02	Synthemax II®	/	Non poreux

L'efficacité des microporteurs (multiplication et croissance des cellules souches) repose sur l'attachement des cellules. En général, ce dernier suit une distribution de Poisson. Pour un ratio cellule inoculé sur microporteur de 1, 2, 3 ou 4, les probabilités théoriques de microporteurs inoccupés sont respectivement de 0.365, 0.135, 0.05, et 0.018 (90). Ainsi, il est important d'inoculer avec un ratio cellules sur microporteurs suffisamment important afin d'atteindre une distribution cellulaire homogène dans laquelle chaque microporteur est occupé par au moins une cellule viable. En règle générale, une concentration théorique cellulaire de 3 à 5 cellules par microporteur est utilisée. Après la phase d'attachement, qui prend en moyenne 4 à 20 h dans des conditions statiques ou d'agitation par intermittence, il est attendu que chaque microporteur ait le même nombre de cellules attachées à sa surface. Cela n'est cependant pas réalisable en pratique, et il faut être par ailleurs attentif à la formation d'agrégats de microporteurs.

Afin de limiter au mieux la contamination croisée, des bioréacteurs à usage unique ont par ailleurs été développés, assurant une sécurité supplémentaire durant l'USP. Les systèmes de culture disponibles ont actuellement un volume utile pouvant atteindre environ 1500 L (Nucleo™ Bioreactor, Pall Life Science / Biostat STR®, Sartorius). L'utilisation de ces volumes est cependant peu envisageable. En effet, de nombreuses banques cellulaires sont nécessaires à la production à grande échelle car l'expansion de ces cellules est limitée. Ainsi, il est estimé que pour produire 10000 doses par an, il faut environ 20 cordons ombilicaux dans un réacteur de 250 L (Figure 24) (91). Les modèles développés sont des cuves rigides cylindriques en polystyrène ou polycarbonate, ou des poches en éthylène ou polyéthylène acétate vinyle. De plus, par rapport aux classes de biocontamination déterminées par les BPF, l'utilisation de ces réacteurs ne nécessite plus forcément une salle blanche de classe A ou B, une classe C ou D suffisant (74).

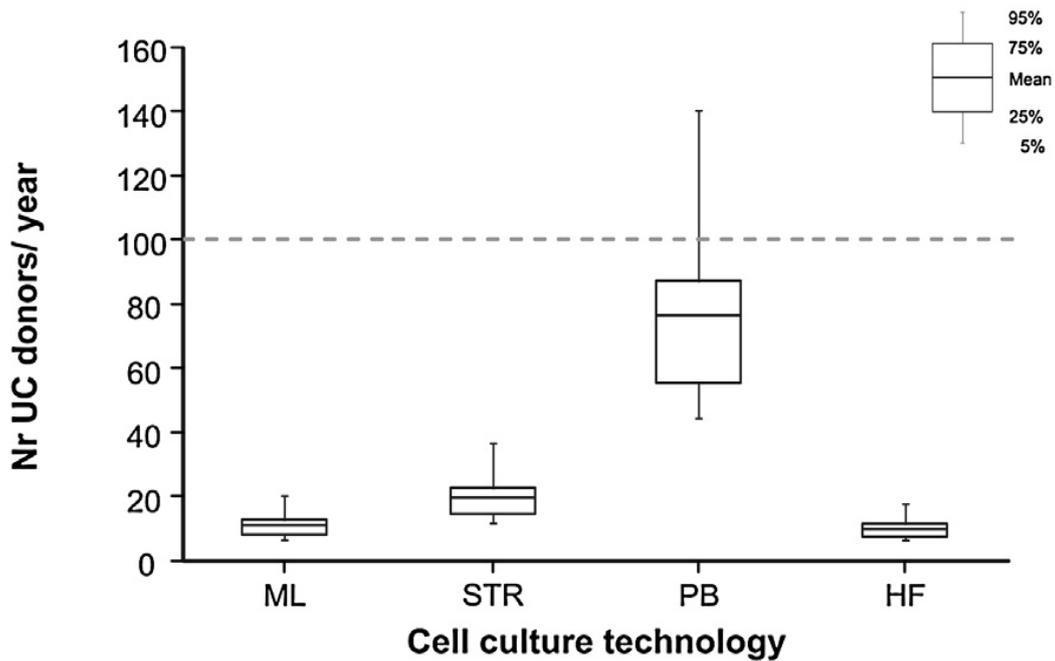


Figure 24 : Distribution du nombre de donneurs nécessaires pour produire 10000 doses par an avec plusieurs technologies (ML : Multi-Layer vessel avec 10 étages ; STR : Stirred tank reactor de 250 L ; PB : Packed bed bioreactor ; HF : Hollow-fiber bioreactor) (91).

7. Milieu de culture et paramètres contrôlés

Le milieu de culture conventionnel utilisé en culture de cellules souches est un milieu de base comme le DMEM ou l' α -MEM. Il doit être supplémenté par des additifs qui sont :

- Des protéines, qui assurent l'adhésion cellulaire aux plastiques.
- Des lipides pour l'anabolisme cellulaire.
- Des facteurs de croissance et des hormones pour stimuler la prolifération cellulaire.

Malgré les inconvénients liés à l'addition de sérum (variabilité inter-lot, contamination possible par des prions, des virus ou des agents zoonotiques, réactions immunologiques), la majorité des milieux de cultures utilisés pour les CSM contiennent 10 à 20 % de sérum de veau fœtal (SVF). Il existe des alternatives au SVF, basées sur des matériaux dérivés du sang (sérum humain, ou dérivés plaquettaire),

cependant ces milieux ne peuvent pas être utilisés dans la production de cellules à grande échelle du fait des volumes nécessaires et du coût associé. A la place du sérum humain, du lysat plaquettaire humain a déjà été utilisé dans la production de CSM avec succès. Cependant, la question du coût se pose par rapport à l'application visée. Même si ces dérivés humains sont considérés plus sûrs que le SVF, il existe toujours un risque de pathogènes humains et leurs composants peuvent avoir un impact sur les CQA. Cela explique l'intérêt récent des milieux de culture exempts de xéno-contaminants, sans sérum, ou des milieux chimiques pour la production clinique des CSM (74).

Les paramètres à surveiller durant la culture des CSM sont biochimiques (concentration en métabolites, nutriments et facteurs de croissance) et physico-chimiques (oxygène, pH, osmolarité).

Paramètres biochimiques

- **Glucose** : Le glucose est l'élément fondamental qui détermine l'efficacité de la culture tant au niveau de la différenciation que de la viabilité cellulaire. Il a en effet été montré que l'absence de glucose dans le milieu de culture entraîne nécessairement la mort des cellules (74). Il n'y a cependant pas de consensus sur la concentration idéale à maintenir, les effets sur les CSM étant contradictoires. Ainsi une concentration élevée en glucose (4,5 g/L) entraîne une sénescence cellulaire, majorant ses mécanismes autophages pour certains (92), alors que d'autres études aboutissent à une meilleure croissance et viabilité cellulaire (93).
- **Lactate** : La consommation du glucose par la glycolyse nécessite une surveillance étroite du lactate. En effet, au cours de la culture ce produit cellulaire augmente l'acidité du milieu induisant une inhibition de la croissance cellulaire. Cependant, les rapports de lactate/glucose sont souvent de l'ordre de deux, signifiant que le lactate est produit par d'autres mécanismes cellulaires et en particulier par la consommation de glutamine (94).

- **L-glutamine** : la glutamine est un aminoacide instable chimiquement. Il est donc nécessaire d'en ajouter au milieu de culture. Cependant, la consommation de glutamine s'accompagne d'une production d'ammonium qui est néfaste pour la croissance des CSM. Il est ainsi recommandé de supplémenter le milieu par le dipeptide L-alanyl-L-glutamine qui est plus stable, induisant une plus faible accumulation d'ammonium (94).
- Des **facteurs de croissance** peuvent également être ajoutés, parmi lesquels FGF-2, EGF, PDGF-AA. Ils permettant de moduler le potentiel de différenciation et de prolifération, mais aussi les mécanismes de survie (95). Les CSM sont par ailleurs soumises au stress oxydatif en cours de culture, et leurs mécanismes antioxydants sont insuffisants ; un apport en sélénite de sélénium permet de restaurer les capacités antioxydantes des cellules, et de limiter ainsi les dommages cellulaires (96).

Paramètres physico-chimiques :

- **Oxygène** : Le niveau d'oxygène est un paramètre pouvant influencer la culture cellulaire (Figure 25). Alors que la plupart des culture *in vitro* sont effectuées à des taux d'oxygène semblables à l'air ambiant (21%), le développement des cultures à des niveaux plus bas, donc en hypoxie, semble se rapprocher des conditions *in vivo*. L'exposition à des taux normaux d'oxygène peut provoquer des dommages à l'ADN entraînant une sénescence plus rapide et une perte des capacités fonctionnelles des cellules (97). Au contraire, l'hypoxie limite la production d'espèces réactives de l'oxygène, ou encore module l'activité paracrine et autocrine de certaines cytokines ou facteurs de croissance (98).

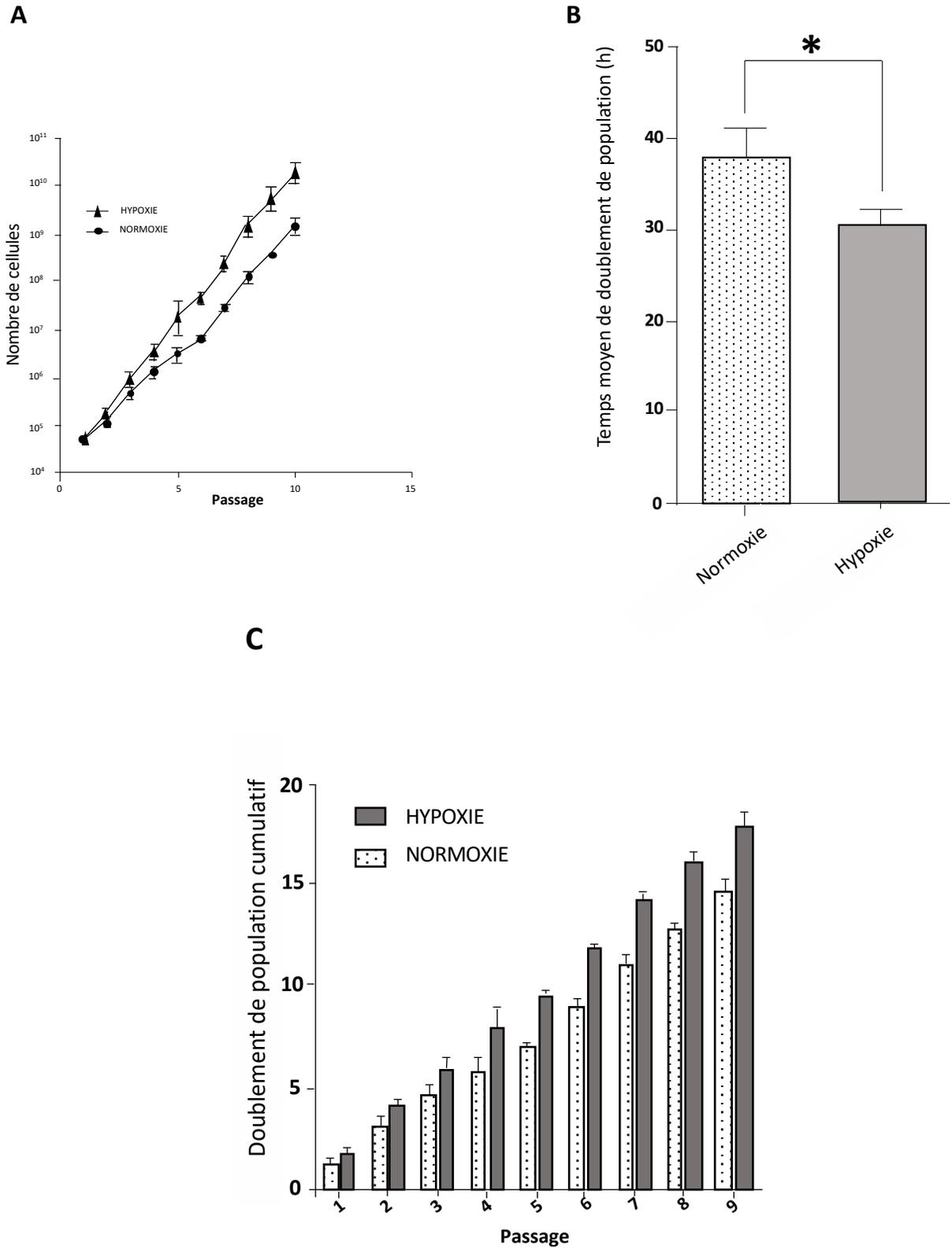


Figure 25 : A) Courbes de croissance des CSM-GW sous hypoxie et normoxie, B) Analyse du temps moyen de doublement de population en heure des CSM-GW C) Doublement de population cumulatif par passage en conditions normoxique et hypoxique (99).

- **Rayonnement lumineux** : il a été démontré que la prolifération cellulaire des CSM-GW et des CSM-MO peut être majorée par l'utilisation de diodes électroluminescentes (100).

C. Downstream Process

Suite à la culture en bioréacteur, la première étape est le détachement des cellules des microporteurs. Elle est effectuée grâce à l'action seule ou combinée de plusieurs mécanismes tels que :

- **Enzymes protéolytiques** tel que la trypsine, le trypLE[®], ou la collagénase (Tableau 9). Les protéines d'adhésion situées à la surface cellulaire sont visées, et plus particulièrement le lien peptidique impliquant un acide aminé avec une lysine ou une arginine (74). Il est important d'optimiser le temps durant lequel les cellules seront exposées aux enzymes, leur concentration dans le milieu, de même que le pH et la température. L'objectif est que cette étape s'effectue sans dommages cellulaires tout en maintenant une activité enzymatique optimale pour récupérer un nombre de cellules suffisant.
- **Agents chélateurs** comme l'EDTA. Cette molécule agit en retenant les ions Ca^{2+} et Mg^{2+} , ainsi que sur la structure du cytosquelette cellulaire en arrondissant la forme de la cellule, permettant de diminuer l'attachement cellulaire (101).
- **Application de forces hydrodynamiques**

Le protocole actuellement privilégié consiste à associer agitation mécanique et trypsine afin de minimiser l'exposition à cette enzyme (102). Le détachement à l'EDTA ne permet pas d'obtenir un rendement cellulaire élevé, et peut endommager la structure cellulaire car les cellules ont tendance à former des agrégats (103).

Tableau 9 : Caractéristiques des cellules souches mésenchymateuses foetales détachées par trypsine, trypLE et collagénase de Cytodex-3 (104).

	Trypsine	TrypLE® express	Collagénase
Durée de contact (min)	5	5	15
Efficacité de récolte (%)	84 ± 3	61±3	97±4
Viabilité cellulaire (%)	>95	>95	>95
Immunophenotype (%)			
CD73	94±3	95±3	96±3
CD90	98±2	96±2	97±4
CD105	92±4	93±6	85±8
CD34	2.0±0.8	0.8±0.4	0.5±0.3
CFU-F (%)	65±8	62±7	61±7
Temps doublement de population (h)	41±5	40±1	40±2

Le détachement des cellules souches dépend en grande partie du type de revêtement du microporteur, la plupart d'entre eux privilégiant souvent l'attachement cellulaire. De nouvelles catégories de microporteurs dont le revêtement ou la matrice facilitent le détachement cellulaire ont ainsi été développés. On peut ainsi rencontrer des microporteurs biodégradables pour lesquels un mélange de deux enzymes (trypsine et collagénase) est utilisé lors du détachement. La collagénase vise alors la structure du microporteur. Le développement de tels microporteurs est aujourd'hui privilégié, car ils réduisent considérablement la complexité des différentes étapes de séparation nécessaires. Des microporteurs thermosensibles ont également été testés pour le détachement de CSM-MO. Les microporteurs Cytodex-3 sont alors recouverts d'un polymère, le poly-(N-isopropylacrylamide), dont la température de solution critique inférieure (LCST) est de 32°C. Lors du détachement, la température est abaissée de 37°C à 32°C afin de dissoudre le polymère et permettre le détachement

des cellules sans utilisation d'enzymes. L'adhérence, la croissance et la multiplication des cellules ne diffèrent pas des autres catégories de microporteurs. Par rapport à des cellules témoins trypsinées, il a été rapporté une diminution de l'apoptose cellulaire (105). Des microporteurs dont les polymères sont sensibles aux stimuli tels que le champ magnétique, le champ électrique ou les ultrasons sont actuellement étudiés. Le détachement pourrait alors être contrôlé à distance, pour une durée déterminée, avec une intensité fixée (106).

En général, le détachement cellulaire est effectué directement dans le bioréacteur. À la fin de la culture, l'agitateur est arrêté, et les microporteurs sédimentent au fond du réacteur, alors que le milieu de culture est retiré à l'aide d'un tube plongeur. Après la séparation cellulaire, les cellules doivent être séparées des microporteurs (étape de concentration cellulaire), procédé généralement reposant sur l'exclusion stérique, dû à la différence de taille entre les cellules détachées (entre 15 et 20 μm) et les microporteurs (90 μm pour les plus petits). Ces deux étapes sont effectuées soit par filtration tangentielle ou par centrifugation. À petite échelle, des filtres membranes en nylon suffisent. Lorsque l'échelle est plus importante, des techniques de filtration plus avancées sont privilégiées. Ainsi, pour des lots de 3 à 200 L, une filtration frontale (Harvesteiner™, Hyclone™) ou des filtres à cartouches constituent des solutions simples à mettre en place et peu coûteuses (87). Au-delà de 200 L, d'autres techniques de filtration sont privilégiées qui peuvent être utilisées aussi bien pour la séparation des cellules et des microporteurs, mais également pour l'étape suivante de concentration cellulaire :

- La **filtration à flux tangentiel (TFF)** est une technologie récente qui vise à concentrer une solution sans nécessité de boucle de recirculation. L'ajout de plusieurs niveaux de membranes augmente la longueur du trajet et le temps de séjour de la solution dans le filtre. Ainsi, une plus grande quantité de perméat est éliminée et le volume d'alimentation diminue en un seul passage. Cette méthode est couramment couplée à l'ultracentrifugation qui, en plus d'isoler les cellules en fonction de leur taille, les trie par leurs propriétés de sédimentation.

La TFF peut être opérée en mode continu ou discontinu (Figure 26). Les profils de concentration cellulaire ont été comparés, de même que la caractérisation des cellules. Les deux modes de filtration ont été conduits durant 9 min, de manière à obtenir des facteurs de concentration cellulaire similaires. Les profils de concentration diffèrent cependant ; des facteurs de concentration plus élevés sont atteints plus rapidement en mode continu. Par ailleurs, les deux modes permettent l'obtention de 80% des cellules présentes dans l'alimentation initiale avec une viabilité de plus de 95%. Les pertes cellulaires sont principalement dûes au procédé de filtration, le nombre de cellules en apoptose étant majoré dans les deux méthodes, de même que les taux d'ADN et de LDH (Figure 27) (107).

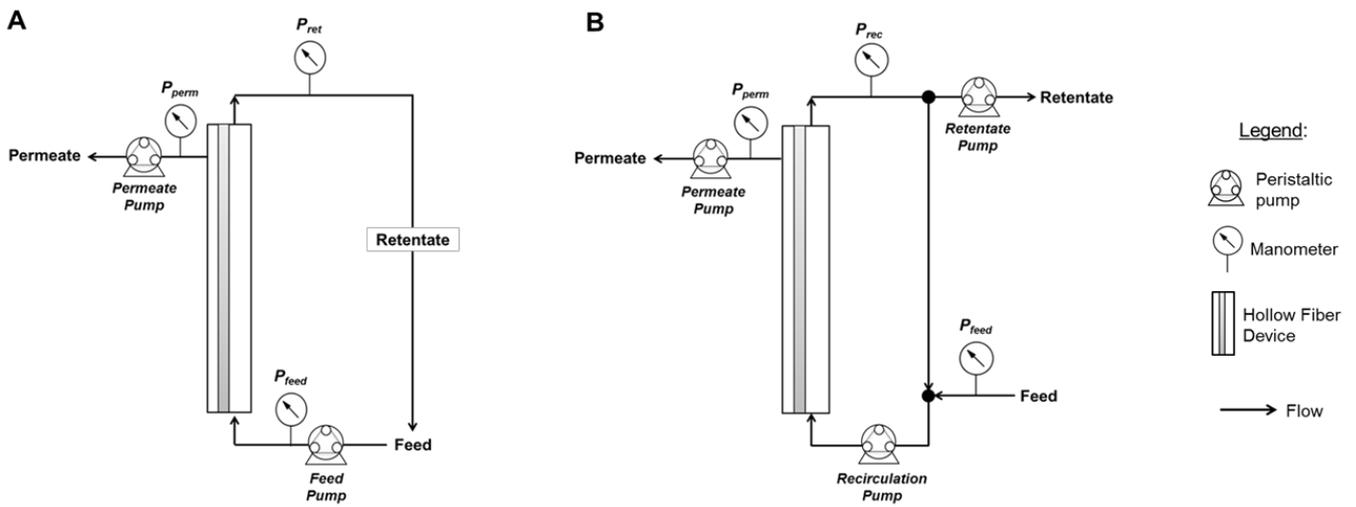


Figure 26 : Concentration cellulaire discontinue (A) ou continue (B) (107).

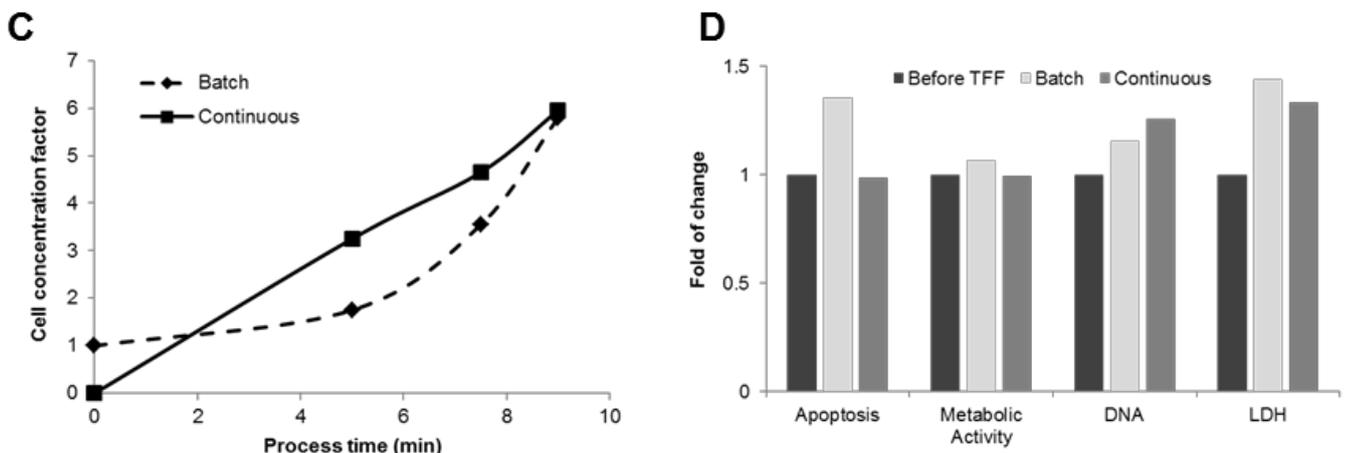


Figure 27 : Profils de concentration cellulaire et de caractérisation des CSM après TFF (107).

- La **centrifugation à flux continu ou à contre-courant** : Cette technique permet de séparer les composants en fonction de leur densité par l'application d'une force centrifuge.
- La **focalisation inertielle** : Les méthodes précédemment citées présentent des inconvénients qui peuvent être limitants au niveau industriel. La formation progressive d'un cake peut boucher les pores et nécessite un nettoyage ou un remplacement récurrent des membranes filtrantes. De plus, les contraintes de cisaillement au sein du système peuvent endommager les cellules et diminuer le rendement cellulaire. La focalisation inertielle permet ainsi de séparer les microporteurs des cellules dans un système continu, tout en assurant des performances stables et fiables à long terme (pureté environ égale à 99%, rendement cellulaire environ égal à 94%). Cette méthode de filtration est uniquement basée sur des forces hydrodynamiques ; dans un écoulement laminaire, ces forces conduisent les particules à migrer à travers des lignes de courant vers des positions d'équilibre précises (108).

Récemment, des microporteurs pouvant être dissous après l'étape de détachement ont été mis en place, compatibles avec la production à grande échelle et pouvant ainsi répondre aux contraintes des bonnes pratiques de fabrication (BPF). En effet, ces microporteurs peuvent se dissoudre lorsqu'ils sont incubés en présence d'une pectinase, permettant ainsi d'éviter les étapes de filtration qui peuvent altérer la fonctionnalité des cellules (109).

La dernière étape consiste à débarrasser le produit des résidus tels que les agents enzymatiques ou les composants du sérum. Cette étape de lavage est effectuée par diafiltration ou plus récemment par chromatographie sur lit expansé. La concentration du produit fini est ensuite ajustée grâce à une solution tampon, en fonction de l'application envisagée. La solution est alors remplie dans les flacons et peut être cryopréservée en attendant son utilisation (74).

IV. ATTRIBUTS QUALITE CRITIQUES DES CELLULES SOUCHES ISSUES DE LA GELEE DE WHARTON CULTIVEES SUR MICROPORTEURS

Au cours de la culture des CSM, il est nécessaire de s'assurer que les cellules souches produites gardent leurs propriétés et soient pleinement fonctionnelles en vue de leur utilisation en thérapeutique. En effet, la principale problématique dans le traitement à base de CSM repose sur la variabilité des résultats (efficacité) et sur la force de l'efficacité (puissance) (110). Les caractéristiques des CSM peuvent en effet varier grandement en fonction du donneur et de la source tissulaire. Par ailleurs, leur qualité peut être influencée par la manière dont les cultures sont conduites, ce qui peut faire varier la balance bénéfique/risque lors des applications cliniques. Le nombre d'essais cliniques devenant de plus en plus important depuis quelques années, il est important de mettre en place des méthodes de caractérisation plus poussées et d'accroître les contrôles qualité lors de la production des CSM, afin d'assurer leur sécurité et efficacité.

Il est ainsi nécessaire de définir les attributs qualité critiques, afin d'uniformiser les pratiques de contrôle qualité lors de la production d'un lot. Les tests de contrôle qualité sont effectués à plusieurs instants du processus de fabrication : avant la production (donneur, matière première), sur la banque de cellules, sur les échantillons en cours de fabrication et lors des tests de libération finale du produit. Les spécifications sont définies pour le donneur, les matières premières et le produit final. Afin de caractériser un produit cellulaire, plusieurs essais doivent être réalisés (111) :

- **Caractérisation physico-chimique :**
 - Physique : taille, morphologie et nombre de cellules, confluence.
 - Chimique : identification et quantification des marqueurs de surface, ainsi que des substances sécrétées. Les tests d'identité comprennent la caractérisation du phénotype et du génotype du produit cellulaire, mais aussi des produits non cellulaires (chimiques ou biologiques) entrant

dans la composition du produit. En vue d'attester de la pureté du produit fini, les intermédiaires de production, les vecteurs, les cellules, les bactéries ou les fongiques qui ne sont pas requis dans le produit fini doivent être identifiés.

- **Caractérisation biologique** : Méthodes qui mesurent la fonction biologique (c'est-à-dire comment les caractéristiques physico-chimiques influencent les systèmes biologiques). Par exemple, mesures *in vitro* ou *in vivo* de la cytotoxicité, de la croissance cellulaire, de la différenciation, de la prolifération, de la migration.
- **Tests de « potency » (également nommé « test de puissance », ou « épreuve biologique »)** : Mesure quantitative *in vitro* ou *in vivo* de l'aptitude d'un produit de thérapie cellulaire à agir sur certaines fonctions biologiques, en vue d'attester de son efficacité. Ces tests permettent également d'évaluer l'impact des modifications apportées à un processus de fabrication (scale-up, transfert de site, donneur différent). Le produit final doit en effet présenter les mêmes attributs qualité après modification du procédé de fabrication, sans effet négatif sur la sécurité ou l'efficacité du produit.
- **Tests de stabilité** : Détermination de la date de péremption, des conditions de stockage du produit fini et des produits intermédiaires, durant lesquels la qualité du produit est maintenue dans les limites définies. La durée d'utilisation et les conditions de transport doivent également être précisées.

Le contrôle qualité des produits de thérapie cellulaire à base de CSM ne comporte pas de tests prédéfinis, un consensus n'ayant pas été établi entre les différents laboratoires dans le monde. La libération de ce type de médicament de thérapie innovante s'effectue au cas par cas selon les exigences des agences nationales telles que l'Agence Européenne du Médicament (EMA) en Europe, ou la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis. Par ailleurs, des contrôles spécifiques à chaque médicament peuvent être nécessaires, les modes d'actions des CSM variant en fonction de la pathologie visée. Par exemple, l'ingénierie tissulaire

nécessite la preuve de la différenciation cellulaire vers une ou plusieurs lignées spécifiques. La sécrétion des facteurs immunomodulateurs et des facteurs de croissance pertinents sera contrôlée, entre autres, pour la thérapie cellulaire.

Accident ischémique cérébral

Effets trophiques (sécrétion de VEGF), immunomodulation et différenciation en cellules endothéliales et en cellules musculaires lisses

Sécrétions de VEGF, CXCL5, et IL-8

Infarctus aigu du myocarde ou insuffisance cardiaque chronique

Facteurs anti-fibrotiques (Adrénomedulline) et sécrétion de cytokines proangiogéniques (SDF-1 α)

Viabilité cellulaire

Marqueurs de surface

Différenciation ostéogénique in vitro

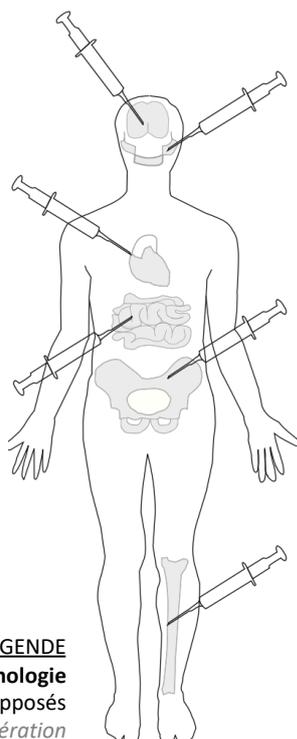
Différenciation en cardiomyocytes in vitro

Fistule – Maladie de Crohn

Modulation des lymphocytes MAIT (Mucosal-Associated Invariant T cells)

Viabilité cellulaire

% de cellules CD45+



Maxillectomie

Reconstruction osseuse et micro vasculaire

Viabilité cellulaire

Adhérence cellulaire aux granules betaTCP (ChronOS® strip)

Marqueurs de surface

Différenciation vers les 3 lignées cellulaires

Réaction aiguë du greffon contre l'hôte

Immunomodulation du système immunitaire

Nombre de passages

Niveau d'expression de TNFR-1

Inhibition de ILR2R α sur les lymphocytes T

Marqueurs de surface

Ischémie critique des membres inférieurs

Activité angiogénique paracrine et participation à la formation de nouveaux vaisseaux

Nombre de cellules et viabilité

Marqueurs de surface

Pas d'expression de hTERT

Identification de gènes spécifiques des cellules souches et du sécrétome

LEGENDE

Pathologie

Modes d'action supposés

Tests de libération

Figure 28 : Traitements potentiels et modes d'action supposés des cellules souches mésenchymateuses, et tests cellulaires spécifiques associés en vue de leur utilisation. Issu d'essais cliniques ciblant plusieurs pathologies, adapté de (112).

Les traitements à base de cellules souches sont considérés comme des médicaments de thérapie innovante (ATMP). Afin de se conformer aux BPF, ils doivent répondre à des critères indispensables (113) :

- Tests virologiques (VIH-1/2, VHB, VHC, HTLV-1/2, HPV, parvovirus B-19, CMV, et EBV), syphilis, *mycoplasma*, et tests de stérilité négatifs.
- Phénotype avec des pourcentages des cellules CD73+, CD90+ et CD105+ \geq 98%, et ceux des cellules CD34-, CD45-, HLA-DR-, CD14- ou CD11b-, CD79- ou CD19- \leq 2%.
- Viabilité cellulaire de 80% après décongélation.

- Quantité d'endotoxines ≤ 2 UE/mL.
- Pas de régulation positive des gènes codant pour la télomérase hTERT et les protéines oncogènes durant l'expansion cellulaire.
- Pas de régulation négative des gènes suppresseurs de tumeurs durant l'expansion cellulaire.
- Capacité de différenciation.

De nombreuses études se sont concentrées jusqu'ici à l'amélioration des technologies de culture à grande échelle, afin de développer des procédés efficaces, robustes et rentable. Cependant, l'essor et l'avancement de nombreux essais cliniques poussent un nombre grandissant d'équipes de recherche à s'intéresser à la qualité cellulaire en vue d'atteindre les critères de libération. L'optimisation de ces essais, fonction du procédé de culture et des cellules utilisées, est particulièrement étudiée, comme par l'équipe Bioprocédés-Biomolécules (BioProMo) du Laboratoire Réactions et Génie des procédés (LRGP), dépendant de l'Université de Lorraine. Elle s'intéresse notamment aux cellules souches mésenchymateuses issues de la gelée de Wharton. Les travaux de recherche portent ainsi sur le développement de méthodes d'expansion sur microporteurs, et sur l'optimisation des protocoles de détachement de ces cellules cultivées sur microporteurs. Ces cultures nécessitent une surveillance quotidienne. Cependant la plupart des contrôles actuels nécessitent une étape de détachement cellulaire difficile à mettre en œuvre sans atteindre à l'intégrité des cellules. Les protocoles ont initialement été développés pour les cellules en suspension et il n'existe actuellement que peu de contrôles pouvant être effectués directement sur microporteurs (comptage cellulaire, viabilité cellulaire). En cours de culture, la surveillance des cultures repose donc sur les prélèvements de milieu de culture, et sur la microscopie afin d'attester de l'attachement et de la croissance sur les microporteurs.

Il sera détaillé dans cette partie les principaux tests à effectuer sur les cellules souches issues de la gelée de Wharton cultivées sur microporteurs, comprenant notamment ceux permettant d'atteindre les critères minimaux définis par l'ISCT.

A. Test d'identité

L'identité des CSM-GW passe par la recherche des marqueurs de surface. La priorité consiste d'abord à identifier les marqueurs de surface décrits par l'ISCT afin d'attester du caractère mésenchymateux des cellules.

Le profil immunophénotypique des CSM-GW est évalué en cytométrie en flux par association avec l'immunofluorescence. Cette méthode est une technique de comptage ainsi que de détermination des propriétés des cellules. On peut ainsi déterminer sur une suspension cellulaire, exempte de microporteurs, leurs caractéristiques individuelles et morphologiques, telles que leur taille, forme, granularité (qui correspond à la complexité de la cellule, soit la densité des organites ou les irrégularités internes ou de surface), mais également paramètres de fluorescence, liés à l'utilisation de marqueurs fluorescents. Les éléments d'intérêt sont détectés en passant devant un faisceau laser. Celui-ci va exciter les fluorochromes associés à un anticorps (couplés de manière directe ou indirecte), ou les sondes fluorescentes rattachées aux composants cellulaires. L'intensité de la fluorescence est mesurée, puis analysée par un logiciel de traitement des données.

On distingue :

- L'immunofluorescence directe : Lors de ce marquage, un anticorps est dirigé contre la molécule recherchée, appelée antigène. Cet anticorps est couplé à un fluorochrome.
- L'immunofluorescence indirecte : L'anticorps primaire est dirigé contre l'antigène recherché. Ensuite on utilise un deuxième anticorps, marqué par un fluorochrome, et possédant une haute affinité pour l'anticorps primaire.

Parmi les fluorochromes couramment utilisés, on trouve l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou la phycoérythrine (PE) dont la longueur d'onde émise est respectivement de 518 et 578 nm. Il ne faut pas oublier de préparer un contrôle négatif, contenant les cellules à tester sans anticorps, afin de détecter une éventuelle auto-

fluorescence des cellules, ainsi qu'un contrôle positif ne contenant que l'anticorps fluoromarké.

Pour l'immunomarquage des clusters de différenciation (ou marqueurs de surface), l'immunofluorescence est directe. La cytométrie en flux peut également être utilisée afin de suivre l'évolution de certains constituants cellulaires au cours de la différenciation ; on pourra ainsi suivre l'expression du collagène I et II dans la différenciation chondrocytaire, qui nécessite un immunomarquage indirect. Cette différenciation est en effet caractérisée par une diminution de la production de collagène de type I par les CSM et par une augmentation du collagène de type II, caractéristique du cartilage (Figure 29) (114).

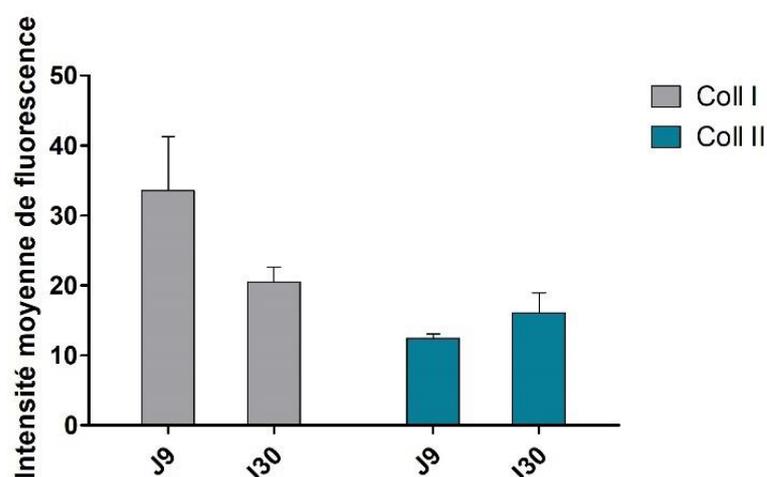


Figure 29 : Expression des collagènes de type I et II par les CSM-GW à J9 et J30 de la différenciation chondrocytaire (114)

Les résultats sont obtenus sous formes de graphiques à points (Figure 30), desquels sont extrapolés les pourcentages d'expression des marqueurs d'intérêt (Figure 31).

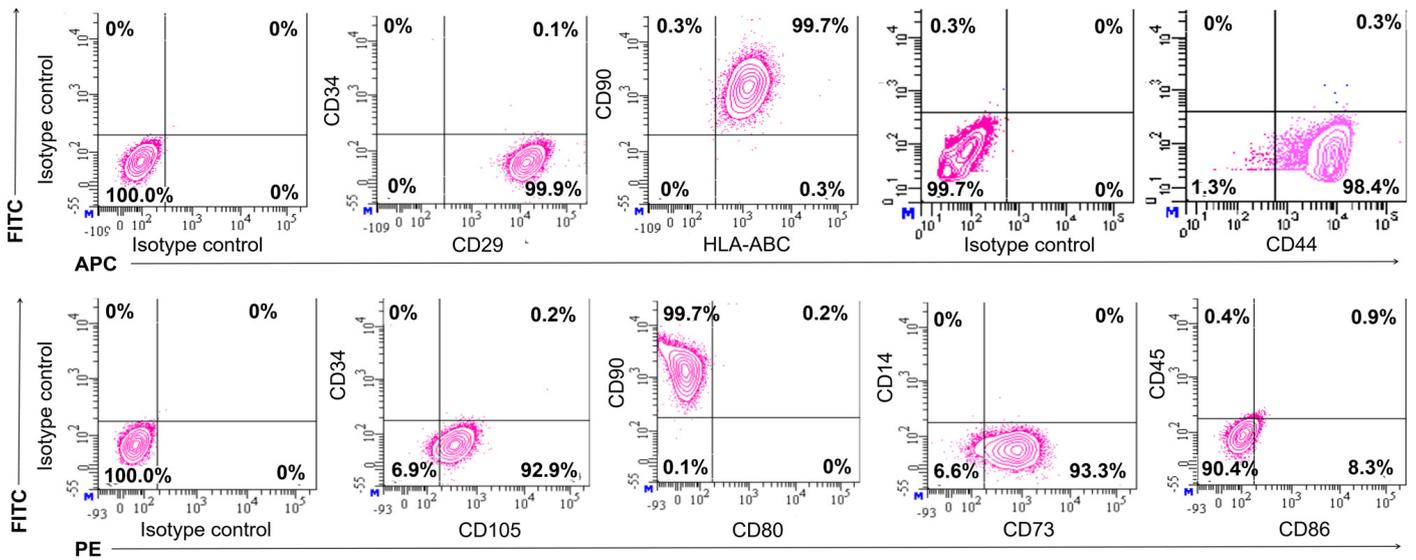


Figure 30 : Analyse en cytométrie en flux de CSM-GW (115)

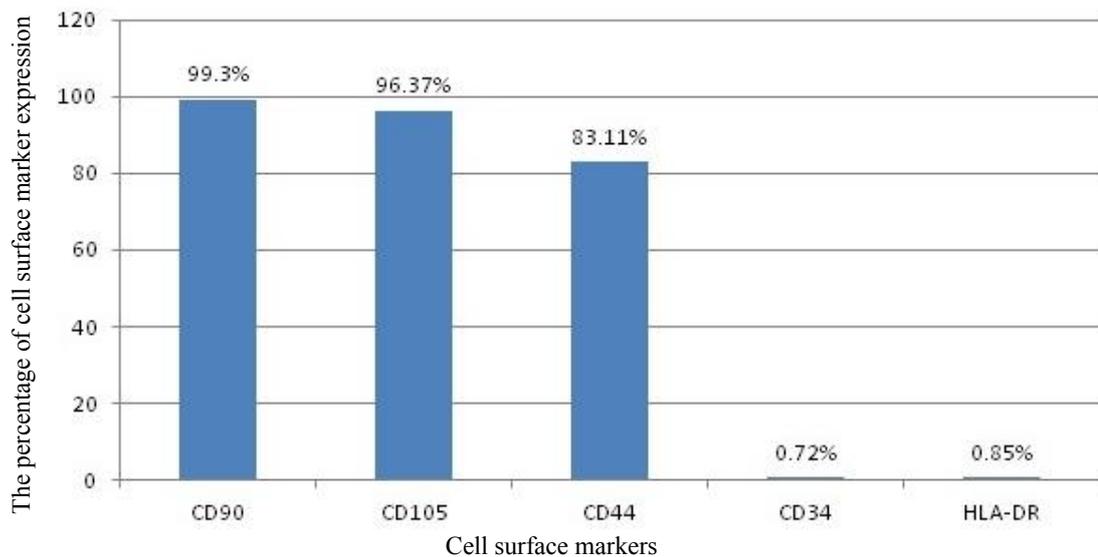


Figure 31 : Pourcentage d'expression des marqueurs de surface de CSM-GW (49)

Les études tendent à affirmer que la culture sur microporteurs n'affecte pas l'expression le phénotype cellulaire ; l'expression des marqueurs de surface remplit les critères de l'ISCT, que la culture soit effectuée en monocouche ou en 3D (Figure 32).

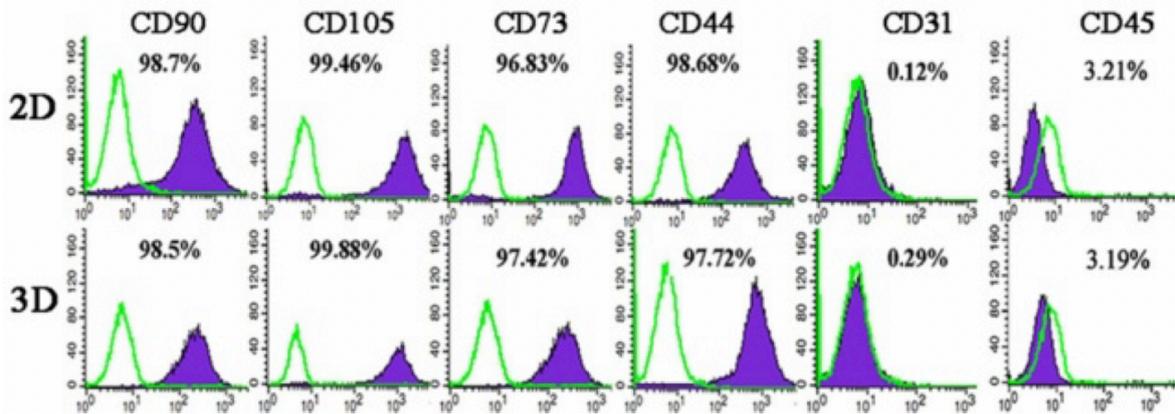


Figure 32 : Profil des marqueurs de surface des CSM-GW après culture 2D et 3D (116)

Le type de microporteur (117), ou les conditions de culture, et notamment d'agitation en bioréacteur (118), ne semblent pas modifier l'expression des antigènes de surface lors de l'étape d'amplification des CSM.

B. Tests de différenciation

La différenciation des cellules issues de la gelée de Wharton est essentielle afin de pouvoir envisager des applications thérapeutiques. En effet, il a été démontré que les CSM-GW peuvent être cultivées en vue de produire notamment des cellules productrices d'insuline, des hépatocytes, ou des neurones.

La proximité entre les cellules et l'utilisation de différents milieux de culture spécifiques permet aux CSM d'acquérir un phénotype ostéocytaire, adypocytaire ou chondrocytaire en 14 à 21 jours. Leur obtention est confirmée par un marquage histochimique. Cependant, cet essai présente plusieurs inconvénients : cette méthode est uniquement qualitative, elle est chronophage et ne permet pas de récupérer les cellules testées. D'autres méthodes, plus rapides, pouvant être lancées en cours de culture et nécessitant moins de manipulations peuvent être envisagées dans le suivi de la différenciation cellulaire : le suivi de l'ARNm par PCR, l'expression de marqueurs spécifiques par cytométrie en flux (112) ou l'utilisation de la spectroscopie Raman (119). L'ensemble des publications relate que les cellules issues d'une culture sur microporteurs sont d'abord détachées avant étude de différenciation.

1. Protocoles de différenciation

Les protocoles présentés dans cette partie, et utilisés par l'équipe BioPromo du LRGP, sont adaptés des consignes du fabricant de kits StemPro de différenciation adipogénique, ostéogénique et chondrogénique (Gibco). Ils nécessitent un détachement préalable des cellules des microporteurs.

a. Ostéocytes

Les cellules sont tout d'abord mises en culture dans du milieu α -MEM supplémenté avec 10 % en volume de SBF à une densité d'ensemencement de 5000 cellules/cm², dans une plaque 24 puits. La culture est reproduite quatre fois, avec un témoin négatif. Suite à une incubation à 37 °C pendant 24 h sous atmosphère humide avec 5 % de CO₂, le milieu de culture est remplacé par le milieu de différenciation ostéogénique contenant une faible concentration de dexaméthasone, du 3-isobutyl-1-méthylxanthine (IBMX), de l'insuline, de l'acide ascorbique et du β -glycérophosphate (β GP). La plaque est placée dans une étuve thermostatée à 37 °C et 5 % de CO₂ pendant 40 jours. Le milieu de différenciation est changé tous les trois à quatre jours.

La différenciation ostéocytaire est mise en évidence par l'alizarine rouge ; une coloration rouge intense apparaît s'il y a réaction avec le calcium issu des cristaux d'hydroxyapatite formé autour des ostéoblastes. Préalablement, une solution de formaldéhyde est préparée avec 3,72 mg de NaH₂PO₄, 0,84 mg de NaOH, 20 mL de formaldéhyde 37 % et complétée par de l'eau ultrapure. Les puits sont rincés une première fois au tampon phosphate salin (PBS), puis deux fois à l'eau ultrapure. Le marquage à l'alizarine 2 % (0,2 g de colorant pour 10 mL de solution, complété avec de l'eau ultrapure) est effectué avec un temps minimal de pause de deux minutes.

b. Adipocytes

La culture s'effectue de manière identique à celle des ostéocytes sur une durée de 40 jours, mais avec une densité d'ensemencement de 10000 cellules/cm². Les additifs du milieu de différenciation sont généralement la dexaméthasone à forte

concentration, l'IBMX, l'insuline ou l'*insuline-like growth factor* (IGF), et l'indométhacine.

La coloration des adipocytes s'effectue avec l'Oil Red O. Ce colorant rouge s'accumule dans les vésicules lipidiques adipocytaires. Il est en effet plus soluble dans les lipides que dans l'isopropanol, qui est le solvant de préparation de ce colorant. Les puits sont rincés avec du PBS. La fixation des cellules s'effectue avec une solution de formaldéhyde à 4 % et dure 30 min. Ce milieu est remplacé par le colorant préparé à 0,5 % dans de l'isopropanol pendant 5 min au minimum, puis est rincé trois fois avec de l'eau distillée.

c. Chondrocytes

La mise en culture des cellules issues de la gelée de Wharton dans un milieu α -MEM supplémenté avec 10 % en volume de SVF s'effectue à une quantité cellulaire de 3×10^3 à 5×10^3 . L'objectif de cette manipulation est d'obtenir une solution cellulaire de $1,6 \times 10^7$ cellules/ml. Des gouttelettes de 5 μ L de solution cellulaire sont placées dans quatre puits différents d'une plaque 24 puits, afin que la culture puisse générer des micromasses typiques de la différenciation chondrocytaire. Après incubation pendant 2 h sous atmosphère humide, le milieu de différenciation chondrogénique préparé avec dexaméthasone, acide ascorbique, TGF- β et ITS (insuline, transferrine, selenium) est ajouté aux tubes. L'incubation dure alors 28 jours dans une étuve thermostatée à 37 °C sous 5 % de CO₂, avec changement du milieu de différenciation tous les trois à quatre jours.

Le bleu Alcian est utilisé afin de colorer les chondrocytes ; il repose sur la liaison du colorant avec la matrice produite d'agrécans sulfatés (protéoglycane du tissu cartilagineux), donnant ainsi sa coloration bleue à l'extérieur de l'agrégat. Le milieu est enlevé après 40 jours de culture, les tubes sont rincés au PBS et les cellules sont fixées avec la solution de formaldéhyde 4 %. Celle-ci est rincée au PBS, puis la coloration est effectuée avec une solution de Bleu Alcian préparée dans 0,1 N de chlorure d'hydrogène (0,1 g de colorant pour 10 mL de solution). Après 30 min, une

solution à 0,1 N de chlorure d'hydrogène permet de rincer trois fois les puits, puis une dernière fois à l'eau ultrapure.

2. Résultats

Après 40 jours de culture, la visualisation des cellules adipocytaires et ostéocytaires, ainsi que de la micromasse chondrocytaire est effectuée à l'aide d'un microscope optique, permettant de visualiser la coloration histochimique (Figure 33). Lorsque les conditions de culture ont été respectées, les cellules se sont différenciées vers les trois lignées cellulaires ; cependant, il n'est pas possible avec ces techniques de déterminer la proportion de CSM différenciées au sein de la population induite. Il peut en effet visuellement être constaté que l'intégralité des cellules ne réagit pas à la coloration. Les publications relatant ces essais de culture sur microporteurs rendent compte systématiquement de la réussite des tests de différenciation.

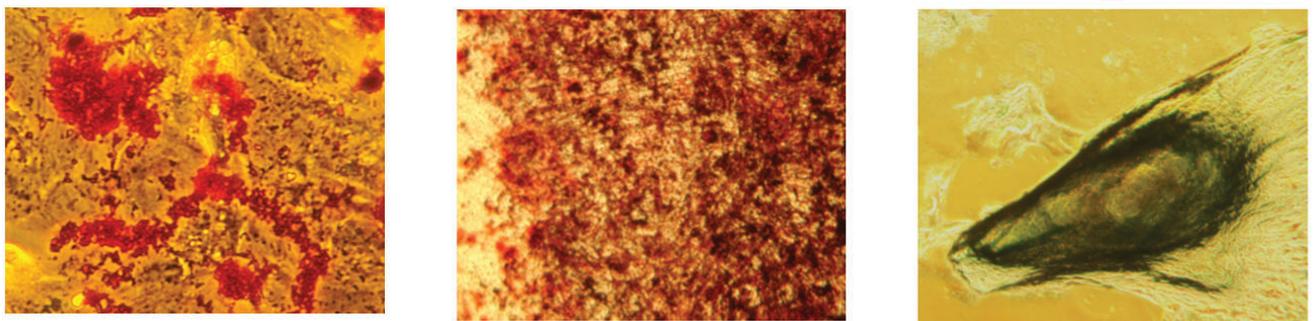


Figure 33 : (A) Différenciation adipocytaire, coloration à l'oil red O, (B) Différenciation ostéocytaire, coloration au red alizarine, (C) Différenciation chondrocytaire, coloration au bleu alcyan (120)

Il pourrait cependant être envisagé d'effectuer le marquage histochimique sans détachement. Cela permettrait d'effectuer ce contrôle en cours de culture sans étapes supplémentaires qui pourraient affecter la qualité des cellules. Dans un premier temps, les microporteurs utilisés doivent être faits des matériaux insensibles à la coloration, afin de ne pouvoir attribuer la coloration éventuelle qu'aux cellules différenciées. Les protocoles de différenciation vers les lignées adipocytaire et ostéocytaire peuvent aisément être transposés en présence des microporteurs, tant que la densité cellulaire est respectée. Des CSM-MO mises en culture sur microporteurs ont par exemple pu

être différenciées sur des microporteurs Cultispher S, puis identifiées après coloration au propidium iodide (121). L'enjeu est cependant différent pour la différenciation chondrocytaire. La chondrogenèse débute par l'agrégation des cellules souches en micromasses qui nécessite donc un nombre de cellules plus important pour initier le processus. Le volume de travail étant par conséquent plus important, la culture en tube Falcon® doit ainsi être privilégiée.

C. Capacités d'auto-renouvellement

Le test de clonogénicité des CSM-GW permet de s'assurer de la prolifération correcte des cellules, afin d'évaluer le nombre de cellules viables. Ce test permet de s'assurer que la propriété d'auto-renouvellement propre aux cellules souches est remplie.

L'essai mesurant l'efficacité CFU-F repose sur la comparaison du nombre de colonies obtenues après une culture de 14 à 21 jours avec la densité d'ensemencement initiale.

Pour évaluer l'efficacité CFU-F, des CSM-GW doivent êtreensemencées dans une boîte de culture à une densité de 10 cellules / cm², et cultivées avec un changement de milieu tous les trois à cinq jours. Après une culture de 14 jours, les cellules sont lavées avec du PBS et fixées dans du formaldéhyde à 4 % (v/v) pendant 30 min. Les colonies sont alors colorées avec du cristal violet à 1% dans du méthanol à 100 % (poids / volume) pendant 30 minutes. Les colonies colorées composées de plus de 25 cellules sont considérées « unités formant des colonies » au microscope à contraste de phase. Le calcul de l'efficacité de CFU-F est effectué selon la formule suivante :

$$\text{Efficacité de CFU-F} = (\text{CFU-F comptés} / \text{cellules ensemencées à l'origine}) \times 100$$

Le cristal violet est un colorant des noyaux de cellules adhérentes (Figure 34) ; il s'agit en effet d'un agent intercalant permettant la quantification de l'ADN et il est donc proportionnel au nombre de cellules. Ce colorant est cependant insensible aux changements de l'activité métabolique cellulaire, il n'est donc pas adapté à la mesure de la viabilité cellulaire.

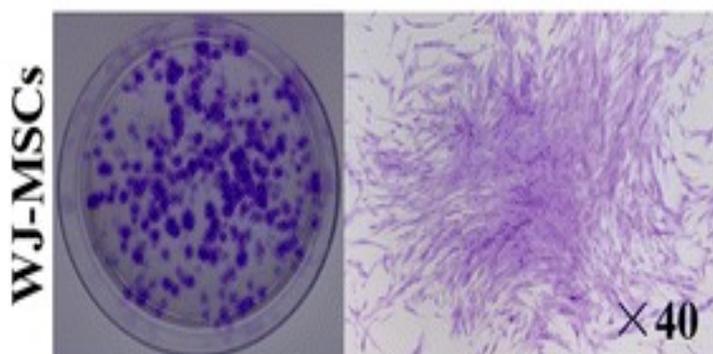


Figure 34 : Nombre de colonies totales et simple clone de CSM-GW (122)

Les résultats du test CFU-F présentent une variabilité importante en fonction des publications. Ils sont en effet dépendants de plusieurs paramètres, notamment la méthode d'isolation, les conditions de culture, la densité d'ensemencement cellulaire, mais sont également fonction de l'âge et de la santé du donneur (112).

Enfin, le potentiel de prolifération des CSM peut être évalué par l'estimation du temps de doublement de population. Pour cela, la formule $2^n = N_x/N_0$ est appliquée à chaque passage, et se base sur le nombre de cellules comptées après trypsination (N_x) et le nombre de cellules initialement ensemencées (N_0) (56).

D. Tests de fonctionnalité

Les CSM ont des origines variées, avec des capacités fonctionnelles propres au tissu dont elles sont issues, ainsi qu'aux méthodes de culture et d'expansion. Il faut donc vérifier que le médicament produit l'effet escompté à une dose déterminée. Il est en effet bien connu que des changements apparemment mineurs, notamment suivant la méthode de culture peuvent causer une altération importante des propriétés biologiques des CSM.

L'emploi des CSM-GW en clinique repose sur l'assurance de leur fonctionnalité (ou « potency »), soit leur aptitude à agir sur les voies de signalisation cellulaire adéquates suivant l'indication thérapeutique. Il s'agit donc de démontrer *in vitro* l'efficacité du produit. Dans les différentes applications thérapeutiques visées, l'action anti-inflammatoire et immunosuppressive des CSM est attendue. La mise en place d'un test permettant de s'assurer de la fonctionnalité des CSM *in vivo* est difficile à mettre en œuvre. Outre la variabilité des sources tissulaires, les mécanismes d'action restent largement non élucidés. Par ailleurs, l'analyse d'une seule voie de signalisation peut être réductrice et trompeuse. En effet, l'action des CSM repose sur une multitude de communications cellulaires induites par des signaux immunitaires et du micro environnement local, comme par exemple dans le cas du diabète sucré (Figure 35)

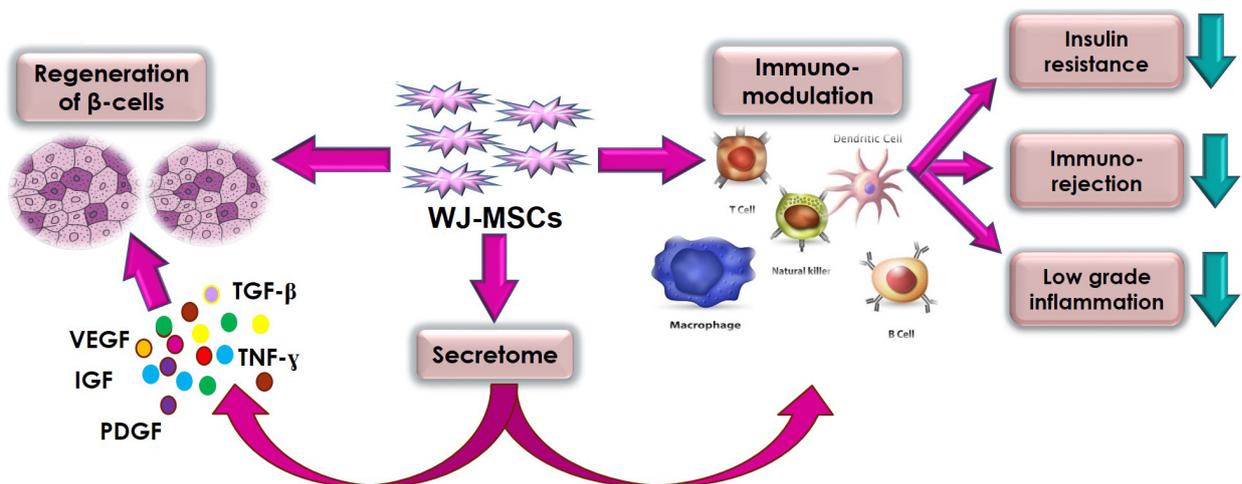


Figure 35 : Résumé des différentes propriétés thérapeutiques et mécanismes d'actions des CSM-GW dans le diabète sucré (123)

L'ISCT recommande à cet effet une analyse matricielle avec la réalisation de plusieurs tests complémentaires. Si les résultats de ces tests sont corrélés à une activité biologique pertinente, cela devrait permettre de garantir l'activité cellulaire. Ces essais sont biologiques ou analytiques et peuvent donner un résultat qualitatif ou quantitatif (124).

Certaines équipes de recherche développent des essais prouvant les capacités régénératrices et immunomodulatrices des CSM. Elles se basent par exemple à la fois sur l'analyse du sécrétome des CSM, et des gènes codant pour les propriétés

immunomodulatrices des CSM. À cet effet, la mise en culture des CSM avec des cellules mononuclées du sang périphériques humaines (PBMC) permet d'obtenir une signature cytokinique spécifique, corrélée à l'inhibition des lymphocytes T. La stimulation des CSM avec l'IFN- γ permet de côté d'identifier par RT-PCR les gènes régulés positivement, impliqués dans l'immunomodulation (125). Une autre approche possible consiste à tester l'inhibition des lymphocytes T en étudiant la phosphorylation des CSM. À la différence des essais précédemment décrits, les CSM, toujours cultivées avec des PBMC, sont utilisées pour étudier leur sécrétome, mais également l'impact de celui-ci sur les CSM (Figure 36) (126). Ces essais concernent cependant uniquement les effets des CSM sur le système immunitaire, qui ne sont cependant pas forcément recherchés dans certaines applications cliniques envisagées. Il est donc nécessaire de définir une approche similaire pour tester, entre autres, les fonctions angiogéniques ou anti-apoptotiques.

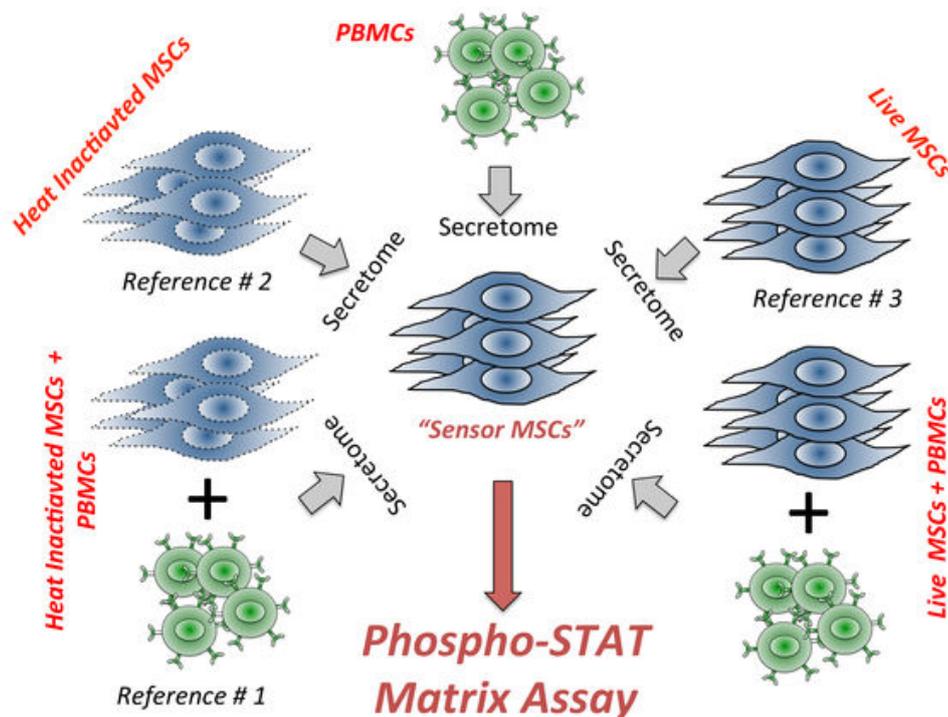


Figure 36 : Test de fonctionnalité basé sur l'utilisation des CSM comme signal et capteur lors de leur interaction avec des cellules mononuclées du sang périphérique (126)

E. Sécrotome

Le mode d'action des CSM implique souvent une importante composante paracrine, qui se traduit par la sécrétion de molécules bioactives en réponse au microenvironnement local. On compte ainsi des molécules immunomodulatrices, anti-apoptotiques, anti-oxydantes, ou ayant des propriétés angiogéniques. Plusieurs techniques permettent de détecter ces cytokines (comme CCL-2, IL-6, ou IL-8), des facteurs de croissance (comme VEGF, PDGF) ou encore des prostaglandines (PGE2). Les méthodes sont listées ci-dessous, mais ne peuvent être effectuées uniquement qu'au moment du downstream process, après détachement des cellules (104):

- Électrophorèse bidimensionnelle associée à la spectrométrie de masse
- Séparation de protéines ou de peptides par chromatographie en phase liquide associée à la spectrométrie de masse. Cette technique permet de détecter des niveaux protéiques plus faibles que la méthode ci-dessus, et même rarement des cytokines quand présentes en grandes quantités.
- Tests immunologiques tels que ELISA, Western Blot, des puces à anticorps

Cependant, le profil protéomique défini *in vitro* n'est pas forcément corrélé à l'efficacité des CSM *in vivo* (100). Par ailleurs, plusieurs équipes ont rapporté que le profil transcriptomique était susceptible d'évoluer au fur et à mesure des passages pour des cellules souches issues de moelle osseuse ou de cordon ombilical, cultivées dans un milieu supplémenté en FBS. Le domaine de la thérapie cellulaire est toujours en train d'évaluer l'impact des formulations des milieux de culture et des suppléments de croissance sur les propriétés biologiques des CSM, et ainsi sur leur potentiel thérapeutique. Un nombre croissant de milieux alternatifs xeno-free et serum-free qui permettent d'assurer la prolifération des CSM et la conservation de leurs propriétés intrinsèques sont utilisés de manière croissante ; l'influence de ces différentes formulations sur la dérive du transcriptome en cours de culture reste à déterminer.

F. Test de viabilité

Dans les essais cliniques au sein desquels les cellules souches sont utilisées, la viabilité cellulaire doit être, selon la FDA, d'au moins 70% (128). La mesure de la viabilité cellulaire est associée à la détermination du nombre de cellules disponibles. Plusieurs essais sont disponibles afin de tester la viabilité cellulaire des cellules détachées :

Acridine orange / Propidium iodide

L'acridine orange (AO) colore l'ADN dans le noyau de toutes les cellules afin d'obtenir le nombre total de cellules nucléées. Le propidium iodide (PI) est également un colorant se fixant à l'ADN mais est utilisé pour identifier les cellules apoptotiques et ainsi déterminer la viabilité cellulaire. Les cellules vivantes sont imperméables de par leur membrane au PI. L'observation au microscope à fluorescence par comptage manuel ou l'utilisation d'un compteur cellulaire automatisé permet d'estimer la viabilité cellulaire. Les cellules vivantes fluorescent vert, alors que les cellules mortes fluorescent rouge (129).

Test d'exclusion au colorant Bleu Trypan

Il est utilisé pour déterminer le nombre de cellules viables présentes dans une suspension cellulaire. Il repose sur le principe que les cellules vivantes possèdent des membranes cellulaires intactes qui excluent certains colorants, tels que le bleu trypan, l'éosine ou le propidium, alors que les cellules mortes y sont perméables. La suspension cellulaire est simplement mélangée avec le colorant, puis examinée visuellement pour déterminer si les cellules absorbent ou excluent le colorant. Une cellule viable aura un cytoplasme clair, tandis qu'une cellule non viable aura un cytoplasme bleu. Afin de compter les cellules, on peut utiliser un hématimètre sur lequel les cellules seront comptées sous microscope optique et déterminer la viabilité par la formule suivante (130) :

$$(\%_{\text{cellules viables}} = \left(1 - \frac{\text{Nombre de cellules colorées bleu}}{\text{Nombre total de cellules}}\right) \times 100$$

On peut également utiliser un analyseur de viabilité cellulaire automatisé tel que le Vi-Cell™ Cell Viability Analyzer Counter (Beckman Coulter).

Les deux méthodes sont équivalentes et peuvent être utilisées selon des moyens disponibles. En effet, il y a une étroite corrélation entre les deux techniques après évaluation sur trente échantillons, la régression linéaire donnant un R^2 supérieur à 0,96% (Figure 37) (131).

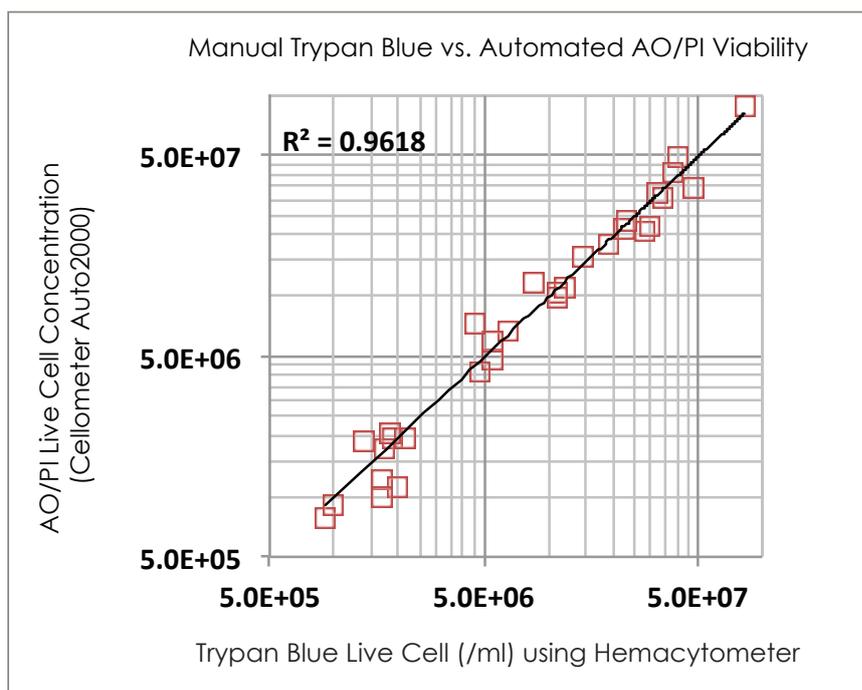


Figure 37 : Comparaison des méthodes AO/PI et trypan bleu (131)

Il est également possible d'évaluer le métabolisme et la prolifération cellulaire en effectuant un dosage colorimétrique au MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Cet essai évalue la viabilité cellulaire en mesurant l'activité des déshydrogénase mitochondriales (132). Les suspensions de CSM-GW doivent être diluées à 2×10^3 cellules par millilitre avec de l' α -MEM contenant 10% de FBS. Des aliquotes de 100 μ L de suspensions de CSM-GW sont ensuite mis en culture dans des plaques de 96 puits et incubées à 37 ° C dans une atmosphère humidifiée à 5% de CO₂. Après 24 heures d'adhésion et de prolifération cellulaire, un volume de 20 μ L de solution de MTT à 5 mg/mL est ajouté à chaque puits. L'incubation dure alors 4 h, à l'issue desquelles le milieu est retiré. Le MTT est une solution d'aspect jaunâtre

qui, au contact des déshydrogénases mitochondriales, est réduit en cristaux de formazan bleu foncé et insolubles dans l'eau. Ces cristaux précipitent dans la cellule et peuvent alors être observés au microscope optique. Le nombre de cellules viables est ainsi corrélé à l'estimation du nombre de mitochondries. Ce dernier est estimé grâce à la spectrophotométrie par la quantité de cristaux et donc la concentration en formazan. En ajoutant 150 µL de dimethylsulfoxyde (DMSO), les cristaux sont dissous, et l'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre à 490 nm (122).

Des essais ont, ces dernières années, permis de déterminer la viabilité cellulaire et d'effectuer le comptage cellulaire en cours de culture, sans étape préalable de détachement cellulaire. Ainsi l'essai au MTT est transposable aux cellules attachées aux microporteurs, et permet de manière indirecte de déterminer la concentration de cellules viables (133). Une méthode quantitative permettant d'effectuer le comptage cellulaire de manière plus robuste, directement sur les microporteurs, a été développée par l'équipe BioPromo. Elle repose dans un premier temps sur la coloration au DAPI des noyaux cellulaires, puis sur la détection des cellules et des contours des microporteurs à l'aide d'un script Matlab. Il est ainsi possible d'obtenir le nombre de cellules par microporteurs avec une erreur moyenne évaluée à 5% par rapport au comptage manuel. Cette méthode ne permet pas cependant de distinguer les cellules viables des cellules non viables (120).

G. Tests complémentaires

Au-delà des tests visant à démontrer l'efficacité et la qualité des cellules souches, des contrôles supplémentaires visant à garantir l'intégrité du produit final sont à effectuer. Sa libération passe ainsi par l'assurance de sa pureté et de sa stérilité.

1. Test de pureté

La pureté des traitements à base de CSM repose sur les tests évaluant les contaminants résiduels, ainsi que sur les tests de pyrogénicité (évaluation des endotoxines bactériennes). En effet, ces médicaments ont pour vocation d'être

administrés par voie parentérale au patient et ils doivent donc répondre aux contraintes des médicaments injectables.

Les normes de la pharmacopée imposent l'absence de substances pyrogènes dans les produits pharmaceutiques entrant en contact avec la circulation sanguine ou le système nerveux central. La pharmacopée européenne, qui spécifie les doses seuils d'endotoxines bactériennes, définit la limite maximale tolérée à 5 UI d'endotoxines par kilogramme de masse corporelle et par heure pour la voie intraveineuse. Afin de déterminer cette valeur, le test du lysat d'amoébocyte de limule (LAL) est couramment utilisé. Le principe de cette méthode colorimétrique repose sur la propriété du lysat à coaguler en présence de quantités infimes d'endotoxines (134).

Parmi les substances pouvant être présentes dans le produit final, on retrouve des contaminants, des résidus (peptides, cytokines, facteurs de croissance...), des produits nouvellement générés ou des produits de dégradation. Elles proviennent potentiellement des matières premières, de composants du milieu, de réactifs chimiques ou de tout autre additif lié à la production. Ces substances, par exemple l'albumine dérivée du sérum de veau foetal ou les antibiotiques utilisés, peuvent avoir des effets délétères sur la qualité et la sécurité du médicament. Il est donc nécessaire de prouver qu'elles ne sont pas présentes ou d'établir des tests appropriés pour contrôler les niveaux admissibles dans le produit final (134). Ces tests de pureté, où le produit final est caractérisé entièrement, peuvent être effectués par cytométrie en flux (135).

2. Test de stérilité

La stérilité doit être assurée tout au long du processus de fabrication. En effet, la stérilité du produit final doit être démontrée avant son utilisation chez un patient. Cette étape est d'autant plus importante car il est impossible de stériliser un produit cellulaire. L'utilisation de matériel humain ou xénogénique peut conduire à une possible contamination accidentelle de l'hôte par des agents tels que les champignons, les bactéries, les virus ou les mycoplasmes.

Le contrôle de la stérilité repose tout d'abord sur la recherche d'éventuels germes ou champignons (levures, moisissures), dont la présence est indésirable. Ces essais de stérilité sont menés par filtration membranaire ou par inoculation directe, selon les protocoles définis par la pharmacopée européenne. Les milieux appropriés aux germes recherchés sont mis en incubation durant une période de 14 jours en présence de la solution à tester. Parmi les milieux disponibles, une gélose tryptocaseïne de soja permet ainsi de détecter les germes totaux, une gélose de Saboraux permet d'isoler les *Fungi*, et un bouillon de Mac Conkey favorisera la croissance d'éventuels *Escherichia Coli*. Si ces résultats ne peuvent être obtenus qu'après l'administration du produit au patient, des méthodes permettant de s'assurer de l'absence de germes éventuels après l'administration doivent être préalablement établies. Dans de tels cas, il faut démontrer que les produits intermédiaires sont stériles, et que cette stérilité a été strictement maintenue durant l'intégralité de la production conduisant au produit final (136).

Préalablement au recueil des cellules souches, le donneur doit être testé pour certains virus et maladies transmissibles selon les recommandations de l'EMA et de la FDA. On citera par exemple le rétrovirus de type 1 et 2 (HTLV-1, HTLV-2), le cytomégalovirus (CMV), le virus de l'immunodéficience humaine de type 1 et 2 (HIV-1, HIV-2), le virus de l'hépatite B (VHB), de l'hépatite C (VHC), le *treponema pallidum*, le prion responsable de l'encéphalopathie spongiforme, ainsi que toute autre maladie pouvant affecter la xénogreffe (137). La recherche de ces agents infectieux doit être également effectuée sur le sérum utilisé au cours de la culture, qu'il soit d'origine xénogénique ou humain, mais également sur le produit final. En effet, les protocoles de culture des CSM principalement présentés à ce jour dans la littérature sont conduits dans des systèmes ouverts, plus propices à des contaminations extérieures que des systèmes fermés (135).

Des tests de tumorigénicité doivent également être menés avant le début d'une thérapie cellulaire. L'objectif est en effet de détecter les anomalies chromosomiques éventuelles, ou d'éviter la formation de tératomes lors de l'administration au patient. Il

a été rapporté que le profil transcriptomique et l'expression de certains gènes pouvaient être altérés durant l'expansion cellulaire. Les gènes reliés à la prolifération, la différenciation, l'apoptose ou l'inflammation seront plus à même d'être déréglés à chaque passage au cours de l'expansion cellulaire, dû au vieillissement cellulaire. L'absence de cellules suspectes dans le produit final est essentielle ; Il n'y a pas aujourd'hui de recul suffisant pour s'assurer de l'absence de prolifération de cellules malignes à long terme après administration des cellules souches au patient. À ce jour, aucun cancer n'a été relevé suite à des essais cliniques utilisant des CSM. Concernant les CSM-GW, elles sont considérées à ce jour comme non-tumorigènes, voire anti-tumorigènes. Les mécanismes associés à ces propriétés ne sont cependant pas totalement élucidés (123). Les tests pouvant être conduits sont les suivants (137):

- Analyse du caryotype
- Hybridation in situ en fluorescence (FISH)
- Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)
- Hybridation génomique comparative (CGH)

Conclusion

La quantité considérable de données mettant en évidence le potentiel thérapeutique des CSM a motivé l'intérêt d'utiliser ces cellules comme outils thérapeutiques. Les cellules souches issues de la gelée de Wharton constituent un choix intéressant de par leur recueil plus aisé que les autres sources de CSM. Leur potentiel de prolifération, mais aussi leurs capacités de différenciation font de ces cellules une source non négligeable en vue d'une culture à grande échelle. Plus immatures que les cellules issues de la moelle osseuse, leurs caractéristiques immunologiques, ainsi que leur ressemblance avec les cellules souches embryonnaires laisse envisager une utilisation clinique plus sécurisée. Même si les résultats des essais cliniques sont encourageants, peu ont rendu leurs conclusions. Le potentiel de ces cellules est néanmoins reconnu mondialement à ce jour, et suscite un intérêt dans de nombreux domaines thérapeutiques, que les maladies soient bien décrites (par exemple dans l'infarctus du myocarde, la maladie de Crohn ou la sclérose en plaques), ou encore méconnues (par exemple la COVID-19).

Même si les protocoles permettent aujourd'hui d'atteindre les spécifications posées par les autorités compétentes, plusieurs points nécessitent d'être éclaircis afin de garantir le développement de médicaments sûrs, et donc de thérapies cellulaires fiables, reproductibles et efficaces. Il est ainsi nécessaire d'éclaircir précisément le phénotype des CSM notamment issues de la gelée de Wharton. On note en effet le manque de données sur les liens entre le phénotype et le fonctionnement précis des cellules. Les propriétés immunomodulatrices sont également prometteuses en vue d'une utilisation thérapeutique, mais nécessitent d'être approfondies.

Les cultures basées sur les microporteurs sont encourageantes en tant qu'alternative à la culture en deux dimensions, et sont potentiellement capables de respecter les BPF. Cependant, plusieurs défis doivent être relevés dans un proche avenir. Même s'il a été démontré que les systèmes de culture basés sur des microporteurs sont moins onéreux à grande échelle que les systèmes de culture

planaires, d'autres aspects peuvent considérablement augmenter les coûts de production, comme les formulations des milieux de culture, capables de favoriser l'adhésion cellulaire et l'expansion des microporteurs. En outre, malgré tous les avantages des systèmes de culture basés sur les microporteurs, il convient de noter que la plupart des produits à base de MSC utilisés dans les essais cliniques sont actuellement fabriqués à l'aide de systèmes planaires. Cela s'explique non seulement par la quantité importante de données générées au cours des dernières décennies à l'aide de ces méthodes, mais également par le fait que le traitement en aval associé est relativement simple et bien établi. Pour que les systèmes basés sur les microporteurs soient pleinement mis en œuvre dans la fabrication à grande échelle, il est essentiel que les opérations de récupération des cellules soient rapidement optimisées. Ces étapes peuvent en effet tout autant influencer la qualité cellulaire. Des équipes de recherche travaillent sur d'autres méthodes de culture à grande échelle, notamment par l'encapsulation des cellules souches qui permettrait de mimer l'environnement *in vivo*. Bien qu'également prometteuse, son utilisation repose sur l'utilisation du biomatériau adéquat, à l'image des microporteurs.

La qualité des cellules doit par ailleurs répondre en tous points aux attentes réglementaires. Des essais sont indispensables en vue de la libération du lot pharmaceutique, portant notamment sur les attributs qualité critiques identifiés. L'objectif initial de ce projet reposait sur l'identification ou l'établissement de protocoles permettant d'effectuer certains essais directement sur les microporteurs, et donc en cours de culture. Peu ont le potentiel d'être transposés à la culture 3D (viabilité cellulaire, différenciation par exemple), du fait entre autres de l'encombrement ou du matériau des microporteurs. Ainsi, ces essais, qui peuvent être chronophages, ne permettent pas de suivre avec précision la culture cellulaire, qui, elle-même, prend plusieurs jours. Certains protocoles sont explicités dans la pharmacopée, mais pour la plupart, la méthode utilisée reste libre.

Il a été présenté dans ce travail les protocoles actuellement proposés par les différentes équipes travaillant sur les CSM-GW ; il est cependant nécessaire

d'uniformiser les pratiques en vue de la mise sur le marché de ces traitements prometteurs.

Bibliographie

1. Maehle A-H. Ambiguous cells: the emergence of the stem cell concept in the nineteenth and twentieth centuries. *Notes Rec R Soc.* 20 déc 2011;65(4):359-78.
2. Chneiweiss H. Plasticité du phénotype cellulaire ou une certaine fin de l'insouciance du déterminisme. *Biol Aujourd'hui.* 2011;205(1):43-6.
3. Comité Consultatif National d'Éthique pour les Sciences de la Vie et de la Santé (CCNE). Utilisation des cellules souches issues du sang de cordon ombilical, du cordon lui-même et du placenta et leur conservation en biobanques. Questionnement éthique. 2012 févr p. 1-29. Report No.: 117.
4. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and Characterization of Mouse Hematopoietic Stem Cells. *Science.* 1988;241(4861):58-62.
5. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci.* 1 avr 1992;89(7):2804-8.
6. National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services. NIH Stem Cell Information Home Page. Stem Cell Information. 2016.
7. Tachdjian G, Baudin B, Bobé P, Cuif-Lordez M-H, Faivre J, Guiochon-Mantel A, et al. Chapitre 19. Prolifération – Différenciation. In: *Toute l'UE2 - Cours + QCM.* 2e éd. Elsevier Masson; 2018.
8. Rao V. Stem Cells: Future of Therapeutics. *Medium.* 19 mai 2019;
9. Ishiuchi T, Enriquez-Gasca R, Mizutani E, Bošković A, Ziegler-Birling C, Rodriguez-Terrones D, et al. Early embryonic-like cells are induced by downregulating replication-dependent chromatin assembly. *Nat Struct Mol Biol.* sept 2015;22(9):662-71.

10. Yang J, Ryan DJ, Wang W, Tsang JC-H, Lan G, Masaki H, et al. Establishment of mouse expanded potential stem cells. *Nature*. oct 2017;550(7676):393-7.
11. Gao X, Nowak-Imialek M, Chen X, Chen D, Herrmann D, Ruan D, et al. Establishment of porcine and human expanded potential stem cells. *Nat Cell Biol*. juin 2019;21(6):687-99.
12. Coulombel L. Pluripotence : une définition à géométrie variable. *Médecine/Sciences*. oct 2009;25(10):798-801.
13. Fluckiger A-C, Dehay C, Savatier P. Cellules souches embryonnaires et thérapies cellulaires du système nerveux. *Médecine/Sciences*. juin 2003;19(6-7):699-708.
14. France. Article L2151-5, Modifié par Loi n°2016-41 du 26 janvier 2016 - art. 155. Code de la santé publique.
15. Blum B, Benvenisty N. The Tumorigenicity of Human Embryonic Stem Cells. In: *Advances in Cancer Research*. Elsevier; 2008. p. 133-58.
16. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. août 2006;126(4):663-76.
17. Bennaceur Griscelli A. Cellules souches pluripotentes induites (IPS). Inserm - La science pour la santé.
18. Narsinh KH, Plews J, Wu JC. Comparison of Human Induced Pluripotent and Embryonic Stem Cells: Fraternal or Identical Twins? *Mol Ther*. avr 2011;19(4):635-8.
19. Hernigou P. Bone transplantation and tissue engineering, part IV. Mesenchymal stem cells: history in orthopedic surgery from Cohnheim and Goujon to the Nobel Prize of Yamanaka. *Int Orthop*. avr 2015;39(4):807-17.

20. Qian H, Yang H, Xu W, Yan Y, Chen Q, Zhu W, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate rat acute renal failure by differentiation into renal tubular epithelial-like cells. *Int J Mol Med.* sept 2008;22(3):325-32.
21. Khoo MLM, Shen B, Tao H, Ma DDF. Long-Term Serial Passage and Neuronal Differentiation Capability of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev.* oct 2008;17(5):883-96.
22. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* sept 2008;8(9):726-36.
23. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol.* janv 2008;9:11-21.
24. Vishwakarma A, Rouwkema J, Jones PA, Karp JM. The Need to Study, Mimic, and Target Stem Cell Niches. In: *Biology and Engineering of Stem Cell Niches.* Elsevier; 2017. p. 3-13.
25. Secunda R, Vennila R, Mohanashankar AM, Rajasundari M, Jeswanth S, Surendran R. Isolation, expansion and characterisation of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood and matrix: a comparative study. *Cytotechnology.* oct 2015;67(5):793-807.
26. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. *Stem Cells.* mai 2006;24(5):1294-301.
27. Hermann A, List C, Habisch H-J, Vukicevic V, Ehrhart-Bornstein M, Brenner R, et al. Age-dependent neuroectodermal differentiation capacity of human mesenchymal stromal cells: limitations for autologous cell replacement strategies. *Cytherapy.* janv 2010;12:17-30.
28. De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum.* août 2001;44(8):1928-42.

29. Lee OK, Kuo TK, Chen W-M, Lee K-D, Hsieh S-L, Chen T-H. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood*. 1 mars 2004;103(5):1669-75.
30. In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, Noort WA, Claas FHJ, Willemze R, et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood*. 15 août 2003;102(4):1548-9.
31. Igura K, Zhang X, Takahashi K, Mitsuru A, Yamaguchi S, Takahashi TA. Isolation and characterization of mesenchymal progenitor cells from chorionic villi of human placenta. *Cytotherapy*. déc 2004;6(6):543-53.
32. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.
33. Fan Y. L'effet immunomodulateur de cellule souche mésenchymateuse et ses exosomes sur l'activité des lymphocytes [Thèse]. Université Paris-Saclay; 2017.
34. Ménard C, Tarte K. Immunosuppression et cellules souches mésenchymateuses - Mieux comprendre une propriété thérapeutique majeure. *Médecine/Sciences*. 1 mars 2011;27(3):269-74.
35. Gondran P. Chapitre 1 : Introduction à l'hématologie. In: *Hématologie*. 3^e éd. Elsevier Masson; 2018.
36. Passweg JR, Chalandon Y, Lehmann T, Kindler V, Tichelli A. Les cellules souches du sang du cordon ombilical. *Paediatrica*. 2010;21(5):52-5.
37. Reppel L. Potentialité des cellules stromales de la gelée de Wharton en ingénierie du cartilage [Thèse]. Université de Lorraine; 2014.
38. Guasch G. Les cellules souches épithéliales de la peau. *Médecine/Sciences*. août 2006;22(8-9):710-2.

39. Arutyunyan I, Elchaninov A, Makarov A, Fatkhudinov T. Umbilical Cord as Prospective Source for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy. *Stem Cells Int.* 2016;2016:1-17.
40. Wang X-Y, Lan Y, He W-Y, Zhang L, Yao H-Y, Hou C-M, et al. Identification of mesenchymal stem cells in aorta-gonad-mesonephros and yolk sac of human embryos. *Blood.* 15 févr 2008;111(4):2436-43.
41. Kim D-W, Staples M, Shinozuka K, Pantcheva P, Kang S-D, Borlongan C. Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications. *Int J Mol Sci.* 31 mai 2013;14(6):11692-712.
42. Moretti P, Hatlapatka T, Marten D, Lavrentieva A, Majore I, Hass R, et al. Mesenchymal Stromal Cells Derived from Human Umbilical Cord Tissues: Primitive Cells with Potential for Clinical and Tissue Engineering Applications. In: Kasper C, Griensven M, Pörtner R, éditeurs. *Bioreactor Systems for Tissue Engineering II.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009. p. 29-54.
43. Seshareddy K, Troyer D, Weiss ML. Method to isolate mesenchymal-like cells from Wharton's Jelly of umbilical cord. *Methods Cell Biol.* 2008;86:101-19.
44. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for Alternative Sources of Postnatal Human Mesenchymal Stem Cells: Candidate MSC-Like Cells from Umbilical Cord. *Stem Cells.* 2003;21:105-10.
45. Varaa N, Azandeh S, Khodabandeh Z, Gharravi AM. Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell: Various Protocols for Isolation and Differentiation of Hepatocyte-Like Cells; Narrative Review. *Iran J Med Sci.* nov 2019;44(6):437-48.
46. Chen AK-L, Reuveny S, Oh SKW. Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: Achievements and future direction. *Biotechnol Adv.* nov 2013;31(7):1032-46.

47. Batsali A, Kastrinaki M-C, A. Papadaki H, Pontikoglou C. Mesenchymal Stem Cells Derived from Wharton's Jelly of the Umbilical Cord: Biological Properties and Emerging Clinical Applications. *Curr Stem Cell Res Ther.* 1 févr 2013;8(2):144-55.
48. Salehinejad P, Alitheen NB, Ali AM, Omar AR, Mohit M, Janzamin E, et al. Comparison of different methods for the isolation of mesenchymal stem cells from human umbilical cord Wharton's jelly. *Vitro Cell Dev Biol - Anim.* févr 2012;48(2):75-83.
49. Ranjbaran H, Abediankenari S, Mohammadi M, Jafari N, Khalilian A, Rahmani Z, et al. Wharton's Jelly Derived-Mesenchymal Stem Cells: Isolation and Characterization. *Acta Med Iran.* 56(1):28-33.
50. Schugar RC, Chirieleison SM, Wescoe KE, Schmidt BT, Askew Y, Nance JJ, et al. High Harvest Yield, High Expansion, and Phenotype Stability of CD146 Mesenchymal Stromal Cells from Whole Primitive Human Umbilical Cord Tissue. *J Biomed Biotechnol.* 11 sept 2009;2009:1-11.
51. Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, Rachakatla RS, Choi M, Merchav S, et al. Human Umbilical Cord Matrix Stem Cells: Preliminary Characterization and Effect of Transplantation in a Rodent Model of Parkinson's Disease. *Stem Cells.* mars 2006;24(3):781-92.
52. Musiał-Wysocka A, Kot M, Sułkowski M, Badyra B, Majka M. Molecular and Functional Verification of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSCs) Pluripotency. *Int J Mol Sci.* 12 avr 2019;20(8):1807.
53. El Omar R, Beroud J, Stoltz J-F, Menu P, Velot E, Decot V. Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells: The New Gold Standard for Mesenchymal Stem Cell-Based Therapies? *Tissue Eng Part B Rev.* oct 2014;20(5):523-44.
54. Che N, Li X, Zhou S, Liu R, Shi D, Lu L, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells suppress B-cell proliferation and differentiation. *Cell Immunol.* janv 2012;274(1-2):46-53.
55. Ribeiro A, Laranjeira P, Mendes S, Velada I, Leite C, Andrade P, et al. Mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix, adipose tissue and bone marrow

exhibit different capability to suppress peripheral blood B, natural killer and T cells. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(5).

56. Batsali AK, Pontikoglou C, Koutroulakis D, Pavlaki KI, Damianaki A, Mavroudi I, et al. Differential expression of cell cycle and WNT pathway-related genes accounts for differences in the growth and differentiation potential of Wharton's jelly and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* déc 2017;8.

57. Wang L, Tran I, Seshareddy K, Weiss ML, Detamore MS. A Comparison of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng Part A.* août 2009;15(8):2259-66.

58. Battiwalla M, Hematti P. Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy.* janv 2009;11(5):503-15.

59. Shi M, Li Y, Xu R, Meng F, Wang F-S. Human umbilical cord mesenchymal stem cell treatment improves survival rate in patients with decompensated liver cirrhosis. *J Hepatol.* 1 janv 2017;66(1, Supplement):S558-9.

60. Martinaud C, Thepenier C, Trouillas M, Peltzer J, Uzan G, Le Bousse Kerdilès M-C, et al. Les cellules souches mésenchymateuses : des cellules pour la médecine régénérative du futur ? *Rev Francoph Lab.* déc 2010;(427):47-59.

61. Bartolucci J, Verdugo FJ, González PL, Larrea RE, Abarzua E, Goset C, et al. Safety and Efficacy of the Intravenous Infusion of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Patients With Heart Failure Novelty and Significance: A Phase 1/2 Randomized Controlled Trial (RIMECARD Trial [Randomized Clinical Trial of Intravenous Infusion Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells on Cardiopathy]). *Circ Res.* 27 oct 2017;121(10):1192-204.

62. Riordan NH, Morales I, Fernández G, Allen N, Fearnot NE, Leckrone ME, et al. Clinical feasibility of umbilical cord tissue-derived mesenchymal stem cells in the treatment of multiple sclerosis. *J Transl Med.* déc 2018;16.

63. Letourneur D, Bordenave L. Ingénierie tissulaire: Une approche multidisciplinaire. *Médecine/Sciences*. janv 2017;33(1):46-51.
64. Akter F, Berhan-Tewolde L, Bulstrode N, De Mel A, Hamid H, Ibanez J, et al. *Tissue engineering made easy*. University of Cambridge, Cambridge, UK: Elsevier, AP; 2016. 101 p.
65. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol*. oct 2012;30(10):546-54.
66. Chua AWC, Khoo YC, Tan BK, Tan KC, Foo CL, Chong SJ. Skin tissue engineering advances in severe burns: review and therapeutic applications. *Burns Trauma*. déc 2016;4.
67. Caddeo S, Boffito M, Sartori S. Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models. *Front Bioeng Biotechnol*. juill 2017;5.
68. Lawrence BD, Marchant JK, Pindrus MA, Omenetto FG, Kaplan DL. Silk film biomaterials for cornea tissue engineering. *Biomaterials*. mars 2009;30(7):1299-308.
69. Griffith LG, Naughton G. Tissue Engineering-Current Challenges and Expanding Opportunities. *Science*. 8 févr 2002;295(5557):1009-14.
70. Hardingham T, Tew S, Murdoch A. Tissue engineering: chondrocytes and cartilage. *Arthritis Res Ther*. 4:S63-8.
71. Hashemi S, Mohammadi AA, Kabiri H, Hashempoor MR, Mahmoodi M, Amini M, et al. The healing effect of Wharton's jelly stem cells seeded on biological scaffold in chronic skin ulcers: A randomized clinical trial. *J Cosmet Dermatol*. 24 mai 2019;18(6):1961-7.
72. Zhang Y, Liu S, Guo W, Wang M, Hao C, Gao S, et al. Human umbilical cord Wharton's jelly mesenchymal stem cells combined with an acellular cartilage

extracellular matrix scaffold improve cartilage repair compared with microfracture in a caprine model. *Osteoarthritis Cartilage*. juill 2018;26(7):954-65.

73. Cao Y, Sun H, Zhu H, Zhu X, Tang X, Yan G, et al. Allogeneic cell therapy using umbilical cord MSCs on collagen scaffolds for patients with recurrent uterine adhesion: a phase I clinical trial. *Stem Cell Res Ther*. déc 2018;9.

74. Jossen V, van den Bos C, Eibl R, Eibl D. Manufacturing human mesenchymal stem cells at clinical scale: process and regulatory challenges. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1 mai 2018;102(9):3981-94.

75. France. Article L5121-1, Modifié par Loi n°2018-1203 du 22 décembre 2018 - art. 66 (V). Code de la santé publique.

76. Fong C-Y, Subramanian A, Biswas A, Bongso A. Freezing of Fresh Wharton's Jelly From Human Umbilical Cords Yields High Post-Thaw Mesenchymal Stem Cell Numbers for Cell-Based Therapies. *J Cell Biochem*. avr 2016;117(4):815-27.

77. Yoon JH, Roh EY, Shin S, Jung NH, Song EY, Chang JY, et al. Comparison of Explant-Derived and Enzymatic Digestion-Derived MSCs and the Growth Factors from Wharton's Jelly. *BioMed Res Int*. 2013;2013:1-8.

78. Can A, Karahuseyinoglu S. Concise Review: Human Umbilical Cord Stroma with Regard to the Source of Fetus-Derived Stem Cells. *Stem Cells*. nov 2007;25(11):2886-95.

79. Tong CK, Vellasamy S, Chong Tan B, Abdullah M, Vidyadaran S, Fong Seow H, et al. Generation of mesenchymal stem cell from human umbilical cord tissue using a combination enzymatic and mechanical disassociation method. *Cell Biol Int*. 1 mars 2011;35(3):221-6.

80. Corotchi M, Popa M, Remes A, Sima L, Gussi I, Lupu Plesu M. Isolation method and xeno-free culture conditions influence multipotent differentiation capacity of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(4).

81. Kalaszczynska I, Ferdyn K. Wharton's Jelly Derived Mesenchymal Stem Cells: Future of Regenerative Medicine? Recent Findings and Clinical Significance. *BioMed Res Int.* 2015;2015:1-11.
82. Widowati W, Gunanegara RF, Rizal R, Widodo WS, Amalia A, Wibowo SHB, et al. Comparative Analysis of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cell (WJ-MSCs) Isolated Using Explant and Enzymatic Methods. *J Phys Conf Ser.* nov 2019;1374.
83. Arutyunyan I, Fatkhudinov T, Sukhikh G. Umbilical cord tissue cryopreservation: a short review. *Stem Cell Res Ther.* déc 2018;9.
84. Lipsitz YY, Milligan WD, Fitzpatrick I, Stalmeijer E, Farid SS, Tan KY, et al. A roadmap for cost-of-goods planning to guide economic production of cell therapy products. *Cytherapy.* 2017;19(12):1383-91.
85. Simaria AS, Hassan S, Varadaraju H, Rowley J, Warren K, Vanek P, et al. Allogeneic cell therapy bioprocess economics and optimization: Single-use cell expansion technologies. *Biotechnol Bioeng.* 2014;111(1):69-83.
86. Harrison RP, Medcalf N, Rafiq QA. Cell therapy-processing economics: small-scale microfactories as a stepping stone toward large-scale macrofactories. *Regen Med.* mars 2018;13(2):159-73.
87. Schnitzler AC, Verma A, Kehoe DE, Jing D, Murrell JR, Der KA, et al. Bioprocessing of human mesenchymal stem/stromal cells for therapeutic use: Current technologies and challenges. *Biochem Eng J.* avr 2016;108:3-13.
88. Rowley J, Abraham E, Campbell A, Brandwein H, Oh S. Meeting Lot-Size Challenges of Manufacturing Adherent Cells for Therapy. *Bioprocess Int.* mars 2012;16-22.
89. Jossen V, Pörtner R, Kaiser SC, Kraume M, Eibl D, Eibl R. Mass Production of Mesenchymal Stem Cells — Impact of Bioreactor Design and Flow Conditions on Proliferation and Differentiation. In: Eberli D, éditeur. *Cells and Biomaterials in Regenerative Medicine.* InTech; 2014.

90. Panchalingam KM, Jung S, Rosenberg L, Behie LA. Bioprocessing strategies for the large-scale production of human mesenchymal stem cells: a review. *Stem Cell Res Ther.* déc 2015;6.
91. Mizukami A, Pereira Chilima TD, Orellana MD, Neto MA, Covas DT, Farid SS, et al. Technologies for large-scale umbilical cord-derived MSC expansion: Experimental performance and cost of goods analysis. *Biochem Eng J.* juill 2018;135:36-48.
92. Chang T-C, Hsu M-F, Wu KK. High Glucose Induces Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Senescence by Upregulating Autophagy. *Plos One.* 11 mai 2015;10(5).
93. Deorosan B, Nauman EA. The Role of Glucose, Serum, and Three-Dimensional Cell Culture on the Metabolism of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 5 avr 2011;2011.
94. Schop D, Janssen FW, van Rijn LDS, Fernandes H, Bloem RM, de Bruijn JD, et al. Growth, Metabolism, and Growth Inhibitors of Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Part A.* 12 janv 2009;15(8):1877-86.
95. Bianchi G, Banfi A, Mastrogiacomo M, Notaro R, Luzzatto L, Cancedda R, et al. Ex vivo enrichment of mesenchymal cell progenitors by fibroblast growth factor 2. *Exp Cell Res.* juill 2003;287(1):98-105.
96. Ebert R, Ulmer M, Zeck S, Meissner-Weigl J, Schneider D, Stopper H, et al. Selenium Supplementation Restores the Antioxidative Capacity and Prevents Cell Damage in Bone Marrow Stromal Cells In Vitro. *Stem Cells.* 2006;24(5):1226-35.
97. Estrada JC, Albo C, Benguría A, Dopazo A, López-Romero P, Carrera-Quintanar L, et al. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death Differ.* mai 2012;19(5):743-55.

98. Lavrentieva A, Majore I, Kasper C, Hass R. Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. *Cell Commun Signal*. 16 juill 2010;8.
99. Nekanti U, Dastidar S, Venugopal P, Totey S, Ta M. Increased Proliferation and Analysis of Differential Gene Expression in Human Wharton's Jelly-derived Mesenchymal Stromal Cells under Hypoxia. *Int J Biol Sci*. 9 sept 2010;6(5):499-512.
100. Babae A, Nematollahi-Mahani SN, Shojaei M, Dehghani-Soltani S, Ezzatabadipour M. Effects of polarized and non-polarized red-light irradiation on proliferation of human Wharton's jelly-derived mesenchymal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 12 2018;504(4):871-7.
101. Derakhti S, Safiabadi-Tali SH, Amoabediny G, Sheikhpour M. Attachment and detachment strategies in microcarrier-based cell culture technology: A comprehensive review. *Mater Sci Eng C*. oct 2019;103.
102. Nienow AW, Rafiq QA, Coopman K, Hewitt CJ. A potentially scalable method for the harvesting of hMSCs from microcarriers. *Biochem Eng J*. avr 2014;85:79-88.
103. Fong D, Duceppe N, Hoemann CD. Mesenchymal stem cell detachment with trace trypsin is superior to EDTA for in vitro chemotaxis and adhesion assays. *Biochem Biophys Res Commun*. mars 2017;484(3):656-61.
104. Goh TK-P, Zhang Z-Y, Chen AK-L, Reuveny S, Choolani M, Chan JKY, et al. Microcarrier Culture for Efficient Expansion and Osteogenic Differentiation of Human Fetal Mesenchymal Stem Cells. *BioResearch Open Access*. avr 2013;2(2):84-97.
105. Yang HS, Jeon O, Bhang SH, Lee S-H, Kim B-S. Suspension Culture of Mammalian Cells Using Thermosensitive Microcarrier that Allows Cell Detachment without Proteolytic Enzyme Treatment. *Cell Transplant*. sept 2010;19(9):1123-32.

106. Tavassoli H, Alhosseini SN, Tay A, Chan PPY, Weng Oh SK, Warkiani ME. Large-scale production of stem cells utilizing microcarriers: A biomaterials engineering perspective from academic research to commercialized products. *Biomaterials*. oct 2018;181:333-46.
107. Cunha B, Aguiar T, Silva MM, Silva RJS, Sousa MFQ, Pineda E, et al. Exploring continuous and integrated strategies for the up- and downstream processing of human mesenchymal stem cells. *J Biotechnol*. nov 2015;213:97-108.
108. Moloudi R, Oh S, Yang C, Teo KL, Lam AT-L, Warkiani ME, et al. Inertial-Based Filtration Method for Removal of Microcarriers from Mesenchymal Stem Cell Suspensions. *Sci Rep*. déc 2018;8.
109. Rodrigues AL, Rodrigues CAV, Gomes AR, Vieira SF, Badenes SM, Diogo MM, et al. Dissolvable Microcarriers Allow Scalable Expansion And Harvesting Of Human Induced Pluripotent Stem Cells Under Xeno-Free Conditions. *Biotechnol J*. avr 2019;14(4).
110. DiMarino AM, Caplan AI, Bonfield TL. Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair. *Front Immunol*. 2013;4.
111. Bravery CA, Carmen J, Fong T, Oprea W, Hoogendoorn KH, Woda J, et al. Potency assay development for cellular therapy products: an ISCT review of the requirements and experiences in the industry. *Cytotherapy*. janv 2013;15:9-19.
112. Martin C, Olmos É, Collignon M-L, De Isla N, Blanchard F, Chevalot I, et al. Revisiting MSC expansion from critical quality attributes to critical culture process parameters. *Process Biochem*. août 2017;59:231-43.
113. Union Européenne. Advanced therapy classification. European Medicines Agency. 2018.
114. Avercenc-Leger L. Devenir des propriétés immunomodulatrices des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton au cours de la différenciation chondrocytaire [Thèse]. Université de Lorraine; 2017.

115. Shirley Ding SL, Kumar S, Ali Khan MS, Ling Mok P. Human Mesenchymal Stem Cells Expressing Erythropoietin Enhance Survivability of Retinal Neurons Against Oxidative Stress: An In Vitro Study. *Front Cell Neurosci.* 31 juill 2018;12.
116. Zhao G, Liu F, Lan S, Li P, Wang L, Kou J, et al. Large-scale expansion of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells on gelatin microbeads, with retention of self-renewal and multipotency characteristics and the capacity for enhancing skin wound healing. *Stem Cell Res Ther.* déc 2015;6.
117. Rafiq QA, Coopman K, Nienow AW, Hewitt CJ. Systematic microcarrier screening and agitated culture conditions improves human mesenchymal stem cell yield in bioreactors. *Biotechnol J.* avr 2016;11(4):473-86.
118. Martin C. Étude des procédés d'amplification de cellules souches mésenchymateuses humaines [Thèse]. Université de Lorraine; 2016.
119. Lazarević JJ, Kukulj T, Bugarski D, Lazarević N, Bugarski B, Popović ZV. Probing primary mesenchymal stem cells differentiation status by micro-Raman spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* avr 2019;213:384-90.
120. Loubière C, Sion C, De Isla N, Reppel L, Guedon E, Chevalot I, et al. Impact of the type of microcarrier and agitation modes on the expansion performances of mesenchymal stem cells derived from umbilical cord. *Biotechnol Prog.* 3 sept 2019;35(6).
121. Declercq HA, Gorski TL, Tielens SP, Schacht EH, Cornelissen MJ. Encapsulation of Osteoblast Seeded Microcarriers into Injectable, Photopolymerizable Three-Dimensional Scaffolds Based on D , L -Lactide and ϵ -Caprolactone. *Biomacromolecules.* mai 2005;6(3):1608-14.
122. Pu L, Meng M, Wu J, Zhang J, Hou Z, Gao H, et al. Compared to the amniotic membrane, Wharton's jelly may be a more suitable source of mesenchymal stem cells for cardiovascular tissue engineering and clinical regeneration. *Stem Cell Res Ther.* déc 2017;8.

123. Kamal MM, Kassem DH. Therapeutic Potential of Wharton's Jelly Mesenchymal Stem Cells for Diabetes: Achievements and Challenges. *Front Cell Dev Biol.* 29 janv 2020;8.
124. Galipeau J, Krampera M, Barrett J, Dazzi F, Deans RJ, DeBruijn J, et al. International Society for Cellular Therapy perspective on immune functional assays for mesenchymal stromal cells as potency release criterion for advanced phase clinical trials. *Cytotherapy.* févr 2016;18(2):151-9.
125. Chinnadurai R, Rajan D, Qayed M, Arafat D, Garcia M, Liu Y, et al. Potency Analysis of Mesenchymal Stromal Cells Using a Combinatorial Assay Matrix Approach. *Cell Rep.* févr 2018;22(9):2504-17.
126. Chinnadurai R, Rajakumar A, Schneider AJ, Bushman WA, Hematti P, Galipeau J. Potency Analysis of Mesenchymal Stromal Cells Using a Phospho-STAT Matrix Loop Analytical Approach: Phospho-STAT Assay Matrix Determines MSC Potency. *Stem Cells.* août 2019;37(8):1119-25.
127. Kupcova Skalnikova H. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie.* déc 2013;95(12):2196-211.
128. Center for Biologics Evaluation and Research. Chemistry, Manufacturing, and Control (CMC) Information for Human Gene Therapy Investigational New Drug Applications (INDs). Food and Drug Administration, US Department of Health and Human Services; 2008.
129. Biotac. Acridine Orange / Propidium Iodide Stain - User Manual [Internet]. Disponible sur: <https://www1.biotac.com/products/F23001-LG>
130. Strober W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol.* 2 nov 2015;111:A.3B.1-A.3B.3.
131. Nexcelom Bioscience. Enumeration and Viability of Nucleated Cells from Bone Marrow, Cord Blood, and Mobilized Peripheral Blood [Internet]. 2012. Disponible sur: <https://www.nexcelom.com/Literature/enumeration-and-viability-of-nucleated-cells-from-bone-marrow-cord-blood-and-mobilized-peripheral-blood.pdf>

132. Pabbruwe MB, Stewart K, Chaudhuri JB. A Comparison of Colorimetric and DNA Quantification Assays for the Assessment of Meniscal Fibrochondrocyte Proliferation in Microcarrier Culture. *Biotechnol Lett.* oct 2005;27(19):1451-5.
133. Dufey V, Tacheny A, Art M, Becken U, Longueville FD. Expansion of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in BioBLU® 0.3c Single-Use Bioreactors. *Eppendorf.* juill 2016;(305).
134. Radrizzani M, Lo Cicero V, Soncin S, Bolis S, Sürder D, Torre T, et al. Bone marrow-derived cells for cardiovascular cell therapy: an optimized GMP method based on low-density gradient improves cell purity and function. *J Transl Med.* déc 2014;12.
135. de Soure AM, Fernandes-Platzgummer A, da Silva CL, Cabral JMS. Scalable microcarrier-based manufacturing of mesenchymal stem/stromal cells. *J Biotechnol.* oct 2016;236:88-109.
136. Hayakawa T, Aoi T, Umezawa A, Ozawa K, Sato Y, Sawa Y, et al. A study on ensuring the quality and safety of pharmaceuticals and medical devices derived from the processing of autologous human somatic stem cells. *Regen Ther.* déc 2015;2:57-69.
137. Chen Y-S. Mesenchymal Stem Cell: Considerations for Manufacturing and Clinical Trials on Cell Therapy Product. *Int J Stem Cell Res Ther.* 30 juin 2016;3(1).

Résumé :

Le potentiel thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses (CSM) suscite un intérêt grandissant en médecine régénérative. Pour cela, les CSM issues de la gelée de Wharton représentent une source alternative aux CSM isolées depuis la moelle osseuse, par leur recueil, leur abondance et leur caractéristiques intrinsèques. Grâce à leurs propriétés d'auto-renouvellement et de différenciation, leur mise en culture, et ainsi, l'obtention de cellules en quantité suffisante, laisse envisager de multiples applications thérapeutiques. Cependant, la culture de cellules stromales mésenchymateuses doit relever aujourd'hui un certain nombre de défis scientifiques et technologiques en vue de leurs utilisation massive en thérapie cellulaire ou en ingénierie tissulaire. Pour cela, la mise en place de procédés de culture robustes garantissant conjointement des performances accrues d'expansion et une qualité constante des cellules est nécessaire. L'utilisation de supports d'adhérence (microporteurs) mis en suspension en bioréacteur est ainsi désormais privilégiée dans cette optique. Quel que soit le mode de culture envisagé, les étapes de production peuvent potentiellement altérer la qualité cellulaire. L'identification des attributs qualité critiques, et la mise en place d'essais visant à les contrôler est essentielle en vue de la libération des lots de production, afin de garantir sécurité et efficacité du produit final.

Mots-clés : Cellules souches mésenchymateuses, Gelée de Wharton, Microporteurs, Contrôle qualité

Title :

Wharton's jelly stem cells, dynamic culture and quality control

Abstract :

The therapeutic potential of mesenchymal stem cells (MSC) raises an increasing interest in regenerative medicine. For such needs, Wharton's jelly stem cells are an alternative source to bone marrow stem cells, by their collection, their abundance and their internal features. Thanks to their self-renewal and differentiation properties, expansion, and thus obtaining a sufficient number of cells, allows numerous therapeutic applications. However, mesenchymal stromal cells expansion faces today a number of scientific and technological challenges to ensure their use on a massive scale in cell therapy or tissue engineering. To this end, the implementation of robust culture processes that jointly guarantee increased expansion performance and consistent cell quality is necessary. For such a purpose, the use of adhesion supports (microcarriers) suspended in a bioreactor is therefore now favored. Regardless of the expansion method, each production step can potentially alter cell quality. The identification of critical quality attributes, and the implementation of tests to control them is essential for the release of production batches, in order to ensure the safety and effectiveness of the final product.

Key words : Mesenchymal stem cells, Wharton's jelly, Microcarriers, Quality control