Université Paris Cité

École doctorale Hématologie – Oncogenèse – Biothérapies (n°561)

Laboratoire de Biologie, Bioingénierie, et Bioimagerie Ostéo-articulaires

UMR CNRS 7052, INSERM U1271 (B3OA)

Contribution au développement d'un hydrogel nutritif visant à maintenir la viabilité des Cellules Stromales Mésenchymateuses transplantées.

Stratégie de libération contrôlée de glucose par la micro-encapsulation de l'amyloglucosidase

Par **Samantha MAGNIN**

Thèse de doctorat en **Biothérapies et Biotechnologies**

Dirigée par **Hervé PETITE**
Et par **Marie-Claire VENIER**

Présentée et soutenue publiquement le 16/12/2025

Devant un jury composé de :

Emmanuel PAUTHE Pr, CY Cergy Paris Université	Examinateur
Natalia DE ISLA Pr, Université de Lorraine	Rapporteuse
Anne AUBERT-POUËSSEL Pr, Université de Montpellier	Rapporteuse
Denis LOURDIN Dr, Université de Nantes	Membre invité
Marie-Line GARRON MCF, Université d'Aix-Marseille	Membre invitée
Hervé PETITE Dr, Université Paris Cité	Directeur de thèse
Marie-Claire VENIER Pr, Université d'Angers	Co-Directrice de thèse

Titre : Contribution au développement d'un hydrogel nutritif visant à maintenir la viabilité des Cellules Stromales Mésenchymateuses transplantées

Stratégie de libération contrôlée de glucose par la micro-encapsulation de l'amyloglucosidase

Résumé : Les Cellules Stromales Mésenchymateuses (CSMs) présentent un fort potentiel thérapeutique en ingénierie tissulaire grâce à (i) leurs effets paracrines, (ii) leur capacité de différenciation et (iii) leur soutien métabolique aux cellules environnantes par transfert de mitochondries. Leur effet thérapeutique reste cependant limité en raison de leur mort massive et rapide, post-implantation, qui limite leur contribution directe (par différenciation cellulaire) ou indirecte (effet paracrine ou transfert de mitochondries) à la réparation de la lésion. Cette mort cellulaire résulte de l'exposition des CSMs à un microenvironnement peu ou pas vascularisé, où le déficit en O_2 et en glucose compromet la production d'ATP nécessaire à leur survie. Or, les études conduites au laboratoire B3OA ont démontré qu'un apport exogène en glucose dans ces conditions permettait de maintenir la viabilité des CSMs *in vivo*.

Partant de ce constat, nous avons choisi de concevoir un dispositif d'apport local, contrôlé et prolongé en glucose, destiné à maintenir les CSMs viables et fonctionnelles jusqu'à ce que la néovascularisation rétablisse, à son tour, l'approvisionnement en nutriments et en O_2. A cet effet, un hydrogel nutritif de 1ère génération a été précédemment développé dans lequel de l'amidon (polymère de glucose) solubilisé et une enzyme, l'AMG (amyloglucosidase), capable d'hydrolyser l'amidon en glucose, ont été incorporés au sein d'un hydrogel de fibrine. *In vivo*, cet hydrogel a pu maintenir la viabilité de CSMs humaines issues de la moelle osseuse jusqu'à 7 jours après leur implantation sous-cutanée chez la souris et d'augmenter significativement l'angiogenèse. Cependant, la viabilité cellulaire diminue ensuite sévèrement au-delà de 7 jours. De façon surprenante, l'analyse de la persistance de l'AMG *in vivo* à l'aide d'AMG fluorescente a révélé sa disparition progressive et complète du site d'implantation au cours de la première semaine. Ainsi, l'hypothèse du présent travail est que la baisse de la viabilité cellulaire observée découle principalement de l'arrêt de la production *in situ* de glucose, conséquence directe de la disparition précoce de l'AMG du site d'implantation.

Face à ce défi notre objectif a été d'étendre la viabilité des CSMs à 21 jours, afin de permettre l'amorce d'une différenciation cellulaire et un renforcement de l'angiogenèse. Pour cela, un nouvel hydrogel nutritif a été développé. Premièrement, l'amidon solubilisé initialement utilisé a été remplacé par des particules d'amidon extrudé dont la faible solubilité permet de constituer un réservoir de glucose adapté aux besoins cellulaires sur 3 semaines. Deuxièmement, pour ralentir la fuite de l'AMG, nous avons encapsulé l'enzyme dans des microsphères de PLGA-Poloxamère 188-PLGA permettant un relargage contrôlé de l'enzyme. Grâce à cette stratégie, jusqu'à 50 % de l'AMG encapsulée demeurait au site d'implantation après 21 jours, avec une activité enzymatique encore détectable, confirmant l'efficacité des microsphères pour préserver l'enzyme. Enfin, si l'AMG encapsulée a pu augmenter significativement la viabilité cellulaire par rapport à l'AMG libre au bout de 7 jours *in vivo*, démontrant ainsi l'intérêt réel de cette stratégie, la viabilité cellulaire s'est avérée comparable les semaines suivantes traduisant la nécessité d'optimiser d'avantage les autres composants de l'hydrogel nutritif (amidon et matrice de l'hydrogel). En réduisant la perte rapide d'activité enzymatique *in vivo* grâce à l'encapsulation de l'AMG, nous avons franchi une première étape d'optimisation des hydrogels nutritifs. Ce travail ouvre ainsi la voie au développement d'hydrogels de fibrine de nouvelle génération, à libération prolongée, dont l'efficacité maximale sera atteinte une fois l'ensemble des composants rationnellement améliorés.

Mots clés : Amidon, Amyloglucosidase (AMG), Cellules Stromales Mésenchymateuses (CSMs), Hydrogel nutritif, Ischémie, Libération contrôlée, Microencapsulation (PLGA-P188-PLGA), Viabilité cellulaire

Title : Contribution to the development of a nutritive hydrogel for sustaining the viability of transplanted Mesenchymal Stromal Cells
Controlled glucose release strategy via Amyloglucosidase micro-encapsulation

Abstract : Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) possess considerable therapeutic potential in tissue engineering, owing to (i) their paracrine effects, (ii) their capacity for differentiation, and (iii) their metabolic support of surrounding cells through mitochondrial transfer. Nonetheless, their therapeutic efficacy is severely constrained by rapid and extensive cell death following implantation, which limits both their direct contribution (cell differentiation) and their indirect contribution (paracrine effect or mitochondrial transfer) to tissue repair. This cell death primarily results from exposure of MSCs to a poorly vascularized microenvironment, where the depletion of oxygen and glucose impedes sufficient ATP production. Previous studies conducted at the B3OA laboratory have demonstrated that exogenous glucose supplementation under such conditions can sustain MSC viability *in vivo*.

Building on these observations, we aimed to develop a system for local, controlled, and sustained glucose delivery to maintain MSC viability and functionality until neovascularization restores nutrient and oxygen supply. To this end, a first-generation nutritive hydrogel was previously engineered by incorporating solubilized starch (a glucose polymer) and amyloglucosidase (AMG), an enzyme that hydrolyzes starch into glucose, within a fibrin hydrogel matrix. *In vivo*, this hydrogel successfully maintained the viability of human bone marrow-derived MSCs for up to 7 days following subcutaneous implantation in mice and significantly enhanced angiogenesis. However, cell viability declined sharply beyond 7 days. Notably, analysis of AMG persistence using fluorescently labeled enzyme revealed its progressive and complete disappearance from the implantation site within the first week. Therefore, our hypothesis is that the observed decline in cell viability results primarily from the cessation of in situ glucose production due to early AMG loss at the implantation site.

To overcome this limitation, we aimed to extend MSC survival to 21 days, thereby enabling cellular differentiation and enhanced angiogenesis. A second-generation nutritive hydrogel was therefore developed. First, the initially employed solubilized starch was replaced with extruded starch particles, whose lower solubility provides a sustained glucose reservoir sufficient to meet cellular demands over three weeks. Second, to mitigate AMG loss, the enzyme was encapsulated in PLGA-Poloxamer 188-PLGA microspheres, allowing controlled release. This strategy effectively reduced AMG leakage from the subcutaneous implantation site, with approximately 50% of the enzyme retained after 21 days. Importantly, enzymatic activity remained detectable at three weeks, demonstrating the microspheres' capacity to preserve AMG functionality. *In vivo*, encapsulated AMG significantly enhanced cell viability compared to free AMG after 7 days, confirming the efficacy of this approach. However, beyond this period, cell viability was comparable, highlighting the need for further optimization of other hydrogel components, including starch and the hydrogel matrix. By limiting the rapid loss of enzymatic activity in vivo through AMG encapsulation, we addressed one of the primary limitations of nutritive hydrogels. These findings lay the groundwork for the development of next-generation fibrin hydrogels with sustained release, whose full potential will be realized once the remaining components are systematically optimized.

Keywords : Amyloglucosidase (AMG), Cell viability, Controlled release, Fibrin, Glucose, Ischemia, Mesenchymal Stromal Cells (MSCs) Microencapsulation (PLGA-P188-PLGA) Nutritive hydrogel Starch

À mon Grand-Père ❤

Remerciements

Je voudrais remercier les membres de mon jury pour avoir pris le temps d'examiner mon travail. Merci également aux membres invités, *Denis* et *Marie-Line,* pour avoir suivi mon travail lors des CSI et des réunions Starchbone avec autant de bienveillance.

Un immense merci à mes deux directeurs de thèse, *Hervé* et *Marie-Claire* pour m'avoir guidée pendant ces 4 ans. *Hervé,* merci de m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse et de m'avoir fait ainsi autant progresser grâce à vos conseils et votre exigence. Merci plus généralement pour vos idées visant à aider les étudiants à se réaliser par la gestion des réunions, les questions à poser au journal club ou le partage d'expérience avec les anciens doctorants. *Marie-Claire,* merci d'avoir rejoint ce projet malgré ton emploi du temps chargé, tu m'as beaucoup appris en termes de pédagogie dans mes présentations et de rigueur. Je garderai un très bon souvenir de mes voyages à Angers grâce à toi, ce qui n'était pas gagné vu le lever à 4h50, la mononucléose et les expériences conduites en chambre froide !

La thèse étant un travail d'équipe, merci à *Nathanaël,* notre superhéros du B3OA sans costume (ou alors je n'étais pas invitée à ces soirées ??), pour avoir répondu à mes nombreuses questions, dont la plus fréquente et que l'on se pose tous « *Pourquoi ça marche pas ?* », à *Hanane* pour avoir réalisé les coupes histologiques mais surtout pour ta gentillesse et ta bienveillance même si tu aimes répéter que tu en as marre de nous (cela fait longtemps que l'on ne te croit plus !), et pour finir à mes stagiaires Fantin et Jason pour m'avoir aidée sur ce projet.

Je tenais bien évidemment à remercier la belle équipe de doctorants auprès de qui j'ai appris les qualités essentielles d'un bon chercheur :

- ♥ Grâce à toi *Pauline,* j'ai amélioré mon sens de l'analyse avec tes « Tu préfères » de la mort (blague à part, merci d'avoir autant été là pour moi, au point de quitter le labo en même temps que ta stagiaire, et cela pour son plus grand bonheur car je refuse d'envisager le B3OA sans toi !).
- ♥ Auprès de toi, *Gabi,* j'ai amélioré ma communication orale, lors de nos discussions qui duraient, maintenant je peux le dire, plusieurs heures, dans notre bureau.
- ♥ Avec toi *Morgane,* j'ai appris à réseauter (MDR) lors de notre DU ou du congrès BIOMAT, mais j'ai surtout appris le sens du soutien en affrontant l'épreuve de l'écriture du manuscrit de thèse ensemble.
- ♥ *Léa,* tu m'as fait pratiquer l'exercice de réponse aux questions, lors de nos sessions *Gossips* au bar, et *Rebecca,* à rester de marbre lorsque tu y enlevais tes lunettes !
- ♥ *William,* tu m'as entraînée à rester concentrée pendant des heures lors de nos marathons de chirurgie, tu as d'ailleurs à jamais mon admiration pour avoir opéré mes souris sous intoxication alimentaire (vraiment un immense merci pour avoir pris de ton temps pour mes 47 souris !).

♥ Enfin, j'ai pu développer ma curiosité grâce aux différents snacks (plus ou moins étranges pour mon palais) et les petits déjeuner chinois apportés par les doctorants. Thank you, *Ying* for your kindness and being so open-minded, *Hao Dong* for your happiness that is very communicative, *Ji* for being always ready to help (and to share food!), *Li* for your kindness and *Guoyan* for having been so thoughtful with me in Wuhan.

Merci également aux anciens doctorants (*Mathilde* et *Rokia*), stagiaires (*Caroline, Sacha, Aurélie* et les deux *Axelle*), et ingénieurs (*Benoît* et *Eva*) dont j'ai eu la chance de croiser la route, à *Sara* et *Marie,* mes copines de stage que j'ai toujours plaisir à revoir, et aux permanents, *Esther, Morad, Lionel, Vincent, Manon, Fani, Elodie* et *Delphine* qui ont à cœur de nous offrir les meilleures conditions de travail possible.

Vous avez tous contribué à cette super ambiance propre au B3OA qui m'a donné envie de poursuivre en thèse. Si j'ai la larme à l'œil à chaque soutenance c'est bien parce que vous allez tous beaucoup me manquer !

Ces 4 ans de thèse ayant alterné aussi avec des moments de décompression, je voudrais remercier mes amis qui ont régulièrement pris des nouvelles de l'avancée du projet autour d'un verre, ce qui n'a pas dû aider à la compréhension du sujet... Ainsi, je voudrais remercier mes amis de Plaisir, auprès de qui j'ai grandi, *Laurine* (20 ans que je t'aime malgré les nombreuses photos traumatisantes de limaces, merci pour ces longues discussions et ces rires que je ne peux avoir qu'avec toi), *Julie* (ma sœur, merci d'être l'amie que tout le monde rêve d'avoir), *Joshua, Louise* (encore désolée pour ton étagère !), *Arthur, Théo* et *Léonard* merci d'être des personnes aussi géniales et d'avoir été présents dans autant de précieux souvenirs. Merci également à mes amis d'école d'ingé (*Andréa, Mélissa,* les colocs du 6NME, *Romain* et *Emilien*) qui ont réussi le miracle de rendre Saint-Etienne attractif, et en particulier, à *Claire* (mon binôme) et *Meryem,* qui pensent à moi depuis l'Australie et le Maroc.

Enfin je voudrais remercier ma famille qu'elle soit à New York ou en France, pour avoir été là pour moi pendant ma thèse (et accessoirement pendant les 23 années d'avant). Merci aux *Grovit,* que je considère comme mes 2e parents et *Max* mon petit frère un peu «spécial». Merci à ma grand-mère dont la force de caractère m'a toujours impressionnée et à mon grand-père qui m'aura vue commencer la thèse. Merci à mon *Nithou* -qui-m'aime (si, si), je ne pouvais pas rêver d'un meilleur coéquipier avec qui grandir ; et évidemment un immense merci à mes incroyables parents pour leur soutien, leur joie de vivre dont j'espère avoir hérité et pour avoir réussi à créer un espace heureux dans lequel grandir (et qu'on prend plaisir à retrouver).
Pour finir, ces remerciements qui commencent à vraiment prendre des airs de discours de remise de César, merci à *Cédric,* pour avoir tout géré pendant l'écriture du manuscrit (stp ne te venge pas trop pendant mon chômage), pour avoir relu le manuscrit, écouté toutes mes présentations (tu dois sûrement connaître ma thèse aussi bien que moi maintenant), et surtout pour me rendre aussi heureuse au quotidien, je t'aime ♥.

Table des matières

Table des Figures 5

Table des tableaux 7

Liste des abréviations 8

CHAPITRE 1. IMPORTANCE THERAPEUTIQUE DES CELLULES STROMALES MESENCHYMATEUSES (CSMS) 10

I. Intérêts thérapeutique des CSMs 10

I. 1. Vue d'ensemble des thérapies cellulaires 10

I. 2. Les Cellules Stromales Mésenchymateuses (CSMs) 11

I. 2. a. Une définition encore débattue 11

I. 2. b. Origine *in vivo*, collecte et isolement des CSMs humaines 13

I. 2. c. Propriétés biologiques clés des CSMs pour la régénération tissulaire 14

☆ Faible immunogénicité 14

☆ Homing/migration limitée vers un tissu lésé 18

☆ Transfert de mitochondries 18

☆ Différenciation 20

☆ Effet paracrine 21

I. 2. d. Utilisations et limites thérapeutiques des CSMs 24

II. La mort massive des CSMs post-greffe 26

II. 1. Le tissu lésé : un microenvironnement hostile 26

II. 2. L'impact de l'ischémie sur la viabilité cellulaire post-implantation 27

II. 2. a. Impact de l'environnement hypoxique sur les CSMs 27

II. 2. b. Impact du manque de nutriments sur les CSMs 29

II. 2. C. Impact de l'accumulation de déchets métaboliques sur les CSMs 33

II. 3. Quelle stratégie adopter ? 34

CHAPITRE 2. LES SYSTEMES A LIBERATION CONTROLEE DE GLUCOSE ET INTERMEDIAIRES GLYCOLYTIQUES 36

I. Les systèmes préchargés en glucose 37

I. 1. Systèmes encapsulant le glucose 37

I. 1. a. Glucose encapsulé dans un réservoir 37

I. 1.b. Glucose encapsulé dans un hydrogel (matrice hydrophile) 38

I. 1. c. Glucose encapsulé dans un ciment (matrice minérale) 39
I. 2. Système à perfusion de glucose 40
II. Les systèmes préchargés en fructose-1,6-bisphosphate (FBP) 42
III. Les systèmes avec production de glucose *in situ* 44
III. 1. Production de glucose par photosynthèse 44
III. 2. Production de glucose à partir d'un polymère de glucose 46
III. 2. a. Production intracellulaire à partir de glycogène 46
III. 2. b. Production extracellulaire à partir d'amidon 48
III. 2. c. Production extracellulaire à partir de laminarine 50
CHAPITRE 3. HYDROGEL NUTRITIF A BASE D'AMIDON ET D'ENZYME (AMG) 53
I. Conception et caractéristiques de l'hydrogel nutritif 53
I. 1. Justification et propriétés du couple amidon / AMG 53
I. 2. Propriétés et mécanisme de formation des hydrogels de fibrine 55
II. Preuve de concept : maintien et limite de la viabilité des CSM et préservation de leur effet pro-angiogène 56
II. 1. Rôle clé de l'hydrogel nutritif dans le maintien de la viabilité cellulaire en conditions mimant l'ischémie 56
II. 2. Maintien et limite de la viabilité des CSMs transplantées 57
II. 3. Préservation des capacités pro-angiogènes des CSMs transplantées 59
OBJECTIFS DE LA THESE 62
CHAPITRE 4. OPTIMISATION D'UNE NOUVELLE FORMULATION DE L'AMIDON 64
Introduction. 64
I. Matériels & Méthodes 66
II. Résultats & Discussion 69
II. 1. Évaluation des mousses d'amidon sous forme de bloc – une piste rapidement écartée 69
II. 1. a. Une adhésion cellulaire limitée… 69
II. 1. b …En parallèle d'une dégradabilité totale 70
II. 2. Évaluation des mousses d'amidon sous forme de particules inclues en hydrogel de fibrine – une piste validée 72
II. 2. a. Taux de rétention des particules d'amidon en hydrogel 72

II. 2. b. Cytocompatibilité et sélection de la taille des particules d'amidon en hydrogel de fibrine 74
Conclusion. 75
CHAPITRE 5. MISE AU POINT DU DOSAGE DE L'ACTIVITÉ AMG 77
Introduction. 77
I. Matériels & Méthodes 80
II. Résultats 82
II. 1. Évaluation du dosage de l'activité AMG dans le tampon citrate 82
II. 2. Évaluation du dosage de l'activité AMG en présence de microsphères/acétone 84
III. Discussion 86
Conclusion 87
CHAPITRE 6 – ARTICLE. ENCAPSULATION DE L'AMG DANS DES MICROSPHERES ET PERSISTANCE *IN VIVO* 88
CHAPITRE 7. ÉVALUATION DE L'IMPACT DES PARTICULES D'AMIDON ET DE L'AMG ENCAPSULÉE SUR LA SURVIE DES CSMS *IN VIVO* 116
Introduction 116
I. Matériels & Méthodes 116
II. Résultats & Discussion - Évaluation de la survie des CSMs *in vivo* 118
Conclusion 122
DISCUSSION GÉNÉRALE 123
I. Comparaison avec la littérature 123
II. Optimisation de l'hydrogel nutritif : quels autres paramètres améliorer ? 125
II. 1. L'activité AMG 125
II. 1. a. La stabilité de l'AMG 125
II. 1. b. La libération de l'activité AMG 126
II. 1. c. La méthode de dosage de l'activité AMG 127
II. 2. La vitesse de dégradation de l'amidon 127
II. 3. La vitesse de dégradation du réseau de fibrine 129
II. 4. Le choix des CSMs (densité et origine) 130
III. Défis et perspectives des hydrogels nutritifs 131
III. 1. Les défis inhérents aux hydrogels nutritifs 131

III. 1. a. Défi d’une compétition métabolique pour le glucose 131
III. 1. b. Défi de l'accumulation d'acide lactique par la glycolyse. 132
III. 2. Les perspectives d’utilisation des hydrogels nutritifs 133
Conclusion des travaux de thèse 135
Références 137
Publications associées à la thèse 157

Table des Figures

Figure 1. Mécanisme de rejet d'une greffe allogénique de cellules - Image et sous-texte adaptés de l'article 15

Figure 2. Immunogénicité des CSMs 17

Figure 3. Les mécanismes de transfert des mitochondries 19

Figure 4. Schéma simplifié de la hiérarchie de potence et des voies de différenciation des CSMs - Image adaptée de la référence 21

Figure 5. Récapitulatif des propriétés des CSMs pour la régénération tissulaire 23

Figure 6. Comparaison entre la respiration aérobique et anaérobique 32

Figure 7. Voies cellulaires permettant la production d'ATP 33

Figure 8. Rendement énergétique de la glycolyse à partir de glucose ou à partir de fructose-1,6-bisphosphate (FBP) 43

Figure 9. Structures chimiques des polymères de glucose 48

Figure 10. Synthèse des systèmes de libération de glucose, classés selon leur durée de libération (en jours, en abscisses) et la période pendant laquelle ils permettent de maintenir la survie cellulaire (en jours, en ordonnées) 51

Figure 11. Schéma de l'hydrolyse de l'amidon par différentes enzymes 55

Figure 12. Structure du fibrinogène et schéma de la formation d'un réseau de fibrine 56

Figure 13. Le glucose produit par l'hydrogel nutritif permet de soutenir la consommation cellulaire et de maintenir leur viabilité dans des conditions mimant l'ischémie 57

Figure 14. Survie cellulaire limitée à 7 jours in vivo 59

Figure 15. Maintien des capacités pro-angiogènes des CSMs *in vivo* 60

Figure 16. Exemples de mousses d'amidon observées au microscope optique 66

Figure 17. Schéma explicatif du changement de morphologie des CSMs en fonction de leur adhésion à un support 67

Figure 18. Critères de sélection des mousses d'amidon : l'adhésion cellulaire et la dégradabilité 71

Figure 19. Dégradabilité et stock effectif des particules d'amidon en hydrogel de fibrine 73

Figure 20. Effet de la taille des particules d'amidon sur la viabilité des CSMs en hydrogel de fibrine 75

Figure 21. Protocole du dosage de l'activité AMG par le kit Megazyme 78

Figure 22. Exemple d'une cinétique enzymatique de type michaelienne et de la relation de proportionnalité existante entre une quantité d'enzyme et la vitesse initiale 80

Figure 23. Courbes des dosages enzymatiques et modélisation linéaire des données 83

Figure 24. Représentation graphique de la vitesse moyenne de réaction en fonction de la quantité d'AMG (mg/mL) et sa modélisation linéaire 85

Figure 25. Survie *in vivo* des CSMs-Luc en hydrogel de fibrine/amidon en présence ou non d'AMG et coupes histologiques des explants avec marquage de l'amidon résiduel 120

Figure 26. Comparaison de l'hydrogel nutritif intégrant l'AMG encapsulée avec les autres systèmes à libération de glucose visant à maintenir la viabilité cellulaire 125

Figure 27. Amidon résiduel après explantation 129

Figure 28. Coupes histologiques représentatives des hydrogels fibrine/amidon/CSMs avec ou sans AMG explantés au 29^{e} jour d'implantation 132

Figure 29. Exemples d'applications thérapeutiques nécessitant un soutien métabolique des CSMs pouvant être comblé par l'hydrogel nutritif 134

Table des tableaux

Tableau 1. Variation des caractéristiques observées in vitro de CSMs extraites de différents tissus (moelle osseuse, tissu adipeux ou cordon ombilical). 14

Tableau 2. Exemples de molécules sécrétées par les CSMs et leur effet paracrine 23

Tableau 3. Exemples de thérapies cellulaires commercialisées à base de CSMs. 25

Tableau 4. Variation des pO_2 en fonction du tissu anatomique. 29

Tableau 5. Résumé des propriétés des systèmes préchargés en glucose par rapport à leur durée de libération de glucose et leur effet sur la viabilité cellulaire. 41

Tableau 6. Résumé des propriétés des systèmes pré-chargés de FBP par rapport à leur durée de libération de FBP et leur effet sur le métabolisme cellulaire. 44

Tableau 7. Paramètre expérimentaux et consommation des CSMs en glucose extraits de 3 études conduites en hypoxie 65

Tableau 8. Source botanique et composition en amylose / amylopectine des mousses d'amidon. 66

Tableau 9. Résumé des caractéristiques de l'AMG. Informations provenant du certificat d'analyse du lot utilisé, fournit par Megazyme. 79

Tableau 10. Mesures de la répétabilité (CV%) et de l'erreurs relatives (ER%) des mesures 84

Tableau 11. Mesures de la répétabilité (CV%) et de l'erreurs relatives (ER%) des mesures. 85

Tableau 12. Viabilité cellulaire au 14^{e} jour d'implantation des hydrogels nutritifs de première et deuxième génération121

Liste des abréviations

2D	Bidimensionnel
3D	Tridimensionnel
αGA	α Glucosidase
AMG	Amyloglucosidase
AMG_P20	AMG encapsulée dans les microsphères P20
AMP_P40	AMG encapsulée dans les microsphères P40
ANG-1	Angiopoietin-1
ATP	Adénosine TriPhosphate
AVC	Accident Vasculaire Cérébrale
Blank_µS	Mix de microsphères P20/P40 non-chargées en AMG
BLI	Bioluminescent
CAR-T	Chimeric Antigen Receptor T-cells
CFU-F	Colony-forming unit–fibroblasts
CO_2	Dioxyde de Carbone
CSHs	Cellules Souches Hématopoïétiques
CSMs	Cellules Souches Mésenchymateuses
CSMs-Luc	CSMs transfectées pour sécréter de la luciférase
$CSMs_{CordonOmbilical}$	CSMs provenant du cordon ombillical
$CSMs_{MoelleOsseuse}$	CSMs provenant de la moelle osseuse
$CSMs_{TissuAdipeux}$	CSMs provenant du tissu adipeux
CV%	Coefficient de variation
DAMPs	Danger-Associated Molecular Patterns
EMA	European Medicines Agency
ER%	Erreur relative
FBP	Fructose-1,6-biphosphate
FDA	Food Drug Administration
G6P	Glucose-6-phosphate
H^+	Cation issu de l'hydrogène
H_2O_2	Péroxyde d'hydrogène
HIF	Hypoxia-Inducible Factor

HLA	Human Leucocyte Antigen
hMSCs	Human MSCs
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IFNγ	Interféron γ
IL	Interleukine
IPSC	Induced pluripotent stem cells
ISCT	International Society for Cell Therapy
LAM	Laminarine
LQ	Limite de Quantification
LDH	Lactate Dehydrogenase
MSCs	Mesenchymal Stem Cells
NAD^+	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme réduite)
O_2	Dioxygène
OGD	Oxygen and Glucose Deprivation
P188	Ploxamère 188
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
Pdt_20_cb	Particules d'amidon de pomme de terre extrudé contenant 20% d'amylose
PLGA	Poly(lactide-co-glycolide)
pO_2	Pression partielle de dioxygène
ROS	Reactive Oxygen Species
TGF-β	Transforming Growth Factor β
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

CHAPITRE 1. IMPORTANCE THERAPEUTIQUE DES CELLULES STROMALES MESENCHYMATEUSES (CSMS)

I. Intérêt thérapeutique des CSMs

I. 1. Vue d'ensemble des thérapies cellulaires

Les thérapies cellulaires consistent en la greffe ou l'injection de cellules provenant soit du patient (autologue) soit d'un donneur (allogénique), dans le but de réparer un tissu ou un organe. Depuis très longtemps, certaines thérapies cellulaires sont couramment appliquées en clinique comme les greffes de cellules souches hématopoïétiques[a], utilisées pour le traitement de maladies du sang (leucémies, lymphomes, drépanocytose, etc..), et dont les premières tentatives datent de la fin des années 50 (transplantation de moelle osseuse) [1]. Dans les années 1970, la culture en laboratoire de kératinocytes, principales cellules de l'épiderme, s'est développée afin de pallier le manque de greffons de peau disponibles, notamment chez les grands brûlés. Cette avancée a abouti à une première greffe de kératinocytes cultivés *in vitro* en 1980 [2]. Au fil du temps, avec le développement de l'ingénierie tissulaire, les thérapies cellulaires se sont complexifiées pour gagner en efficacité, notamment en étant associées à des biomatériaux. C'est le cas des greffes autologues de chondrocytes, les cellules du cartilage, qui dans les années 90 ont d'abord été implantées sans matrice dans le cartilage du genou (thérapie ACI – *Autologous Chondrocyte Implantation*) [3], puis ont ensuite été intégrées à une matrice de collagène (thérapie MACI – *Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation*) [4] dont l'utilisation est approuvée par l'EMA (*European Medicines Agency*) depuis 2013 [5]. Un autre exemple plus récent est celui des thérapies basées sur les cellules génétiquement modifiées, comme les CAR-T (*Chimeric Antigen Receptor T-cells*) qui correspondent à des lymphocytes T autologues modifiés génétiquement pour neutraliser les cellules cancéreuses (lymphomes non hodgkiniens, leucémies aiguës lymphoblastiques, myélomes multiples) et dont l'utilisation a été autorisée par la FDA (*Food Drug Administration*) et l'EMA en 2017 et 2018, respectivement [6,7]. Le domaine des thérapies cellulaires est donc resté très dynamique depuis la fin des années 50. Ainsi, selon un rapport de 2024, le marché mondial des thérapies cellulaires était estimé à 25,06 milliards de dollars en 2023 et devrait croître jusqu'à atteindre 143,96 milliards de dollars d'ici 2032 [8].

Concernant les essais cliniques en thérapie cellulaire, différents types cellulaires sont actuellement étudiés. Les données présentées ci-dessous ont été obtenues le 17/04/2025 à partir de la base de

[a] Cellules à l'origine des cellules sanguines dont elles assurent la production (hématopoïèse) tout au long de la vie.

données *ClinicalTrials.gov*, en utilisant les mots-clés « [type cellulaire] therapy ». Le nombre d'essais cliniques indiqué correspond à ceux répertoriés dans la section « Looking for participants » du site.

- **Les CAR-T.** Principalement utilisées en oncologie avec quelques études portant sur les maladies auto-immunes, les CAR-T comptabilisent le plus grand nombre d'essais cliniques en cours de recrutement avec 810 études enregistrées auprès de *ClinicalTrials.gov* en 2025.
- **Les cellules souches hématopoïétiques (CSHs).** Bien que déjà largement utilisées pour les maladies du sang, les greffes de CSHs continuent de faire l'objet d'essais cliniques, dont 347 en cours de recrutement, notamment pour diminuer les risques de rejet des greffes allogéniques.
- **Les Cellules Stromales Mesenchymateuses (CSMs).** Utilisées pour des applications très diverses comprenant les maladies inflammatoires, auto-immunes, orthopédiques, cardiovasculaires, neurologiques, les CSMs font actuellement l'objet de 203 essais cliniques en cours de recrutement.
- **Les lymphocytes NK (Natural Killer).** Utilisées comme immunothérapies, les lymphocytes NK présentent l'avantage de causer moins d'effets secondaires considérés comme graves que les CAR-T (ex : Syndrome de Libération de Cytokines (CRS) ou des neurotoxicités)**.** Ils comptabilisent cependant moins d'essais cliniques avec 167 études en cours de recrutement.
- **Les cellules souches pluripotentes, embryonnaires ou induites**[a]. Utilisées pour leur pluripotence, capacité à se différencier en tous les types cellulaires excepté les cellules du placenta, elles sont particulièrement étudiées dans les cas de diabète ou de maladies dégénératives telles que Parkinson, et sont concernées par 43 essais cliniques en cours de recrutement.

Ainsi les thérapies cellulaires sont divisées en deux domaines majoritaires : l'oncologie (CAR-T, lymphocytes NK) et la régénération tissulaire (CSH pour le tissu sanguin, CSMs pour une grande diversité de tissus tel que le tissu osseux, cartilagineux, etc..). Par la suite, nous nous intéresserons plus particulièrement à la régénération tissulaire et l'utilisation des CSMs.

I. 2. Les Cellules Stromales Mésenchymateuses (CSMs)

I. 2. a. Une définition encore débattue

Bien que l'existence des CSMs avait été pensée dès 1867 par Cohnheim qui soupçonnait la présence de cellules non-hématopoïétiques dans la moelle osseuse capables de migrer jusqu'à un site lésé pour participer à la réparation du tissu [9], il a fallu attendre un siècle pour que des CSMs soient observées

[a] La cellule souche pluripotente induite est une cellule immature générée à partir d'une cellule adulte (mature) qui a retrouvé sa capacité de se différencier en n'importe quel type de cellule de l'organisme.

pour la première fois par Friedenstein à la fin des années 60 [10], et 25 années supplémentaires pour le premier essai clinique [11]. Les CSMs constituent une population hétérogène dont la définition et même leur appellation de « cellule stromale mésenchymateuse[a] » font encore aujourd'hui l'objet de débat au sein de la communauté scientifique. Longtemps appelées « cellule souche mésenchymateuse » sur l'initiative de Caplan au début des années 90 [12], l'*International Society for Cell Therapy* (ISCT) leur a préféré le terme de « cellule stromale mésenchymateuse multipotente» en 2005 [13]. En effet, l'appellation « souche » de ces cellules supposait des capacités d'auto-renouvellement sur un temps long et de différenciation en plusieurs types cellulaires qui n'ont pas été démontrées *in vivo* pour l'ensemble des CSMs. Ainsi, les cellules souches mésenchymateuses correspondraient plutôt à une sous-population dont l'absence de critères spécifiques connus rend difficile sa sélection au sein de la population hétérogène des CSMs. L'ISCT a donc choisi de remplacer le terme « souche » afin de ne pas induire en erreur le lecteur et de garder l'abréviation « CSM » communément utilisée dans la littérature scientifique. Le terme « multipotent » est ajouté afin de souligner l'existence de capacités de différenciation des CSMs tout en s'opposant au qualificatif « pluripotent », supposé initialement [12], qui leur prêtait un pouvoir de différenciation plus large. Quinze ans plus tard, en observant la diversité de comportements cellulaires des CSMs provenant de tissus différents, l'ISCT préconisa de préciser dans le nom des CSMs le tissu dont elles sont issues ($CSMs_{MoelleOsseuse}$ pour la moelle osseuse , $CSMs_{TissuAdipeux}$ pour le tissu adipeux, etc…) [14,15]. Ainsi, l'origine tissulaire des CSMs sera indiquée systématiquement et, à défaut, il conviendra de considérer qu'il s'agit des CSMs de manière générale.

De plus, l'ISCT a également établi des caractéristiques minimales que doivent avoir les CSMs pour être définies comme telles. En 2006, elle a considéré que les CSMs devaient répondre à 3 critères *in vitro* [16]:

- Être capable d'adhérer au plastique dans les conditions standards de culture cellulaire.
- Exprimer certains antigènes et pas d'autres. Ainsi la population cellulaire testée ($\geq$ 95 %) doit exprimer au cytomètre en flux les marqueurs CD105, CD73 and CD90 ; et *a contrario* ne pas exprimer ($\leq$ 2% de la population testée) certains marqueurs (CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79α, CD19 et HLA-DR), majoritairement des antigènes hématopoïétiques, afin de ne pas les confondre avec d'autres cellules.
- Être capable de se différencier en plusieurs types cellulaires (ostéoblastes, chondroblastes et adipocytes[b]).

Récemment, l'ISCT est revenu sur le déterminisme de certains marqueurs [14]. Ainsi, il a été observé que des CSMs humaines provenant du tissu adipeux ou de la moelle osseuse, pouvaient être CD34 positives [17,18]. En effet plusieurs études ont même observé l'acquisition de la négativité du marqueur CD34 durant la culture des CSMs *in vitro*, ce qui suggérerait leur positivité *in vivo* [19].

[a] Cellule qui appartient au stroma et d'origine mésenchymateuse. Stroma : Tissu qui sert au soutien et à la nutrition d'un organe. Mésenchyme : Tissu conjonctif embryonnaire dérivé du mésoblaste, qui est à l'origine des autres tissus conjonctifs et des éléments du sang.
[b] Cellules formant respectivement le tissu osseux, cartilagineux et adipeux.

Ainsi la définition des CSMs évolue encore aujourd'hui avec l'acquisition de nouvelles connaissances scientifiques. Le développement des techniques d'analyse « single cell » devrait permettre d'affiner les critères qui définissent les CSMs et de mieux caractériser l'hétérogénéité de cette population dans les prochaines années.

I. 2. b. Origine *in vivo*, collecte et isolement des CSMs humaines

Origine *in vivo*. Si des CSMs ont pu être collectées en faibles quantités (et caractérisées *in vitro*) dans pratiquement tous les tissus de l'organisme, l'origine *in vivo* des CSMs reste encore floue. En effet, les critères définissant les CSMs reposent sur de l'observation *in vitro*, et traduisent donc plutôt un état induit et fixé par les conditions de culture que la réalité plus dynamique des CSMs *in vivo.* Les péricytes, cellules entourant la couche externe des capillaires et micro-vaisseaux, se rapprochent d'un équivalent *in vivo* des CSMs : ils partagent des critères communs (localisation *in vivo* proche, morphologie, adhésion sur plastique, expression ou non de marqueurs antigéniques, différenciation ostéo/chondro/adipocytaire) et peuvent donner naissance à des CSMs après isolement et culture *in vitro*. Cependant, les péricytes ne sont pas tout à fait équivalents aux CSMs car ils correspondent également à une population très hétérogène et l'entièreté des péricytes ne partagent pas l'ensemble de ces critères communs [20,21].

Collecte et isolement. La collecte et l'isolement des CSMs reposent sur des méthodes spécifiques qui dépendent du tissu-source et de l'espèce [22]. Bien que présentes en petites quantités dans presque tous les tissus de l'organisme, les CSMs sont le plus souvent isolées à partir de la moelle osseuse, du tissu adipeux et du cordon ombilical (en particulier la gelée de Wharton). D'autres sources, comme le placenta, le liquide amniotique ou la pulpe dentaire, sont utilisées plus rarement [23,24]. Une fois le tissu-source prélevé, il est traité soit par des méthodes enzymatiques (généralement à l'aide de collagénase) soit par des procédés mécaniques (comme l'agitation ou le hachage) pour en libérer les cellules. La fraction cellulaire d'intérêt est alors séparée des débris tissulaires par centrifugation, puis mise en culture sur support plastique. Seules les cellules capables d'adhérer à ce support sont retenues et sélectionnées comme CSMs [22,23]. L'extraction des CSMs de la moelle osseuse, bien qu'historiquement la première source décrite, implique une procédure invasive sous anesthésie (ponction de la crête iliaque majoritairement) comportant les risques inhérents à une chirurgie, contrairement au prélèvement sur cordon ombilical qui lui est, tout à fait non-invasif. L'extraction de CSMs du tissu adipeux, bien que nécessitant également une procédure invasive (par lipoaspiration, souvent de la zone abdominale) permet un rendement en cellules bien plus élevé, jusqu'à 100 à 500 fois plus de CSMs par gramme que la moelle osseuse [25], ce qui en fait aujourd'hui l'une des sources les plus exploitées. Cependant, le choix du tissu-source influence également les propriétés fonctionnelles des CSMs (*Tableau 1*). Ainsi, les CSMs issues de la moelle osseuse présentent un potentiel ostéogénique et chondrogénique plus élevé que celles issues du tissu adipeux ou du cordon ombilical [26]. Les CSMs dérivées du tissu adipeux possèdent des capacités immunomodulatrices plus marquées en empêchant, par exemple, l'activation des lymphocytes B et T [27]. Les CSMs extraites du cordon ombilical, quant à

elles, se distinguent par leur vitesse de prolifération élevée, leur sénescence[a] retardée et leur effet immunomodulateur [24], caractéristiques que l'on retrouve plus généralement chez les CSMs extraites de tissus fœtaux (placenta, liquide amniotique) [28,29]. Ainsi, le choix du tissu-source doit être pris en compte en fonction de l'action thérapeutique visée.

Caractéristiques	Moelle osseuse	Tissu adipeux	Cordon ombilical	Références
Rendement cellulaire	Faible à modéré	Elevé	Modéré à élevé	*25,30,31*
Vitesse de prolifération	Lente	Modérée	Rapide	*24,26,31–36 22/02/2026 20:59:00*
Sénéscence	Modérée	Rapide	Plus lente	*24,26,32,36,3722/02/2026 20:59:00*
Différenciation ostéogénique	+++	++	+	*26,28,34–37 22/02/2026 20:59:00*
Différenciation chondrogénique	+++	++	++	*26,28,34,36*
Différenciation adipogénique	++	+++	++	*26,28,34–37*

Tableau 1. Variation des caractéristiques observées *in vitro* de CSMs extraites de différents tissus (moelle osseuse, tissu adipeux ou cordon ombilical).

Les CSMs répondant au cahier des charges de l'ISCT peuvent être également obtenues à partir de cellules pluripotentes (cellules souches embryonnaires ou cellules souches pluripotentes induites) en les cultivant dans des conditions spécifiques [38–40]. Cependant, les cellules pluripotentes peuvent proliférer de manière incontrôlée et l'utilisation de CSMs, dérivées de ces cellules, représente donc un risque cancérigène plus élevé du fait de la présence résiduelle potentielle de cellules pluripotentes parmi les CSMs [41].

Dans les exemples cités tout au long de la thèse, les CSMs seront d'origine humaine et dans les cas contraires, l'espèce d'origine sera précisée.

I. 2. c. Propriétés biologiques clés des CSMs pour la régénération tissulaire

☆ *Faible immunogénicité*

Mécanisme du rejet de la greffe cellulaire. Les greffes cellulaires allogéniques, issues d'un donneur distinct du receveur, permettent de surmonter plusieurs limites associées aux greffes autologues pour

[a] Vieillissement d'un organisme, d'un organe, etc., traduisant une modification progressive et irréversible de son fonctionnement physiologique.

lesquelles le donneur de cellules est le receveur. Elles offrent notamment : (i) un accès à une plus grande quantité de cellules disponibles, (ii) l'évitement d'un prélèvement chirurgical chez le receveur, (iii) une qualité cellulaire potentiellement supérieure grâce à l'origine saine du donneur, et (iv) un gain de temps en supprimant la nécessité d'une expansion *in vitro* des CSMs autologues. Toutefois, l'allogreffe expose à un risque accru d'incompatibilité immunologique, pouvant entrainer un rejet du greffon. Le rejet de cellules allogéniques transplantées est principalement médié par la reconnaissance comme « étranger » des antigènes HLA (Human Leucocyte Antigen) de classe I ou II, présents à la surface des cellules transplantées, par le système immunitaire de l'hôte (cellules présentatrices d'antigène et lymphocytes T) (*Figure 1*). Cette reconnaissance de l'antigène va ensuite, par le biais de molécules dites co-stimulatrices, induire l'activation de ces lymphocytes T qui vont soit détruire directement la cellule transplantée (lymphocytes T CD8+), soit activer d'autres cellules du systèmes immunitaire (réponse innée et adaptative) qui détruiront à leur tour la cellule transplantée par la production de cytokines[a] ou d'anticorps par exemple (lymphocytes T CD4+) [42].

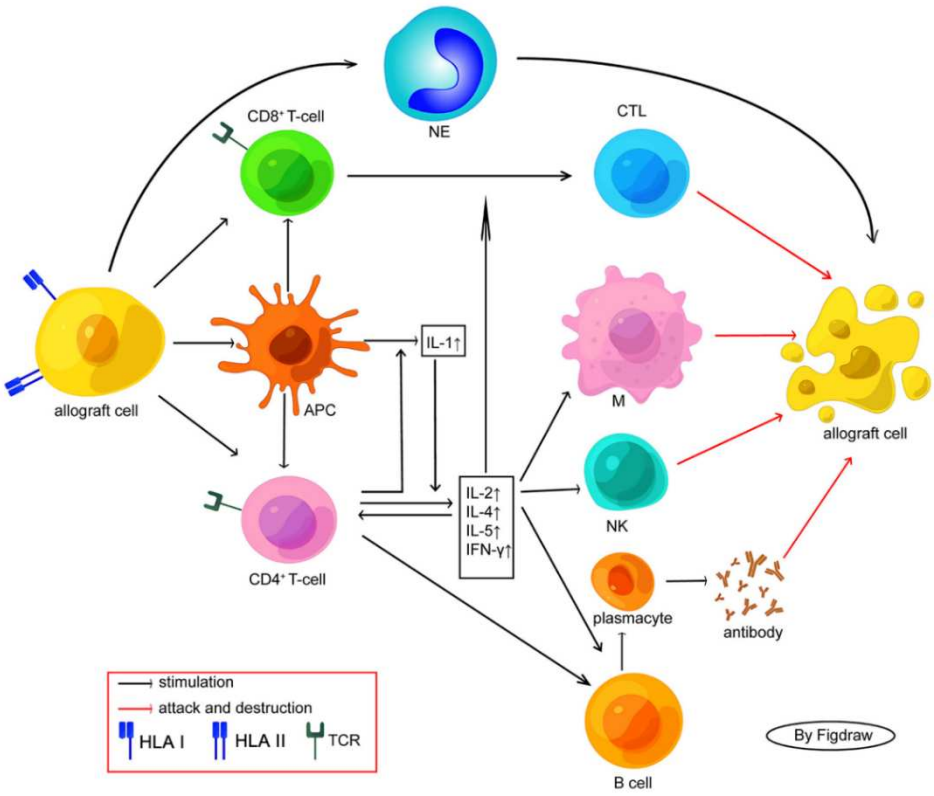


Figure 1. Mécanisme de rejet d'une greffe allogénique de cellules - Image et sous-texte adaptés de l'article[42]. (APC, cellule présentatrice d'antigène ; CTL, lymphocyte T cytotoxique ; M, macrophage ; NK, lymphocyte NK ; NE, neutrophile ; HLA, antigène des leucocytes humains ; TCR, récepteur des cellules T). **A.** Les cellules T reconnaissent les antigènes HLA I et II présents sur les cellules allogreffées par le biais de leur récepteur TCR et des cellules APC qui vont également produire les molécules co-stimulatrices nécessaire à leur activation. **B.** les

[a] Molécule sécrétée par un grand nombre de cellules et impliquée dans le développement et la régulation des réponses immunitaires.

cellules T CD8+ reconnaissent les antigènes de classe HLA I, s'activent et prolifèrent pour donner des CTL matures, qui ont un effet agressif sur les greffons. **C.** Les cellules T auxiliaires CD4+ reconnaissent les antigènes HLA II et favorisent la libération d'IL-1 par les cellules APC. L'IL-1 est une cytokine favorisant la prolifération des cellules T auxiliaires et libérant l'IL-2, qui peut également favoriser la prolifération des cellules T auxiliaires et induire la différenciation des CTL. **D.** En plus de l'IL-2, les cellules T auxiliaires peuvent également produire des cytokines telles que l'IL-4 et l'IL-5, qui favorisent directement et indirectement la différenciation des lymphocytes B et la production d'anticorps anti-greffon qui participeront à leur tour à la destruction des cellules transplantées. **E.** Les cellules T auxiliaires peuvent également activer les lymphocytes NK et les macrophages pour attaquer les cellules transplantées en produisant des cytokines telles que l'IL-2 et l'INFγ. **F.** Les neutrophiles vont également participer à la réponse immunitaire en capturant et tuant les cellules allogreffées.

Immunogénicité. Les CSMs expriment les antigènes HLA de classe I (HLA - A,B,C), mais n'expriment ni les antigènes HLA de classe II (HLA-DR,DM,DQ,DP), ni les molécules co-stimulatrices (CD40, CD80, CD86) dans les conditions standard de culture [35,43,44]. Cette particularité leur confère une faible immunogénicité, car l'activation des lymphocytes T CD4+ repose principalement sur la reconnaissance des antigènes HLA de classe II. Cette reconnaissance constitue l'un des principaux mécanismes de rejet des cellules allogéniques, car une fois activés, les lymphocytes T CD4+ vont induire et entretenir la réponse immunitaire (innée et adaptative) [45]. Cependant, la faible immunogénicité des CSMs est dépendante, au moins *in vitro,* de l'environnement de la cellule. Par exemple, exposées à une hypoxie[a] (pO_2=0.1%) [46], ou à de l'interferon γ (molécule présente en environnement inflammatoire) [35,43,44], les CSMs surexpriment *in vitro* HLA II. Sur le plan clinique, plusieurs essais rapportent l'apparition d'anticorps anti-HLA dirigés contre le donneur chez 7 à 11.5% des patients [47,48] ce qui indique que les CSMs allogéniques administrées ne sont pas entièrement ignorées par le système immunitaire. Néanmoins, l'absence d'effets indésirables majeurs dans les mois suivants leur administration [49–51] tend à confirmer leur faible immunogénicité globale.

Immunomodulation. Outre leur profil antigénique avantageux, les CSMs allogéniques exercent également un effet immunomodulateur sur les cellules du système immunitaire. Elles peuvent, par sécrétion de molécules immunomodulatrices (IL-10, TGF-β, PGE2, IDO[b] etc…) ou par contact direct avec les cellules environnantes, inhiber la prolifération, l'activation et la différenciation de nombreuses cellules impliquées dans la réponse immunitaire (lymphocytes B et T, macrophages, etc…), voire même induire leur apoptose[c] [42,52] (*Figure 2*). Par exemple, dans un modèle murin de sepsis[d], l'injection systémique de $CSMs_{MoelleOsseuse}$ de souris a permis de reprogrammer les macrophages vers un phénotype[e] anti-inflammatoire (M2) et d'augmenter ainsi la longévité des souris par rapport à celles

[a] Environnement appauvri en oxygène.
[b] Interleukine-10, Facteur de croissance transformant β (transforming growth factor β), Prostaglandine E2, Indoleamine 2,3-dioxygenase
[c] Processus physiologique programmé qui conduit une cellule à sa mort naturelle.
[d] Dysfonctionnement d'organes menaçant le pronostic vital, causé par une réponse excessive et incontrôlée de l'organisme à une infection.
[e] Ensemble des caractéristiques observables à l'échelle cellulaire, qui résulte de l'expression génique et, éventuellement, de l'influence exercée par l'environnement.

n'ayant pas reçu de cellules. Cet effet bénéfique des CSMs sur les macrophages a été confirmé par l'absence d'amélioration de la survie chez les souris préalablement déplétées en macrophages, malgré l'injection des mêmes CSMs [53]. De manière similaire, dans un modèle murin de polyarthrite rhumatoïde, l'injection systémique de $CSMs_{TissuAdipeux}$ a également permis de diminuer la quantité de cellules T CD4+ activées dans la rate par rapport au contrôle sans CSMs injectées [54]. L'activité immunomodulatrice des CSMs semble dépendre de cytokines pro-inflammatoires agissant comme un signal d'activation. En leur absence ou en dessous d'un seuil critique de ces cytokines, les CSMs ne présenteraient plus d'effet immunosuppresseur [55].

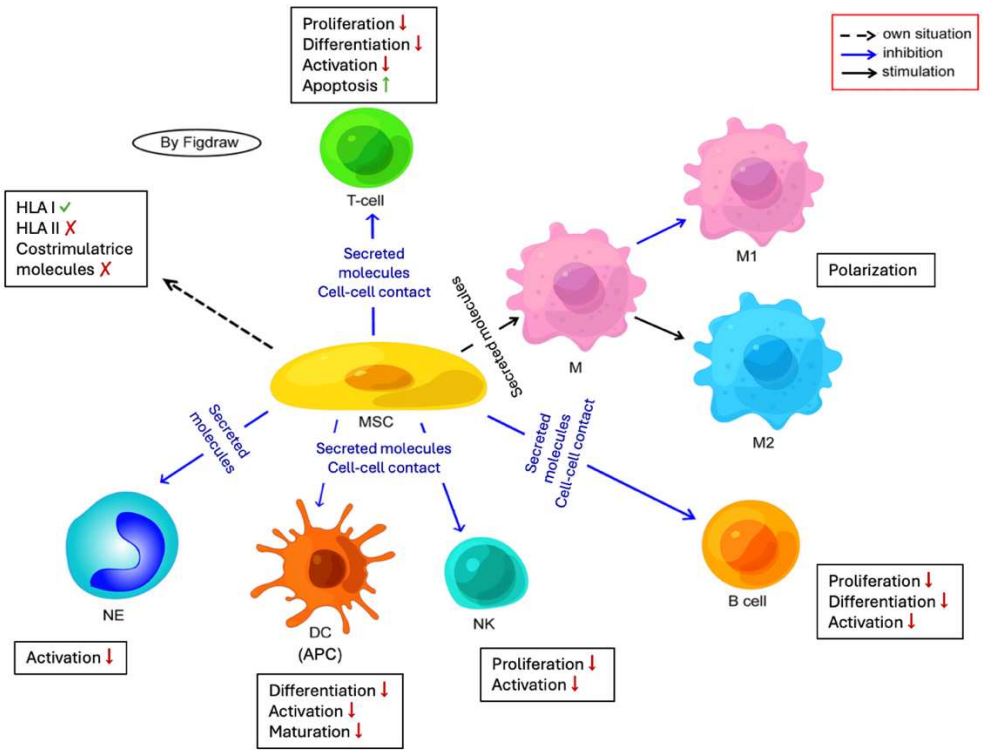


Figure 2. Immunogénicité des CSMs - Image et sous-texte adaptés des références [42] et [52]. [MSC, cellules stromales mésenchymateuses ; M, macrophage ; NK, lymphocyte NK ; NE, neutrophile ; DC, cellule dendritique (principale cellule présentatrice d'antigène] **A.** Bien qu'exprimant des HLA de classe I, les MSC expriment très peu de HLA II et de molécules de costimulation. **B.** Les MSC inhibent la prolifération des lymphocytes T, altèrent la différenciation et l'activation des cellules T CD4+ et induisent l'apoptose des lymphocytes T activés par contact direct ou par sécrétion de facteurs immunomodulateurs. **C.** Les MSC facilitent la transition des macrophages de phénotype pro-inflammatoire (M1) vers des macrophages de phénotype anti-inflammatoire (M2) par le biais de molécules sécrétées. **D.** Les MSC peuvent inhiber la prolifération et la production d'anticorps des lymphocytes B et contrôler leur différenciation par contact direct ou sécrétion de facteurs. **E.** Les MSC inhibent la prolifération et la cytotoxicité des lymphocytes NK par contact intercellulaire et médiation de facteurs sécrétées. **F.** Les MSC ont un effet inhibiteur sur la différenciation, la maturation et l'activation des cellules dendritiques ce qui diminue leur capacité à activer les lymphocytes T. **G.** Certaines études ont démontré que les MSC étaient capables de diminuer la cytotoxicité des neutrophiles alors que d'autres ont observé la capacité des MSC à maintenir leur viabilité et activité.

☆ *Homing/migration limitée vers un tissu lésé*

Le *homing* cellulaire, soit la capacité de certaines cellules à migrer vers des tissus en réponse à un signal de stress, d'inflammation ou de lésion, représenterait un atout prometteur pour la régénération tissulaire. Il permettrait de cibler un tissu lésé sans avoir recours à des techniques invasives pour acheminer les CSMs sur le site cible. Plusieurs études suggèrent que les CSMs auraient cette capacité de migration. Ainsi, Li *et al.* (2016) ont montré que des $CSMs_{TissuAdipeux}$ injectées dans des articulations de rat atteintes d'arthrose migraient vers les zones les plus endommagées et y restaient 2,5 fois plus longtemps que chez les rats sains [56], tandis que Granero-Moltó., *et al* (2009) ont observé sur 2 semaines la migration de $CSMs_{MoelleOsseuse}$ murines vers les sites de fractures osseuses (tibias) après injection intraveineuse (veine caudale) chez la souris [57]. Kimura., *et al* (2016) ont pour leur part mis en évidence la capacité des $CSMs_{TissuAdipeux}$ à migrer vers les tumeurs de la zone abdominale après injection intrapéritonéale dans un modèle murin de neuroblastome [58]. Toutefois, malgré ces observations encourageantes, le *homing* des CSMs est dans les faits très limité, en particulier après une administration intraveineuse où une grande partie des cellules est souvent piégée dans d'autres organes non ciblés (principalement dans les poumons et le foie) [58], mais également après une injection locale [59]. Ainsi, même si le *homing* permettrait une utilisation moins invasive des CSMs en thérapie cellulaire, il reste encore très limité sans avoir recours à des stratégies complémentaires pour en renforcer l'efficacité, telles que le préconditionnement cellulaire, l'utilisation d'ultra-sons ou la modification génétique des cellules, qui sont actuellement en cours d'étude [60].

☆ *Transfert de mitochondries*

Le transfert de mitochondries par les CSMs est un mécanisme observé *in vitro* et *in vivo*, permettant de secourir les cellules environnantes en détresse. Les mitochondries sont des organites intracellulaires essentiels qui permettent la production d'ATP (adénosine triphosphate), principale source d'énergie nécessaire aux fonctions cellulaires, via la respiration aérobie[a]. En cas de dommage mitochondrial (par exemple en réponse à une inflammation) la cellule ne parvient plus à produire suffisamment d'ATP, ni à réguler normalement le stress oxydatif produit durant la respiration aérobie, et finit par entrer en apoptose. Les CSMs vont alors détecter ces cellules en souffrance grâce à des signaux de détresse, comme les DAMPs[b] qui les attirent et déclenchent le processus de transfert [61,62]. Le transfert de mitochondries fonctionnelles se fait principalement via deux mécanismes : (i) les « tunneling nanotubes », structures cytoplasmiques intercellulaires permettant un transport direct d'organites, et (ii) les vésicules extracellulaires ou microvésicules transportant des mitochondries entières ou fragmentées (*Figure 3*) [61]. Une fois intégrées dans la cellule receveuse, ces mitochondries

[a] Processus métabolique qui permet aux cellules de produire de l'énergie sous forme d'ATP à partir de glucose et en présence d'O_2. On le définit ici comme la succession des différentes étapes suivantes : la glycolyse, la décarboxylation du pyruvate, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative. Ce sont les deux dernières étapes qui ont lieu dans les mitochondries.

[b] Danger-Associated Molecular Patterns. Molécules libérées par des cellules endommagées, stressées ou mourantes, qui alertent le système immunitaire de la présence d'un danger non infectieux.

exogènes permettent de restaurer une respiration mitochondriale efficace, et par conséquent, de reprendre la production normale d'ATP et la régulation du stress oxydatif, ce qui prolongera ultimement la survie de la cellule receveuse. Ce transfert mitochondrial a été documenté dans divers contextes pathologiques *in vivo,* impliquant une variété de cellules receveuses comme les cellules alvéolaires[a] (lésions pulmonaires) [63], les cellules endothéliales[b] (syndrome de détresse respiratoire aiguë) [64], les cardiomyocytes[c] (ischémie cardiaque) [65], les ténocytes[d] (tendinopathie) [66], ainsi que les cellules neuronales (lésion de la moelle épinière) [67]. A titre d'exemple, des $CSMs_{MoelleOsseuse}$ murines et humaines injectées localement dans un modèle de lésion pulmonaire aigüe (souris) ont pu transférer leurs mitochondries aux cellules épithéliales alvéolaires par formation de nanotubes et de microvésicules. Ce transfert a restauré les niveaux d'ATP, réduit l'inflammation locale (nombre de leucocytes divisé par 3,5) et amélioré significativement la survie des souris (taux de survie à 72h multiplié par 3), comparativement aux souris n'ayant reçu aucune injection de CSMs. En revanche, aucun transfert mitochondrial n'a été observé chez des souris saines, non lésées. Par ailleurs, bien que des CSMs génétiquement modifiées pour posséder des mitochondries dysfonctionnelles aient pu transférer ces organites, elles n'ont pas permis de restaurer les niveaux d'ATP. Leur action anti-inflammatoire et protectrice, bien que présente, s'est révélée plus limitée que celle des CSMs non-modifiées (nombre de leucocytes divisé par 1,3 ; survie à 72h multipliée par 1,8) [63]. Ainsi, bien que l'effet thérapeutique des CSMs repose également sur d'autres propriétés, le transfert de mitochondries participe directement à la restauration fonctionnelle des tissus lésés.

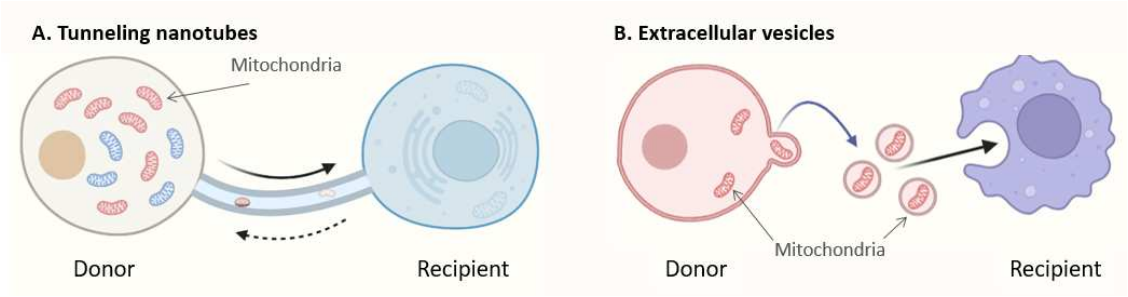


Figure 3. Les mécanismes de transfert des mitochondries - Image et sous-texte adaptés de la référence [61]. Les mitochondries peuvent être transférées d'une cellule donneuse à une cellule receveuse principalement via deux mécanismes distincts. **A**. « Tunneling nanotubes » : structures tubulaires membranaires reliant directement deux cellules, formant un canal ouvert permettant le passage de mitochondries. **B**. Vésicules extracellulaires : microvésicules ou exosomes contenant des mitochondries, libérées par la cellule donneuse par bourgeonnement de la membrane plasmique, puis internalisées par la cellule receveuse.

[a] Cellules tapissant l'intérieur des alvéoles.
[b] Cellules formant la couche interne des vaisseaux sanguins.
[c] Cellules composant le muscle cardiaque
[d] Cellule formant le tendon.

☆ *Différenciation*

La différenciation cellulaire. La différenciation cellulaire correspond au processus par lequel une cellule souche acquiert des caractéristiques spécifiques pour devenir une cellule dite spécialisée. Ce mécanisme repose sur l'activation sélective de certains gènes et l'inactivation d'autres. Chez les cellules souches humaines il existe différents pouvoirs de différenciation : la totipotence (capacité de se différencier en toutes les cellules d'un organisme complet et fonctionnel), la pluripotence (capacité de se différencier en toutes les cellules d'un organisme, à l'exception des annexes embryonnaires[a]), et la multipotence (capacité de se différencier en toutes les cellules issues d'un seul des 3 feuillets embryonnaires[b]). Plus une cellule souche sera à un stade différencié et plus son pouvoir de différenciation sera restreint, jusqu'à l'unipotence de la cellule spécialisée. Grâce à leur capacité à se différencier, les cellules souches constituent un véritable réservoir cellulaire pour l'organisme, le maintien de l'homéostasie tissulaire et la réparation des tissus endommagés. Par exemple, dans leur microenvironnement, les CSMs sont généralement maintenues dans un état de quiescence[c]. En cas de lésion, les signaux émis par le tissu endommagé (production de facteurs biochimiques, stimuli physique ou mécanique, …) modifient cet environnement local, activant ainsi les CSMs. Celles-ci se mettent alors à proliférer, migrent hors de leur niche, se différencient et remplacent les cellules mortes ou dysfonctionnelles [68–71].

La multipotence des CSMs. Classiquement, les CSMs sont considérées comme multipotentes et capables de se différencier en cellules issues du mésoderme, notamment en cellules du tissu osseux (différenciation ostéogénique), du tissu adipeux (différenciation adipogénique), et du tissu cartilagineux (différenciation chondrogénique) [26,34,72] (*Figure 4*). Néanmoins, les CSMs étant une population hétérogène, elles n'ont pas toutes le même potentiel différenciatif. Friedenstein., *et al* (1987) ont par exemple observé que seulement 30 à 50% des CFU-F[d] (sous-population de CSMs) de lapin étaient capables de se différencier[e] en cellule osseuse *in vivo* [73]. De leur côté, Kurnetsov., *et al* (1997) ont rapporté un taux de 58% pour des CFU-F humaines [74]. De plus, quelques études ont suggéré que les CSMs pourraient également se différencier en cellules issues de différents feuillets embryonnaires telles que les hépatocytes (cellules du foie) [75,76], les myocytes (cellules musculaires) [77], les cellules épithéliales [78] ou encore les cellules neuronales [79], une hypothèse toutefois encore largement débattue et sans consensus au sein de la communauté scientifique.

---

[a] Tissus non embryonnaires dont le but est d'accompagner l'embryon et le fœtus lors de son développement (ex : placenta, amnios, vésicule vitelline).

[b] Les 3 feuillets embryonnaires sont : (i) l'endoderme – dont les cellules donneront*, la majorité des organes du système digestif (ii) le mésoderme – dont les cellules formeront* le cartilage, les os et les vaisseaux sanguins et (iii) l'ectoderme – dont les cellules donneront* l'épiderme et le système nerveux. *listes non-exhaustives)

[c] Etat cellulaire métaboliquement peu actif

[d] Colony-forming unit–fibroblasts. Sous population multipotente des CSMs identifiée par leur capacité à former des colonies lorsqu'elles sont cultivées à faible densité *in vitro*. En isolant la colonie, on obtient des cellules provenant toutes d'une même cellule mère.

[e] Car capables de former du tissu osseux en chambre de diffusion (système fermé) *in vivo.*

Ainsi le potentiel de différenciation des CSMs est particulièrement intéressant en médecine régénérative, car il permettrait d'obtenir, une fois injectées, des cellules fonctionnelles capables de remplacer des tissus endommagés. Cependant, bien que la capacité des CSMs à induire la formation de néo-tissus (osseux, adipeux ou cartilagineux) *in vivo* ait été démontrée, la différenciation *in vivo* des CSMs injectées a elle été surtout observée pour la voie ostéogénique [80].

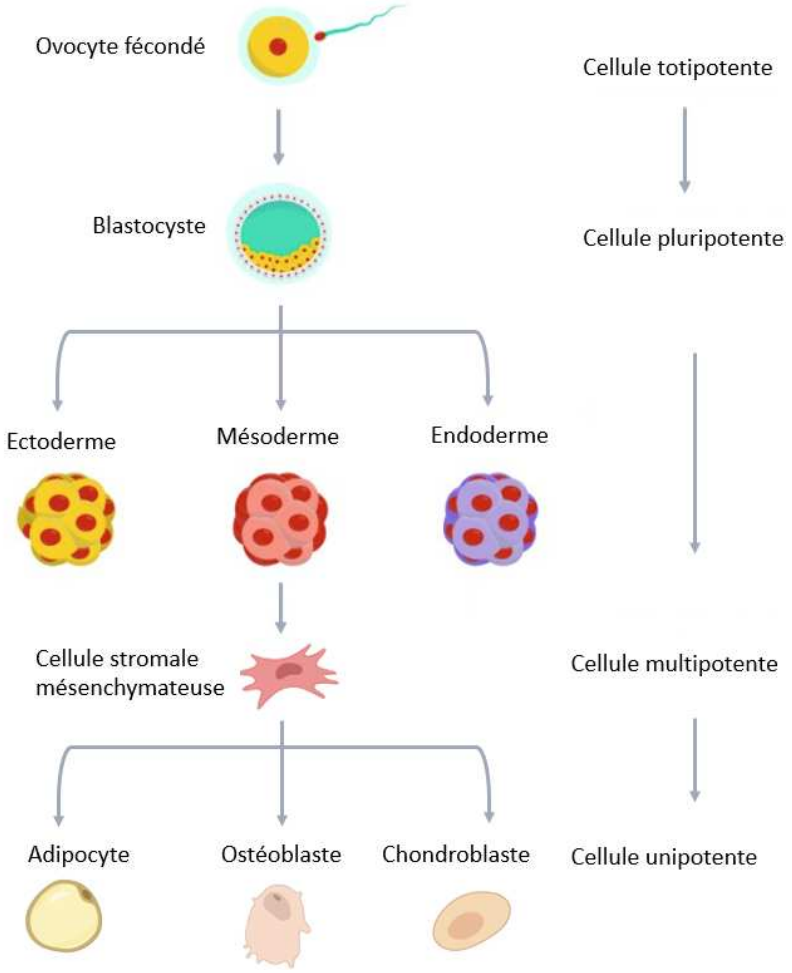


Figure 4. Schéma simplifié de la hiérarchie de potence et des voies de différenciation des CSMs - Image adaptée de la référence [81].

☆ *Effet paracrine*

Une autre propriété clé des CSMs pour la régénération tissulaire concerne leur effet paracrine. En sécrétant des molécules bioactives (cytokines, facteurs de croissance, exosomes, etc…), les CSMs peuvent agir sur les cellules voisines à distance et induire ainsi la réparation du tissu (*Tableau 2*). A l'échelle cellulaire, les molécules sécrétées par les CSMs peuvent ainsi modifier le comportement des cellules environnantes en :

- Attirant les cellules voisines sur le site cible (chimiotactisme) telles que les CSMs endogènes[a] [82], les cellules immunitaires [83], ou encore les cellules endothéliales[b] [84].
- Modulant leur prolifération : les CSMs peuvent bloquer la prolifération des lymphocytes T [52] ou au contraire stimuler celle des cellules endothéliales [85].
- Modulant leur différenciation/activation : les CSMs peuvent favoriser la différenciation des macrophages en macrophages M2 [52], [53] ou des CSMs en ostéoblastes par exemple [86].
- Favorisant ou non leur survie : les CSMs peuvent favoriser l'apoptose des lymphocytes T activés [37] ou avoir une action anti-apoptique auprès des cellules endothéliales [85].

A l'échelle tissulaire, l'effet paracrine des CSMs se traduit en un pouvoir :

- Pro-angiogène, capable d'induire la formation de vaisseaux sanguins, en modulant notamment le comportement des cellules endothéliales. L'angiogenèse est importante pour la réparation tissulaire car les vaisseaux sanguins néoformés vont ainsi permettre l'apport d'oxygène et de nutriments au tissu lésé, l'élimination de déchets métaboliques et faciliter l'arrivée des cellules immunitaires et autres cellules réparatrices [84,87,88].
- Antifibrotique, capable d'éliminer l'excès de tissu fibreux (tissu cicatriciel) formé après une lésion ou une inflammation et pouvant gêner la réparation du tissu. Pour cela les CSMs vont empêcher la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes (cellules produisant le tissu fibreux) ou agir sur les cellules immunitaires pour diminuer l'inflammation [89,90].
- Immunomodulateur, capable de s'adapter à leur environnement inflammatoire en diminuant l'inflammation et l'intensité de la réponse immunitaire en inhibant la prolifération, la différenciation, ou encore l'activation des cellules de l'immunité (comme vu précédemment au paragraphe 2.c.1) afin d'éviter que l'inflammation ne perdure et ne devienne chronique ; ou au contraire en favorisant l'inflammation et l'immunité en activant et recrutant les neutrophiles sur le site de l'inflammation en cas d'infection aigüe [52].

Il est aujourd'hui relativement bien établi auprès de la communauté scientifique que l'effet thérapeutique des CSMs provient essentiellement de leur effet paracrine plutôt que de leur capacité à se différencier en cellule spécialisée, notamment à cause de leur mort massive post-implantation qui sera détaillée dans la partie II.

[a] Cellules appartenant à l'hôte
[b] Cellules formant la couche interne des vaisseaux sanguins

Abbreviation	Nom complet	Effet paracrine principal
TSG-6	TNF-stimulated gene 6	Antifibrotique
PGE2	Prostaglandine E2	Immunomodulateur
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygénase	Immunomodulateur
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor	Immunomodulateur
HLA-G5	Human leukocyte antigen class I molecule G5	Immunomodulateur
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor	Pro-angiogène
ANG-1	Angiopoietin-1	Pro-angiogène
IL-10	Interleukine-10	Immunomodulateur / Antifibrotique
MMPs	Matrix Metalloproteinases	Pro-angiogène / Antifibrotique
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor	Pro-angiogène / Antifibrotique
FGF-2	Fibroblast Growth Factor-2	Pro-angiogène / Antifibrotique
TGF-β	Transforming Growth Factor-beta	Immunomodulateur / Pro-angiogène
IL-6	Interleukine-6	Immunomodulateur / Pro-angiogène
IL-8	Interleukine-8	Immunomodulateur / Pro-angiogène
HGF	Hepatocyte Growth Factor	Immunomodulateur / Pro-angiogène / Antifibrotique

Tableau 2. Exemples de molécules sécrétées par les CSMs et leur effet paracrine [42,88,90].

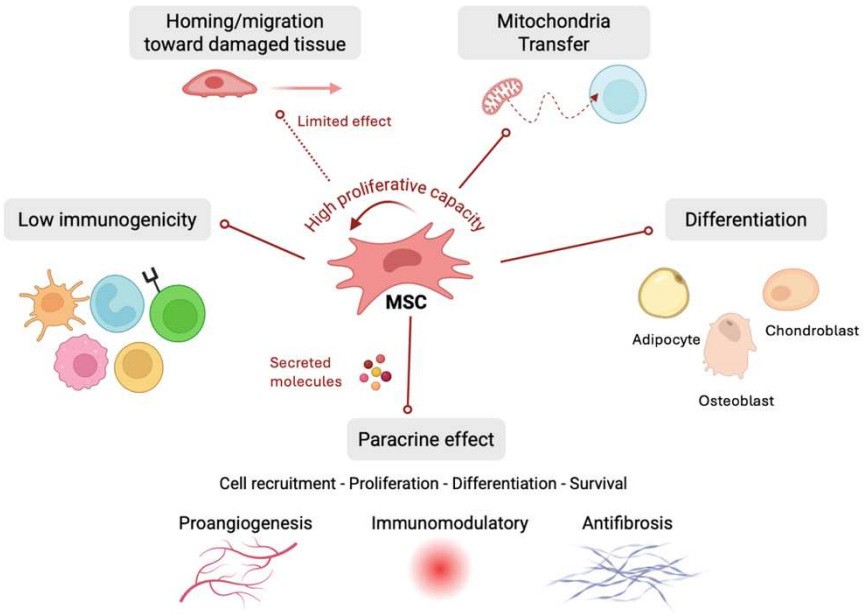


Figure 5. Récapitulatif des propriétés des CSMs pour la régénération tissulaire.

I. 2. d. Utilisations et limites thérapeutiques des CSMs

Les CSMs présentent donc un potentiel thérapeutique particulièrement intéressant grâce à l'ensemble des propriétés citées ci-dessus (*Figure 5*). Bien qu'il existe plusieurs produits commercialisés à base de CSMs, essentiellement autorisés dans les pays asiatiques (*Tableau 3*), les CSMs sont toujours majoritairement utilisées et étudiées en essais cliniques principalement pour le traitement de maladies cardiovasculaires (ex : cardiomyopathie [91], Accident Vasculaire Cérébral ou AVC [92,93]), pulmonaires (ex : fibrose pulmonaire [94,95], COVID long [96]), auto-immunes (ex : lupus [97,98], diabète de type 1 [99]), ou encore neurodégénératives (ex : Parkinson [100], maladie de Charcot [101]).

Produit (Entreprise)	Pays (date) d'approbation	CSMs	Indication principale (voie d'administration - Injection)
Alofisel® (Takeda)	Japon (2021)	Tissu adipeux (allogénique)	Fistules périanales complexes chez les patients atteints de la maladie de Crohn. (Locale) [102]
Cartistem® (Medipost)	Corée du Sud (2012)	Cordon ombilical (allogénique)	Arthrose sévère du genou. (Intraarticulaire) [103]
Cellgram® (FCB-Pharmicell)	Corée du Sud (2011)	Moelle osseuse (autologue)	Infarctus aigu du myocarde. (Intracoronaire) [104]
Cupistem® (Anterogen)	Corée du Sud (2012)	Tissu adipeux (autologue)	Fistules périanales chez les patients atteints de la maladie de Crohn. (Locale) [105]
Neuronata-R® (Corestem)	Corée du Sud (2014*)	Moelle osseuse (autologue)	Maladie de Charcot. (Intrathécale) [106]
Prochymal® (Osiris Therapeutics, puis Mesoblast)	Canada, Nouvelle-Zélande (2012)	Moelle osseuse (allogénique)	Réaction du greffon contre l'hôte aiguë et réfractaire aux stéroïdes chez les enfants. (Intraveineuse) [107]
Queencell® (Anterogen)	Corée du Sud (2015)	Tissu adipeux (autologue)	Lésions du tissu sous-cutané. (Intradermique) [105]
Ryoncil ® (Mesoblast)	États-Unis (2024)	Moelle osseuse (allogénique)	Réaction du greffon contre l'hôte aiguë et réfractaire aux stéroïdes chez les enfants. (Intraveineuse) [108]
Stemirac® (Nipro Corporation)	Japon (2018*)	Moelle osseuse (autologue)	Lésions de la moelle épinière. (Intrathécale[a]) [109]
Stempeucel® (Stempeutics Research)	Inde (2020)	Moelle osseuse (allogénique)	Ischémie critique des membres (Locale en intramusculaire) et arthrose du genou. (Intraarticulaire) [110]
Temcell HS Inj.® (JCR Pharmaceuticals)	Japon (2015)	Moelle osseuse (allogénique)	Réaction du greffon contre l'hôte aiguë après transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques. (Intraveineuse) [111]

Tableau 3. Exemples de thérapies cellulaires commercialisées à base de CSMs.

[a] Injection dans le canal rachidien.
*Approbation conditionnelle (sous réserve d'autres études cliniques).

Toutefois, malgré le grand nombre d'études cliniques en cours, les résultats thérapeutiques observés ne sont pas toujours convaincants. La spécialité Alofisel®, développée par le laboratoire Takeda pour traiter les fistules périanales grâce à l'action des CSMs chez les patients atteints de la maladie de Crohn, a ainsi été retirée du marché européen en décembre 2024 après son autorisation en 2018 à cause de résultats cliniques jugés insuffisants. Plus généralement, un obstacle majeur à la mise en œuvre clinique des CSMs est leur faible survie post-implantation : plus de 90 % des cellules disparaissent dans les 3 à 7 jours suivant l'implantation, même après une injection locale ciblée [112–115]. Cette mort cellulaire rapide et massive limite considérablement le potentiel thérapeutique des CSMs qui n'ont tout simplement pas le temps de déployer durablement leur action paracrine ni d'initier leur différenciation. En contexte clinique, cette disparition précoce des CSMs après administration a des répercussions directes sur les modalités de traitement, rendant souvent nécessaire le recours à des injections répétées de CSMs pour maintenir un effet thérapeutique. Chaque injection supplémentaire augmente les risques (infection, douleur, réaction allergique, effets secondaires), alourdit la prise en charge (mobilisation du personnel, du matériel, des infrastructures) et pèse sur l'observance (fatigue, découragement, abandon du traitement). Par exemple, bien qu'il n'y ait pas eu d'études évaluant la mortalité des CSMs administrées, les traitements Ryoncil®, Temcell HS Inj.® et Prochymal® nécessitent jusqu'à 8 à 12 perfusions intraveineuses réparties sur plusieurs semaines.

II. La mort massive des CSMs post-greffe

II. 1. Le tissu lésé : un microenvironnement hostile

Après implantation dans une lésion, les CSMs sont confrontées à un microenvironnement hostile qui compromet fortement leur survie. En effet, les CSMs implantées sont exposées à la fois à une diminution locale de la vascularisation (soit un milieu appauvri en dioxygène, dit hypoxique, et en nutriments) et à une inflammation (caractérisée par un stress oxydatif[a] et des cytokines pro-inflammatoires[b]), induisant une cascade de signaux biologiques qui va entraîner leur mort. Le rôle essentiel de la vascularisation a été mis en évidence par l'implantation de CSMs dans des biomatériaux pré-vascularisés, insérés dans un défaut osseux critique chez le lapin**.** La pré-vascularisation a été obtenue en introduisant des faisceaux vasculaires directement au sein du biomatériau avant l'ajout des CSMs et l'implantation. Comparés aux [biomatériaux + CSMs] non pré-vascularisés, les implants vascularisés ont favorisé une revascularisation plus rapide et une formation osseuse accrue, suggérant un meilleur maintien de la viabilité cellulaire grâce à la présence préalable de vaisseaux sanguins [116].

[a] Déséquilibre entre la présence de molécules oxydantes (principalement les ROS - reactive oxygen species – tels que H_2O_2 ou $OH\cdot$) et les capacités antioxydantes de la cellule. Ce déséquilibre entraîne des dommages aux composants cellulaires (ADN, lipides, protéines) jusqu'à induire la mort de la cellule.
[b] Molécules sécrétées capables de promouvoir l'inflammation. Exemple : les interleukines IL-1, IL-6, IL-12, et IL-18, le facteur tumor necrosis factor alpha (TNF-α), ou l'interféron gamma (IFNγ).

De même, le rôle critique de l'inflammation a pu être démontré dans un modèle de lésion de la moelle épinière chez le rat, où l'injection locale de $CSMs_{MembraneAmniotique}$, combinée à un anti-inflammatoire (la méthylprednisolone), a permis de réduire significativement, après 7 jours, l'inflammation et le nombre de cellules apoptotiques total (incluant les CSMs greffées et les cellules endogènes), en comparaison à l'administration de CSMs ou de méthylprednisolone seules [117]. Toutefois, l'arrêt partiel ou total de la vascularisation (ischémie) semble être le facteur déterminant dans la mort rapide des CSMs post-implantation du fait de son effet immédiat sur l'appauvrissement en O_2 et nutriments, essentiels aux CSMs, alors qu'à l'inverse, l'inflammation s'installe de manière plus progressive. En effet, Becquart., *et al* (2012) ont ainsi montré que, dès la première semaine suivant l'implantation de $CSMs_{MoelleOsseus}$ combinées à un biomatériau (hydrogel de fibrine et corail) par voie sous-cutanée chez la souris, les CSMs situées au centre du biomatériau exprimaient davantage de marqueurs d'ischémie (HIF-1α, LDH-A et BNIP3)[a] et présentaient une mortalité plus élevée que celles localisées en périphérie, qui exprimaient ces marqueurs de façon moins marquée (et qui étaient probablement plus exposées à l'inflammation)[118].

II. 2. L'impact de l'ischémie sur la viabilité cellulaire post-implantation

Comme abordé précédemment, l'ischémie se définit comme un arrêt total ou partiel de l'apport sanguin à un tissu. Elle peut résulter d'une insuffisance générale du débit sanguin (ex : arrêt cardiaque) ou bien d'une altération des vaisseaux sanguins telles qu'une rupture de vaisseau, une obstruction (ex : thrombose, embolie, athérosclérose), ou une compression (par un œdème ou une tumeur). L'arrêt total ou partiel des échanges normalement assurés par la circulation sanguine va entraîner essentiellement un manque en O_2 (l'hypoxie), un manque en nutriments, et une accumulation de déchets métaboliques au niveau de la zone ischémiée. L'approvisionnement en O_2 et en nutriments (ou l'évacuation des déchets métaboliques) ne se fait plus alors que par diffusion passive depuis (ou vers) les zones vascularisées, dont l'efficacité est plus limitée. A titre d'exemple, la diffusion de l'O_2 est restreinte *in vivo* à une distance d'environ 100-200 μm [119,120]. Ces 3 caractéristiques du milieu ischémique (l'environnement hypoxique, le manque en nutriment, et l'accumulation de déchets métaboliques) vont donc modifier l'environnement cellulaire et impacter, chacun à leur niveau, la viabilité des CSMs implantées.

II. 2. a. Impact de l'environnement hypoxique sur les CSMs

Définition. En biologie, l'hypoxie est définie au niveau tissulaire comme un environnement appauvri en O_2, généralement par rapport à la pression partielle d'O_2 (pO_2 – souvent exprimée en fraction d'O_2 inspirée) dans le sang (13%) ou dans l'air (21%). Au niveau cellulaire, elle est objectivée par la présence d'une accumulation de la protéine HIF-1α dans les cellules. En effet, HIF-1α est dégradée par des

[a] HIF-1α : , LDH-A : Lactate DeHydrogenase - A et BNIP3 : BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3

enzymes sensibles à l'O_2. Or, en hypoxie, ces enzymes sont inhibées, ce qui permet à HIF-1α d'échapper à sa dégradation, et de s'accumuler et migrer vers le noyau où elle s'associera à une autre protéine (HIF-1β) pour former le complexe HIF-1 qui induira l'expression de nombreux gènes afin de permettre aux cellules de s'adapter à l'hypoxie [121]. Ainsi, les types cellulaires sont plus ou moins adaptés à vivre en hypoxie, la pression partielle d'O_2 variant grandement en fonction du tissu (*Tableau 4*). Par exemple, dans leur niche biologique, les CSMs sont exposées à des pO_2 faibles (*Tableau 4*), la dégradation d'HIF-1α est bloquée : leur microenvironnement est biologiquement hypoxique sans être pour autant délétère pour les CSMs. La notion d'hypoxie doit donc être nuancée en fonction des besoins spécifiques des cellules concernées. Pour mieux s'y retrouver, la littérature distingue la « normoxie », qui correspond à la pression partielle en oxygène de l'air ambiant (21 % de pO_2), de la « physioxie », qui fait référence à la pO_2 physiologique, propre à chaque type de tissu. Lorsque la privation en oxygène devient extrême, au point que l'O_2 est pratiquement absent, on parle alors d'anoxie. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que la culture des CSMs humaines en normoxie ne reflète pas les conditions physiologiques réelles alors qu'elle constitue la norme en laboratoire. Ce décalage pourrait contribuer à la mortalité cellulaire observée après implantation, en raison du choc oxydatif induit par la transition brutale entre l'atmosphère riche en O_2 de la culture *in vitro,* à la quasi-anoxie du site d'implantation. De façon intéressante, il a pu être montré qu'un simple pré-conditionnement des CSMs de 24h en physioxie (pO_2 = 1 – 3%) ou en proche anoxie (pO_2 < 1%) suffit pour augmenter à très court terme leur survie post-implantation dans des modèles ischémiques [122].

L'impact de l'hypoxie sur la viabilité des CSMs. De manière générale, l'O_2 est utilisé par les cellules à travers la « respiration aérobie »[a], pour produire de l'énergie sous forme d'ATP (Adenosine TriPhosphate) avec un rendement élevé. Malgré cette implication forte de l'O_2 dans le métabolisme cellulaire, l'hypoxie a, de façon surprenante, peu d'effet sur la mortalité des CSMs implantées en milieu ischémique. En effet, Deschepper., *et al* (2012) ont montré qu'à une pO_2 de 0,1%, soit la pression mesurée au cœur d'un biomatériau implanté en sous-cutané [123], les $CSMs_{MoelleOsseuse}$, à condition d'être cultivées en présence de glucose (5 g/L), maintiennent une viabilité élevée et stable sur 3 semaines (soit 1,4 fois le nombre de cellules initiales à J21) [124,125]. Ces résultats ont également été confirmés dans les mêmes conditions (pO_2=0,1% et 5g/L de glucose) sur 14 jours (60% de survie à J14) [123] ou pour une pO_2 plus élevée (1%) sur 7 jours (100% de survie à J7) [126]. Ces données montrent qu'en condition de déplétion en O_2, les CSMs sont capables de maintenir leur viabilité pendant plusieurs semaines, témoignant de leur résilience métabolique.

L'impact de l'hypoxie sur la fonctionnalité des CSMs. Si les CSMs font preuve d'une grande capacité d'adaptation en condition hypoxique, certaines de leurs fonctions biologiques essentielles restent néanmoins dépendantes de la disponibilité en O_2 [127,128,129]. Ainsi, des études ont montré qu'en milieu hypoxique (pO_2 de 1%) la différenciation ostéogénique et adipocytaire des CSMs, contrairement à la

[a] Processus métabolique qui permet aux cellules de produire de l'énergie sous forme d'ATP à partir de glucose et en présence d'O_2. On le définit ici comme la succession des différentes étapes suivantes : la glycolyse, la décarboxylation du pyruvate, le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative.

différenciation chondrogénique, étaient inhibées *in vitro* [128,129,130]. De même, il a été observé que la sécrétion *in vitro* de facteurs pro ou anti-inflammatoires par des $CSMs_{MoelleOsseuse,}$ bien que confirmée en normoxie et physioxie (pO_2 de 5%), était inhibée en anoxie (pO_2 de 0,1%) [131].

L'impact de l'hypoxie sur la revascularisation. De manière contre-intuitive, le maintien des CSMs en hypoxie contribue à la résolution de l'ischémie. En effet, l'hypoxie stabilise le complexe HIF-1, qui active l'expression de gènes clés impliqués dans la néovascularisation. Cela induit notamment la sécrétion de facteurs pro- angiogènes tels que le VEGF[a] (qui module la néoangiogenèse), le PDGF[b] et l'angiopoïétine (qui participent à la maturation et à la stabilité des nouveaux vaisseaux) [132]. Ainsi, Paquet., *et al* (2015) ont étudié les facteurs pro- angiogènes sécrétés par des $CSMs_{MoelleOsseuse}$ cultivées à différentes pO_2 (pO_2=0,1% – HIF-1α stable ; pO_2=5% – HIF-1α modérément stable et pO_2=21% – HIF-1α instable). Ils ont observé que les CSMs ne produisaient des facteurs pro- angiogènes (VEGF, MCP-1[c], IL-8) que sous anoxie (pO_2=0,1%), et ce jusqu'à 10 jours de culture *in vitro.* En outre, les milieux conditionnés[d] par ces cellules en anoxie ont permis la formation de réseaux vasculaires plus denses aussi bien *in vitro* (en présence de cellules endothéliales) qu'*in vivo* dans un modèle d'ischémie sous-cutanée chez la souris [131]. Ainsi le maintien de l'hypoxie permet de stabiliser HIF-1α, de former le complexe HIF-1, et, *fine*, accélère la revascularisation de la zone ischémiée.

Tissu	**pO_2 (%)***
Artère [133,134]	10 – 13
Foie [134,135]	4 – 7
Cerveau [134,135]	4 – 5
Poumon [133,135]	10 – 16
Tissu intestinal [135]	7 – 9
Rein [134–136]	5 – 10
Niches des CSMs	
Moelle osseuse [133,135,137]	1 – 7
Cordon ombilical [135,138]	1 – 4
Tissu adipeux [139]	3 – 11

Tableau 4. Variation des pO_2 en fonction du tissu anatomique.

II. 2. b. Impact du manque de nutriments sur les CSMs

L'impact de la déplétion en glucose. Le glucose contribue à la production d'ATP non seulement lors de la 1ère étape de la respiration aérobie, mais également à travers une autre voie métabolique majeure : la glycolyse anaérobie (glycolyse + fermentation lactique). Contrairement à la respiration aérobie, la glycolyse anaérobie a l'avantage de fonctionner en l'absence de O_2, bien qu'elle produise

[a] Vascular Endothelial Growth Factor
[b] Platelet-Derived Growth Factor
[c] Monocyte Chemotactic Protein
[d] Un milieu conditionné correspond au milieu de culture cellulaire prélevé après un certain temps de culture cellulaire et qui contient donc des facteurs actifs, sécrétés par les cellules pendant ce temps de culture.

15 à 20 fois moins d'ATP par molécule de glucose (*Figure 6*). Ainsi, en hypoxie, le glucose à travers la glycolyse permet aux CSMs de continuer à assurer une production énergétique minimale pour maintenir leur survie. En effet, dans l'étude de Deschepper., *et al* (2012) mentionnée précédemment, seules les $CSMs_{MoelleOsseuse}$ cultivées en présence de glucose (5 g/L) ont réussi à maintenir leur survie pendant trois semaines, malgré des conditions de quasi-anoxie (pO_2 = 0,1 %), tandis que celles privées de glucose sont mortes dès la première semaine. Ce résultat a été expliqué par l'emprunt de la glycolyse, observable seulement chez les CSMs cultivées en présence de glucose, qui leur a permis de maintenir leur niveau d'ATP cellulaire stable sur les 3 semaines, contrairement aux CSMs cultivées sans glucose. Dans cette même étude, les CSMs implantées avec du glucose en sous-cutanée[a] chez la souris ont pu survivre plus longtemps que celles implantées sans glucose (50% de survie à J14 contre 15%) [124,125]. Ces résultats ont par la suite été largement confirmés dans d'autres études [140–143]. Outre la production d'énergie, le glucose permet également, par la voie métabolique des pentoses phosphates (*Figure 7. A*), d'assurer les fonctions antioxydantes des CSMs, permettant de contrôler le stress oxydatif intracellulaire, ainsi que d'assurer la production des nucléotides nécessaire à la réparation de l'ADN [144]. Une altération de cette voie entraîne alors une accumulation de radicaux libres pouvant endommager l'ADN, et conduit ultimement à une sénescence ou à la mort cellulaire (apoptose). Enfin, le glucose est également utilisé comme source d'unités glucidiques qui, une fois attachés à des protéines et lipides, forment des glycoprotéines et les glycolipides, soit des macromolécules essentielles impliquées notamment dans la signalisation cellulaire, la reconnaissance immunitaire ou l'adhésion cellulaire [145].

L'impact du manque des autres nutriments. D'autres nutriments sont également importants comme les acides aminés, et en particulier les acides aminés dits « essentiels » (9 parmi les 20 acides aminés existants) qui proviennent exclusivement d'un apport du milieu extracellulaire et qui, à l'inverse des autres, ne peuvent être obtenus par synthèse intracellulaire. Ils permettent la synthèse protéique et jouent donc un rôle majeur dans la plupart des processus cellulaires. Ainsi Li., *et al* (2023) ont montré que la privation d'acides aminés essentiels chez des cellules pré-ostéoblastiques murines (MC3T3-E1), cultivées en normoxie et en présence de glucose, entraînait dès les premiers jours une augmentation du stress oxydatif, une apoptose massive (50 % de mortalité en 72 h) [146], ainsi qu'un arrêt de la prolifération et de la différenciation ostéogénique [147]. Cependant, le taux de glucose restant dans le milieu de culture n'ayant pas été mesuré nous ne pouvons exclure que les effets observés ne proviennent également d'une privation de glucose à la suite de sa consommation totale.

Par ailleurs, plusieurs travaux suggèrent que, parmi les nutriments, le glucose jouerait un rôle prépondérant dans la survie cellulaire, surpassant l'impact de la privation d'autres substrats comme les acides aminés. Ainsi Moya., *et al* (2017) ont cultivé des $CSMs_{MoelleOsseuse}$ en conditions ischémiques (pO_2 = 0,1%, sans glucose ni sérum) et en ajoutant soit de la glutamine soit de la sérine, afin d'étudier la possibilité pour les CSMs d'emprunter d'autres voies métaboliques capables de produire de l'ATP :

[a] Modèle utilisé classiquement pour mimer l'ischémie.

la glutaminolyse et la sérinolyse (*Figure 7. A*). Cependant, seules les CSMs cultivées en présence de glucose ont démontré un taux de survie élevé au bout de 14 jours (≈ 60% de survie en présence de glucose contre 30% pour la supplémentation en glutamine ou en sérine), démontrant ainsi que la glycolyse est la voie privilégiée par les CSMs en anoxie [123]. Cette prédominance du rôle du glucose a aussi été observé en normoxie par Deorosan., *et al* (2011). Pour cela, les auteurs ont étudié l'effet de milieux de culture contenant différentes combinaisons de concentrations de glucose (0,5mM ; 1mM ; 5mM et 25mM) et de sérum (contenant donc du glucose et les autres nutriments – 2%, 5%, 10%) sur la viabilité de CSMs murines. Ils ont observé un nombre plus faible de CSMs apoptotiques pour les deux plus hautes concentrations de glucose en 48h, indépendamment de la concentration en sérum, démontrant ainsi la prédominance du glucose sur la viabilité des CSMs [148].

Les réserves énergétiques. Pour compenser l'absence d'apports extérieurs de nutriments résultant de l'ischémie, les CSMs peuvent mobiliser leurs réserves glycolytiques (glucose interne et le glycogène) et les lipides. Chez les animaux, le glycogène constitue une réserve énergétique facilement mobilisable à travers sa transformation en glucose-6-phosphate (intermédiaire de la glycolyse) par la glycogénolyse (*Figure 7. A*), permettant ainsi la poursuite de la glycolyse en l'absence de glucose exogène[a]. Cependant, les réserves glycolytiques représentent un stock énergétique limité. Ainsi des $CSMs_{MoelleOsseuse}$ cultivées en conditions ischémique (pO_2 = 0,1%, sans glucose ni sérum) ou de proche ischémie (pO_2 = 0,1%, faible concentration en glucose – 0,25g/L, sans sérum) épuisent leur réserve glycolytique respectivement en 24h et 72h [123]. Bien que les lipides permettent un stockage plus efficace de l'énergie que le glycogène, leur utilisation comme source énergétique par la β-oxydation des acides gras nécessite la poursuite de la respiration aérobie pour produire l'ATP et donc la présence d'O_2 (*Figure 7. A*). Les lipides ne peuvent donc être utilisés en milieu ischémique comme source énergétique [149].

L'autophagie. Enfin, en l'absence de nutriments, les CSMs activent parallèlement l'autophagie, qui va permettre de recycler les composants intracellulaires en les isolant dans une vésicule (autophagosome) qui fusionnera ensuite avec un lysosome[b] (autolysosome) où ils seront dégradés par les enzymes lysosomales pour fournir des nutriments de secours et ultimement de l'énergie (*Figure 7. B*). L'autophagie va ainsi permettre aux CSMs d'utiliser les protéines comme source d'acides aminés, et le glycogène et les lipides comme sources d'énergie [150]. Toutefois, l'autophagie peut également entrainer la mort de la cellule, de manière directe, si elle est mal régulée ou devient trop intense en détruisant alors des organites essentiels, ou de manière indirecte en activant d'autres voies de mort cellulaire[c] (ex : apoptose, ferroptose, ou nécroptose) [151].

[a] Extérieur à la cellule.
[b] Organite présente dans la plupart des cellules vivantes et jouant un rôle essentiel dans la digestion intracellulaire de molécules, de microorganismes, de cellules.
[c] Il s'agit ici de 3 types de morts cellulaires programmées. L'apoptose est la forme la plus classique, caractérisée par la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques, qui sont ensuite éliminés sans provoquer d'inflammation. La Ferroptose est déclenchée par une défaillance d'un système cellulaire antioxidant

Ainsi, en cas de privation de nutriments et en particulier de glucose, les CSMs tentent de compenser ce manque par des stratégies adaptatives (utilisation des réserves énergétiques, autophagie) sans pouvoir pour autant maintenir leur viabilité sur du long terme.

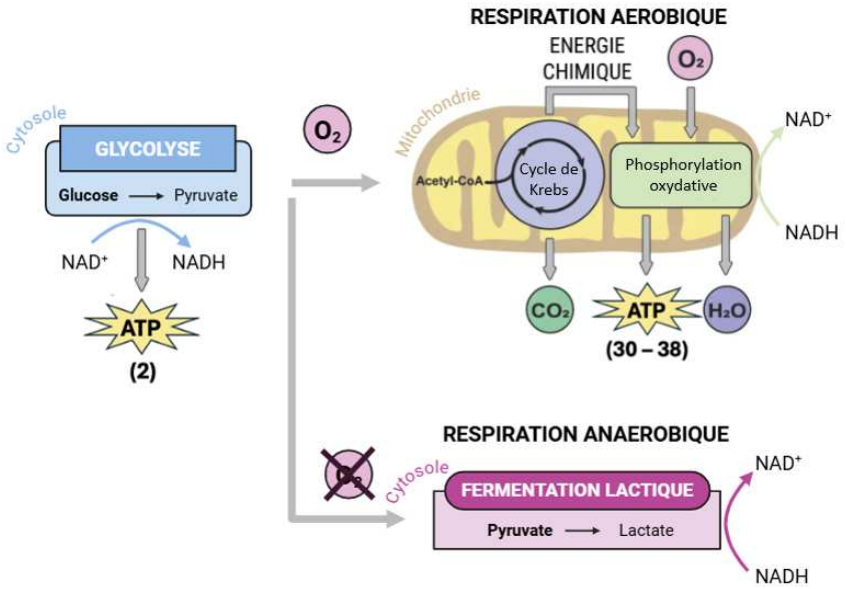


Figure 6. Comparaison entre la respiration aérobique et anaérobique - Image adaptée de la référence [152]. La respiration aérobique est une voie métabolique à haut rendement énergétique (30 à 38 molécules d'ATP produites) qui permet aux cellules de produire de l'énergie sous forme d'ATP à partir de glucose et en présence d'O_2. Elle comprend la glycolyse, qui a lieu dans le cytoplasme de la cellule et transforme le glucose en acide pyruvique/pyruvate. Ce dernier est ensuite acheminé dans les mitochondries, où il subit la décarboxylation pour former de l'acétyl-CoA. Ce composé entre dans le cycle de Krebs, suivi de la phosphorylation oxydative. Ces étapes mitochondriales permettent la production massive d'ATP, en particulier par phosphorylation oxydative. La respiration anaérobique ou glycolyse anaérobique est une voie métabolique à faible rendement énergétique (2 molécules d'ATP produites) qui permet aux cellules de produire de l'énergie sous forme d'ATP en absence d'O_2 et à partir de glucose. Elle partage avec la respiration aérobie la glycolyse en première étape, et est suivie ensuite de la fermentation lactique (transformation de l'acide pyruvique en acide lactique). La glycolyse anaérobie a lieu exclusivement dans le cytoplasme et peut également se produire en présence d'O_2 (on parle alors de glycolyse aérobie ou d'effet Warburg). NAD^+ (nicotinamide adénine dinucléotide) est une coenzyme indispensable à la poursuite de la glycolyse, car elle capte les électrons libérés lors des réactions chimiques. La phosphorylation oxydative et la fermentation lactique permettent toutes les deux de régénérer NAD^+ à partir de sa forme réduite NADH, permettant ainsi à la glycolyse de continuer.

(glutathion peroxydase 4). La necroptose implique, elle, une perte d'intégrité de la membrane, libérant le contenu cellulaire dans l'environnement et provoquant une inflammation.

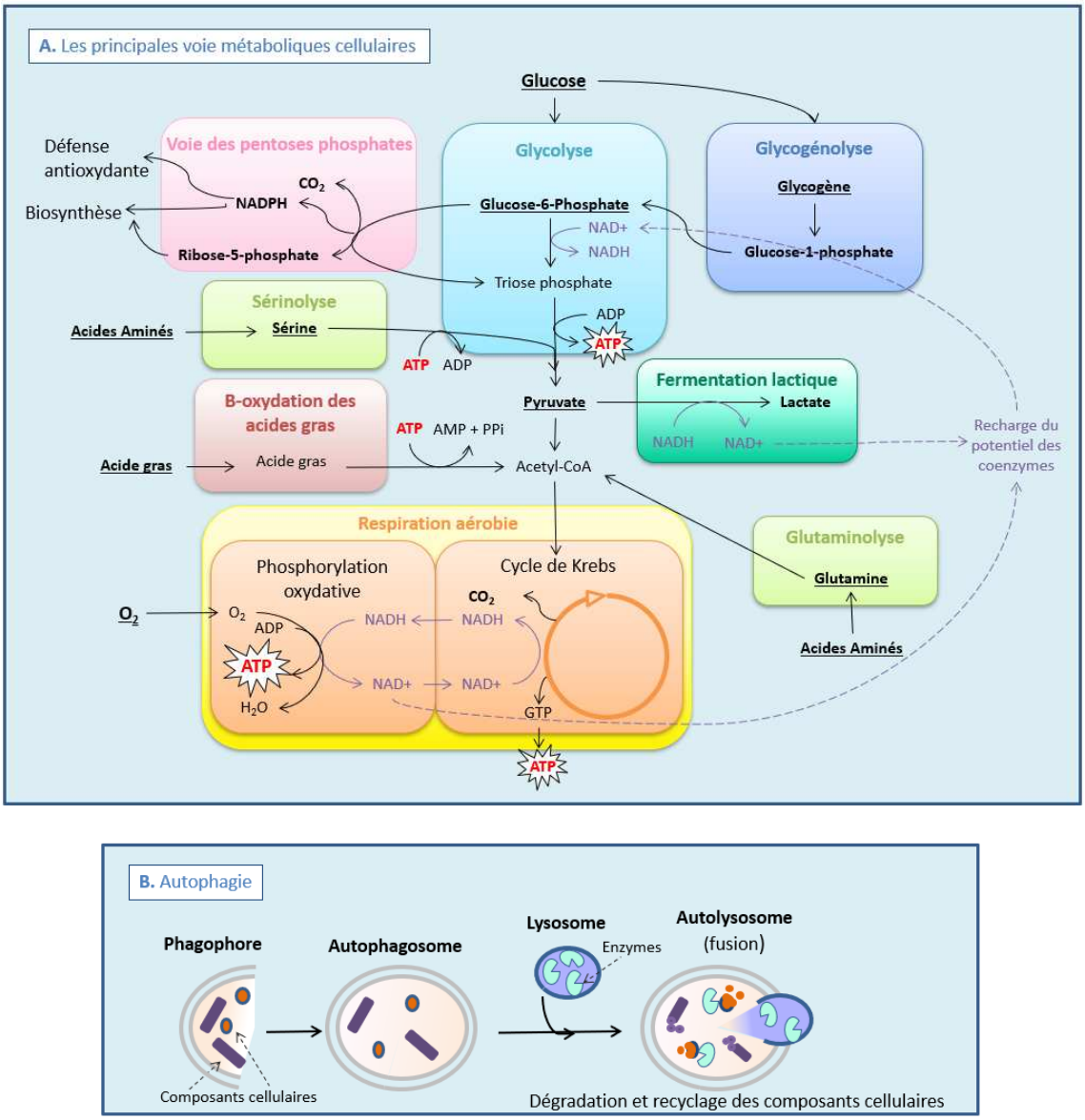


Figure 7. Voies cellulaires permettant la production d'ATP. A. Les voies métaboliques principales (adapté de la thèse *«Développement d'un hydrogel capable d'augmenter la survie et la fonctionnalité des cellules stromales mésenchymateuses transplantées»* de P. Wosinski, 2024 [153]). **B**. Schéma du processus d'autophagie.

II. 2. C. Impact de l'accumulation de déchets métaboliques sur les CSMs

Les processus d'acidification. Sans vascularisation, l'élimination des déchets métaboliques produits par les CSMs ne s'effectue plus que par simple diffusion. Cela entraîne une acidification locale, liée principalement à l'accumulation de protons H^+ produits lors de la glycolyse anaérobie (métabolisme privilégié des CSMs en hypoxie). En effet, au début de la glycolyse deux molécules d'ATP sont consommées pour assurer l'énergie nécessaire à sa mise en place. Lors de la consommation de l'ATP par hydrolyse, un proton est libéré. De même, en fin de glycolyse anaérobie, l'acide lactique formé lors de la fermentation lactique cède un proton afin de subsister sous sa forme basique plus stable (lactate). Cette accumulation d'H^+ va engendrer une acidification intracellulaire, conduisant la cellule

à expulser les protons émis qui acidifieront alors localement le milieu extra-cellulaire. En l'absence d'ATP, l'acidification intracellulaire est aggravée car certains transporteurs permettant l'expulsion d'H^+ (ex : l'échangeur Na^+/ H^+ ou la pompe H^+-ATPase) cessent de fonctionner [154].

Enfin, le dioxyde de carbone (CO_2), produit majoritairement lors de la respiration aérobie, participe également à l'acidification du milieu. En effet sans pouvoir être évacué par la vascularisation, il réagit avec l'eau libérant ainsi un proton selon la formule : $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$ [155]. Cependant, la respiration aérobie étant quasi nulle en milieu ischémique, ce phénomène serait résiduel dans ce contexte.

L'impact de l'acidification. De nombreuses études ont mesuré cette acidification d'origine ischémique. A titre d'exemples, Hagberg (1985) et Nedergaard., *et al* (1991) ont mesuré après 4h d'ischémie induite *in vivo*, une chute du pH extracellulaire de 7,3 à 6,4 dans le muscle gastrocnémien (mollet) chez le lapin [156] et de de 7,2 à 6,6 dans un modèle d'AVC chez le rat [157] ; ainsi qu'une baisse du pH intracellulaire, passant de 7 à 6,6, dans leurs deux modèles respectifs. Cette acidification du milieu impacte directement la viabilité des CSMs. Des études menées sur des CSMs d'origine murine ou humaine (tissu adipeux) cultivées à différents pH (7,4 ; 7,1 ; 6,8 ; 6,5) montrent une augmentation nette de la mortalité cellulaire à mesure que le pH diminue. Après 5 jours de culture, on observe jusqu'à 14 % de cellules apoptotiques à pH 6,8 et 20 % à pH 6,5 [158]. D'autres travaux rapportent jusqu'à 40 à 50 % de cellules apoptotiques et nécrotiques après 6 jours à ces mêmes pH [159].]. En revanche, à plus court terme, cultiver des CSMs issues de moelle osseuse à pH 6,8 pendant 2 jours semble légèrement améliorer leur viabilité [160].

Il faut donc noter que l'acidité requiert plusieurs jours avant d'impacter la viabilité cellulaire, et que ces études de survie ont été menées *in vitro* (et en normoxie) donc en système fermé, contrairement à l'*in vivo* qui permet probablement un rééquilibrage plus rapide du pH. De plus, l'effet de l'acidité semble dépendant du tissu source des CSMs. La 1ère étude a en effet mis en évidence une mortalité des CSMs issues du nucleus pulposus[a] divisée par 2 par rapport aux CSMs issues du tissu adipeux.

II. 3. Quelle stratégie adopter ?

De nombreuses stratégies ont été développées pour tenter d'améliorer la survie des CSMs post-implantation, telles que le pré-conditionnement cellulaire, ou la modification génétique des cellules. Différents pré-conditionnements cellulaires ont été étudiés aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* afin d'adapter les cellules aux conditions hostiles du site d'implantation. Parmi eux, ont été testées : une pré-exposition à une hypoxie (pO_2=0,5%)[161], à des cycles anoxie / réoxygénation [162], à la chaleur (42°C) [163], ou à de faibles doses de molécules cytotoxiques (CO[b], LiCl[c], H_2O_2[d]) [164–166], sans pour autant permettre

[a] Partie centrale du disque vertébral.
[b] Monoxyde de carbone
[c] Chlorure de lithium
[d] Peroxyde d'hydrogène

une viabilité élevée (taux de survie souvent faibles malgré l'amélioration) et sur du long terme (études limitées à quelques heures voire quelques jours). De même, les modifications génétiques visant à surexprimer les voies angiogènes (surexpression de VEGF) [167] ou anti-apoptotiques (surexpression de Bcl-2[a]) [168] ont des résultats limités. Par exemple, dans l'étude menée sur les $CSMs_{MoelleOsseuse}$ de rat surexprimant Bcl-2 dans un modèle murin d'infarctus du myocarde, le taux de survie cellulaire à trois semaines était certes doublé par rapport au groupe de CSMs non-modifiées, mais ne représentait que 3 % des cellules implantées. De plus transplanter des cellules génétiquement modifiées soulève des préoccupations quant au risque tumoral.

Toutefois, ces approches fondées sur le pré-conditionnement des CSMs ou sur leur modification génétique ne s'attaquent pas au problème central de la privation de glucose résultant de l'environnement ischémique. En effet, nous avons établi précédemment, que l'ischémie induisait la mort des CSMs principalement en limitant leur production d'ATP[b], indispensable à leur survie et fonctionnement. Or :

1. L'apport de glucose, même sans dioxygène, permet aux CSMs de continuer à produire de l'ATP via la glycolyse anaérobie.
2. L'hypoxie, à elle seule, n'est pas délétère ; au contraire, son maintien stabilise HIF-1α et accélère la revascularisation.

Partant de ce constat, nous avons choisi de concevoir un dispositif d'apport local et prolongé en glucose, destiné à maintenir les CSMs viables et fonctionnelles jusqu'à ce que la néovascularisation rétablisse, à son tour, l'approvisionnement en nutriments et en O_2, ainsi que l'évacuation des déchets métaboliques.

Le chapitre suivant portera donc sur les dispositifs conçus pour délivrer du glucose ou des intermédiaires glycolytiques[c] (intermédiaires métaboliques utilisés lors de la glycolyse) *in situ.*

[a] B-cell lymphoma 2 (protéine)
[b] L'acidification du milieu, bien que présente, semble en effet jouer un rôle secondaire dans ce processus.
[c] Composés chimiques dérivés du glucose, produits et utilisés au cours de la glycolyse.

CHAPITRE 2. LES SYSTEMES A LIBERATION CONTROLEE DE GLUCOSE ET INTERMEDIAIRES GLYCOLYTIQUES

Malgré son rôle central dans le métabolisme cellulaire, le développement de systèmes de libération contrôlée de glucose a été peu exploré. Cette situation s'explique à la fois par le nombre restreint d'applications médicales actuellement identifiées nécessitant un apport exogène et prolongé en glucose, et par les difficultés techniques liées à leur formulation. En effet, le glucose est une petite molécule non chargée et hautement hydrosoluble, ce qui favorise sa diffusion rapide à travers les tissus environnants et complique ainsi la conception de systèmes capables de piéger et libérer du glucose de façon contrôlée et prolongée dans le temps. De plus, les doses délivrées de glucose ne doivent pas être trop élevées (> 20g/L) afin de pas augmenter la pression osmotique (hyperosmolarité) et devenir cytotoxique pour les cellules. L'hyperosmolarité extracellulaire provoque, en effet, un déséquilibre de pression osmotique de part et d'autre de la membrane cellulaire, ce qui force les cellules à perdre de l'eau par osmose[a], entraînant leur déshydratation, un rétrécissement du volume cellulaire, et ultimement, une perturbation des fonctions cellulaires essentielles pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire.

Ainsi, dans le but de soutenir la survie cellulaire post-implantation en environnement ischémique, notre système de libération de glucose devra remplir 3 objectifs :

1. Assurer une libération continue de glucose sur plusieurs semaines afin de maintenir les cellules en vie jusqu'à la revascularisation du site.
2. Fournir le glucose à des doses physiologiques : suffisantes pour soutenir la consommation cellulaire, mais évitant toute cytotoxicité liée à l'hyperosmolarité.
3. Contenir un stock suffisant de glucose pour permettre une libération soutenue sur la durée souhaitée

Les systèmes actuellement identifiés pour la libération de glucose ou d'intermédiaires métaboliques de la glycolyse seront présentés ci-dessous. Bien que leur objectif principal ne soit pas toujours le maintien de la viabilité cellulaire, chacun de ces systèmes sera analysé quant à sa capacité à satisfaire les exigences exposées ci-dessus. Parmi les exemples recensés, 2 grandes stratégies se distinguent : les systèmes initialement préchargés en glucose et ceux intégrant une étape de production *in situ* de glucose.

[a] Diffusion de l'eau à travers une membrane semi-perméable (qui laisse passer l'eau mais pas le soluté) d'un milieu où la concentration en soluté est faible vers un milieu où elle est élevée. Autrement dit, l'eau se déplace pour équilibrer les concentrations de part et d'autre de la membrane cellulaire.

I. Les systèmes préchargés en glucose

Les systèmes préchargés en glucose intègrent directement le glucose dans leur formulation. L'encapsulation du glucose constitue la méthode la plus couramment employée ; cependant, un exemple basé sur l'administration continue de glucose par perfusion sera également présenté.

I. 1. Systèmes encapsulant le glucose

Classiquement l'encapsulation consiste à piéger un principe actif, ici le glucose, afin de contrôler sa libération. Le glucose peut être soit encapsulé dans un système réservoir, il est alors contenu dans le noyau central entouré d'une couronne, soit encapsulé dans une matrice (hydrophile ou dense), il est alors réparti dans toute la masse. Les principaux systèmes à libération de glucose par encapsulation seront détaillés ci-dessous.

I. 1. a. Glucose encapsulé dans un réservoir

Noyau de glucose entouré d'une couronne d'éthylcellulose. Des granules de glucose ont été développées en enrobant le glucose par une couronne semi-perméable d'éthylcellulose [169–171]. L'objectif est de prévenir les épisodes d'hypoglycémie chez les jeunes patients diabétiques grâce à la prise orale de ces granules. L'hypoglycémie étant souvent liée à un déséquilibre entre la prise de médicaments antidiabétiques (réduction de la glycémie) et l'apport alimentaire (augmentation de la glycémie), ce système vise à libérer le glucose de manière différée pour couvrir les besoins au moment où une chute glycémique est attendue, notamment la nuit ou après une activité physique, lorsque la prise de nourriture est difficile. Dans ce système, la vitesse de libération du glucose est contrôlée en ajustant l'épaisseur de la couronne d'éthylcellulose (représentant 12.5 %, 25 % ou 50 % du poids total des granules) [171]. En augmentant l'épaisseur de la couronne d'éthylcellulose des granules, le délai de libération du glucose est prolongé[a] : une couronne à 25 % retarde la libération de 1h à 2h, tandis qu'une épaisseur de 50 % atteint jusqu'à 6h. Toutefois, cette dernière limite la libération à 50 % du glucose, contrairement aux couronnes plus fines qui assurent une libération complète.

Le système réservoir présente plusieurs avantages par rapport au système matriciel. En encapsulant le glucose sous forme de noyau central, il permet : (i) de stocker une quantité élevée de glucose, généralement supérieure à celle des systèmes matriciels de même volume ; (ii) de limiter le phénomène de libération initiale rapide (burst effect), souvent observé en début de diffusion, grâce à la présence d'une couronne qui sépare physiquement le glucose du milieu extérieur. Toutefois, malgré ces atouts, **la libération complète du glucose est atteinte en moins de 12h** [169–171], ce qui reste trop rapide pour répondre aux besoins d'un maintien prolongé de la viabilité cellulaire après implantation.

[a] Testé sur des granules d'environ 0. 8-1mm de diamètre, à 37°C, dans de l'eau.

I. 1.b. Glucose encapsulé dans un hydrogel (matrice hydrophile)

Définition d'un hydrogel. Un hydrogel est une matrice constituée d'un réseau 3D de polymère hydrophile, capable de piéger les molécules, par exemple de glucose, dans les mailles de sa structure. Les molécules d'intérêt piégées au sein des hydrogels étant majoritairement hydrophiles, leur libération s'effectue principalement par diffusion. Dans notre contexte, le glucose, petite molécule hydrophile, diffuse facilement à travers le réseau de l'hydrogel, dont les mailles sont insuffisamment resserrées pour entraver la diffusion. Le transport est alors gouverné par le gradient de concentration entre l'intérieur de l'hydrogel et le milieu environnant. Cependant, la diffusion seule ne suffit pas toujours à expliquer les profils de libération observés des molécules d'intérêt à partir d'hydrogel. D'autres mécanismes concomitants peuvent intervenir, tels que le gonflement de l'hydrogel (qui modifie sa structure interne), ou des interactions spécifiques entre la molécule d'intérêt et l'hydrogel (liaison covalente, liaison hydrogène), influençant alors la libération du glucose [172]. Nous verrons ici deux hydrogels contenant du glucose (« hydrogel de glucose ») mettant chacun en jeu des mécanismes de libération distincts ou combinés.

Gonflement de l'hydrogel de glucose à base de gomme gellane. Le gonflement d'un hydrogel de glucose influence sa libération, lorsqu'il se produit parallèlement à sa diffusion. C'est le cas des hydrogels à base de gomme gellane, contenant du glucose[173], dont la structure est naturellement enrichie en groupes acylés (R–C(=O)–). Ces groupes, constitués d'un groupement carbonyle (C=O) lié à une chaîne hydrocarbonée (–R), sont greffés sur les chaînes de polysaccharides[a] de la gomme gellane et perturbent leur organisation en réseau 3D. Cette désorganisation réduit la densité de réticulation et conduit l'hydrogel à absorber l'eau, favorisant ainsi son gonflement progressif. Dans ces conditions et en présence d'eau déionisée, la masse de l'hydrogel de gellane, riche en groupes acylés, est multipliée par 4 en 48h, ce qui a pour effet de ralentir la libération du glucose encapsulé. Ainsi, après 2 heures, seulement 40 % du glucose est libéré par l'hydrogel de gellane fortement acylé, contre 60 % pour sa version réalisée à partir de gellane faiblement acylée. L'analyse des cinétiques indique que seul ce dernier suit un mécanisme de diffusion, sans que son absence de gonflement n'ait toutefois été confirmée. A l'inverse, l'hydrogel de gellane fortement acylé perturbe par son gonflement ce mécanisme en allongeant le chemin de diffusion[b] et en réduisant le gradient de diffusion par dilution locale du glucose [174]. Toutefois, le ralentissement observé reste modeste **: la libération complète du glucose est atteinte en 24h**, quel que soit le degré d'acylation. De plus, le gonflement est fortement atténué en présence d'ions, ce qui suggère une moindre influence de ce phénomène dans un contexte *in vivo.*

Glucose lié par liaison covalente avec l'hydrogel. Lier une molécule d'intérêt de manière covalente aux chaînes de polymères de l'hydrogel est une stratégie efficace pour en ralentir sa libération [172].

[a] Polymère constitué de plusieurs unités de sucre
[b] Distance que doit parcourir une molécule de glucose à l'intérieur du gel pour atteindre le milieu environnant.

Cette stratégie a été utilisée pour délivrer du glucose dans le contexte du traitement de l'arthrose. Dans cette approche, du glucose lié par des liaisons covalentes à un hydrogel d'acide hyaluronique, a pu être libéré sous l'action de la β-glucosidase, une enzyme présente dans le liquide synovial des articulations, capable de rompre ces liaisons [175]. L'articulation arthrosique étant localement appauvrie en glucose[a], cette stratégie vise à fournir une source de glucose aux CSMs injectées localement, afin de prolonger leur viabilité et de renforcer leur effet immunomodulateur. Ce système peut toutefois être adapté à d'autres applications, en co-injectant de la β-glucosidase en plus de l'hydrogel et des CSMs. Bien que cette approche ait montré *in vitro* une **libération complète du glucose en 72h**, celle-ci pourrait être ralentie en diminuant la concentration de β-glucosidase, qui n'a été testée qu'à une seule dose (10U/mL) dans l'étude. Par ailleurs, cet apport exogène en glucose a permis d'améliorer la viabilité de $CSMs_{MoelleOSseuse}$ cultivées dans des conditions de privation de glucose pendant 3 jours, comparées aux cellules sans glucose exogène (71% vs 53% de viabilité cellulaire). Cet effet bénéfique reste cependant à nuancer pour des applications en contexte ischémique, car l'expérience a été menée en conditions normoxiques, alors que l'hypoxie entraînerait une consommation accrue de glucose par glycolyse anaérobie.

I. 1. c. Glucose encapsulé dans un ciment (matrice minérale)

Ciment de phosphate de calcium. Dans l'état actuel de nos connaissances, le glucose n'a pas été encapsulé dans des matrices denses comme les ciments à des fins de délivrance contrôlée. Il a toutefois été encapsulé dans des ciments de phosphate de calcium (CCP) pour jouer le rôle d'agent porogène, sa dissolution progressive permettant de créer des pores au sein de la matrice [176]. Dans ces conditions, la libération du glucose, par dissolution puis diffusion, est rapide : **moins de 3 jours** (la libération totale ayant probablement eu lieu avant mais la mesure a été réalisée au 3^{e} jour seulement). Néanmoins, la combinaison du glucose avec le CCP, matériau utilisé en réparation osseuse pour sa composition chimique proche de l'os, présente un certain intérêt en ingénierie tissulaire. En effet, dans le cadre des défauts osseux de taille critique[b], une ischémie locale limite l'efficacité thérapeutique des CSMs implantées. Ainsi, sous réserve de pouvoir prolonger la durée de libération du glucose, le développement d'un système tripartite incluant le CCP (matériau ostéoconducteur[c]), le glucose (prise en compte de l'ischémie locale) et les CSMs, permettrait une stratégie spécifiquement adaptée à la prise en charge des défauts osseux de taille critique par thérapie cellulaire.

---

[a] L'appauvrissement en glucose provient d'une calcification anormale de l'articulation qui réduit localement la diffusion de glucose et donc son approvisionnement.

[b] Un défaut osseux de taille critique est une perte de substance osseuse d'une ampleur telle qu'elle ne peut pas se régénérer spontanément au cours de la vie de l'organisme (en pratique 6 mois), sans intervention thérapeutique.

[c] Matériau qui favorise la croissance osseuse en servant de support aux cellules osseuses et aux vaisseaux sanguins, sans pour autant déclencher, lui-même, la formation osseuse.

I. 2. Système à perfusion de glucose

En parallèle des systèmes à encapsulation de glucose, des systèmes à perfusion de glucose par le biais de pompes implantables ont été développés.

Fonctionnement d'une pompe osmotique de glucose. Une pompe osmotique fonctionne selon le principe suivant : une fois implantée, grâce à un agent osmotique contenu à l'intérieur de la pompe, l'eau du milieu extérieur (ex : tissus ou fluides corporels) diffuse à travers la membrane semi-perméable qui entoure la pompe. Une fois à l'intérieur, cette eau est absorbée par un agent osmotique, ce qui provoque un gonflement du réservoir et génère une pression. Cette pression pousse ensuite le glucose, situé dans un compartiment adjacent, vers l'extérieur de la pompe à travers un orifice.

Étude d'une pompe osmotique de glucose. Des pompes osmotiques de glucose ont été étudiées afin de maintenir la viabilité de cellules neuronales humaines (cellules mésencéphaliques ventrales fœtales) greffées dans un modèle de Parkinson induit chez le rat [177]. En effet, le cœur de la greffe cellulaire étant exposé à une anoxie et à un déficit en glucose, une baisse de près de 80 % de viabilité est observée dès les premières 24 h. Après avoir démontré que ces cellules neuronales pouvaient survivre *in vitro* en anoxie tant que du glucose leur était fourni, des pompes osmotiques de glucose ont été implantées, directement après l'injection de ces cellules, dans le cerveau des rats parkinsoniens. La pompe osmotique était réglée pour délivrer 0,1mg de glucose par jour à 500 000 cellules transplantées. Malheureusement, la viabilité des cellules évaluée *ex vivo* au bout de 7 jours n'a pas été améliorée malgré l'apport de glucose continu par la pompe osmotique. Une explication possible est l'obstruction de la pompe. En effet, bien que les pompes osmotiques permettent, en théorie, une **délivrance continue de glucose sur plusieurs semaines**, ce problème d'obstruction est récurrent pour ce type de pompes implantables. De plus, la quantité de glucose délivrée par jour *in vivo* serait insuffisante. En effet, les résultats *in vitro* de survie en anoxie, extrapolés à 500 000 cellules, montrent qu'un apport de 0,5 mg de glucose en 24 h, soit une dose 5 fois plus élevée que celle délivrée *in vivo,* entraîne une diminution de la viabilité cellulaire de 30%. Cela met en évidence une limite critique liée à la concentration de glucose effectivement injectable. En pratique, une concentration élevée de glucose augmenterait la viscosité de la solution, ce qui ralentirait le débit d'injection et favoriserait une accumulation locale autour de la canule. Cette situation exposerait les cellules voisines à un risque de toxicité, tandis que les cellules plus éloignées pourraient au contraire souffrir d'un déficit d'apport en glucose.

À ce jour, ce sont surtout les pompes électroniques implantables programmables qui sont utilisées en clinique, notamment pour l'administration continue de médicaments contre la spasticité (ex : baclofène dans la moelle épinière) [178], et la douleur chronique (ex : morphine intrathécale) [179], ou encore d'insuline dans certains cas de diabète [180]. Cependant, l'implantation de pompes, osmotiques ou électroniques, implique une intervention chirurgicale invasive, un coût élevé, et des risques associés (infection, dysfonctionnement), ce qui en fait une stratégie de dernier recours rendant la recherche d'autres alternatives nécessaire.

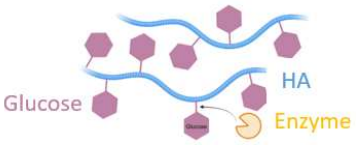
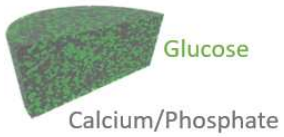
Systèmes préchargés en glucose	Durée de libération de glucose	Effet sur viabilité cellulaire
Granules de glucose enrobées d'une membrane. 	Inférieur à 0,5 jour.	Non testé.
Glucose encapsulé dans hydrogel acylé. 	1 jour.	Non testé.
Hydrogel de glucose lié par liaisons covalentes. 	3 jours.	↗ Viabilité cellulaire *in vitro.* $CSM_{MoelleOsseuse}$ cultivées pendant 3 jours en absence de glucose et à pO_2=21%.
Glucose encapsulé dans ciment de phosphate de calcium. 	Inférieur à 3 jours (car dosage effectué seulement au 3e jour)	Non testé.
Pompe osmotique implantable de glucose. 	Plusieurs semaines en théorie.	Ø Sans effet *in vivo*. Pas d'effet observé en comparaison avec le contrôle négatif à 7 jours post-implantation.

Tableau 5. Résumé des propriétés des systèmes préchargés en glucose par rapport à leur durée de libération de glucose et leur effet sur la viabilité cellulaire.

En conclusion, bien qu'ils n'aient pas tous été initialement conçus à cette fin, les systèmes préchargés en glucose abordés ont montré qu'ils présentaient des limites, notamment une cinétique de libération trop rapide de glucose pour permettre un soutien durable du métabolisme énergétique des cellules greffées (*Tableau 5*). Dans cette optique, le recours à des intermédiaires situés plus en aval dans la glycolyse, tels que le fructose-1,6-biphosphate (FBP), pourrait offrir un rendement énergétique supérieur par molécule. Ce gain en efficacité métabolique pourrait atténuer en partie les limitations des systèmes préchargés en glucose, ce qui justifie l'exploration de la libération contrôlée de FBP, présentée dans la section suivante.

II. Les systèmes préchargés en fructose-1,6-bisphosphate (FBP)

Effet du FBP sur le métabolisme cellulaire. Le fructose-1,6-bisphosphate (FBP) est un intermédiaire central de la glycolyse, situé en aval des premières étapes. Or, ces premières étapes impliquent une consommation de 2 molécules d'ATP pour phosphoryler[a] le glucose. Ainsi, en débutant la glycolyse directement à partir de FBP, ces étapes sont contournées, évitant cette consommation initiale d'ATP. Les étapes suivantes de la glycolyse se déroulant normalement, le rendement énergétique final est alors augmenté. De plus, en court-circuitant partiellement la glycolyse, l'administration exogène de FBP permet, *in vitro*, de réorienter le glucose-6-phosphate (G6P) vers la voie des pentoses phosphates, renforçant ainsi les capacités cellulaires antioxydantes (*Figure 8*).

Hydrogel de FBP. À notre connaissance, seuls des hydrogels à base de FBP ont été testés à ce jour pour leur capacité à augmenter les niveaux d'ATP intracellulaire. Un premier hydrogel (FBP(+)), formé par complexation[b] du FBP avec des ions Cu^{2+}, a permis une **libération de 50 % du FBP encapsulé en 7 jours**, suggérant une libération prolongée au-delà d'une semaine [181]. Son effet métabolique a été évalué *in vitro* en ajoutant les hydrogels FBP(+) ou FBP(-) à des cellules endothéliales issues de la veine ombilicale humaine (HUVEC) cultivées en conditions anoxiques et en présence d'une concentration réduite en glucose[c]. Dans ce modèle, FBP(+) a induit, au bout de 3 jours, une augmentation des réserves intracellulaires d'ATP multipliées par 1,3 par rapport au groupe témoin FBP(-), ce qui s'est traduit par une viabilité cellulaire améliorée. *In vivo*, dans un modèle murin d'ischémie cutanée, l'injection locale de FBP(+) a révélé, après 7 jours, une augmentation de la prolifération des cellules de l'hôte et un effet anti-inflammatoire, illustré par une diminution des espèces réactives de l'oxygène (ROS), par rapport à FBP(-).

Une deuxième formulation d'hydrogel FBP(+)[d] a été développée et testée *in vitro* sur des cardiomyocytes de rat[e] [182]. Contrairement au premier article [181], ce travail n'a pas étudié la cinétique de libération du FBP, mais s'est concentré sur son utilisation métabolique par les cellules, en analysant l'activité d'enzymes[f] clé intervenant dans la glycolyse en aval du FBP (PFK et PK) et dans la voie des pentoses phosphates (G6PDH). En effet, sous stress oxydatif (H_2O_2 pendant 36 h), l'activité de ces enzymes a significativement augmenté 12h après l'ajout de FBP(+), atteignant les niveaux observés chez les cardiomyocytes non stressés, contrairement aux cellules ayant été cultivées avec FBP(-). L'effet était particulièrement marqué chez les enzymes glycolytiques dont l'activité enzymatique a été multipliée par 2 (PFK) ou par 1,5 (PK). De plus, les niveaux intracellulaires d'ATP ont été restaurés uniquement avec FBP(+), suggérant que le FBP libéré a bien été capté et métabolisé par les

[a] Ajout d'un groupement phosphate ($–PO_4^{3-}$)
[b] Réaction chimique permettant la formation d'un complexe de coordination entre un ion métallique et une ou plusieurs molécules appelés ligands.
[c] L'auteur précise que les HUVEC étaient cultivées dans du milieu très concentré en glucose (4.5g/L) en amont de l'expérience mais qu'il l'a remplacé par un milieu à 1g/L afin de mimer les conditions ischémiques *in vitro*.
[d] Dans cet hydrogel le FBP est greffé aux chaines de chitosan, polymérisé avec de la dextrane (propriété anti-inflammatoire), auxquels sont ajoutés des nanoparticules contenant de la baicaline (anti-inflammatoire).
[e] Cellules composant le muscle cardiaque. Les cellules utilisées ici sont les cellules de lignée H9C2.
[f] PFK : phosphofructokinase ; PK : pyruvate kinas ; G6DPH : glucose-6-phosphate déshydrogénase

cardiomyocytes via la glycolyse pour produire de l'énergie. Cependant, *in vivo*, dans un modèle d'infarctus du myocarde, cinq jours après l'injection de FBP(+) chez le rat, l'augmentation des niveaux d'ATP dans les cellules de l'hôte n'était pas significativement différente du groupe témoin FBP(-).

Ces données, résumées dans le *Tableau 6*, montrent un effet positif du FBP sur le métabolisme énergétique des cellules limité à du très court terme *in vitro* (3 jours et 12h). Par ailleurs, le mécanisme d'entrée du FBP dans les cellules demeure encore flou. Bien que son intégration ait été confirmée *in vitro* par marquage radioactif chez les cardiomyocytes [183], elle est probablement moins rapide que celle du glucose. De plus, l'efficacité d'internalisation semble dépendre du type cellulaire : les taux intracellulaires de FBP captés étaient au moins deux fois plus faibles chez les HUVEC, les hépatocytes, les splénocytes et certaines lignées tumorales, comparés aux cardiomyocytes [184]. À noter que la capacité des CSMs à métaboliser le FBP exogène n'a pas encore été explorée.

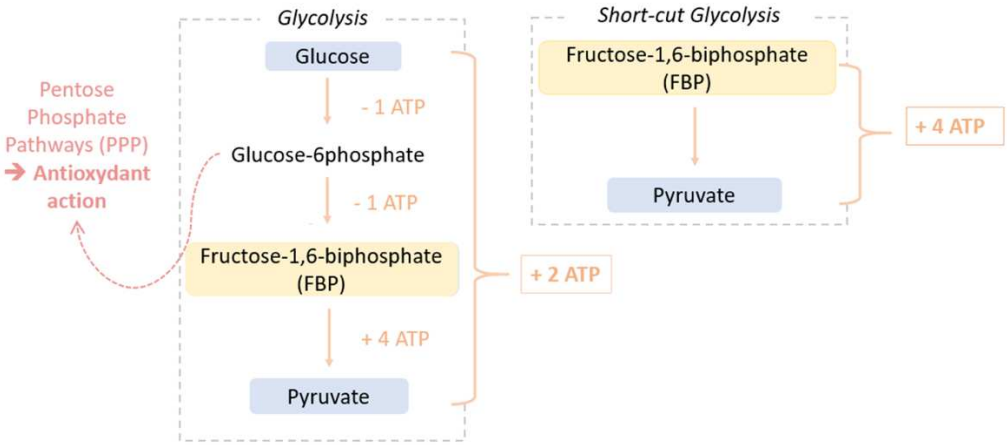


Figure 8. Rendement énergétique de la glycolyse à partir de glucose ou à partir de fructose-1,6-bisphosphate (FBP). À partir d'une molécule de glucose, la glycolyse génère 2 molécules d'ATP, tandis qu'à partir d'une molécule de fructose-1,6-bisphosphate (FBP), elle en produit 4. Par ailleurs, l'administration exogène de FBP permet de réorienter le glucose-6-phosphate (G6P) vers la voie des pentoses phosphates, renforçant ainsi les capacités cellulaires antioxydantes.

Etudes	Durée de libération de glucose	Effet sur le métabolisme cellulaire
Hydrogel de FBP n°1 	Supérieur à 7 jours. 50% de FBP libéré à J7.	↗ Réserves intracellulaires d'ATP + viabilité *in vitro.* HUVEC cultivées sur 3 jours sans glucose et en anoxie. ↗ Prolifération + effet anti-inflammatoire *in vivo.* Cellules étudiées = endogènes après 7 jours d'implantation en modèle murin d'ischémie cutanée.
Hydrogel de FBP n°2 	Non testé.	↗ Réserves intracellulaires d'ATP *in vitro.* Cardiomyocytes cultivés pendant 12h en anoxie. Ø Réserves intracellulaires d'ATP *in vivo.* Cellules étudiées = endogènes après 5 jours d'implantation en modèle murin d'infarctus du myocarde.

Tableau 6. Résumé des propriétés des systèmes pré-chargés de FBP par rapport à leur durée de libération de FBP et leur effet sur le métabolisme cellulaire.

Malgré la promesse d'une glycolyse plus efficace sur le plan énergétique, l'apport de FBP aux cellules n'a entraîné *in vivo* qu'une augmentation limitée des niveaux d'ATP intracellulaire, probablement en raison d'une captation cellulaire moins efficace qu'avec le glucose. Ainsi, pour palier la cinétique de libération trop rapide des systèmes préchargés en glucose et pouvoir permettre un maintien durable de la viabilité des CSMs transplantées en environnement ischémique, des stratégies autres que la libération de fructose doivent être explorées.

III. Les systèmes avec production de glucose *in situ*

Contrairement aux systèmes libérant directement du glucose libre, la libération indirecte de glucose repose sur un mécanisme, doté d'une cinétique propre, permettant la production de glucose *in situ*.

III. 1. Production de glucose par photosynthèse

Production *in vitro* de glucose par les cyanobactéries. Chez les organismes photosynthétiques, dont les cyanobactéries, la photosynthèse convertit l'énergie lumineuse, le CO_2 et l'eau en O_2 et en sucres phosphorylés. Ces sucres, intermédiaires de la glycolyse, sont ensuite utilisés directement pour produire de l'énergie ou stockés sous forme de polymères. Le glucose libre est ainsi rarement synthétisé dans ces organismes. Cependant, une avancée notable a été réalisée grâce à la modification

génétique de la souche de cyanobactérie *Synechococcus elongatus* PCC 7942 [185]. En bloquant[a] l'expression de deux gènes codant pour la glucokinase (enzyme phosphorylant le glucose), une accumulation intracellulaire de glucose a été observée induisant un stress métabolique. Ce stress a ensuite entraîné une mutation spontanée dans un gène codant un transporteur membranaire**,** permettant l'excrétion du glucose hors de la cellule. Sous lumière (200 µmol photons/m²/s) et en présence de 3 % de CO_2, cette souche modifiée **a pu produire jusqu'à 1,6 g/L de glucose en 16 jours à 30 °C**. Une optimisation supplémentaire (mutation[b] additionnelle, milieu 2 fois plus concentré et re-suspension cellulaire[c]) a permis d'atteindre 2,7 g/L à 16 jours, et 5 g/L à **32 jours**. Dans la littérature, d'autres bactéries, cyanobactéries ou non, ont également été modifiées pour produire du glucose, mais avec des rendements moindres [186,187]. Cependant, le passage vers la clinique nécessite un apport d'énergie lumineuse indispensable à la production du glucose sécrété. Cet apport d'énergie lumineuse a été permis par une lumière infra-rouge transcutanée chez le rongeur [188,189], mais son efficacité chez l'humain demeure incertaine en raison de l'épaisseur tissulaire plus importante. De plus, même si l'absence de toxicité aiguë de la souche de cyanobactérie *Synechococcus elongatus* a été démontrée chez le rat [190], les récents progrès permettant de produire du glucose *in vitro* sans cellules, grâce à l'isolement des enzymes responsables de la photosynthèse, laissent envisager que l'on favorisera dans le futur des systèmes photosynthétiques artificiels, plus sûrs et contrôlables, que les cyanobactéries [191].

Enfin, il est intéressant de noter que l'utilisation de cyanobactéries a largement été explorée dans des contextes d'ischémie en tant que système à libération d'O_2 (également par photosynthèse). Elle a été étudiée dans divers modèles ischémiques chez l'animal, tels que des modèles d'infarctus du myocarde [189,192,193] de lésion de la moelle épinière [194], ou encore de plaie diabétique chronique [188], avec des effets notables pour l'infarctus du myocarde possiblement expliqués par l'exposition courte à l'ischémie (temps d'étude court (60 min) ou modèle d'ischémie (45-60 min) / reperfusion). Toutefois, la survie des cyanobactéries n'ayant pas été quantifiée *in vivo*, leur viabilité en contexte d'ischémie demeure inconnue.

Ainsi, la modification génétique de cyanobactéries permet la production de glucose sur des temps compatibles avec notre stratégie d'apport de glucose visant à maintenir la viabilité cellulaire jusqu'à la revascularisation du site ischémié. En outre, même si elle n'a pas été mesurée dans l'étude, il est probable que la mutation n'ait pas entravé la capacité de la cyanobactérie à produire de l'O_2 par photosynthèse. Cette approche permettrait donc non seulement un apport de glucose mais également d'O_2, sous réserve toutefois que la cyanobactérie reste viable et qu'une quantité suffisante d'énergie lumineuse, de CO_2 et d'eau soit disponible.

[a] Méthode du Knock out.
[b] Surexpression de la phosphoglucose mutase qui intervient dans la production de glucose dans le métabolisme du saccharose (voie métabolique dominante dans la sécrétion du glucose par les PCC 7942 modifiées.
[c] Récolte des bactéries et re-suspension dans du milieu de culture frais.

III. 2. Production de glucose à partir d'un polymère de glucose

III. 2. a. Production intracellulaire à partir de glycogène

Une stratégie innovante, basée également sur une modification génétique, vise à conférer aux CSMs la capacité d'accumuler d'importantes réserves de glycogène intracellulaire. Ce polymère ramifié de glucose représente la principale forme de stockage énergétique dans les cellules humaines et animales. Lors de l'ischémie post-implantation, il peut être rapidement dégradé en G6P (forme phosphorylée du glucose), directement utilisable par la glycolyse pour générer de l'ATP. En court-circuitant ainsi l'étape initiale de la glycolyse, habituellement consommatrice d'1 ATP, cette voie métabolique optimise le rendement énergétique, produisant 3 ATP par molécule de G6P contre 2 à partir du glucose libre. L'enjeu est de développer des CSMs « préchargées » en glycogène, capables ainsi de soutenir leur métabolisme glycolytique de manière autonome et donc de survivre dans un environnement dépourvu de nutriments.

Dans ce cadre, des $CSMs_{TissuAdipeux}$ murines ont été transduites par un lentivirus[a] afin de surexprimer une glycogène synthase (GYS), enzyme clé de la conversion du glucose en glycogène [195]. Le gène introduit a été préalablement modifié afin de remplacer certaines sérines de la séquence de l'enzyme GYS par des alanines[b] afin d'empêcher les enzymes kinases endogènes de phosphoryler ces sites et d'inactiver ainsi l'enzyme GYS. Trois jours après la modification des CSMs, les CSM-GYS présentaient une teneur en glycogène intracellulaire 5 fois plus élevée que des CSMs non modifiées. Cultivées en l'absence totale de nutriments, 39% des réserves de glycogène ont été consommés en 48h, permettant un taux de survie de 40% des CSMs-GYS après 72h de culture, contre moins de 10 % de viabilité dès 8 h pour les cellules non modifiées. La forte chute de la viabilité des CSM-GYS est à relativiser par rapport aux autres études de survie présentant des taux de viabilité bien plus élevés (ex : 100% à J3[142], 80% à J14[196]) en conditions similaires (absence de glucose + normoxie). En effet, cette étude-ci a été menée dans des conditions particulièrement sévères par rapport aux autres, car elle utilise une solution de DPBS[c] qui à la différence des milieux de culture classiquement utilisés, est dépourvue de molécules bioactives (acides aminés, protéines, lipides, vitamines, facteurs de croissance, …). Par ailleurs, cette modification génétique n'a pas affecté les capacités de prolifération des CSMs, mais a induit une diminution de leur potentiel de différenciation adipogénique, les différenciations ostéogénique et chondrogénique n'ayant pas été explorées. Enfin, l'efficacité de cette stratégie a été testée *in vivo* dans un modèle murin de fibrose pulmonaire[d]. Sept jours après une administration intra-trachéale, près de 90 % des CSM-GYS étaient encore détectables dans les poumons, contre seulement 20 % pour les CSMs non

[a] Modification génétique stable, obtenue grâce à un virus (lentivirus) qui va insérer le gêne d'intérêt dans l'ADN de la cellule.
[b] Une enzyme étant une protéine, elle est composée d'acides aminés, dont la sérine et l'alanine font partie.
[c] Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline. Solution saline tamponnée (pH 7,4) servant au lavage des cellules et non à leur culture.
[d] La progression de la fibrose pulmonaire entraîne une raréfaction des capillaires, limitant l'apport en oxygène et en nutriments aux cellules locales.

modifiées. Cette meilleure persistance cellulaire s'est traduite par une amélioration significative de la survie : à 20 jours, 80 % des souris traitées avec les CSM-GYS étaient toujours vivantes, contre 50 % dans le groupe recevant les CSMs contrôles et 30 % dans le groupe non traité.

Cette modification génétique permet donc de maintenir des CSMs vivantes après au moins 1 semaine d'implantation en environnement appauvri en glucose et en O_2. Cela la rapproche partiellement de notre cahier des charges fixé en début de chapitre, qui requiert une survie sur plusieurs semaines. Il serait donc intéressant de prolonger l'étude de survie afin de conclure quant à la persistance de cet effet sur la viabilité à long-terme des CSMs. Toutefois, cette méthode reste probablement limitée par la quantité finie de glycogène accumulable en intracellulaire sans induction d'un stress cellulaire délétère. En effet, un gonflement cellulaire (volume augmenté d'environ 1,5 fois) dû à l'accumulation de glycogène a été observé dans cette étude ; le glycogène s'accumulant dans le cytoplasme (localisation physiologique) mais aussi dans le noyau, où il pourrait potentiellement interférer avec l'expression génique.

À l'instar des cellules animales qui stockent leur énergie sous forme de glycogène, les plantes accumulent l'amidon, et les algues brunes, la laminarine. Bien que tous soient des polymères de glucose, ils diffèrent par leurs structures chimiques et la nature de leurs liaisons glycosidiques (*Figure 9*). C'est pourquoi d'autres approches se sont intéressées à ces polymères d'origine végétale ou algale, en les combinant à une enzyme spécifique capable de rompre par hydrolyse[a] les différentes liaisons glycosidiques pour en libérer du glucose.

[a] Lors de l'hydrolyse, une molécule d'eau est utilisée pour rompre une liaison glycosidique, et libérer une molécule de glucose.

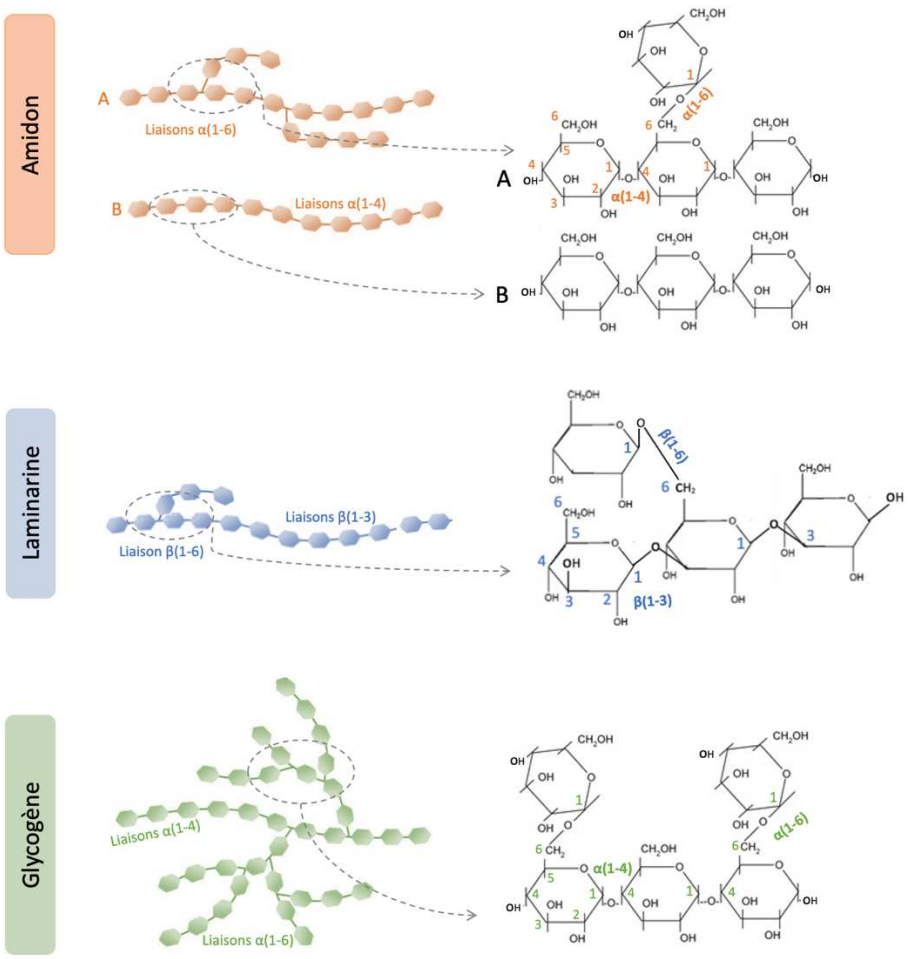


Figure 9. Structures chimiques des polymères de glucose. L'amidon est composé de 2 polymères de glucose : **A**. l'amylopectine, composée d'unités de glucose liées linéairement par liaison α(1-4) et ramifiée en α(1-6), et **B.** l'amylose, polymère linéaire contenant seulement des liaisons α(1-4). La laminarine est, elle, composée d'unités de glucose reliées linéairement par liaison β(1-3) avec très peu de ramifications reliées en β(1-6). Enfin le glycogène est un polymère extrêmement ramifié par des liaisons α(1-6) et contient également des liaisons α(1-4).

III. 2. b. Production extracellulaire à partir d'amidon

Dès les années 2010, le laboratoire B3OA s'est penché sur le développement d'un apport exogène de glucose afin de maintenir la viabilité des CSMs implantées en environnement ischémique. A cet effet, le laboratoire a mis au point un hydrogel nutritif en encapsulant au sein d'un hydrogel de fibrine, de l'amidon de blé et une enzyme, l'amyloglucosidase (AMG) ; la libération de glucose étant assurée par la rupture enzymatique des liaisons glycosidiques de l'amidon. Les différentes composantes ainsi que la preuve de concept de cet hydrogel nutritif seront détaillées au chapitre suivant.

Sur la base de ces travaux menés par le B3OA, deux autres hydrogels nutritifs combinant un polymère de glucose (amidon ou laminarine) avec de l'AMG ont été développés pour favoriser la survie des CSMs transplantées en environnement ischémique. Ils seront abordés dans les paragraphes suivants.

Amidon et AMG encapsulés dans des microgels d'alginate. Le plus récent de ces hydrogels nutritifs associe de l'amidon (origine non précisée) et de l'AMG encapsulés dans des microsphères d'alginate (« microgels »), permettant une **libération progressive de glucose sur 10 jours** [126]. Ces microgels

(Amidon/AMG(+)) ont été ajoutés, ou non (contrôle négatif), à des CSMs humaines cultivées en hypoxie (pO_2 = 1 %) et sans glucose, sauf pour le contrôle positif (CSMs cultivées sans microgels, avec 1 g/L de glucose). Après 7 jours, les réserves cellulaires d'ATP des CSMs en présence d'Amidon/AMG(+) étaient environs 45 fois supérieures à celles du contrôle négatif et seulement 1,2 fois inférieures au contrôle positif. La viabilité cellulaire a également été évaluée et rapportée à celle du contrôle positif : les Amidon/AMG(+) ont permis d'atteindre une viabilité cellulaire d'environ 80 % par rapport au contrôle positif, contre seulement 20 % pour le contrôle négatif. Toutefois, la viabilité étant exprimée en pourcentage du contrôle positif sans préciser le taux de survie absolu, ni le glucose résiduel, une chute de la viabilité cellulaire ne peut être totalement exclue. *In vivo*, les CSMs ont été encapsulées dans un hydrogel de fibrine[a] contenant également les microgels Amidon/AMG(+). L'ensemble a ensuite été placé dans des chambres fermées, composées de 2 membranes filtrantes et d'un anneau de plexiglas, scellés avec un adhésif médical (silicone), afin d'empêcher la colonisation des implants par les cellules endogènes. Elles ont ensuite été implantées par voie sous-cutanée chez des souris pendant 7 jours, puis explantées. Les implants CSMs/Amidon/AMG(+) ont présenté une survie cellulaire 4,5 fois supérieure à celle du contrôle négatif (CSMs sans microgels), bien qu'aucune comparaison n'ait été faite avec le nombre initial de cellules implantées. Un effet pro-angiogène accru a également été observé lorsque les CSMs étaient combinées aux Amidon/AMG(+).

L'intérêt de l'hydrogel d'amidon pour le maintien de la survie cellulaire en conditions ischémiques sur plusieurs semaines est confirmé par sa libération de glucose pendant 10 jours ainsi que par ses effets bénéfiques sur la viabilité cellulaire *in vitro* et *in vivo*. À noter qu'une autre étude utilisant des microsphères d'alginate encapsulant de l'amidon et de l'AMG a rapporté une libération de glucose sur **14 jours** à 25°C [197]

Amidon encapsulé dans un hydrogel double couche. Une autre formulation originale de l'amidon repose sur la conception d'un hydrogel double couche, destiné à des cultures cellulaires *in vitro.* Un premier hydrogel d'agarose contenant 10 % d'amidon de pomme de terre joue le rôle de réservoir, et est recouvert d'un second hydrogel sans amidon, qui forme une barrière de diffusion qui va ralentir la fuite de l'amidon. Lorsqu'il atteint le milieu de culture contenant de l'AMG, l'amidon est dégradé en glucose [198]. Sur les premières 30 heures, la présence de cette barrière de diffusion a réduit de 1,5 fois la fuite de l'amidon, permettant une **libération linéaire et continue de glucose sur 6 jours**. Bien que l'enzyme doive également probablement diffuser à travers les deux hydrogels, l'étude ne précise pas à quel moment un équilibre de diffusion est atteint. Cette approche pourrait sans doute être adaptée à un usage *in vivo* en intégrant l'AMG et les CSMs dans le 2e hydrogel. Toutefois, pour une application en ingénierie tissulaire, il serait préférable de remplacer l'agarose, dont la biodégradabilité est très lente, par un hydrogel plus rapidement dégradable (ex : fibrine, collagène, chitosan) afin de ne pas entraver le remodelage tissulaire.

[a] Protéine jouant un rôle clé dans la coagulation sanguine.

III. 2. c. Production extracellulaire à partir de laminarine

Dans le 2e hydrogel nutritif développé sur la base des travaux du B3OA, l'amidon et la fibrine sont remplacés par de la laminarine, un polymère de glucose, qui par greffage de groupements méthacrylate[a], peut être transformé en hydrogel. A l'instar de l'amidon, du glucose est produit à partir de laminarine par dégradation enzymatique des liaisons glycosidiques.

Dans le but de soutenir la viabilité des CSMs exposées à un environnement ischémique en leur fournissant du glucose, des $CSMs_{CordonOmbilical}$ ont été encapsulées dans un hydrogel de laminarine en présence d'AMG (CSMs/LAM/AMG(+))[196]. En modulant la concentration d'AMG encapsulée (0,7 % ou 2 %), respectivement 20% et 40% du glucose théoriquement disponible ont été libérés par hydrolyse enzymatique, **sur une période de 14 jours**. Cependant, la quantité totale de glucose théoriquement disponible n'étant pas précisée, la quantité correspondante de glucose générée n'est pas connue. Après 2 semaines d'incubation dans du milieu dépourvu de glucose, les CSMs/LAM/AMG(+) ont permis un taux de survie cellulaire supérieur à 80%. En comparaison, après la même durée, les CSMs/LAM/AMG(-) incubés soit avec 1 g/L de glucose (contrôle positif), soit sans glucose (contrôle négatif), ont présenté des taux de survie d'environ 40 % et 20 %, respectivement. Le faible taux de survie observé dans le contrôle positif pourrait indiquer que tout le glucose exogène a été consommé pendant ces 2 semaines, ce qui suggère que les hydrogels LAM/AMG(+) assureraient une libération de glucose supérieure à 1 g/L dans le temps. Par ailleurs, cette expérience de viabilité cellulaire a été menée en conditions normoxiques, ce qui pourrait sous-estimer les besoins en glucose des CSMs en situation d'hypoxie. *In vivo,* la viabilité cellulaire a également été explorée de manière qualitative. Les hydrogels CSMs/LAM/AMG(+) et CSMs/LAM/AMG(-), ont été implantés par voie sous-cutanée chez la souris, puis explantés aux jours 7 et 14 pour procéder au marquage des cellules présentes au cœur des hydrogels. Les CSMs/LAM/AMG(+) semblaient alors héberger un plus grand nombre de cellules vivantes à ces deux temps. Toutefois, l'étude ne distinguait pas les cellules implantées des cellules endogènes ayant infiltré l'hydrogel, et l'absence de données quantitatives ne permet pas de conclure avec certitude sur la capacité réelle du système LAM/AMG à maintenir la viabilité des CSMs *in vivo.*

Malgré ces réserves méthodologiques, ce système présente l'idée ingénieuse d'utiliser les polymères de glucose à la fois comme matrice structurante et comme réservoir de glucose. Néanmoins, la dégradabilité totale de la laminarine reste incertaine : (i) les groupes méthacrylate n'étant pas eux même biodégradables et pouvant gêner (encombrement stérique) l'hydrolyse enzymatique de la laminarine en fonction de leur taux de substitution et (ii) l'AMG étant, en théorie, incapable d'hydrolyser les liaisons β(1-3) et β(1-6) qui composent la laminarine (*Figure 9).*

[a] ($–CH_2=C(CH_3)COO–$)

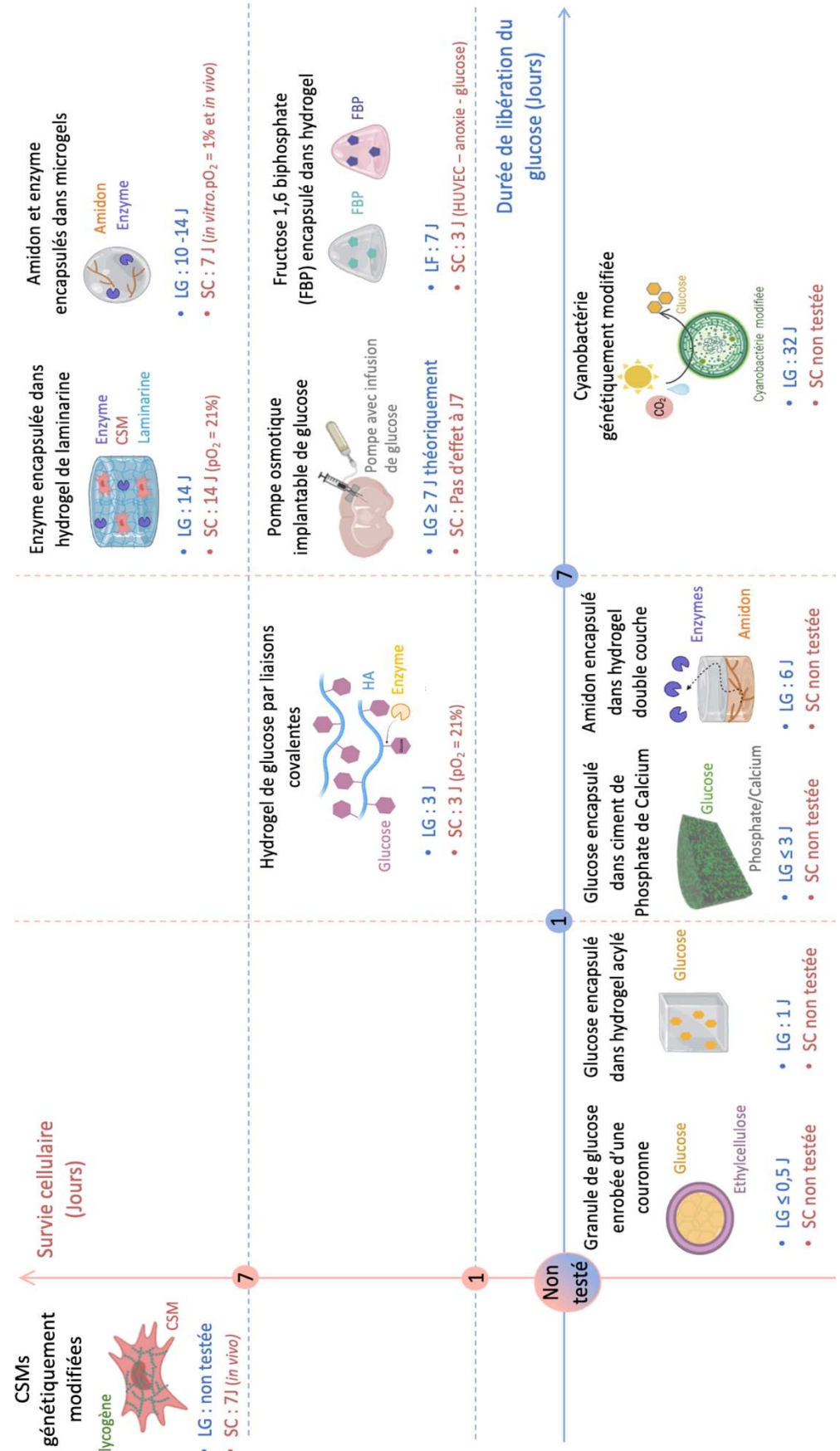


Figure 10. Synthèse des systèmes de libération de glucose, classés selon leur durée de libération (en jours, en abscisses) et la période pendant laquelle ils permettent de maintenir la survie cellulaire (en jours, en ordonnées). LG : durée de libération de glucose. **LF :** durée de libération de FBP. **SC :** durée pendant laquelle le taux de survie cellulaire reste significativement supérieur à celui du contrôle (sans apport exogène de glucose). Sauf indication contraire, les cellules utilisées sont des CSMs humaines.

Ainsi, divers systèmes libérant soit du glucose, soit des intermédiaires glycolytiques (FBP) ont été développés, pour la plupart destinés à des fins autres que le maintien de la survie cellulaire. Cependant, au regard de cette application, aucun dispositif à ce jour ne satisfait pleinement les 3 critères essentiels définis en début de chapitre, permettant un soutien métabolique cellulaire :

1. Assurer une libération continue de glucose (ou d'intermédiaires glycolytiques) sur plusieurs semaines.

2. Fournir le glucose (ou l'intermédiaire glycolytique) à des doses physiologiques.

3. Contenir un stock suffisant de glucose (ou d'intermédiaires glycolytiques) pour permettre une libération soutenue sur la durée souhaitée.

En effet, les systèmes initialement préchargés en glucose, à l'exception des pompes implantables qui sont invasives et donc non-optimales, ont démontré une cinétique de libération de glucose restreinte à quelques jours (1er critère non respecté). La délivrance de l'intermédiaire glycolytique FBP, malgré sa promesse d'un rendement énergétique plus efficace a montré des résultats modestes probablement dus à la captation cellulaire limitée (2^{e} critère non respecté). Si les stratégies intégrant une étape de production *in situ* de glucose permettent une libération prolongée sur plusieurs semaines, elles ne garantissent pourtant pas une survie cellulaire au-delà d'1 semaine (probablement un défaut du 2^{e} et/ou 3^{e} critère). Ces résultats sont résumés, ci-dessus, en *Figure 10*.

Globalement, les systèmes à production de glucose *in situ* semblent les plus adaptés à un soutien métabolique prolongé grâce à leur plus longue durée de libération de glucose, confirmant ainsi le choix fait par le B3OA d'un hydrogel nutritif. La version initiale de ce système sera présentée dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 3. HYDROGEL NUTRITIF A BASE D'AMIDON ET D'ENZYME (AMG)

Comme abordé précédemment, le B3OA a mis en évidence, dès les années 2010, le rôle clé du glucose dans la survie des CSMs exposées à un environnement ischémique [124,125]. Dans ce contexte, un premier hydrogel nutritif a été conçu, permettant de délivrer du glucose grâce à l'hydrolyse enzymatique d'amidon de blé par l'AMG. Dans un premier temps, les composants de cet hydrogel nutritif et son processus de formation seront présentés ; dans un second temps, son efficacité à maintenir la viabilité cellulaire et à préserver le pouvoir paracrine proangiogène des CSMs, ainsi que ses limites seront analysées en condition ischémique.

I. Conception et caractéristiques de l'hydrogel nutritif

Cette section présente les fondements de l'hydrogel nutritif, en détaillant le choix et les caractéristiques des composants (amidon et AMG), ainsi que le mécanisme de formation de la matrice de fibrine.

I. 1. Justification et propriétés du couple amidon / AMG

Choix de l'amidon comme polymère de glucose. L'amidon a été sélectionné parmi les différents polymères de glucose (glycogène, laminarine, cellulose, etc.) en raison de ses caractéristiques favorables : d'origine végétale, il est abondant, facile à extraire, peu coûteux et sa large utilisation dans l'industrie en fait un matériau bien caractérisé et maîtrisé. Par ailleurs, il est déjà couramment utilisé dans le domaine pharmaceutique, sous une forme plus ou moins modifiée, comme excipient de comprimés destinés à la voie orale (ex : Doliprane®, ou Spasfon®)[a].

Composition et dégradabilité de l'amidon. L'amidon est composé de deux polymères de glucose (*Figure 9*) : l'amylose, polymère linéaire qui comprend entre 300 et 3 000 unités de glucose liées par des liaisons α(1-4), et l'amylopectine, un polymère fortement ramifié composé de courtes chaînes latérales (environ 20 unités) rattachées à une chaîne principale, pouvant contenir entre 2 000 et 200 000 unités de glucose. La teneur relative en amylose et amylopectine varie entre les amidons, notamment en fonction de leur origine botanique : par exemple, l'amidon de maïs cireux (waxy en anglais) est presque exclusivement composé d'amylopectine (jusqu'à 100 %), tandis que l'amidon de pois ridé en contient seulement 20 à 30 % [199]. Cette proportion amylose / amylopectine influence la

[a] Informations extraites de la base de données du médicament *Vidal* pour la formulation en comprimé.

dégradabilité enzymatique de l'amidon et la cinétique de libération du glucose, en particulier pour l'amidon gélatinisé[a]. Le choix de la source d'amidon permet ainsi de moduler directement cette cinétique. Pour ce premier prototype d'hydrogel nutritif, un amidon de blé soluble (gélatinisé), composé de 80 % d'amylopectine et de 20 % d'amylose a été utilisé [143].

Choix de l'AMG. L'hydrolyse enzymatique de l'amidon est assurée majoritairement par 4 grandes familles de glycosidases[b], classées selon leur mode de clivage[c] des liaisons glycosidiques (*Figure 11*). Les α-amylases, présentes notamment chez l'homme (salive, pancréas), clivent de manière aléatoire les liaisons α(1-4), produisant principalement des maltodextrines[d]. Les β-amylases, principalement d'origine végétale et fongique, libèrent du maltose[e] en clivant successivement les liaisons α(1-4) à partir de l'extrémité non réductrice[f]. Les glucoamylases ou amyloglucosidases (AMG), issues de microorganismes (champignons, bactéries), hydrolysent à la fois les liaisons α(1-4) à partir de l'extrémité non réductrice et, plus lentement, les liaisons α(1-6) pour libérer du glucose. Enfin, les enzymes débranchantes (comme la pullulanase ou l'isoamylase), produites par certaines bactéries, levures ou plantes, ciblent spécifiquement les liaisons α(1-6) des points de ramification de l'amylopectine.

Les AMG étant les seules enzymes capables de dégrader l'amidon directement en glucose, elles ont été retenues pour intégrer notre système de libération. L'AMG issue du champignon *Aspergillus niger* a été choisie, en raison de son faible coût et de sa disponibilité industrielle (Megazyme ; Wicklow, Irlande), permettant de multiplier les essais à diverses concentrations sans contrainte majeure.

[a] La gélatinisation est le processus par lequel les granules d'amidon, chauffés en présence d'eau, gonflent, perdent leur organisation cristalline et libèrent partiellement les chaînes d'amylose et d'amylopectine. L'amidon gélatinisé est la forme la plus exploitée, car il présente des propriétés absentes à l'état natif (dégradabilité enzymatique accrue, fort pouvoir épaississant et gélifiant, meilleure solubilité).
[b] Classe d'enzymes qui catalysent l'hydrolyse des liaisons glycosidiques dans les sucres complexes.
[c] Désigne l'action de couper une liaison chimique entre deux atomes ou molécules.
[d] Mélange de polymères de glucose obtenu par hydrolyse partielle de l'amidon et contenant entre 2 à une vingtaine d'unités de glucose.
[e] Polymère de glucose contenant 2 unités de glucose
[f] Glucose terminal ne pouvant subir une oxydation et donc accueillir une nouvelle unité de glucose.

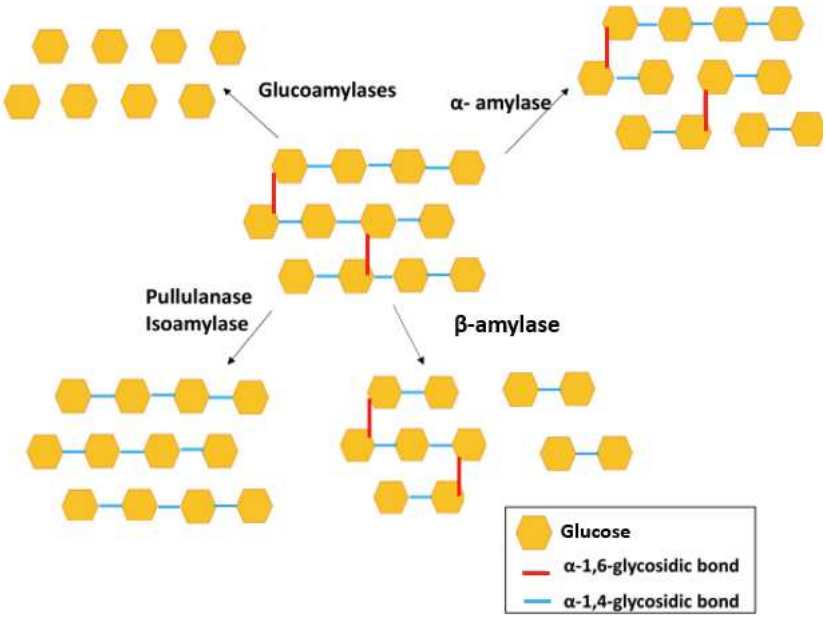


Figure 11. Schéma de l'hydrolyse de l'amidon par différentes enzymes - Image adaptée de la référence [200].

I. 2. Propriétés et mécanisme de formation des hydrogels de fibrine

Propriétés des hydrogels de fibrine. Les hydrogels de fibrine sont largement utilisés en ingénierie tissulaire pour leurs interactions favorables avec les cellules : ils constituent un bon support cellulaire en facilitant l'adhésion, la survie, la migration et la prolifération des cellules [201,202] tout en promouvant l'angiogenèse[204]. De plus, ils sont biodégradables, injectables, et disponibles sous forme de produits de grade clinique (ex : Tisseel®, Artiss® ou Evicel®).

Mécanisme de formation des hydrogels de fibrine. Les hydrogels de fibrine sont constitués d'un réseau tridimensionnel de fibrine dont la formation repose sur la réaction entre 2 protéines clés de la coagulation sanguine : le fibrinogène et la thrombine. Le fibrinogène, est une protéine présente dans le plasma, comptant pour 2 à 3% des protéines présentes dans le sang. C'est le précurseur de la fibrine (*Figure 12*), une protéine fibreuse insoluble qui formera la charpente du caillot sanguin (et de l'hydrogel dans notre cas). Le fibrinogène est constitué de trois paires de chaînes polypeptidiques (Aα, Bβ et γ). Dans sa forme native, les segments N-terminaux[a] des chaînes Aα et Bβ contiennent des résidus d'acides aminés chargés négativement, permettant de repousser par électrostatisme les molécules de fibrinogène entre elles, ce qui empêche leur agrégation spontanée et maintien leur solubilité. Lors de la coagulation (ou de la formation de l'hydrogel), ces segments N-terminaux sont clivés par la thrombine, une enzyme également présente dans le sang. Elle neutralise alors les charges répulsives et expose des sites de liaison spécifiques, déclenchant l'auto-assemblage du fibrinogène en un réseau 3D insoluble de fibrine : l'hydrogel (*Figure 12*). Afin de prolonger la stabilité de cette matrice,

[a] Les chaînes polypeptidiques contiennent des acides aminés, reliés entre eux par des liaisons peptidiques et formant une séquence linéaire. Chaque chaîne possède une extrémité N-terminale, présentant un groupe NH_2, qui marque le début de la chaîne et une extrémité C-terminale, présentant un groupe –COOH, qui marque la fin de la chaîne.

l'aprotinine, une enzyme anti-fibrinolytique, est ajoutée pour inactiver les enzymes endogènes (protéases) responsables de la dégradation de la fibrine.

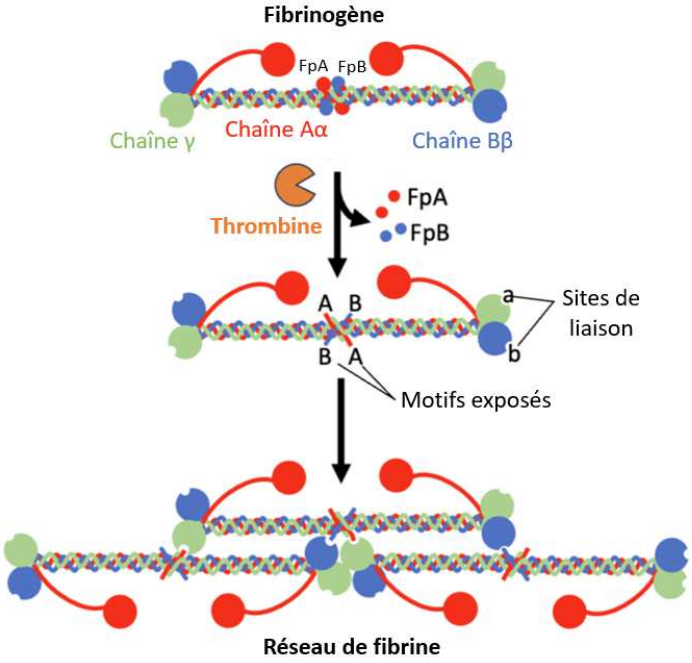


Figure 12. Structure du fibrinogène et schéma de la formation d'un réseau de fibrine - Image adaptée de la référence [203]. Le fibrinogène est constitué de 3 paires de chaînes polypeptidiques (Aα, Bβ et γ). Deux fibrinopeptides A et B (FpA et FpB), riches en acides aminés chargés négativement, sont localisées sur les segments N-terminaux des chaînes Aα et Bβ. Sous l'action de la thrombine, FpA et FpB sont clivées, ce qui expose les motifs A et B. Ces motifs peuvent alors interagir avec des sites de liaison situés aux extrémités C-terminales des chaînes γ et Bβ d'autres molécules de fibrinogène, initiant ainsi la polymérisation et permettant in fine la formation d'un réseau 3D de fibrine.

Dans ce projet l'hydrogel nutritif à base de fibrine et contenant l'amidon de blé et l'AMG a été développé en collaboration avec le laboratoire ERRMECe et a fait l'objet d'un brevet (EP14306700, 2017). Il a été étudié en détail dans l'article de Denoeud., *et al* (2023) [204]. Nous résumerons ici les résultats principaux de cet article.

II. Preuve de concept : maintien et limite de la viabilité des CSM et préservation de leur effet pro-angiogène

II. 1. Rôle clé de l'hydrogel nutritif dans le maintien de la viabilité cellulaire en conditions mimant l'ischémie

Après avoir confirmé la capacité de l'hydrogel nutritif (*Figure 13. A*), composé d'amidon (2% w/v) et d'AMG (2% w/v), à libérer du glucose, son aptitude à supporter la viabilité de $CSMs_{MoelleOsseuse}$ humaines

a été évaluée en conditions mimant l'ischémie (pO2=0,1% - absence de glucose) (*Figure 13*. *B*). Contrairement aux hydrogels supplémentés par 1g/L de glucose (Glc 5,5 mM) ou dépourvus de glucose (Glc free), seul l'hydrogel nutritif (2% amidon/AMG) a permis de maintenir, sur deux semaines, la viabilité des 2×10^5 CSMs inclues en hydrogel (≈ 65 % de cellules vivantes), alors que les autres formulations n'assuraient aucune survie. Le rôle essentiel du glucose a été confirmé par l'ajout d'un inhibiteur de la glycolyse, le 2-Désoxy-D-glucose (2DG). Dans les trois conditions expérimentales, l'addition de 2DG induisait une mortalité cellulaire massive dès le 3e jour, démontrant ainsi l'importance vitale de l'approvisionnement en glucose dans un contexte ischémique (*Figure 13*. *C*).

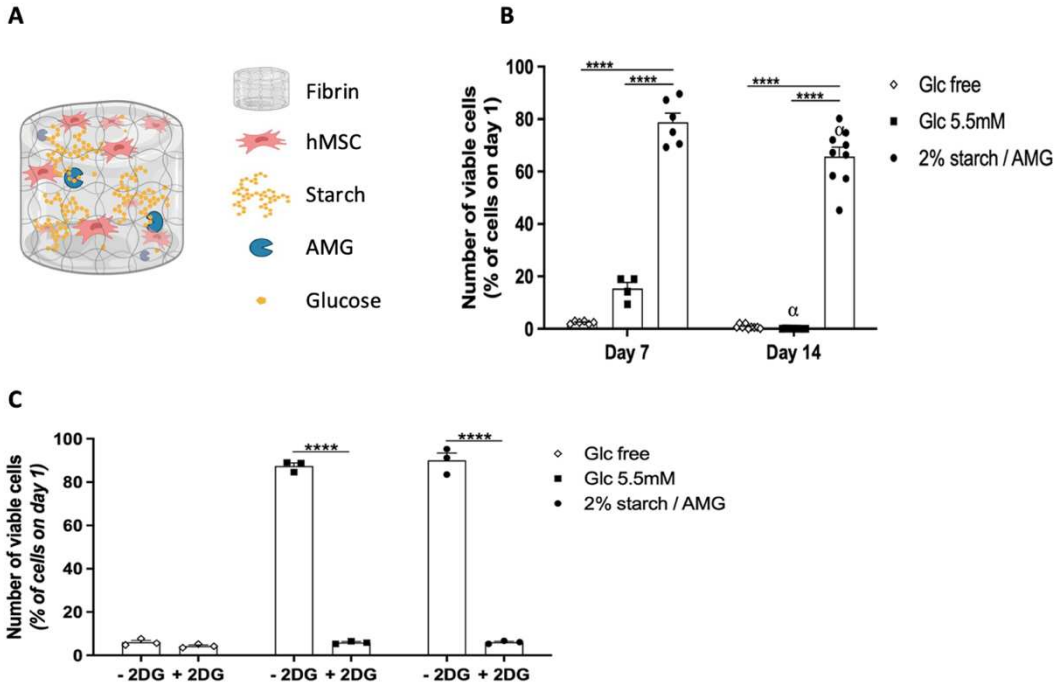


Figure 13. Le glucose produit par l'hydrogel nutritif permet de soutenir la consommation cellulaire et de maintenir leur viabilité dans des conditions mimant l'ischémie. A. Représentation de l'hydrogel nutritif (200µL), formulé à partir d'un réseau de fibrine et contenant les CSMs (2x 10^5), l'amidon et l'AMG (2 % (w/v). **B**. Viabilité à 7 et 14 jours des CSMs ensemencées seules dans des hydrogels (Glc free) ou contenant soit du glucose (Glc 5,5mM), soit de l'amidon et de l'AMG (2% starch/AMG) (*n=4-9*). **C**. Viabilité des CSMs dans les mêmes conditions, en présence ou non de 2DG (*n=3*). Pour les études de viabilité, le nombre de cellules vivantes a été normalisé avec celui du J1. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM (Erreur standard de la moyenne ou Standard Error of the Mean en anglais). Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs, suivie d'un test post-hoc de Tukey. **** : p-value < 0,0001.

II. 2. Maintien et limite de la viabilité des CSMs transplantées

La capacité de l'hydrogel nutritif à maintenir la viabilité des CSMs a ensuite été testée en site sous-cutané chez la souris Nude[a]. Pour cela, les CSMs sont transfectées avec un gène codant pour la

[a] Souris génétiquement modifiée pour être immunodéficiente : elle ne produit pas de lymphocytes T fonctionnels.

luciférase[a] permettant de générer un signal bioluminescent proportionnel au nombre de cellules vivantes [205]. Puis, ces cellules ont été chargées (2 x 10^5 CSMs/hydrogel) dans les 3 mêmes hydrogels que précédemment (*i.e*. 2% starch/AMG, Glc free, et Glc 5,5mM). Après 7 jours, la viabilité des CSMs transplantées dans l'hydrogel 2% starch/AMG atteignait 76,4%, soit une augmentation de 2,8 fois par rapport aux Glc 5,5mM (et de 3,4 fois par rapport aux Glc free), démontrant une capacité de maintien de la survie cellulaire plus importante qu'en hydrogel chargé directement en glucose (*Figure 14. A*). La viabilité décline ensuite sous les 20 % au cours de la semaine suivante.

Des résultats similaires de viabilité cellulaire ont été observés en site sous-cutané sur 7 jours avec des microgels d'alginate contenant également de l'amidon et de l'AMG [126]. Bien qu'il n'y ait pas de seuil fixé par la FDA ou l'EMA, les thérapies cellulaires garantissent, de manière générale, un maintien de la viabilité cellulaire pré-implantation autour de 70 - 80 % [206–208] en vue de leur commercialisation. En considérant ce seuil comme valeur de référence pour assurer une efficacité thérapeutique *in vivo*, la baisse de la viabilité cellulaire observée lors de la 2e semaine et l'absence de temps intermédiaire ne permettent pas à l'hydrogel d'amidon/AMG de vérifier ce critère au-delà des 7 premiers jours.

Parallèlement à ce déclin de la survie cellulaire, le suivi par marquage fluorescent de l'AMG a montré une disparition progressive de l'enzyme, dont la présence n'était plus détectable au-delà du 7e jour post-implantation (*Figure 14. B*). Cette disparition rapide de l'AMG hors du site d'implantation a probablement entrainé une diminution de l'apport en glucose, susceptible d'expliquer la baisse observée de la viabilité des CSMs transplantées. Cette perte pourrait résulter soit de la diffusion de l'AMG hors de l'hydrogel puis du site d'implantation, soit de sa dégradation par des protéases endogènes. L'absence de dégradation de l'AMG observée après un mois d'incubation en présence de CSMs *in vitro*[153] suggère que ces dernières ne sont pas responsables de sa disparition *in vivo*.

Par ailleurs, l'analyse histologique des explants révèle la présence d'amidon résiduel à 21 jours post-implantation (en bleu/violet sur l'image *Figure 14. C*), ce qui suggère une activité enzymatique locale insuffisante, renforçant l'hypothèse de la responsabilité de la disparition de l'AMG dans la survie limitée des cellules transplantées. Alternativement, l'amidon de blé utilisé ayant été préalablement chauffé pour être solubilisé puis conservé à température ambiante ; une rétrogradation partielle (cristallisation) de l'amidon, le rendant moins digestible, pourrait également expliquer cette persistance. Cependant, cette hypothèse a été infirmée dans des conditions *in vitro*[153], ce qui la rend peu probable.

[a] Enzyme, qui en présence de luciférine (apportée par injection locale aux temps désirés), permet l'émission d'un signal bioluminescent. La luciférase utilisée est la Luciférase Firefly (de luciole).

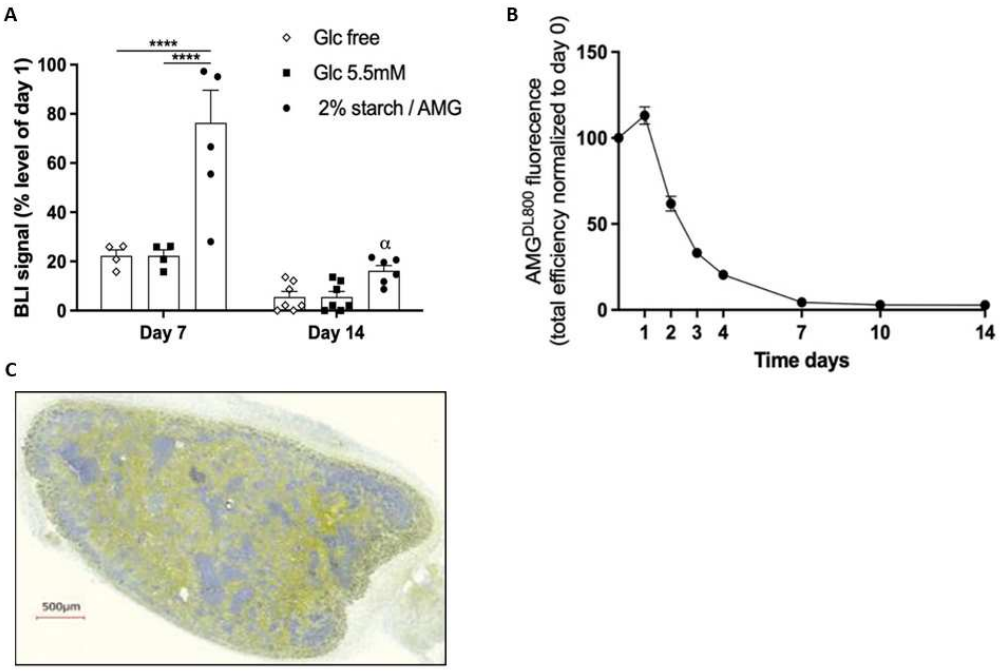
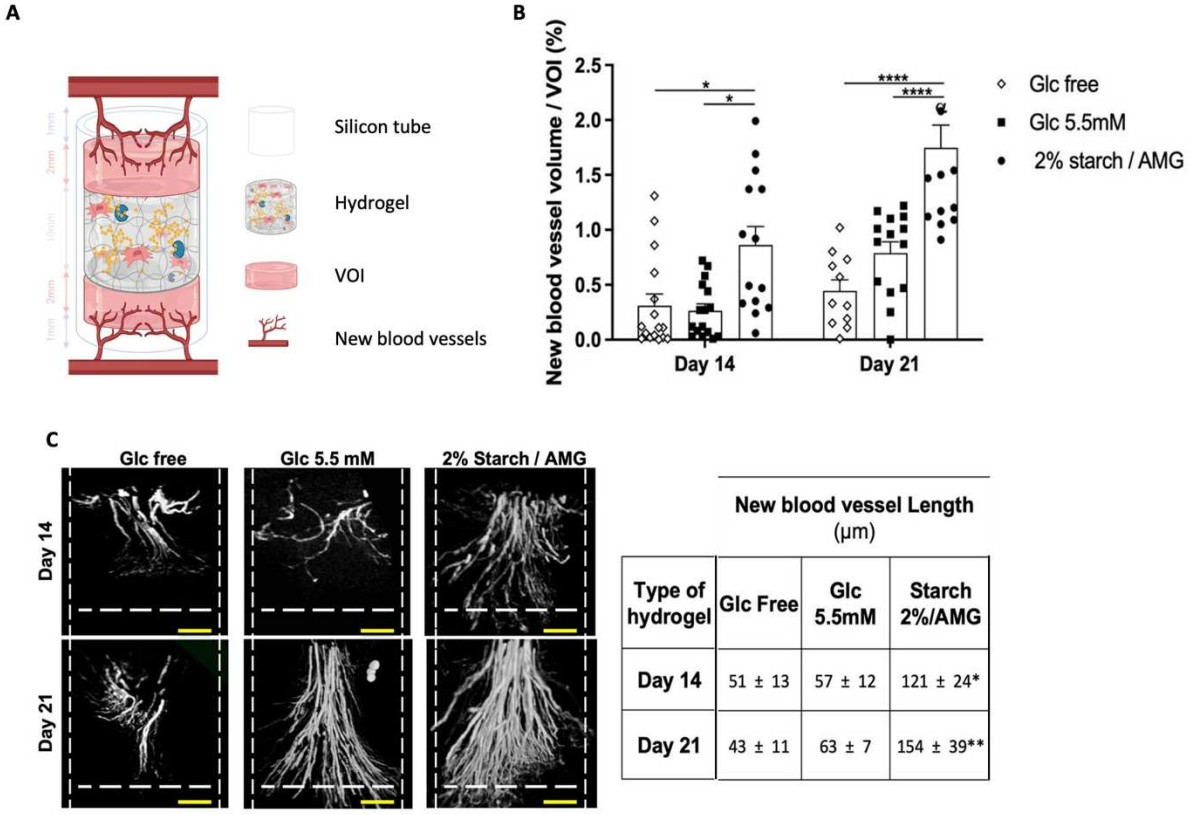


Figure 14. Survie cellulaire limitée à 7 jours in vivo. A. Quantification de la viabilité des CSMs transfectées par suivi du signal bioluminescent à 7 et 14 jours post-implantation. Les CSMs ont été ensemencées seules dans des hydrogels (Glc free) ou contenant soit du glucose (Glc 5,5mM), soit de l'amidon et de l'AMG (2% starch/AMG). La survie a été normalisée avec le signal bioluminescent du J1 (*n=4-7*). **B**. Cinétique de disparition de l'AMG marquée d'un fluorochrome par suivi du signal fluorescent restant sur le site d'implantation. L'efficacité fluorescente a été normalisée avec celle du J0 (*n=6*). **C**. Coupe histologique d'un hydrogel de fibrine contenant 2% d'amidon et d'AMG (w/v), explanté après 14 jours de greffe sous-cutanée dans des souris et colorée au Lugol (marque l'amidon en bleu-violet). Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs, suivie d'un test post-hoc de Tukey. **** : p-value < 0,0001 ; α : p-value < 0,05 par rapport à J7.

II. 3. Préservation des capacités pro-angiogènes des CSMs transplantées

La préservation de la capacité paracrine pro-angiogène des CSMs a également été démontrée *in vivo*. A cet effet, chaque hydrogel cellularisé appartenant aux trois groupes expérimentaux (2% starch/AMG, Glc free, et Glc 5,5mM) a été inséré à l'intérieur d'un tube en silicone, entre deux hydrogels acellulaires (*Figure 15. A*). Après implantation sous-cutanée, les hydrogels 2% amidon/AMG présentaient un volume occupé par les néovaisseaux sanguins respectivement 2,9 fois (J14) et 4 fois (J21) plus élevé que pour les Glc free, et 3,4 fois (J14) et 2,3 fois (J21) plus élevé que pour les Glc 5,5mM (*Figure 15. B*). Bien que le nombre de néovaisseaux formés soit similaire entre les trois conditions, leur longueur moyenne était significativement plus grande avec les hydrogels 2% amidon/AMG, comparativement aux hydrogels Glc free (jusqu'au jour 21) et aux Glc 5,5mM (jusqu'au jour 14) (*Figure 15. C*). L'hydrogel nutritif 2% amidon/AMG préserve donc mieux la capacité pro-angiogène des CSMs qu'un hydrogel Glc free ou Glc 5,5mM.

Ainsi, malgré la mort rapide des CSMs du contrôle négatif (Glc free), une faible néoformation de vaisseaux sanguins a néanmoins été observée. Cette observation corrobore des études récentes, menées *in vitro* et *in vivo,* qui ont montré que les CSMs exerceraient un effet transitoire au moment de leur apoptose, via la libération de vésicules apoptotiques internalisées par les cellules endothéliales. Ces vésicules induiraient alors un effet pro-angiogène, en stimulant la migration, la prolifération et l'organisation des cellules endothéliales en structures vasculaires, bien que les mécanismes sous-jacents demeurent encore mal compris [209–211]. Toutefois, l'effet pro-angiogène étant plus marqué dans la condition présentant le plus haut taux de survie (2% amidon/AMG), cela suggère que la sécrétion de facteurs paracrines par des CSMs vivantes présente un effet pro-angiogène significativement plus important que les CSMs apoptotiques, renforçant ainsi l'intérêt de stratégies visant à prolonger leur survie pour accélérer la revascularisation du site.



	New blood vessel Length (µm)		
Type of hydrogel	Glc Free	Glc 5.5mM	Starch 2%/AMG
Day 14	51 ± 13	57 ± 12	121 ± 24*
Day 21	43 ± 11	63 ± 7	154 ± 39**

Figure 15. Maintien des capacités pro-angiogènes des CSMs *in vivo*. A. Schéma des conditions expérimentales : les hydrogels appartenant aux 3 groupes expérimentaux (2 % starch/AMG, Glc free et Glc 5,5mM) ont été insérés à l'intérieur de tube en silicone, entre deux hydrogels acellulaires (VOI). **B.** Quantification du volume occupé par les néovaisseaux, réalisée à partir de l'analyse d'images acquises par micro-CT, aux jours 14 et 21 post-implantation sous-cutanée chez la souris nude (*n=8*). **C.** Reconstructions 3D des images micro-CT et mesures de la longueur des vaisseaux sanguins observés aux jours 14 et 21 après implantation (*n=8*). Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide d'une ANOVA à deux facteurs, suivie d'un test post-hoc de Tukey. * : p-value < 0,05 ; **** : p-value < 0,0001.

En conclusion, notre laboratoire a développé un hydrogel nutritif associant de l'amidon de blé à une AMG, capable de libérer du glucose par hydrolyse. Ce système maintient les CSMs viables pendant deux semaines *in vitro* dans des conditions simulant l'ischémie, et jusqu'à 7 jours *in vivo*, délai suffisant pour initier la revascularisation. Cependant, la viabilité des CSMs diminue fortement au cours de la deuxième semaine *in vivo*, restreignant ainsi leur potentiel thérapeutique à la première semaine. Une hypothèse avancée par notre équipe pour expliquer cette diminution de la viabilité cellulaire repose sur la disparition progressive de l'AMG du site d'implantation, observée également lors de la première semaine d'implantation.

OBJECTIFS DE LA THESE

Les CSMs présentent un fort potentiel thérapeutique en ingénierie tissulaire grâce à (i) leurs effets paracrines (pro- angiogènes ou anti-inflammatoires), (ii) leur capacité de différenciation (en cellules osseuses, adipeuses ou cartilagineuses) et (iii) leur soutien métabolique aux cellules environnantes par transfert de mitochondries (Chap. 1 : I. 2. c)Leur effet thérapeutique reste cependant limité en raison de leur mort massive et rapide, post-implantation, qui limite leur contribution directe (par différenciation cellulaire) ou indirecte (par transfert de mitochondries ou effet paracrine) à la réparation de la lésion. Cette mort cellulaire résulte de l'exposition des CSMs à un microenvironnement peu ou pas vascularisé (ischémie). En raison de l'appauvrissement local en glucose et en O_2, les CSMs ne peuvent assurer une production d'ATP suffisante pour couvrir leurs besoins énergétiques, compromettant à la fois leur survie et l'accomplissement de leurs fonctions essentielles dans la réparation tissulaire. Or, les études conduites au B3OA ont démontré qu'un apport exogène en glucose dans ces conditions permettait aux CSMs de restaurer leur niveau d'ATP via la glycolyse anaérobie et de maintenir ainsi leur survie (Chap.1 : II.2).

Partant de ce constat, nous avons choisi de concevoir un dispositif d'apport local, contrôlé et prolongé en glucose, destiné à maintenir les CSMs viables et fonctionnelles jusqu'à ce que la néovascularisation rétablisse, à son tour, l'approvisionnement en nutriments et en O_2, ainsi que l'évacuation des déchets métaboliques. Le développement de tels dispositifs de libération reste un défi. En effet, le glucose étant très hydrophile, sa diffusion est rapide, ce qui complique le contrôle de sa biodisponibilité. Il peut également devenir toxique lorsqu'il est présent en trop forte concentration localement [212].

Dans la littérature, les systèmes à libération contrôlée de glucose sont conçus selon deux grandes approches : les systèmes préchargés en glucose et ceux capables d'en produire directement *in situ* (Chap. 2). Au laboratoire, mes prédécesseurs ont choisi de développer un système à libération de glucose incluant une étape de production de glucose *in situ* à partir d'un polymère de glucose et d'AMG capable de l'hydrolyser en glucose. Pour cela, de l'amidon de blé et de l'AMG ont été incorporés dans un hydrogel de fibrine (Chap. 3). Par comparaison avec un hydrogel directement chargé en glucose, l'apport indirect de glucose à partir de ce système a permis (i) de maintenir la viabilité des CSMs jusqu'à 7 jours après leur implantation sous-cutanée (76% de survie) et (ii) d'augmenter significativement l'angiogenèse. Cependant, à l'instar de la littérature, la viabilité cellulaire n'a pu être maintenue à un taux suffisant au-delà de 7 jours. De façon surprenante, l'analyse de la persistance de l'AMG *in vivo* à l'aide d'AMG fluorescente a révélé sa disparition progressive et complète du site d'implantation au cours de la première semaine [143].

Ainsi, nous posons l'hypothèse que la baisse de viabilité observée découle principalement de l'arrêt de la production *in situ* de glucose, conséquence directe de la disparition précoce de l'AMG au site

d'implantation. Ce scénario est étayé par la présence d'amidon résiduel non dégradé dans les explants à 21 jours post-implantation. Dès lors, prolonger la présence d'AMG active *in vivo,* tout en garantissant un réservoir d'amidon suffisant, constitue la stratégie centrale retenue pour maintenir un apport durable en glucose aux CSMs transplantées jusqu'à la revascularisation de la lésion. C'est précisément dans cette perspective que s'inscrit le présent travail de thèse articulé autour de trois objectifs :

1. **Optimiser la formulation de l'amidon** afin de **garantir un stock d'amidon suffisant** permettant de couvrir les besoins énergétiques des CSMs transplantées pendant 3 semaines.

2. **Encapsuler l'AMG dans des microsphères de copolymère (PLGA/Poloxamère 188)**, permettant une libération contrôlée de l'enzyme au cours du temps, afin d'**obtenir une meilleure persistance de l'AMG au niveau du site d'implantation**. Pour cela, nous avons **mis au point une méthode de dosage de l'activité AMG plus sensible** que le kit commercial.

3. **Évaluer l'impact de ces nouvelles formulations d'amidon et d'AMG sur la survie des CSMs *in vivo*,** en sous-cutané (modèle ischémique).

Tout au long de la thèse, les CSMs utilisées seront issues de moelle osseuse humaine.

CHAPITRE 4. OPTIMISATION D'UNE NOUVELLE FORMULATION DE L'AMIDON

Introduction.

L'hydrogel nutritif développé par le laboratoire B3OA a permis d'assurer le maintien de la viabilité des CSMs à un taux supérieur à 70 % sur 7 jours. Cependant, cette durée reste insuffisante, car la différenciation cellulaire *in vivo* s'établit sur plusieurs semaines, voire plusieurs mois. Par exemple les différenciations ostéogénique et chondrogénique requièrent, entre 1 à 2 semaines pour les premiers marqueurs de différenciation [213,214], et de 1 à plusieurs mois pour la formation d'une matrice mature (minéralisée [215] ou présence de chondrocytes [214]). Ainsi, il apparait clairement que prolonger la survie des CSMs au-delà de la 1ère semaine d'implantation leur permettrait de se différencier et de contribuer directement à la réparation de la lésion. De plus, la présence de néovaisseaux sanguins observés jusqu'à 21 jours, suggère qu'une prolongation de la survie permettrait non seulement d'augmenter l'effet proangiogène, mais également de maintenir les néovaisseaux et éviter leur « possible » régression. En effet, une phase de régression des vaisseaux néoformés est souvent observée dans les études de revascularisation, notamment à cause de l'arrêt de l'émission de signaux pro-angiogènes (VEGF, PDGF) [216], résultant, dans notre cas, de la mort des CSMs. Ainsi, en accord avec l'étude précédente de néovascularisation, **nous nous sommes fixés comme objectif de prolonger la survie des CSMs sur au moins 21 jours.**

Pour atteindre cet objectif, il est indispensable d'anticiper leurs besoins énergétiques en glucose. Ainsi, pour estimer la quantité de glucose nécessaire au maintien de la consommation cellulaire sur 21 jours, nous nous sommes appuyés sur 3 études *in vitro* [123,124] menées en conditions de proche-anoxie et résumées dans le *Tableau 7*. Wosinski., *et al* (2024)[153], a montré que la consommation de glucose par les cellules augmentait avec la concentration initiale en glucose. Nous nous sommes donc basés sur la consommation cellulaire mesurée pour une concentration initiale de glucose de 1 g/L, correspondant à la glycémie physiologique. Nous avons ainsi retenu l'ordre de grandeur moyen des 3 études, soit une consommation de **10 pmol de glucose/CSMs/jour**. L'hydrogel nutritif élaboré au laboratoire servant de support pour 2 x 10^5 CSMs, un apport d'environ **8 mg de glucose, et donc d'amidon**[a] (*Equation 1 p.*68) est requis pour couvrir la consommation cellulaire sur 21 jours dans ces conditions.

Cette estimation met en évidence un défi majeur : celui des réserves limitées en amidon**.** L'hydrogel nutritif, dans sa version présentée précédemment, contient 4 mg d'amidon (2% w/v), soit seulement la moitié des 8 mg nécessaires pour couvrir les besoins énergétiques de 2 x 10^5 CSMs exposées à une

[a] 1mg de glucose correspond environ à 1mg d'amidon.

ischémie sur 21 jours. Cependant, l'amidon de blé, utilisé sous forme soluble, ne peut pas être incorporé à des concentrations plus élevées. En effet, atteindre une teneur de 4 % (w/v) en amidon dans l'hydrogel exigerait une solution mère à 8 % (w/v), dont la viscosité élevée est telle que le pipetage en devient imprécis et peu reproductible, rendant son incorporation dans l'hydrogel de fibrine techniquement irréalisable.

Auteur	**Origine des CSMs**	**pO_2 – Glucose**	**Conditions de culture cellulaire**	**Consommation cellulaire en glucose (pmol/jour/CSM)**	**Stock d'amidon (mg) correspondant pour 2 x 10^5 CSMs et 21 jours**
Deschepper., *et al* [124]	Mouton – Moelle osseuse	1 % – 1 g/L	2D – 10^4 CSMs – 3 jours	5	3,8
Moya., *et al* [123]	Humaines – Moelle osseuse	0,1 % – 1 g/L	2D – 2 x 10^4 CSMs – 7 jours	12	9,1
Wosinski., *et al* [153]	Humaines – Moelle osseuse	0,1 % – 1 g/L	3D (hydrogel) – 10^5 CSMs – 7 jours	9	6,8
Valeur retenue (ordre de grandeur)				**10**	**7,6**

Tableau 7. Paramètres expérimentaux et consommation des CSMs en glucose extraits de 3 études conduites en hypoxie. La 2e colonne décrit l'origine des CSMs utilisées, la 3e détaille la pO_2 et la concentration initiale en glucose, et la 4e indique les conditions de culture cellulaire (2D vs 3D, densité cellulaire et temps de culture). La 5e colonne résume le taux journalier moyen de la consommation de glucose par cellule et la 6e en tire le stock correspondant d'amidon pour 200 000 CSMs sur 21 jours. La dernière ligne correspond aux valeurs retenues.

Pour contourner cette limite, nous avons envisagé dans le cadre de l'*ANR-20-CE19-0002* une nouvelle formulation de l'amidon sous forme de mousse, se présentant comme un bloc poreux (*Figure 16*). L'objectif est d'utiliser directement ces blocs de mousse d'amidon, comme support, en remplacement de l'hydrogel. Les CSMs pourraient ainsi adhérer à leur surface tandis que l'AMG, encapsulée en amont dans des microsphères, serait piégée au sein de leurs pores. Un tel support, uniquement composé d'amidon, offre des réserves élevées de glucose (> 8 mg) permettant de réduire la contrainte liée aux besoins énergétiques cellulaires. Toutefois, sa biodégradabilité est déterminante : elle conditionne à la fois la libération progressive de l'amidon, garantissant la disponibilité en glucose, et sa disparition complète, indispensable pour ne pas entraver la réparation tissulaire.

Ainsi, ce chapitre explore donc la stratégie consistant à utiliser des mousses d'amidon comme support pour les CSMs transplantées. Pour ce faire, des mousses issues de différentes origines botaniques et présentant des ratios amylose/amylopectine variés, ont été produites par extrusion par le laboratoire *Biopolymers, Interactions & Assemblies* (BIA - INRAE, UR 1268). Leur dégradabilité ainsi que leur capacité à favoriser l'adhésion cellulaire ont été évaluées. Les résultats décevants obtenus avec les blocs de mousse d'amidon ont conduit à privilégier une autre approche : l'utilisation de particules de mousses d'amidon, obtenues par cryobroyage et incorporées en hydrogel de fibrine. Le chapitre sera

donc structuré en deux parties : (i) l'évaluation des mousses d'amidon sous forme de blocs et (ii) l'évaluation des mousses sous forme de particules.

I. Matériels & Méthodes

Sauf indication contraire, tous les réactifs ont été fournis par Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France).

Production de blocs de mousses d'amidon. Six mousses d'amidon de composition et d'origine botanique différente (*Tableau 8* et *Figure 16*) ont été fabriquées sous forme de bloc poreux par l'équipe de Denis Lourdin du laboratoire *Biopolymers, Interactions & Assemblies* (BIA), INRAE, UR 1268 : (i) Maïs_70, (ii) Maïs_47, (iii) Maïs_23, (iv) Maïs_01, (v) Pdt_20, et (vi) Pdt_05, composées respectivement à 70%, 47%, 23%, 1%, 20% et à moins de 5% d'amylose. Elles ont été obtenues par extrusion, dont la procédure et les paramètres utilisés sont respectivement décrits dans les articles [217,218]. Brièvement, un mélange d'amidon et d'eau est chauffé à haute température (110°C) dans l'extrudeuse, où il subit une forte pression ainsi qu'un cisaillement intense, puis est expulsé à travers une filière (respectivement 56mm et 25mm de diamètre pour les mousses d'amidon de maïs et de pomme de terre). En sortie de filière, le retour brutal à la pression atmosphérique provoque la dilatation des mousses ainsi que la formation de leur porosité, due à l'évaporation de l'eau piégée dans le mélange amidonné. Les mousses se solidifient ensuite en refroidissant à température ambiante. Les teneurs en amylose des différents amidons (*Tableau 8*) ont été évaluées par calorimétrie différentielle à balayage [218].

Mousses d'amidon	**Maïs_70**	**Maïs_47**	**Maïs_23**	**Maïs_01**	**Pdt_20**	**Pdt_05**
Source botanique	Maïs	Maïs	Maïs	Maïs	Pomme de terre	Pomme de terre
Amylose (%) : Amylopectine (%)	70 : 30	47 : 53	23 : 77	1 : 99	20 : 80	< 5 : > 95

Tableau 8. Source botanique et composition en amylose / amylopectine des mousses d'amidon.

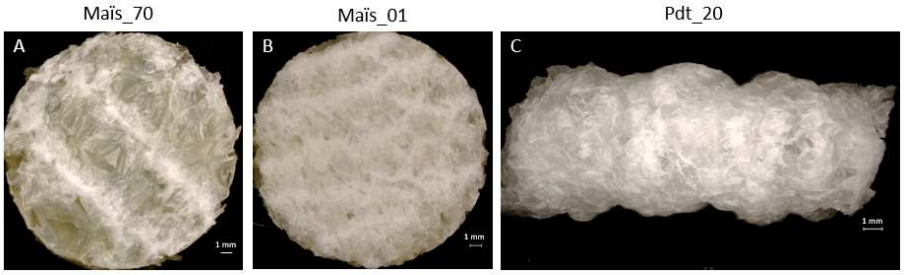


Figure 16. Exemples de mousses d'amidon observées au microscope optique. A. Mousse de maïs à 70 % d'amylose (Maïs_70). **B**. Mousse de maïs à 1 % d'amylose (Maïs_01). **C**. Mousse de pomme de terre à 20 % d'amylose (Pdt_20). Échelle : 1 mm.

Production de particules de mousses d'amidon. Le cryobroyage des blocs de mousses d'amidon Pdt_20 et Pdt_05 a été réalisé par le laboratoire BIA, conduisant à l'obtention des particules d'amidon extrudé Pdt_20_cb et Pdt_05_cb.

Évaluation de l'adhésion cellulaire des CSMs sur les blocs de mousses d'amidon. Les CSMs humaines ont été obtenues à partir de la moelle osseuse de 3 donneurs. Brièvement, les CSMs de chaque donneur ont été cultivées séparément jusqu'au passage 4 ou 5, dans des conditions standards (pO_2 = 21 %, pCO_2 = 5 %, 37 °C), puis regroupées en proportions équivalentes pour obtenir une suspension cellulaire à une concentration de 1×10^6 cellules/mL. La suspension cellulaire a été marquée à l'aide des colorants fluorescents CellTracker™ Orange CMTMR[a] (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), pour visualiser les cellules vivantes, et DAPI[b] (4',6-diamidino-2-phénylindole, 2HCl), pour identifier les cellules mortes. 100 µL de cette suspension ont été déposés sur chacune des 4 faces des blocs de mousses d'amidon (*n=3*), avant incubation à 37°C. Le processus d'adhésion cellulaire a été observée sur 24h par microscopie confocale (LSM 800, ZEISS ; Göttingen, Allemagne), en suivant la morphologie des cellules (*Figure 17*). L'évaluation de l'adhésion des CSMs cultivées dans des puits classiques de culture (10^5 CSMs/puit) a servi de contrôle positif.

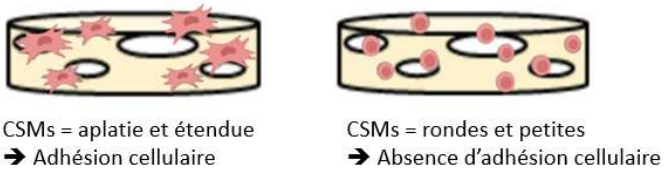


Figure 17. Schéma explicatif du changement de morphologie des CSMs en fonction de leur adhésion à un support.

Étude de la dégradabilité des blocs de mousses d'amidon. L'AMG (EC 3. 2. 1. 3) utilisée est issue de la souche *Aspergillus niger* (Neogen Megazyme ; Lansing, USA). L'étude de dégradation des mousses a été conduite par Anaïs Lescher (BIA - INRAE, UR 1268) dans le cadre de sa thèse et décrite dans l'article [218]. En résumé, une solution d'AMG à 1,3 mg/mL a été obtenue par dissolution de l'enzyme dans de l'EBSS[c] (Earle's Balanced Salt Solution, fabriquée sans dextrose, pH 7,6). Les 6 mousses d'amidon (*n=3*) ont été immergées dans 4 mL de cette solution d'AMG, puis incubées à 37°C. Aux temps voulus, 15 µL de surnageant ont été prélevés afin d'y doser le glucose par la méthode DNS[d] (acide 3,5-dinitrosalycilique) [219]. Le pourcentage d'amidon hydrolysé a ensuite été calculé (*Equation 1*).

$$Amidon\ hydrolysé\ (\%) = \frac{Masse\ de\ glucose\ libéré \times 0.9}{Masse\ initiale\ d'amidon - \ teneur\ en\ eau} \times 100$$

[a] Marque le cytoplasme des cellules vivantes. Après avoir traversé la membrane cytoplasmique, il diffuse dans le cytoplasme où il se retrouve piégé une fois activé par des enzymes (les estérases cytoplasmiques).
[b] Marque l'ADN. Il traverse difficilement la membrane cytoplasmique.
[c] Solution tampon servant généralement pour le rinçage, et le transport de cellules.
[d] Le glucose réduit le DNS en un composé coloré dont l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie (généralement à 540 nm). L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en glucose (et en tout autre sucre réducteur qui pourrait être présent).

Equation 1. Calcul du pourcentage d'amidon hydrolysé à partir de la mesure du glucose libéré lors de l'hydrolyse enzymatique. Le glucose libéré est multiplié par 0,9 afin de correspondre au glucose anhydre (glucose sous forme liée) présent dans l'amidon.

Préparation des hydrogels fibrine/amidon. Les hydrogels (200 µL) ont été préparés dans des bouchons de tubes Eppendorf® de 1,5 mL tapissés de Parafilm® afin de rendre le support hydrophobe. Le détail des concentrations est donné au Chap. 6. Pour les hydrogels de fibrine seuls, la préparation débutait par l'ajout de 82 µL d'une solution de fibrinogène (Merck, Darmstadt, Germany). Sous agitation mécanique (750rpm), une seconde solution (118 µL), composée de thrombine, d'aprotinine, de sels (NaCl + $CaCl_2$) et, le cas échéant, de CSMs (2×10^5 cellules/hydrogel), était ensuite ajoutée. L'agitation se poursuivait pendant 1min supplémentaire, puis, les mélanges étaient incubés à 37 °C pendant 1 h 30 sous atmosphère humide afin de permettre la polymérisation.

Pour les hydrogels fibrine/amidon, le protocole était identique, à l'exception d'un dépôt préalable de 8 mg de particules Pdt_20_cb ou Pdt_05_cb dans les bouchons avant l'ajout de la solution de fibrinogène.

Évaluation du taux de rétention des particules d'amidon par les hydrogels de fibrine. Des hydrogels de fibrine contenant des particules d'amidon Pdt_20_cb ou Pdt_05_cb (200–400 µm) ont été préparés puis démoulés par scalpage de leur support. Ils ont ensuite été incubés pendant 1 h à 37 °C dans 1 mL d'une solution d'AMG (0,08 mg/mL) préparée dans du tampon citrate (0,1 M, pH 5,4). Après incubation, la totalité du surnageant a été collectée (*n = 5)* pour le dosage du glucose libéré. Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un automate (Respons910, Diasys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Allemagne) et du kit biochimique associé (Glucose HK, Diasys Diagnostic Systems GmbH). Le pourcentage correspondant d'amidon hydrolysé a ensuite été déterminé (*Equation 1*). La quantité d'amidon hydrolysée ne correspondant pas à la quantité d'amidon initiale, un groupe contrôle d'hydrogels non démoulés a été soumis au même protocole de dégradation par l'AMG et de dosage, afin d'évaluer si cette perte d'amidon provenait d'une rétention de celui-ci sur le support ou d'une plus faible dégradation en hydrogel.

Impact de la taille des particules sur la cytocompatibilité des hydrogels d'amidon. Des hydrogels amidon/fibrine contenant des CSMs ont été préparés avec des particules Pdt_20_cb (petites < 150 µm et larges 200 – 400 µm), sélectionnées par tamisage puis incorporées dans l'hydrogel (*n=4*). Une forte hétérogénéité de forme et de dimensions au sein de ces 2 groupes de particules a été observée. Parallèlement, des hydrogels de fibrine cellularisés ont également été préparés comme contrôle positif. Tous les hydrogels ont ensuite été recouverts d'1 mL de milieu αMEM (alpha Minimum Essential Medium ; PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Allemagne), contenant du glucose (1 g/L), puis incubés à 37 °C (5% CO2, 95% air, en atmosphère humide). L'effet de la taille des particules sur la viabilité des CSMs a été déterminé par cytométrie en flux. Aux jours 1 et 7, les hydrogels ont été « scalpés » des bouchons d'Eppendorf et incubés 30 min dans 1 mL de solution (trypsine 10 mg/mL, EDTA 0,4 mg/mL, Hoechst 33342 1,5 µg/mL) afin de digérer l'hydrogel et récupérer les CSMs. Après digestion, 1,5 µg/mL d'iodure de propidium (IP) ont été ajoutés et le nombre de CSMs a été déterminé

par cytométrie en flux (Attune, Life Technologies, St Aubin, France). Pour éviter toute obstruction de l'appareil par les particules d'amidon, la suspension a été filtrée à travers un tamis cellulaire de 70 µm (Clearline, Dominique Dutscher ; Brumath, France). Seules les CSMs HE positives et IP négatives ont été comptées comme vivantes.

Statistique et reproductibilité. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart-type. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel *GraphPad Prism v8.0.2* (GraphPad Software, Californie, USA). Chaque condition expérimentale a été répétée au moins trois fois. Les effets de groupe et de temps, ainsi que leurs interactions ont été évalués par une ANOVA à deux facteurs, suivie d'un test post-hoc de Tukey. Pour toutes les analyses, une p-value < 0,05 a été considérée comme significative, et annotée comme suit : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; **** : $p < 0,0001$.

II. Résultats & Discussion

II. 1. Évaluation des mousses d'amidon sous forme de bloc – une piste rapidement écartée

Après l'extrusion d'amidons de maïs ou de pomme de terre, 6 types de mousses d'amidon, composées de ratio amylose/amylopectine différents, ont été obtenus sous forme de bloc poreux : (i) Maïs_70, (ii) Maïs_47, (iii) Maïs_23, (iv) Maïs_01, (v) Pdt_20, et (vi) Pdt_05 (*Tableau 8* et *Figure* 16). Afin de caractériser ces formulations et d'identifier la plus adaptée, deux critères ont été considérés : **l'adhésion cellulaire** et **la dégradabilité**. En effet, en tant que support cellulaire *in vivo*, l'amidon doit remplir un double rôle essentiel : offrir une surface propice à l'adhésion des CSMs et se dégrader entièrement. Cette dégradation assure non seulement un apport continu et suffisant en glucose aux cellules transplantées, mais évite également tout encombrement stérique susceptible de compromettre la réparation tissulaire.

II. 1. a. Une adhésion cellulaire limitée…

Les mousses Maïs_23, Maïs_01, Pdt_20, et Pdt_05 présentaient une solubilité trop élevée pour permettre l'étude de l'adhésion cellulaire, la structure s'effondrant lors de l'ajout de la suspension cellulaire. De ce fait, seules les mousses Maïs_70 ont été testées, leur solubilité réduite constituant un environnement plus propice à l'adhésion des CSMs. Pour cela, elles ont été ensemencées avec des CSMs préalablement marquées au CellTracker™ (cytoplasme coloré en rouge sur les images). Les modifications de morphologie cellulaire, indicatives d'une éventuelle adhésion (cellules étalées vs rondes), ont été observées par microscopie confocale 3h et 24h après l'ensemencement (*Figure 18. A*).

Après 3h, les CSMs sur les mousses Maïs_70 présentaient une morphologie ronde, tandis que les cellules du contrôle positif commençaient à s'étaler. Vingt-quatre heures plus tard, les CSMs des mousses Maïs_70 restaient rondes et leur nombre avait nettement diminué, alors qu'une adhésion marquée, caractérisée par des cellules étalées, était visible dans le contrôle positif. La diminution du nombre de CSMs résulte probablement du défaut d'adhésion aux mousses Maïs_70, celles-ci ne retenant pas les cellules sur leur surface. En accord avec cette hypothèse, le marquage des cellules mortes est resté négatif aux deux temps d'observation, ce qui suggère que la perte cellulaire observée n'est pas liée à une mort précoce, mais plutôt à l'absence d'adhésion, ayant entraîné leur décrochage et probablement leur dépôt au fond des puits de culture.

II. 1. b …En parallèle d'une dégradabilité totale

Le taux de dégradabilité des mousses sous forme de bloc a été évalué en parallèle [218]. Pour cela, les 6 mousses d'amidon ont été immergées dans une solution enzymatique concentrée en AMG (*Figure 18. B*). La cinétique de dégradation a été suivie en dosant le glucose produit lors de l'hydrolyse de l'amidon sur une période de 21 jours.

Deux profils de dégradabilité apparaissent : un groupe hautement dégradable (≥ 80 % : Maïs_23, Maïs_01, Pdt_20, Pdt_05) et un groupe faiblement dégradable (≤ 20 % : Maïs_70, Maïs_47). Cette baisse de dégradabilité est liée à la teneur en amylose : après extrusion, l'amylose recristallise plus rapidement et de manière plus stable par rétrogradation[a] que l'amylopectine, formant une barrière physique qui limite l'accès des enzymes et ralentit la dégradation[218,220]. La présence de lipides[b] renforce encore cet effet et favorise la formation de complexes amylose-lipide, eux aussi très résistants à l'hydrolyse enzymatique [218,220]. La chute de dégradabilité n'est pas progressive mais brutale lorsque la teneur en amylose passe de 23 à 47 %, un phénomène déjà décrit dans les gels d'amidon entre 30 et 40 % d'amylose [221]. Dans ce cas, la cristallisation de l'amylose conduit à la formation d'une phase continue qui emprisonne des fragments d'amylopectine, réduisant ainsi leur accessibilité enzymatique et, par conséquent, la dégradabilité finale de l'amidon. Bien que la distribution de l'amylopectine par rapport à l'amylose n'ait pas été étudiée dans les mousses d'amidon extrudées, ce mécanisme fournit une hypothèse cohérente pour expliquer la baisse observée de leur dégradabilité [218,221].

[a] La rétrogradation est le phénomène par lequel, après chauffage et refroidissement (soit après extrusion), les chaînes d'amylose et d'amylopectine des amidons se réorganisent en structures cristallines. L'amylose rétrograde rapidement, tandis que l'amylopectine rétrograde très lentement.

[b] Amidon de maïs : environ 1 à 1,5 % de lipides vs. Amidon de pomme de terre : environ 0,1% de lipides. Même à d'aussi faibles teneurs, les lipides peuvent impacter la dégradabilité de l'amidon lorsque celui-ci est concentré en amylose par la formation de complexes amylose-lipide.

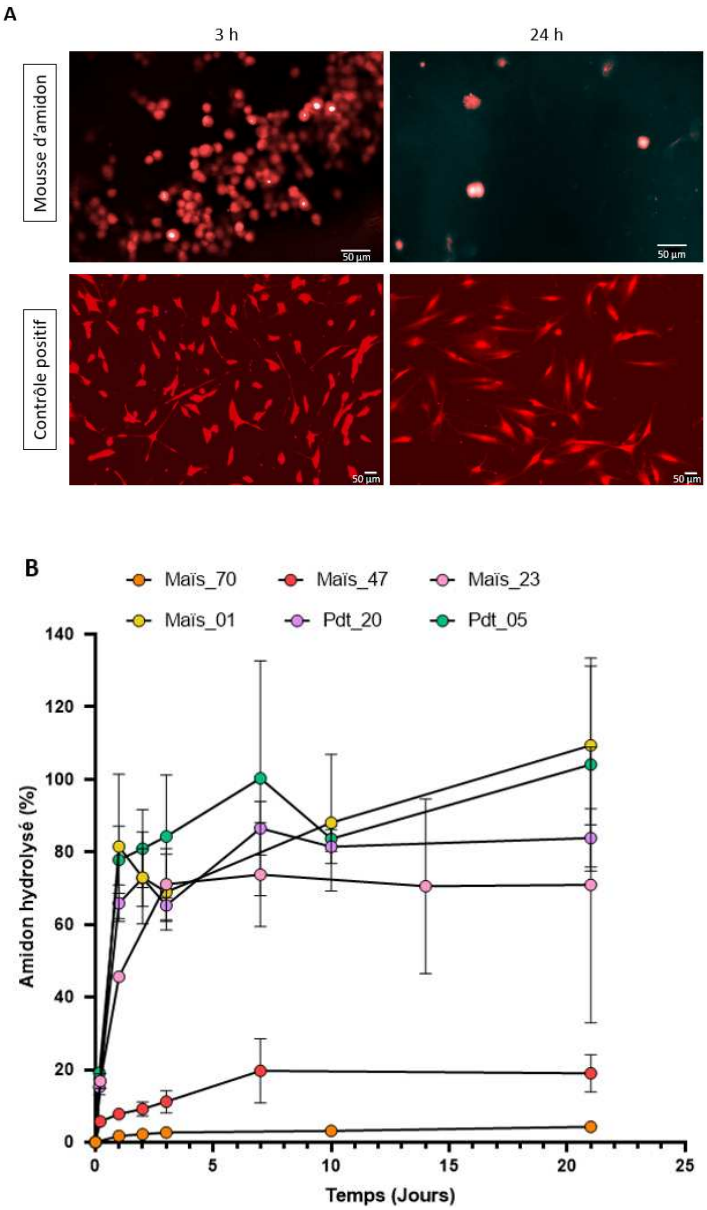


Figure 18. Critères de sélection des mousses d'amidon : l'adhésion cellulaire et la dégradabilité. A. Observation de l'adhésion cellulaire sur les mousses Maïs_70 au microscope confocal 3h et 24h après ensemencement. Une quantité de 10^5 CSMs, préalablement marquées au CellTracker™ (marquage des cellules vivantes, en rouge sur les images) et au DAPI (marquage des cellules mortes, négatif sur les images), a été ensemencée sur chaque surface de la mousse (*n=3*). Le contrôle positif correspond à des CSMs cultivées en puits de culture (10^5 CSMs/puit) (*n=3*). L'échelle représente 50 µm. **B.** Cinétique de dégradation des 6 mousses d'amidon par hydrolyse enzymatique sur 21 jours (1,3 mg/mL d'AMG - 37°C - pH7,6) (*n=3*) [218].

Ainsi, aucune des mousses d'amidon testées ne satisfait simultanément les deux critères retenus. En effet, bien que 4 mousses sur 6 soient considérées comme entièrement dégradables (Maïs_01, Maïs_23, Pdt_05, Pdt_20), nous avons observé que les CSMs n'adhéraient pas aux mousses d'amidon, que ce soit pour les Maïs_70 ou les autres mousses dont la solubilité élevée n'a pas permis leur étude. Pour ces raisons, les mousses d'amidon sous forme de blocs ont été délaissées au profit d'une forme particulaire, générée par cryobroyage puis incorporée dans un hydrogel de fibrine.

II. 2. Évaluation des mousses d'amidon sous forme de particules inclues en hydrogel de fibrine – une piste validée

Afin de contourner le manque d'adhésion cellulaire observé précédemment, nous sommes retournés à une formulation d'hydrogel de fibrine permettant le confinement simultané des particules d'amidon, de l'AMG (qui sera encapsulée en microsphères) et des CSMs. Contrairement à l'amidon de blé utilisé précédemment sous forme solubilisée, l'utilisation de particules solides dans cette nouvelle formulation permet d'incorporer une quantité plus élevée d'amidon dans l'hydrogel. Elle permet ainsi d'atteindre l'objectif fixé à 8 mg, sans être contrainte par l'augmentation de viscosité associée à l'amidon solubilisé.

Parmi les 4 mousses d'amidon entièrement dégradables (Maïs_23, Maïs_01, Pdt_20, et Pdt_05), nous avons sélectionné Pdt_20 et Pdt_05 pour être cryobroyées en particules Pdt_20_cb et Pdt_05_cb, en raison de la meilleure biocompatibilité de l'amidon de pomme de terre par rapport à celui de maïs. En effet, si l'amidon de maïs[a] extrudé a provoqué une réaction à corps étranger[b] après 30 jours d'implantation intramusculaire chez le rat [222], l'amidon de pomme de terre[c] extrudé n'a présenté qu'une légère réaction inflammatoire[d] [222]. Cette différence est notamment expliquée par la plus faible teneur en lipides et protéines, molécules immunogènes, dans les amidons de pomme de terre que dans ceux de maïs (environ 10 fois moins).

Ainsi, pour valider l'utilisation de ces particules d'amidon en hydrogel, deux critères seront évalués : (i) la capacité de l'hydrogel à contenir 8 mg de particules d'amidon afin de répondre aux besoins énergétiques des CSMs sur 21 jours, et (ii) la cytocompatibilité des particules d'amidon incorporées dans l'hydrogel avec les CSMs, évaluée *in vitro* en fonction de leur taille.

II. 2. a. Taux de rétention des particules d'amidon en hydrogel

Afin d'estimer le taux d'amidon effectivement retenu en hydrogel, des hydrogels de fibrine/amidon contenant des particules Pdt_20_cb ou Pdt_05_cb (200–400 µm) ont été préparés dans des moules (bouchons Eppendorf). Après polymérisation, les hydrogels ont été démoulés par scalpage afin de déterminer la fraction d'amidon effectivement implantable (*Figure 19. A*), puis incubés pendant 1 h dans une solution d'AMG, suivie du dosage du glucose libéré. Dans ces conditions, la fraction d'amidon récupérée a été quasi complète pour les Pdt_20_cb (90 ± 13 %), tandis qu'elle n'atteignait qu'environ la moitié pour les Pdt_05_cb (56 ± 17 %) (*Figure 19. B*). Un liquide résiduel ayant été observé dans le

[a] Amidon extrudé de maïs testé était composé à 70% d'amylose et 30% d'amylopectine
[b] Caractérisé par la présence d'un granulome avec présence de cellules géantes multinucléées, d'un tissu fibreux épais et d'une nécrose centrale.
[c] Amidon extrudé de pomme de terre testé était composé à 20% d'amylose et 80% d'amylopectine.
[d] Présence de macrophages M2, absence de macrophages M1. Une colonisation cellulaire a également été observée pour l'amidon de pomme de terre par opposition à la nécrose observée pour l'amidon de maïs.

moule après scalpage, la perte apparente d'amidon des Pdt_05_cb pourrait résulter d'une solubilisation et diffusion accrue dans ce liquide resté sur le support. Une autre hypothèse est que la perte apparente d'amidon serait due à une dégradation partielle des particules, leur dégradation complète n'ayant pas été démontrée en hydrogel.

Pour répondre à cette question, des hydrogels non démoulés ont été soumis au même protocole. La digestion de l'amidon s'est faite directement dans le bouchon du tube Eppendorf (« hydrogel non-scalpé ») pour éviter toute perte d'amidon. Dans ce cas, la totalité de l'amidon a été retrouvée pour les deux types de particules (95 ± 3 % et 95 ± 2 % pour les particules Pdt_20_cb et Pdt_05_cb, respectivement) (*Figure 19. B*). Ces résultats confirment que ni le cryobroyage ni l'inclusion des particules d'amidon dans la matrice de fibrine n'impactent l'accès de l'AMG à l'amidon et finalement sa dégradabilité. Les pertes observées concernent spécifiquement les hydrogels scalpés, indiquant qu'une partie des particules Pdt_05_cb est restée dans le liquide résiduel.

Le liquide résiduel observé dans les hydrogels scalpés pourrait résulter de la synérèse [223], une expulsion d'eau due à la contraction du réseau de fibrine lors de la polymérisation. Les particules Pdt_05_cb, étant plus solubles que les Pdt_20_cb, elles diffuseraient davantage dans l'eau résiduelle, restée sur le support, après le scalpage des hydrogels. Cette différence de solubilité résulte en partie de la plus haute teneur en amylopectine des Pdt_05_cb, qui, en raison de sa structure ramifiée, devient plus soluble dans l'eau, après extrusion, que l'amylose qui cristallise [224,225]. Par ailleurs, la part des Pdt_05_cb ayant solubilisée avant la polymérisation pourrait localement augmenter la viscosité et entraver la formation du réseau de fibrine à proximité et donc la rétention des particules dans le réseau.

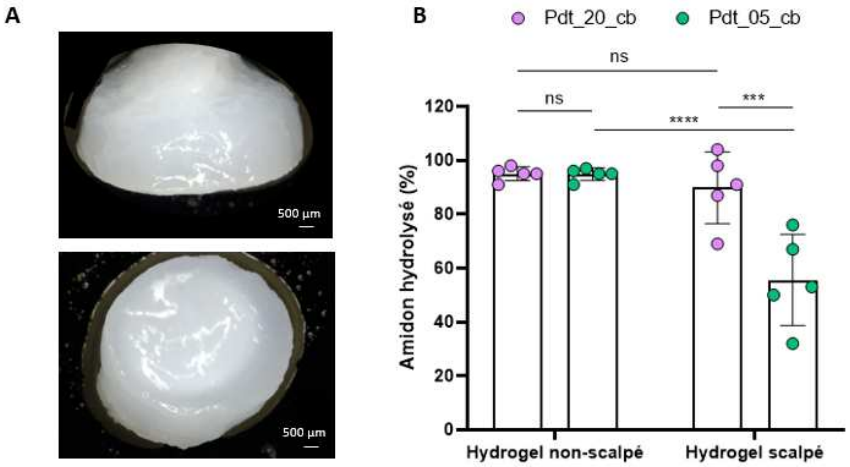


Figure 19. Dégradabilité et stock effectif des particules d'amidon en hydrogel de fibrine. A. Observation au microscope optique d'un hydrogel de fibrine (200 µL) scalpé, contenant 8 mg de particules de Pdt_20_cb (image du haut) et de Pdt_05_cb (image du bas). L'échelle représente 500 µm**. B.** Dégradabilité des particules Pdt_20_cb (en violet) et Pdt_05_cb (en vert) inclues en hydrogel de fibrine non-scalpé ou scalpé après hydrolyse enzymatique totale (0,08 mg/mL d'AMG - pH=5,4 - 1h - 37°C) (*n=5*).

Dans ces conditions, les hydrogels de fibrine peuvent ainsi incorporer au maximum 4,6 ± 1,4 mg de Pdt_05_cb contre 7,2 ± 1,2 mg de Pdt_20_cb. Les particules Pdt_05_cb ne permettant pas d'atteindre

un stock d'amidon en hydrogel suffisant pour répondre aux besoins cellulaires estimés sur 21 jours (8mg d'amidon requis), seules les particules Pdt_20_cb seront retenues pour l'évaluation de leur cytocompatibilité.

II. 2. b. Cytocompatibilité et sélection de la taille des particules d'amidon en hydrogel de fibrine

Des résultats préliminaires, suggérant que la taille des particules (200–400 µm) pouvait affecter la viabilité cellulaire (données non présentées), ont conduit à considérer leur dimension comme un facteur critique. La cytocompatibilité des particules Pdt_20_cb a donc été réévaluée pour deux tailles : (i) des particules larges (200–400 µm), utilisées précédemment, et (ii) des particules plus petites (<150 µm). Ces 2 groupes de particules ont été inclus en hydrogel de fibrine (8 mg par hydrogel) avec des CSMs. Des hydrogels de fibrine sans amidon et contenant des CSMs (Pdt_20_cb (-)), ont servi de contrôles. La viabilité cellulaire a été mesurée par cytométrie en flux après 1 et 7 jours d'incubation en conditions standards de culture, puis normalisée par rapport à la valeur initiale (J0) (*Figure 20*).

Aux deux temps, les particules <150 µm ont maintenu une viabilité élevée (J1 : 86 ± 3 % ; J7 : 78 ± 8 %), significativement supérieure à celle des particules 200–400 µm (J1 : 67 ± 3 % ; J7 : 58 ± 7 %) et comparable au contrôle positif.

Étonnamment, la diminution de la viabilité cellulaire s'est produite principalement au cours des premières 24 heures dans les hydrogels contenant des particules d'amidon, tandis que dans le contrôle positif, la baisse a surtout été observée entre J1 et J7 (malgré la présence de glucose résiduel à J7). Ce résultat suggère que les particules d'amidon affectent la viabilité cellulaire durant l'étape de polymérisation de l'hydrogel. En effet, l'étape étant réalisée sous agitation, elle pourrait induire une friction mécanique entre les particules solides et les CSMs, ce qui expliquerait la perte de viabilité observée dès 24h après encapsulation en hydrogel.

Les particules Pdt_20_cb de taille inférieure à 150 µm n'affectant pas la survie des CSMs sur la première semaine nous garderons donc cette taille de particules pour la suite de la thèse.

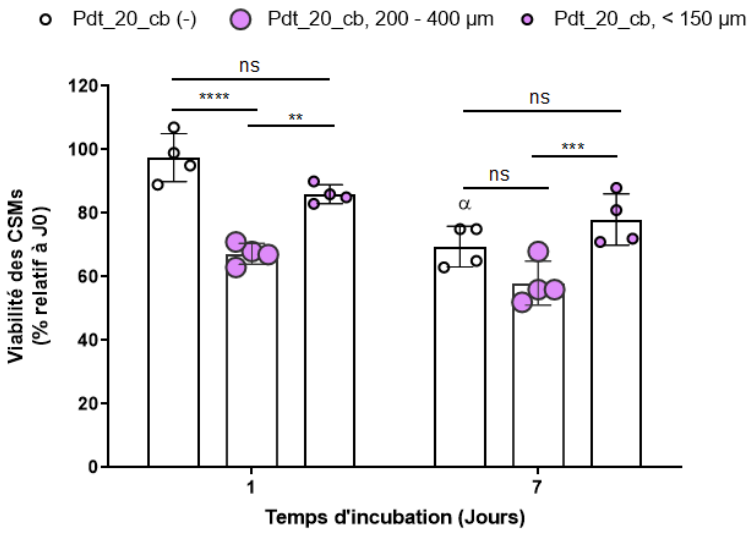


Figure 20. Effet de la taille des particules d'amidon sur la viabilité des CSMs en hydrogel de fibrine. Différents groupes d'hydrogels de fibrine (200µL) contenant des CSMs humaines (2 x 10^5 CSMs par hydrogel) ont été fabriqués, soit (i) sans amidon, servant de contrôle positif (Amidon (-), ronds blanc), soit avec des particules d'amidon Pdt_20_cb (ii) de grande taille, c'est-à-dire entre 200 et 400 µm (grands ronds violet), ou (iii) de petite taille, inférieure à 150 µm (petits ronds violet). La viabilité cellulaire a été mesurée au bout d'1 et 7 jours d'incubation, par cytométrie en flux et marquage cellulaire Hoechst/IP. Seules les CSMs Hoechst positif / IP négatif sont comptées comme vivantes. La viabilité a ensuite été rapportée à J0 (*n=4*). α : p-value < 0.05 par rapport à J1.

Conclusion.

Notre objectif est de développer un hydrogel nutritif permettant de répondre aux besoins énergétiques des CSMs jusqu'à 21 jours, permettant leur survie, ainsi que l'amorce d'une différenciation cellulaire et un renforcement de l'angiogenèse. Pour cela, **un apport de 8 mg d'amidon était requis pour assurer la survie des 2 × 10^5 CSMs chargées en hydrogel sur 21 jours**. L'emploi sous forme solubilisé de l'amidon de blé précédemment utilisé ne permettant pas d'atteindre cet objectif, une reformulation de l'amidon s'est avérée nécessaire.

Nous avons ainsi opté pour l'utilisation de mousses d'amidon extrudé sous forme de particules obtenues par cryobroyage. En particulier, **les particules Pdt_20_cb ont été sélectionnées** en raison de plusieurs avantages : (i) une meilleure biocompatibilité observée *in vivo* pour l'amidon extrudé de pomme de terre (ii) une dégradabilité totale après cryobroyage et encapsulation en hydrogel de fibrine, et (iii) l'obtention d'un stock d'amidon suffisant en hydrogel de fibrine (8 mg). En outre, la réduction de leur taille à moins de 150 µm a permis de ne pas impacter la viabilité des CSMs sur la première semaine, confirmant leur compatibilité cellulaire au moins à court terme en hydrogel.

Ainsi, les particules Pdt_20_cb (< 150 µm) seront intégrées, pour la suite, en hydrogel de fibrine avec les CSMs et l'AMG, l'enzyme devant être au préalable encapsulée dans des microsphères. En amont de cette encapsulation enzymatique, une nouvelle méthode de dosage de l'activité de l'AMG, plus sensible que le kit commercial, a été développée afin d'en assurer le contrôle. Elle sera détaillée au chapitre suivant.

CHAPITRE 5. MISE AU POINT DU DOSAGE DE L'ACTIVITÉ AMG

Introduction.

Dans le cadre de la thèse, pouvoir doser l'activité de l'AMG (ou « activité AMG ») est essentiel, car elle reflète la proportion d'enzyme fonctionnelle, effectivement apte à libérer, à un moment donné, du glucose par hydrolyse de l'amidon. De plus, l'AMG devant subir un processus d'encapsulation au sein de microsphères, susceptible d'altérer sa structure et donc son activité, ce dosage est indispensable pour évaluer l'intégrité fonctionnelle de l'enzyme et l'efficacité du processus d'encapsulation (ex : conservation de l'activité AMG post-encapsulation, suivi cinétique de la libération de l'AMG active hors des microsphères). L'activité étant directement liée à la structure tridimensionnelle de l'AMG, elle est particulièrement sensible à son environnement : l'AMG peut perdre sa conformation active et ainsi être dénaturée sous l'effet de la température, du pH ou d'autres facteurs environnementaux (concentration en sels, présence de solvants organiques, etc…) [226]. En outre, *in vivo,* des protéases peuvent également cliver les liaisons peptidiques entre les acides aminés constitutifs de la structure de l'AMG [227].

En accord avec la littérature, l'activité enzymatique sera, tout au long de la thèse, exprimée en unités (U), et définie comme la quantité d'enzyme catalysant la transformation d'une micromole de substrat par minute dans des conditions expérimentales données (pH, température, substrat).

Usuellement, le kit de dosage de l'activité AMG utilisé au laboratoire est le kit R-AMGR3 [228], vendu par Neogen Megazyme (Lansing, USA), également fournisseur de l'AMG. Il repose sur l'hydrolyse successive d'un substrat synthétique, le p-nitrophényl β-D-maltoside, par l'AMG et une seconde enzyme, la β-glucosidase, entraînant alors la libération d'une molécule colorée et quantifiable, proportionnelle à l'activité AMG (*Figure 21*). Toutefois, bien que le fabricant annonce une reproductibilité de 3 %, une forte variabilité inter-essais est observée en pratique, limitant la possibilité de suivre des cinétiques enzymatiques. De plus, dans les conditions du test (pH 4,5 et 40°C), sa limite de détection est fixée à 2,5 U/mL, soit 69 µg/mL d'AMG [a]. Or, le protocole d'encapsulation de l'AMG utilisé et décrit au chapitre suivant, permet une encapsulation théorique maximale[b] de 6 µg d'AMG/mg de microsphères. Compte tenu de la limite de détection du dosage Megazyme et du taux d'encapsulation, recourir au kit Megazyme nécessiterait l'utilisation de grandes quantités de microsphères pour pouvoir contrôler l'encapsulation de l'AMG[c].

[a] Selon Megazyme, dans les conditions de leur test (pH 4,5 et 40°C), 1mg d'AMG achetée chez eux (ce qui est notre cas) contient 36 U.
[b] En considérant que 100% de l'AMG est encapsulée.
[c] Par exemple, pour l'étude du profil de libération de l'AMG, si diminuer le volume du milieu de dissolution pourrait augmenter la concentration de l'AMG (ex : 10mg de microsphères dans 0,1mL de solution tampon citrate pH 5,4), cela augmenterait en pratique le risque d'erreur (hétérogénéité due à la mise en suspension plus difficile des microsphères, prélèvement du milieu de dissolution plus difficile avec risque de prélever des microsphères).

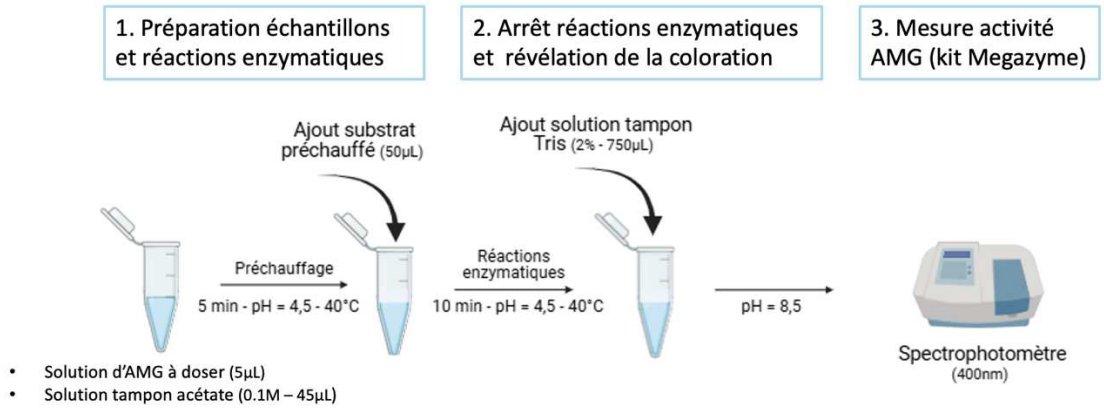


Figure 21. Protocole du dosage de l'activité AMG par le kit Megazyme [228]. La solution enzymatique est diluée dans un tampon acétate de sodium 100 mM à pH 4,5 et pré-chauffée à 40°C. Le substrat (p-nitrophenyl β-D-maltoside + β-glucosidase) préchauffé également à 40°C est ensuite ajouté à la solution enzymatique, donnant lieu aux réactions suivantes : 1) *AMG + p-nitrophenyl ß-D-maltoside → Glucose + p-nitrophenyl ß-D-glucoside* et 2) *ß-glucosidase + p-nitrophenyl ß-D-glucoside → Glucose + p-nitrophenol*. Après 10min précisément, la réaction est arrêtée par l'ajout d'un tampon basique (TRIS[a], pH=8,5) qui révèle alors la coloration du p-nitrophenol dont l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie. L'activité de la solution est ensuite déterminée par la formule suivante : $\boldsymbol{Activité}\ (\boldsymbol{U/mL}) = \frac{\Delta A_{400}}{10} \times \frac{3,4}{0,2} \times \frac{10}{18,1} \times 11,5$; *avec* $\Delta \boldsymbol{A_{400}}$ *= signal mesuré – signal blanc.*

Face au besoin d'un dosage de l'activité AMG plus reproductible et plus sensible, une méthode de dosage alternative a été développée au laboratoire. Elle s'appuie sur un protocole existant de dosage de l'activité AMG [229], basé sur la quantification du glucose libéré lors de l'hydrolyse d'amidon (pH 4,5 - 55°C), dont les limites de détection et de quantification n'étaient toutefois pas spécifiées. Les conditions expérimentales ont été modifiées comme suit afin d'améliorer la sensibilité du test :

- La maltodextrine[b] a été retenue comme substrat car elle est (i) entièrement hydrolysable en glucose par l'AMG et (ii) soluble à température ambiante. Bien que l'utilisation des particules d'amidon Pdt_20_cb aurait permis une mesure plus représentative des conditions réelles, elle n'a, cependant, pas été retenue en raison de leur solubilité partielle, source potentielle d'hétérogénéité du milieu réactionnel et de perte de reproductibilité.
- Un pH de 5,4 et une température de 50°C ont été retenus afin de pouvoir doser de faibles activités AMG : même s'ils s'écartent des conditions physiologiques, ils permettent d'assurer la stabilité de l'enzyme sur plusieurs heures tout en se rapprochant des conditions optimales d'activité enzymatique (conditions pour lesquelles l'activité AMG est maximale sur un temps court) (*Tableau 9*). En outre, des études préliminaires (données non présentées) ont montré une variabilité réduite des mesures à pH 5,4 et 50 °C, plutôt qu'aux conditions du test Megazyme (pH 4,5 et 40°C).
- Un rapport de 40% de solution à mesurer et 60% de solution tampon citrate (v/v) a été retenu, afin de garantir que, lorsque les échantillons proviennent d'un milieu physiologique (pH 7,4),

[a] Tris(hydroxyméthyl)aminométhane.
[b] Mélange d'oligosaccharides de glucose (2 à ≈ 20 unités) issus de l'hydrolyse partielle de l'amidon.

le pH du mélange final lors du test est maintenu à pH 5,4, soit à un pH plus optimal pour mesurer l'activité enzymatique

Caractéristiques de l'AMG	Valeur
Origine Source commerciale	*Aspergillus niger* Megazyme
pH optimal Domaine pH de stabilité	4 4 – 5,5
Température optimale Domaine température de stabilité	70°C < 60°C
Diamètre (nm) Poids moléculaire (kDa)	5 - 10 143 500

Tableau 9. Résumé des caractéristiques de l'AMG. Informations provenant du certificat d'analyse du lot utilisé, fournies par Megazyme.

Ainsi, le protocole mis au point repose sur la quantification du glucose produit par l'hydrolyse de la maltodextrine (Roquette ; Lestrem, France) proportionnellement à la quantité d'AMG (*Equation 2*). L'AMG étant une enzyme michaelienne[a], pour que la relation de proportionnalité soit respectée (*Equation 3*), la maltodextrine doit être maintenue en excès pendant la réaction afin que la vitesse initiale (V_i) soit assimilable à la vitesse moyenne de réaction ($\frac{\Delta Glucose}{\Delta t}$) (*Figure 22*). Dans ces conditions, l'activité de l'AMG peut alors être déduite à partir de la formule en *Equation 3*.

$$\underline{\text{AMG}} + \text{Maltodextrine} \rightarrow \text{Glucose}$$

Equation 2. Equation de la réaction enzymatique se déroulant lors du dosage mis au point (réaction non réversible dans nos conditions).

$$V_i = \frac{\Delta Glucose}{\Delta t} = k1 \times [AMG] = k2 \times \mathcal{A}_{AMG}$$

V_i : la vitesse initiale de réaction;

$\Delta Glucose$: la quantité de glucose produite (mg)

Δt : le temps de réaction (min)

k1 et k2 : les coefficients de proportionnalité

[AMG] : la concentration en AMG (mg/mL) de l'échantillon à doser.

$\mathcal{A}_{AMG}$: l'activité AMG (U/mL) de l'échantillon à doser, mesurée sur de la maltodextrine, à 50°C et pH 5,4.

Equation 3. Formule décrivant la méthode de dosage d'activité AMG mise au point.

[a] Enzyme qui suit la cinétique de Michaelis-Menten.

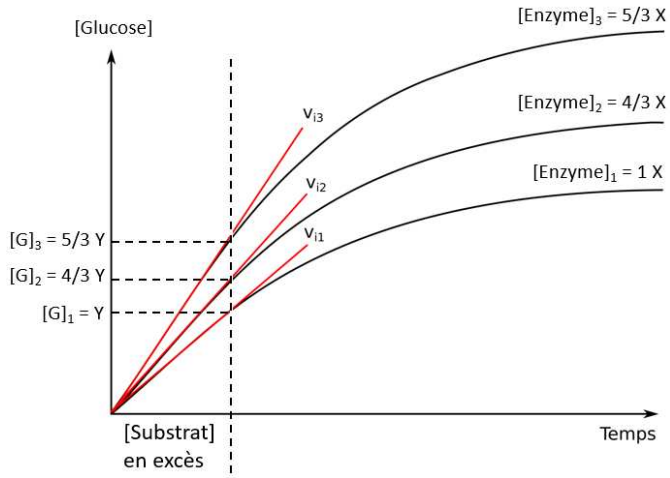


Figure 22. Exemple d'une cinétique enzymatique de type michaelienne et de la relation de proportionnalité existante entre une quantité d'enzyme et la vitesse initiale [230]. Lorsque le substrat est en excès, la vitesse initiale $\boldsymbol{V_i}$ correspond à $\frac{\Delta Glucose}{\Delta t}$ et est proportionnelle à la quantité d'enzyme (et donc à son activité enzymatique). Cette relation est perdue lorsque le substrat consommé, durant la réaction, n'est plus en situation d'excès.

Ainsi, ce dosage permet de déterminer l'activité AMG dans un échantillon inconnu en mesurant sa vitesse moyenne de réaction. Dans ce protocole, l'unité de l'activité de l'AMG (U) est définie par rapport à la maltodextrine, à un pH de 5,4 et à une température de 50 °C.

L'objectif est donc de développer une méthode de dosage **reproductible,** d'équation $\frac{\Delta Glucose}{\Delta t} = k2 \times \mathcal{A}_{AMG}$, et **plus sensible des faibles activités AMG** que la méthode Megazyme (jusqu'à 1% d'AMG encapsulée, soit 0,6 µg d'AMG en considérant un taux d'encapsulation de 100%) afin d'assurer un contrôle fiable de l'encapsulation de l'AMG. De plus, la détermination du taux d'encapsulation de l'AMG demandant la dissolution des microsphères dans de l'acétone afin d'avoir accès à la totalité de l'enzyme encapsulée, la méthode de dosage devra également être **compatible avec la présence d'acétone et du polymère des microsphères.**

Ainsi, la méthode de dosage de l'activité AMG a été évaluée en solution tampon et en présence de microsphères/acétone, en analysant, pour ces deux dosages, la linéarité de la courbe d'étalonnage, la répétabilité et l'erreur relative associée aux mesures.

I. Matériels & Méthodes

Réalisation des droites de calibration

Gamme pour le dosage de l'activité AMG en solution tampon

Une gamme de 9 quantités d'AMG connues ([AMG]), allant de 0,6 à 300 µg/mL a été préparée dans une solution de tampon citrate (pH 5,4 - 0,1 M).

Gamme pour le dosage de l'activité AMG en présence de microsphères/acétone

La gamme d'AMG a été préparée dans les conditions mimant le protocole de préparation de l'échantillon pour le dosage de l'AMG active encapsulée dans 8mg de microsphères[a] afin de prendre en compte l'effet du polymère sur l'activité AMG. Pour cela, une solution de 500 µg/mL d'AMG a été préparée dans du tampon citrate (pH 5,4 - 0,1 M). Puis, 8mg de microsphères « blanches » (non-chargées en AMG), ont été dissouts sous agitation magnétique (1h, 450 rpm), soit dans 0,1mL de la solution d'AMG et 0,9mL d'acétone (Solution A), soit dans 0,1mL de tampon citrate et 0,9mL d'acétone (Solution B). Après dissolution des microsphères blanches, 3mL de solution tampon citrate ont été ajoutés aux deux solutions A et B, puis remises sous agitation pendant 1h supplémentaire. Une gamme d'AMG allant de 1,5 à 12,25 µg/mL a été préparée à partir de la solution A avec les facteurs de dilution suivants (1 ; 1,3 ; 2 ; 4 et 8) en utilisant comme solution de dilution la solution B.

Construction des gammes d'étalonnage d'AMG

Après réalisation des gammes d'AMG, pour chaque point, 400 µL de solution ont été mélangés avec 500 µL de tampon citrate et 100 µL de maltodextrine (16 % w/v, dissoute dans le tampon citrate). L'ensemble a été incubé à 50°C et les réactions enzymatiques ont été chronométrées avec précision. Elles ont ensuite été arrêtées par immersion des tubes dans de l'eau bouillante pendant 10 minutes afin d'inactiver l'AMG.

Les temps de réaction ont été déterminés à l'aide d'un pré-test de façon à maintenir la maltodextrine en excès ($\geq 90\ \%$ de maltodextrine finale restante, soit $\leq 1{,}6$ mg de glucose produit). Les quantités de glucose produites au cours des réactions ont ensuite été quantifiées à l'aide de l'automate Respons910 et du kit biochimique associé (Diasys Diagnostic systems GmbH). Brièvement, le dosage du glucose repose sur les réactions successives avec 2 enzymes (Glucose hexokinase et G6P déshydrogénase) et dont le produit final (NADPH), formé en proportion stœchiométrique avec le glucose, est dosé par spectrophotométrie.

Les quantités de glucose mesurées ont été rapportées aux temps de réaction pour obtenir les vitesses moyennes de réaction ($\frac{\Delta Glucose}{\Delta t}$) en chaque point des deux gammes. Le coefficient de proportionnalité k1 liant $\frac{\Delta Glucose}{\Delta t}$ aux concentrations [AMG] (*Equation 3*) a été donné par la pente de la droite de calibration. Enfin, une unité d'activité AMG correspondant à la quantité d'enzyme produisant 1 µmole de glucose (soit 0,18 mg) par minute ($\frac{\Delta Glucose}{\Delta t}$ = 0,18mg/min), les concentrations des deux gammes ont pu être converties en activités enzymatique ($\mathcal{A}_{AMG}$) à l'aide de la formule de l'*Equation 4.*

$$[AMG] \times k1 = \frac{\Delta Glucose}{\Delta t}, avec\ k1\ connu.$$

En se plaçant dans 1mL :

$$1\ \text{U d'AMG} \times\ k1 = 0{,}18$$

$$1\ \text{mg d'AMG} = \frac{k1}{0{,}18}\ \text{U}$$

[a] La fabrication des microsphères est expliquée dans le chapitre suivant.

Equation 4. Relation entre la quantité d'AMG (mg) et son activité (U).

Validation de la méthode de dosage. La linéarité du dosage en solution tampon et en présence de microsphères a été validée par régression linéaire. Les droites de calibration obtenues sans contrainte présentaient une ordonnée à l'origine de 0,003161 (IC95% : -0,01047 à 0,01679) en solution tampon et une de -0,0001214 (IC95% : -0,001259 à 0,001017) en présence de microsphères/acétone, soient non significativement différentes de zéro. Les régressions ont donc été recalculées en imposant une interception nulle, conformément à la réalité biologique (une concentration nulle correspond à un signal nul). La répétabilité des mesures a été évaluée par le calcul du coefficient de variation (CV%), dont la formule ainsi que celle de l'erreur relative (ER%), sont données en *Equation 5*. Les CV% et ER% ont été calculés à partir de la moyenne des réplicats pour chaque niveau de concentration.

$$(A)\ CV\% = \frac{Ecart-type}{Moyenne} \times 100$$

$$(B)\ ER\% = \frac{Valeur\ mesurée - Valeur\ théorique}{Valeur\ théorique} \times 100$$

Equation 5. Equation des indicateurs de répétabilité et de justesse des mesures. Formules **(A)** du coefficient de variation (CV%) et **(B)** de l'erreur relative (ER%).

Statistiques. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart-type. Chaque concentration correspond à 8 - 9 réplicats pour le dosage en solution tampon et 4 réplicats pour le dosage en présence de microsphères, réalisés sur au moins 3 jours différents. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel *GraphPad Prism v8.0.2* (GraphPad Software, Californie, USA). Pour la régression linéaire, le logiciel de statistique ne donnant pas de coefficient de corrélation lorsqu'une interception est forcée, le coefficient de corrélation indiqué est celui donné par le logiciel lorsque l'interception n'est pas imposée.

II. Résultats

II. 1. Évaluation du dosage de l'activité AMG dans le tampon citrate

Dans un premier temps, la linéarité de la droite de calibration a été confirmée par un R^2 de 0,9902, et décrite par l'équation : $[AMG] \times 5{,}828 = \frac{\Delta Glucose}{\Delta t}$ (*Figure 23. A*). Dans ces conditions, 1 mg d'AMG correspondait à 32 U d'activité enzymatique (*Equation 4*), ce qui a permis, dans un deuxième temps, de convertir les concentrations d'AMG de la gamme étalon en activités enzymatiques, donnant ainsi le modèle final du dosage (*Figure 23. B*), d'équation :

$$\mathcal{A}_{AMG} \times 0{,}1802 = \frac{\Delta Glucose}{\Delta t}$$

Le facteur de conversion de 32 U/mg, qui permet, à partir d'une quantité d'AMG (mg), d'obtenir l'activité enzymatique correspondante (U) dans les conditions du test et pour un échantillon préparé dans la même solution tampon que celle utilisée durant le dosage, sera gardé comme référence pour la suite afin de pouvoir comparer les activités dosées indépendamment de la préparation de l'échantillon.

Les CV% (*Tableau 10*) présentent une valeur moyenne de 10,7 % de 9,7U/mL (300 µg/mL) jusqu'à 0,2 U/mL (6 µg/mL), puis se dégrade aux activités AMG inférieures, dépassant les 20 %. Les dosages ayant été réalisés sur au moins 3 jours distincts par concentration, le CV% reflète également la répétabilité inter-essais. Les ER% sont en valeur absolues globalement en dessous de 10% jusqu'à 0,02 U/mL (0,6 µg/mL), à l'exception de 0,064U/mL et du point-test 2U/mL. Par ailleurs, le test tend à sous-estimer (ER% < 0) les plus faibles activités AMG (< 0,2 U/mL).

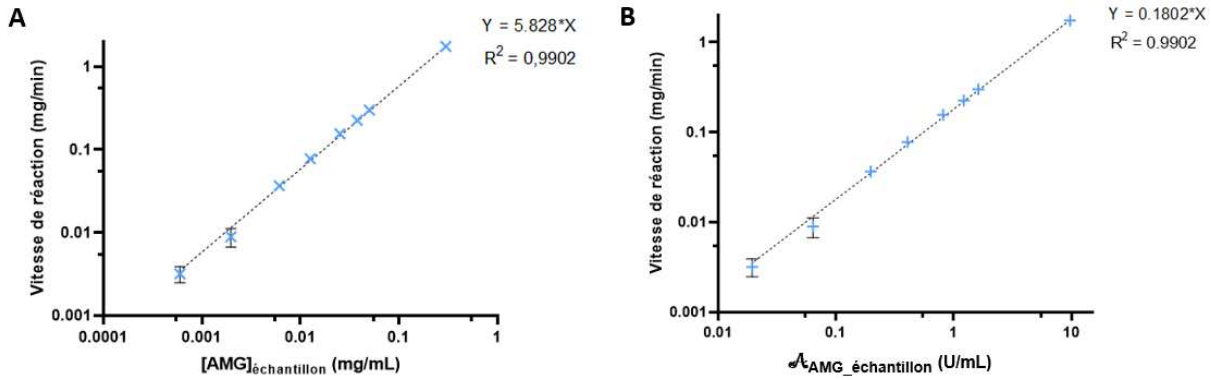


Figure 23. Courbes des dosages enzymatiques et modélisation linéaire des données. A. Représentation graphique de la vitesse moyenne de réaction en fonction de la quantité d'AMG (mg/mL). **B.** Représentation graphique de la vitesse moyenne de réaction en fonction de l'activité AMG (U/mL). A noter que les deux modèles étant mathématiquement équivalents, la linéarité de l'un implique celle de l'autre.

Quantité d'AMG [AMG] (mg/mL)	Activité AMG $\mathcal{A}_{AMG}$ (U/mL)	Vitesse de réaction (mg/min)	Réplicats	CV%	ER%
3,00E-01	9,7	1,75E+00	9	9,2	-1,0
5,00E-02	1,6	3,00E-01	9	10,3	2,0
3,77E-02	1,2	2,26E-01	9	11,1	1,9
2,51E-02	0,81	1,56E-01	8	11,7	5,4
1,26E-02	0,41	7,76E-02	8	11,8	5,1
6,10E-03	0,20	3,66E-02	9	10,5	2,2
1,97E-03	0,064	8,96E-03	9	25,0	-22,7
6,00E-04	0,02	3,19E-03	9	22,1	-9,4
Points tests					
6,00E-02	1,9	4,27E-01	9	12,5	21,1
4,50E-02	1,5	3,00E-01	5	5,7	13,6
1,50E-02	0,49	9,75E-02	5	3,8	10,7
6,00E-04	0,020	2,84E-03	3	16,90	-19,4

Tableau 10. Mesures de la répétabilité (CV%) et de l'erreur relative (ER%) des mesures. Trois points tests ont été utilisés pour challenger la méthode**.** Le CV% montre une dégradation dans les valeurs à partir de 0,2 U/mL (6 µg/mL). Les ER% sont globalement stables de 9,7 U/mL à 0,02 U/mL, à l'exception de 2 points (0,064 U/mL et 2 U/mL).

II. 2. Évaluation du dosage de l'activité AMG en présence de microsphères/acétone

Afin de représenter les conditions de détermination du taux d'encapsulation de l'AMG, les concentrations de la gamme ont été choisies de manière à représenter 12,5 ; 25 ; 50 ; 75 et 100% d'AMG encapsulée dans environ 8 mg de microsphères et en présence de microsphères blanches dissoutes dans de l'acétone. De manière similaire au dosage précédent, la linéarité de la droite de calibration, décrite par l'équation : $[AMG] \times 3{,}789 = \frac{\Delta Glucose}{\Delta t}$, a également été confirmée (0,9912) (*Figure 24*). La pente plus faible que celle du dosage précédent (3,789 vs. 5,828) indique une inhibition partielle de l'activité de l'AMG probablement due à la présence d'acétone. Les activités

correspondantes (0,05 à 0,41U/mL), obtenues avec le facteur de conversion (32 U/mg) déterminé précédemment ont été données dans le *Tableau 11.*

L'étude des CV% montre des valeurs réduites par rapport au dosage précédent, indiquant une variabilité plus faible. On retrouve toutefois également une variabilité plus importante vers les activités les plus faibles (0,05U/mL). Les ER% sont elles restées stables. Le dosage ayant été réalisé en présence du polymère des microsphères, la faible variabilité indique que s'il y a un effet de la matrice, il est présent de manière homogène pour tous les points. Une comparaison de l'AMG dosée par cette méthode avec ou sans microsphères blanches pourrait par ailleurs nous renseigner sur cette hypothèse.

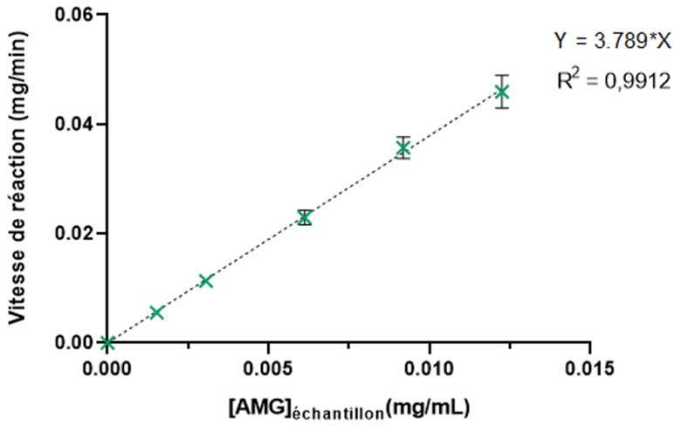


Figure 24. Représentation graphique de la vitesse moyenne de réaction en fonction de la quantité d'AMG (mg/mL) et sa modélisation linéaire.

Quantité d'AMG [AMG] (mg/mL)	Activité AMG $\mathcal{A}_{AMG}$ (U/mL)	Vitesse de réaction (mg/min)	Réplicats	CV%	ER%
1,23E-02	0,40	4,60E-02	4	6,6	-0,98
9,19E-03	0,30	3,57E-02	4	5,5	2,5
6,13E-03	0,20	2,30E-02	4	5,8	-1,1
3,06E-03	0,099	1,14E-02	4	10	-2,2
1,53E-03	0,050	5,54E-03	3	18	-2,5

Tableau 11. Mesures de la répétabilité (CV%) et de l'erreur relative (ER%) des mesures.

III. Discussion

Bien que la méthode de dosage ne rentre pas complètement dans les méthodes bioanalytiques[a], les recommandations internationales les concernant (ICH M10)[231], préconisent un CV% et une $|ER\%|$ inférieurs à 15 % pour les concentrations standards, et inférieurs à 20 % aux environs de la limite de quantification (LQ : plus faible concentration de la courbe d'étalonnage mesurée avec CV% et $|ER\%| \leq 20$ %). Cela pourrait signifier que les LQ de nos dosages soient aux environs de 0,2 U/mL (6 µg/mL) pour le dosage en solution tampon et 0,05 U/mL (1,5 µg/mL) pour le dosage en présence de microsphères. Cependant, nous avons toléré pour les profils de libération de l'AMG hors des microsphères, le dosage d'activités allant jusqu'à 0,02U/mL (0,6 µg/mL). En effet, lors des études de libération de l'AMG, 10 mg de microsphères sont mis en suspension dans 1mL de solution tampon. En considérant une encapsulation de 100% (soit 60 µg), cela aurait demandé 100 mg de microsphères ou 0,1 µL de volume de suspension pour pouvoir doser jusqu'à 1% d'activité AMG libérée en accord avec ces recommandations, ce qui aurait était soit trop gourmand en microsphères, soit limité techniquement (volume trop petit pour une mise en suspension convenable).

De plus, bien que la méthode de dosage développée nécessite un pré-test pour fixer la durée de réaction enzymatique garantissant l'excès de maltodextrine, elle offre une sensibilité au moins dix fois supérieure à celle du kit commercial Megazyme. Cette supériorité s'explique par la courte durée de la réaction enzymatique du kit, fixée à 10 minutes. Des essais visant à prolonger la réaction pour accroître la sensibilité ont été réalisés au laboratoire, mais les résultats obtenus ne respectaient alors plus l'équation du modèle fournie par le fabricant.

Par ailleurs, le facteur de conversion mesuré (32 U/mg d'AMG) dans nos conditions (maltodextrine, pH 5,4 et 50°C) est proche de celui de Megazyme (36 U/mg d'AMG) mesuré dans d'autres conditions (amidon[b], pH 4,5 et 40°C). Cela suggère que l'emploi de maltodextrine (liaisons α(1-4), plus facilement hydrolysables que les liaisons α(1-6) de l'amidon) associé à une température plus proche de l'optimum de l'AMG, compensent l'effet d'un pH plus basique, plus éloigné de son optimum (*Tableau 9*). Les deux facteurs étant relativement proches, nous avons choisi pour la suite de la thèse de garder le facteur de conversion donné par Megazyme (36 U/mg d'AMG), afin de faire comme mes prédécesseurs et faciliter ainsi la reprise des travaux par les futures étudiants. Enfin, l'utilisation de l'automate Respons910 (employé en clinique) pour la mesure du glucose contribue fortement à la répétabilité du dosage en limitant l'erreur expérimentale.

[a] Dosage en milieu biologique (sang, urine, salive, etc). L'ICH M10 a été choisi car les recommandations de l'ICH Q2, plus adaptées à notre dosage, ne précisaient pas de valeur seuil.
[b] D'après fournisseur : Activité AMG sur amidon = 11,5 x l'activité AMG sur p-nitrophényl β-D-maltoside.

Conclusion

Afin de répondre au besoin d'un dosage plus reproductible et sensible, une nouvelle méthode de dosage de l'activité AMG a été mise au point. Elle repose sur la quantification du glucose produit en un temps donné lors de l'hydrolyse d'une maltodextrine, maintenue en excès, par l'AMG dans des conditions garantissant sa stabilité et proche de son optimum d'activité (pH 5,4 et 50°C).

Cette nouvelle méthode de dosage s'est révélée **reproductible** et au moins **largement plus sensible** que le kit commercial Megazyme. De plus, cette méthode de dosage reste **fiable en présence de microsphère dissoutes dans de l'acétone**, la rendant ainsi utilisable pour déterminer le taux d'encapsulation. Dans le chapitre suivant, consacré à l'encapsulation de l'AMG cette méthode de dosage sera utilisée pour contrôler chaque étape de l'encapsulation (de la nanoprécipitation de l'AMG au suivi du profil de libération de l'AMG active à partir des microsphères).

CHAPITRE 6 – ARTICLE. ENCAPSULATION DE L'AMG DANS DES MICROSPHERES ET PERSISTANCE *IN VIVO*

À la suite des résultats obtenus *in vivo* avec l'hydrogel nutritif initial — caractérisés par une survie cellulaire et une présence de l'AMG limitées à 7 jours sur le site d'implantation — nous avons formulé l'hypothèse que l'augmentation de la mortalité des $CSMs_{MoelleOsseuse}$, au-delà de la première semaine, résultait d'un apport en glucose insuffisant consécutif à la disparition précoce de l'AMG [204].

Face à ce challenge, nous avons initié le développement d'une nouvelle génération d'hydrogel nutritif, par l'encapsulation de l'AMG au sein de microsphères de copolymères type PLGA[a]–P188[b]–PLGA, dans le but de prolonger la rétention de l'AMG sur le site d'implantation et, par voie de conséquence, prolonger l'apport de glucose permettant le maintien de la survie et des fonctions des CSMs en conditions ischémiques. Ces microsphères ont été spécifiquement sélectionnées pour deux raisons : (i) leur diamètre, de l'ordre de la dizaine de micromètres, permettant leur rétention dans l'hydrogel de fibrine (maille ≈ 10 nm–1 µm) [232–234], et (ii) leur capacité démontrée à libérer des protéines sur plusieurs semaines [235,236], confirmant leur adéquation avec notre objectif de libération d'AMG et de glucose sur 21 jours.

Ainsi, les microsphères ont été obtenues par le procédé d'émulsion évaporation/extraction de solvant de type *solid-in-oil-in-water*. Deux copolymères PLGA-P188-PLGA ont été retenus, se différenciant par la masse moléculaire du bloc PLGA situé à chaque extrémité : P20 (PLGA 20 kDa) et P40 (PLGA 40 kDa). Ces deux polymères permettent de générer des profils de libération de l'enzyme distincts et complémentaires. De cette manière, l'AMG active encapsulée dans les microsphères P20 (AMG_P20) a été libérée avec un profil caractérisé par un plateau atteint à 21 jours (≈ 86 % d'AMG libérée), tandis que celle encapsulée dans les microsphères P40 (AMG_P40) a montré une libération prolongée jusqu'à 49 jours (≈ 57 % d'AMG libérée).

Afin d'estimer l'activité AMG minimale nécessaire pour hydrolyser 8 mg d'amidon en 3 semaines (correspondant aux besoins énergétiques de $2x10^5$ cellules sur 21 jours), nous nous sommes basés sur l'activité de l'AMG définie à pH 4,5 et 40 °C par le fournisseur Megazyme[c], conduisant à la dose de référence de 0,03 U. À partir de cette valeur, deux conditions

[a] Poly(lactic-co-glycolic) acid. Les blocs de PLGA utilisés sont composés de 25% d'unités D-lactic, 25% d'unités L-lactic et 50% d'unités glycoliques.
[b] Poloxamère 188 : Copolymère triblock de poly(ethylene oxyde) (PEO) - poly(propylene oxyde) (PPO) - PEO
[c] D'après la définition de l'activité AMG : 1U d'AMG libère 0,18 mg de glucose (1 µmol) en 1 minute. Il faut donc 0,03 U pour libérer 8 mg de glucose sur 21 jours. Or d'après Megazyme, 1mg = 36U d'AMG à pH 4,5 et 40°C, donc 0,03U correspond à 0,8µg d'AMG dans ces conditions.

expérimentales ont été testées : une dose équivalente à cette référence (0,03 U) et une dose trois fois plus élevée (0,09 U), chacune incorporée dans un hydrogel de fibrine chargé en particules d'amidon (Pdt_20_cb). Pour les deux doses, la différence de cinétique de libération de l'AMG observée *in vitro* s'est traduite par des vitesses distinctes d'hydrolyse de l'amidon : plus rapide pour AMG_P20 et plus progressive pour AMG_P40. De plus, l'AMG_P20 (0,09 U) a permis d'atteindre environ 80 % d'amidon hydrolysé en 3 semaines en conditions physiologiques *in vitro*, ce qui laisse envisager qu'une dégradation complète puisse être atteinte à des doses similaires *in vivo*. Par ailleurs, aucune cytotoxicité aiguë causée par le système n'a été observée sur des $CSMs_{MoelleOsseuse}$ humaines, cultivées pendant 14 jours en conditions mimant l'ischémie. Au contraire, même à une dose faible (0,03U), l'AMG encapsulée a généré une production de glucose suffisante pour maintenir la viabilité de ces CSMs à environ 90 % de cellules vivantes pour AMG_P20 et 75 % pour AMG_P40 après 2 semaines.

Enfin, et de façon cruciale, l'encapsulation de l'AMG a significativement amélioré la rétention de l'AMG fluorescente au site d'implantation sous-cutané sur 21 jours (AMG_P20 : 41 ± 13 % de signal fluorescent résiduel ; AMG_P40 : 59 ± 20 %) comparativement à l'AMG libre (6 ± 3 %), tout en préservant son activité *in vivo* sur les 3 semaines d'implantation.

Ainsi, cette stratégie d'encapsulation ouvre la voie à une meilleure survie cellulaire et au maintien des fonctions des CSMs *in vivo* grâce à un apport contrôlé et prolongé en AMG (et in fine en glucose).

Ces résultats sont décrits plus en détail dans l'article suivant, formaté en vue de sa soumission et publication dans la revue *Tissue Engineering part A*.

Nutritive Hydrogel Incorporating a Micro-Encapsulated Amyloglucosidase: Toward Prolonged Metabolic Support of Transplanted Mesenchymal Stromal Cells Via Glucose Supply

MAGNIN Samantha[1], WOSINSKI Pauline[1], BAKARI William[1], LOURDIN Denis[2], POTIER Esther[1], VENIER-JULIENNE Marie-Claire[3], PETITE Hervé[1]

[1]B3OA, CNRS UMR 7052, INSERM U1271, Paris Cité University. Paris, France
[2]BIA, INRAE UR 1268. Nantes, France
[3]Université d'Angers, Inserm, CNRS, MINT, SFR ICAT, F-49000 Angers, France

Human Mesenchymal stromal cell (hMSC)-based therapies are promising for ischemia-related conditions (e.g., critical bone defects, ischemic stroke…) but their efficacy is limited by massive MSC death due to glucose depletion post-transplantation. To address this, a glucose delivery system combining starch and an enzyme that hydrolyses starch into glucose, amyloglucosidase (AMG), was developed to support hMSC survival. However, AMG rapidly disappears from the implantation site, limiting the system's effectiveness to seven days. To prolong glucose release, AMG was encapsulated into PLGA-Poloxamer188-PLGA microspheres, using two copolymers P20 (20kDa PLGA) and P40 (40kDa PLGA) to obtain distinct AMG release profiles. P20 allows quas-full AMG release over 21 days, while P40 offered a slower release, reaching 57% of released AMG over 49 days. Within a fibrin hydrogel containing starch and hMSCs, no evidence of acute cytotoxicity was associated with AMG encapsulation. *On the contrary, glucose was delivered in relevant amount to maintain MSC viability under oxygen and glucose deprivation conditions (OGD — 0 glucose/serum, pO2 = 0.1%) with 90 ± 11% (P20) and 75 ± 7% (P40) viable cells after 14 days. AMG encapsulation significantly improved enzyme retention at the subcutaneous implantation site over 21 days (P20: 41 ± 13%, P40: 59 ± 20%) versus free AMG (6 ± 3%). Together, these findings demonstrate that AMG encapsulation enables sustained in vivo enzyme delivery and prolonged local activity — a critical step toward enhancing hMSC survival and function in ischemic environments.*

Keywords: AMG encapsulation, Fibrin/starch hydrogel, hMSC viability, Ischemia, PLGA-P188-PLGA copolymer, Microspheres, Controlled glucose delivery.

1. Introduction

Mesenchymal stromal cells (MSCs) have attracted considerable interest within the scientific community due to their immense potential in tissue engineering. They can contribute to tissue repair both directly, through cellular differentiation, and indirectly, via paracrine effects (secretion of pro-survival, pro-angiogenic, or anti-inflammatory factors), making them highly promising candidates for a wide range of therapeutic applications. However, although numerous clinical trials have been attempted, only a few have successfully reached clinical use *(2,3)*. One major limitation is the massive death of implanted MSCs, with over 90 % of cell death within 3 to 7 days post-implantation *(4–7)*, due to the hostile environment of injured tissues. Ischemic exposure prevents MSCs from generating

sufficient ATP to meet their energy demands, thereby compromising both their survival and their ability to carry out essential functions in tissue repair.

To counteract this metabolic stress, we focused on the central role of glucose in supporting MSC viability under ischemic stress. We previously demonstrated that local glucose supplementation markedly improves human MSC (hMSCs) survival both *in vitro* (pO_2=0.1–1%, glucose deprivation) *(8–11*) and *in vivo* (subcutaneous model) *(9,10)*. Based on this finding, we designed a fibrin-based nutritive hydrogel containing starch (a glucose polymer) and amyloglucosidase (AMG), an enzyme that hydrolyzes starch into glucose *(1)*. When hMSCs were incorporated into this formulation and implanted subcutaneously, their viability during the first week was greatly improved (76.4% with starch/AMG vs. 23% without starch/AMG) and their pro-angiogenic function was preserved. Yet this benefit vanished by the second week, with viability falling below 20%, a duration insufficient for transplanted MSCs to support neovessel maturation *(12),* undergo differentiation *(13,14)*, and achieve their full therapeutic potential.

To elucidate the underlying causes of this sharp decline in transplanted hMSC viability between day 7 and 14, fluorescence imaging of labelled AMG was performed and revealed a complete disappearance of AMG from the implantation site during the first week *(1).* This observation highlights an inherent limitation of enzyme-based strategies: the difficulty of maintaining sustained local enzymatic activity over time due to enzyme diffusion from the target site and its proteolytic degradation *(15–18)*. In injured tissues, this challenge is exacerbated by a protease-rich microenvironment *(19)*, which further compromises enzyme persistence. Although this limitation is acknowledge, the local fate (>48 h) of injected enzymes remains poorly characterized in proof-of-concept studies *(20–23)*, hindering the rational optimisation of effective therapeutic strategies *(24,25)*.

Here, we address this gap by focusing on the long-term fate of administered AMG both *in vitro* and *in vivo*. To confine the enzyme and control its release at the implantation site, we investigate a novel nutritive hydrogel in which AMG is encapsulated in PLGA-P188-PLGA microspheres (poly(lactic-co-glycolic acid) and Poloxamer 188) *(26)*. These microspheres have efficiently release encapsulated enzymes *(26)* and growth factors *(27)* for 2–5 weeks *in vitro,* supporting their suitability as a carrier for AMG. Our underlying hypothesis is that physical confinement of AMG will prolong its local activity, thereby sustaining glucose generation over clinically relevant timescales to maintain hMSC viability.

We first optimise the AMG encapsulation process to obtain two complementary release profiles by varying the PLGA molecular weight, enabling tailored glucose delivery. We then confirmed the cytocompatibility of the novel nutritive hydrogel and its ability to sustain hMSC viability under conditions of oxygen and glucose deprivation (OGD). Finally, we demonstrated that encapsulation effectively ensures AMG local retention at the implantation site and preserves its activity. By overcoming a key limitation of conventional nutritive hydrogels—the rapid *in vivo* loss of enzymatic activity—this study paves the way for a new generation of long-acting fibrin-based delivery systems, whose full therapeutic potential can be realized once the remaining components are systematically optimized.

2. Materials & methods

All chemicals were furnished by Sigma Aldrich (St Quentin Fallavier, France) unless otherwise specified.

2. A. *In vitro* studies.

2. A. 1. AMG nanoprecipitation optimisation

To optimize AMG nanoprecipitation (*Aspergillus niger*. Neogen Megazyme. Lansing, USA), three parameters at 3 levels were studied using an experimental design: (i) incubation time (X_1), (ii) NaCl concentration (X_2), and (iii) temperature (X_3). AMG (20 mg/mL) and P188 (Kolliphor® - 200 mg/mL) solutions were prepared by dissolving the compounds in citrate buffer (pH 5.4) with varying NaCl concentrations (0.01, 0.155, or 0.3 M). For each NaCl concentration, the corresponding AMG and poloxamer solutions were mixed (1:1 v/v), and 90 µL of this mixture was added to 3 mL glycofurol in 10 mL teflon centrifuge tubes (Thermo Scientific. New York, US). Nanoprecipitations were then carried out at 0, 10, or 20 °C for 30, 60, or 90 min. Suspensions were centrifuged (10,000 g, 30 min, 4 °C), and the supernatants were removed to collect nanoprecipitates for activity assays. Nanoprecipitation efficiency was defined as the percentage of active AMG recovered relative to the initial amount.

Optimization of the enzyme precipitation was carried out using response surface methodology (DoE), consisting in 15 experiments uniformly distributed over the cubic studied experimental domain including 6 tests points (*Figure. 1*). The central point (experiment 9), and four additional randomly selected conditions (experiment 3; 7; 10; 12) were repeated for statistical analysis. The response (Y) was the AMG precipitation yield (%). A polynomial model of degree 1 was used to fit the experimental data. The experimental design and the treatment of experimental results (regression, statistical tests etc.) were performed with Azurad® software (Azurad. Marseille, France). The model has been validated (lack of fit and regression test) by analysis of variance (ANOVA). Graphical plots representative of the response surfaces in the experimental domain were drawn using Azurad® software.

Additionally, six nanoprecipitations were performed for 30 min with 0.01 M NaCl at −4 °C to investigate the effect of decreased temperature.

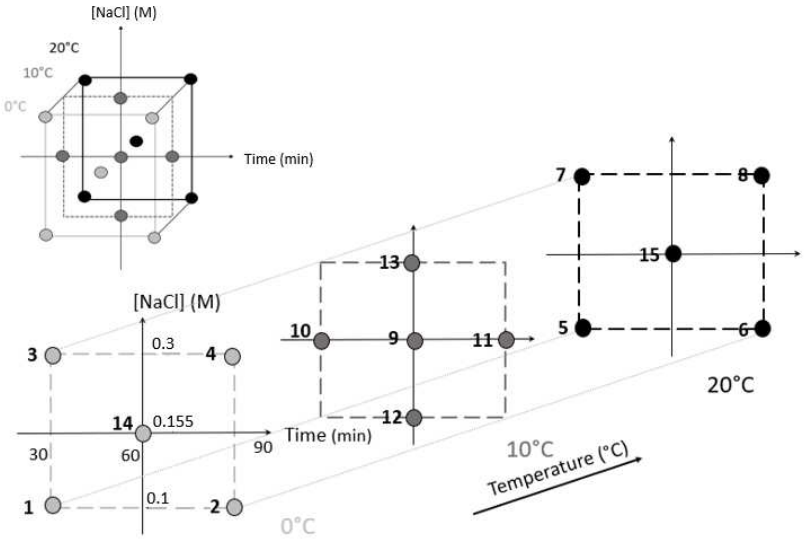


Figure. 1 Spatial representation of the experimental design and the 15 experiments involved.

2. A. 2. AMG activity dosage

AMG activity was measured by quantifying glucose released from maltodextrin (Roquette. Lestrem, France) enzymatic hydrolysis. Briefly, 400 µL of unknown AMG solution were mixed with 500 µL citrate

buffer (pH 5.4, 0.1 M) and 100 µL maltodextrin solution (16% w/v citrate buffer). Hydrolysis was performed at 50 °C and then stopped by immersing the tubes in boiling water for 10 min to inactivate AMG. The reaction time was pre-established by a preliminary test to ensure substrate excess (i.e., glucose production ≤ 1.6 mg) so that glucose produced was proportional to enzyme activity. Produced glucose was quantified using a commercial kit (Glucose H. Diasys Diagnostic Systems GmbH. Holzheim, Germany) with Respons910 automated analyser (Diasys Diagnostic Systems GmbH) and normalized to reaction time to obtain glucose production rates. The unknown AMG activity was determined by comparing its glucose production rate to the rates obtained from a standard curve. Results were classically expressed in units (U), with a conversion factor of 36 U/mg AMG according to commercial provider.

2. A. 3. Microsphere preparation

AMG was nanoprecipitated under optimized conditions (30min, 0.3 M NaCl, –4 °C), then nanoprecipitated enzyme was recovered by centrifugation (10,000g, 4°C, 30 min) before to be encapsulated in microspheres via a the solid-in-oil-in-water (s/o/w) emulsion solvent evaporation/extraction process (26,28). Briefly, recovered AMG nanoprecipitates were dispersed in a PLGA-P188-PLGA copolymer solution (150 mg copolymer in 2 mL dichloromethane/acetone, 3:1 v/v).

The tri-block copolymer consisted of a central P188 segment (M_n = 8,400 g/mol), corresponding to a copolymer (PEO-PPO-PEO) of poly(ethylene oxyde) (PEO) and poly(propylene oxyde) (PPO), flanked by two PLGA segments, containing 25% D-lactic units, 25% L-lactic units, and 50% glycolic units. Two different copolymers, P20 and P40, were used, with average molecular weights of $M_{n\ GPC}$ 26, 100 g/mol (M_w/M_n=1.30) and $M_{n\ GPC}$ 38, 800 g/mol (M_w/M_n=1.38), respectively (SynBio3, Institut des biomolecules Max Mousseron, Montpellier, France).

The solid-in-oil suspension was emulsified in 90 mL PVA (6% w/v) (Mowiol® 4-88. Kuraray Specialities Europe. Frankfurt, Germany) at 1 °C with mechanical stirring (950 rpm, 1min) in a glass vessel (4.5 cm inside diameter) with a dual wall to control the temperature. 100 mL of cold water for injection (WFI) were then added, and the emulsion was stirred for 10 min more. Then, the emulsion was poured into a second glass vessel (10 cm inside diameter, with a dual wall) containing 500 mL of WFI (1 °C) and stirred continuously at 300 rpm during 20 min to extract the solvent. In all steps, an overhead stirrer with a 4 blades propeller was used (Heidolph® RZR 2041, Schwabach, Germany). Finally, microspheres were recovered by filtration on a 5 µm filter (HVLP type, Millipore SA, Guyancourt, France), washed, freeze dried and stored at −80 °C. Blank microspheres (without AMG) were prepared similarly by replacing initial AMG solution with citrate - 0.3 M NaCl buffer. The theoretical AMG loading was 0.6% (w/w).

“AMG_P20” and “AMG_P40” refer to AMG-loaded P20 and P40 microspheres respectively, while “Blank_µS” refers to a mix of blank P20/P40 (1:1 w/w).

2. A. 4. Microsphere characterization

<u>Microsphere morphology and mean size</u>

The microsphere mean size was measured using a Coulter® Multisizer (Coultronics, Margency, France). Microspheres were dispersed in an isotonic saline solution prior to be analyzed (Isoton® II solution, Coultronics, Margency, France).

Microsphere surface morphology was observed using scanning electron microscopy – SEM (FEG-SEM Ultra55, Zeiss. LISE lab UMR8235. Paris, France). Freeze-dried microspheres were mounted on metal stubs with double-sided adhesive tape and sputter-coated with a gold nanolayer prior to analysis. The internal morphology of microspheres was investigated following the procedure described in (26). Briefly, 10 mg of microspheres were dispersed into Shandon Cryomatrix® (Thermo Fisher Scientific. Waltham, USA) and frozen (−80 °C, 1 h). The resulting blocks were sectioned into 15 µm-thick slices at −20 °C using a microtome (Leica CM1860, Leica Biosystems. Nanterre, France). Slices were rinsed three times with cold water (1 °C) before freeze-drying. Samples were then analyzed by SEM as described above.

AMG encapsulation efficiency

Encapsulation efficiency was determined by dissolving 8 mg of AMG-loaded microspheres in 0.9 mL acetone and 0.1 mL citrate buffer under mechanical stirring (600 rpm) for 1 h, followed by the addition of 3 mL of citrate buffer and stirring for an additional hour. The resulting solution was diluted 30-fold, and AMG activity was, then, measured as described previously.

To account for potential effects of acetone and dissolved PLGA–P188–PLGA polymer on AMG activity, a standard curve was prepared as follows: 8 mg of blank microspheres (Blank_µS) were dissolved in 0.9 mL acetone and 0.1 mL of AMG solution (500 µg/mL in citrate buffer), corresponding to 100% of the theoretical AMG loading in 8 mg of microspheres. The same dissolution and dilution procedure (1h stirring, addition of 3 mL citrate buffer, 1h stirring, followed by 30-fold dilution) was applied. From this stock solution, five standards were prepared corresponding to 100%, 75%, 50%, 25%, and 12.5% of the theoretical AMG loading.

Encapsulation efficiency was expressed as the percentage of active AMG recovered relative to the theoretical loading (0.6% w/w). The efficiency was evaluated across ten independent batches of AMG_P20 and AMG_P40 formulations.

AMG distribution within microspheres

AMG was fluorescently labelled with DyLight 650 NHS ester (Thermo Fisher Scientific. Waltham, USA) following the manufacturer's instructions, achieving a dye-to-protein ratio of 1.4 mol/mol. Labelled and non-labelled AMG were then co-encapsulated in P20 and P40 microspheres at a 1:5 ratio. Fluorescent AMG distribution within the microspheres was observed by confocal microscopy (LSM ZEISS 510)

Release of active AMG from microspheres

For release studies, 10 mg microspheres were suspended in 1 mL citrate buffer (pH 5.4) and incubated at 37 °C under mechanical stirring (125 rpm). At set intervals, suspensions were centrifuged (3,000 g, 5 min), and supernatants were collected for activity measurement. A standard curve was generated by incubating non-encapsulated AMG (Free AMG) under identical conditions to correct for potential activity loss over time (*Supplementary Figure S 1*). Recovered microspheres were resuspended in fresh buffer and re-incubated until the next time point. Cumulative release was expressed as the percentage

of total encapsulated activity in 10 mg microspheres. Experiments were performed in triplicate on four independent batches of AMG_P20 and AMG_P40.

2. A. 5. Fibrin-based hydrogels preparation

Fibrin-based hydrogels (200 µL, 7mm diameter, 5mm height) were prepared in Parafilm®-coated 1.5 mL Eppendorf® caps to render the surface hydrophobic. Solution A (*Table 1*) was first added to the caps and mixed with solution B (*Table 1*) under mechanical stirring (2 min, 750 rpm). The mix was then incubated at 37 °C for 1.5 h under a humidified atmosphere to polymerize. For starch-loaded hydrogels, 8 mg starch particles were added prior to solution A. Starch particles obtained by cryo-milling extruded potato starch, were provided by BIA laboratory (INRAE UR1268. Nantes, France). Starch extrusion was performed as using a HAAKE™ Rheomex OS Twin Screw Extruder, (ThermoScientific, US) under controlled conditions of temperature (100-130°C), water content (23%), feed rate (60 g/min), and screw rotation speed (500 rpm).

Preliminary experiments (*Supplementary Figure S* 2) showed better AMG preservation at pH 7.2 versus 7.4, without affecting cell viability or adhesion; therefore, hydrogels were covered with 1 mL αMEM (PAN Biotech GmbH. Aidenbach, Germany) supplemented with 10 mM MOPS and 10 mM HEPES to maintain pH 7.2 (hereafter, supplemented αMEM) in subsequent *in vitro* studies.

	Components	Components concentration in hydrogel
Solution A 82µL	Fibrinogen (50 mg/mL – 72 µL)	18 mg/mL
	HEPES buffer (10 mM – 10 µL)	0.5 mM
	w/wo AMG_P20 or AMG_P40	0.031 U to 0.31 U
	w/wo Blank_µS	(weight_AMG_P20 + weight_AMG_P40) ÷ 2
Solution B 118µL	Aprotinin (3000 U/mL – 7.4 µL)	18.6 U/mL
	Thrombin (500 U/mL – 7.2 µL)	18 U/mL
	Salts (0.3 M NaCl + 0.04 M $CaCl_2$ – 10µL)	0.15 M NaCl & 0.02 M $CaCl_2$
	HEPES buffer (10 mM – 90 µL)	4.5 mM
	w/wo Free AMG (3.4 µL)	0.031 U to 0.31 U
	w/wo hMSCs	$2x10^5$ cells/ hydrogel

Table 1. Components and final concentrations in fibrin-based hydrogel. All components were dissolved in 10 mM HEPES buffer (pH 7.2). Hydrogels were formed by mixing Solution A, containing fibrinogen with or without (w/wo) microspheres, with Solution B, containing thrombin, aprotinin, salts, and optionally Free AMG or hMSCs. Amounts of Blank_µS and Free AMG were adjusted to match, respectively, the average weight of AMG-loaded microspheres (AMG_P20 + AMG_P40) and their encapsulated AMG load.

2. A. 6. Glucose release in hydrogels

Starch-loaded hydrogels (*n = 4*) were prepared as described, containing either a mix of blank P20 and P40 microspheres (Starch/Blank_µS, negative control) or encapsulated AMG (Starch/AMG_P20 or Starch/AMG_P40) at low (0.03 U) or high (0.09 U) AMG load per hydrogel. After polymerization, hydrogels were covered with 1 mL supplemented αMEM (glucose- and serum-free) and incubated at 37 °C (pO_2 21%, pCO_2 5%). Supernatants were collected at set time points for glucose measurement

using a Respons910 analyzer. Hydrolysed starch was expressed as a percentage according to the following formula.

$$Hydrolysed\ starch\ (\%) = \frac{Weight\ of\ released\ glucose \times 0.9}{Initial\ weight\ of\ starch - \ water\ content} \times 100$$

2. A. 7. hMSCs-based study

Culture conditions

hMSCs were obtained from bone marrow discarded during routine orthopedic surgery from three male donors (ages 5, 16, and 18) at Lariboisière Hospital, Paris, France, with informed consent in accordance with hospital regulations and relevant ethical standards. Cells were isolated following adapted protocols (30,31) and characterized by surface markers ($CD90^+/CD105^+/CD40^-/CD73^+$). hMSCs were cultured in αMEM (1 g/L glucose) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (PAA Laboratories GmbH. Les Mureaux, France) and 1% (v/v) antibiotic/antimycotic (PAA Laboratories GmbH) under standard conditions (37 °C, 5% CO_2, humidified atmosphere). Cells were passaged at 80–90% confluence using trypsin-EDTA and replated at 1×10^4 cells/cm². For experiments, hMSCs from each donor were expanded separately to passage 4–5 and then pooled in equal proportions.

hMSCs survival assay

Four groups of 200 µL hydrogels (n = 5), each containing 2×10^5 hMSCs, were prepared: (i) starch with Blank_µS (Starch/Blank_µS, negative control), (ii) starch with 0.03 U AMG_P20 (Starch/AMG_P20), (iii) starch with 0.03 U AMG_P40 (Starch/AMG_P40), and (iv) no starch or AMG (Starch(-)/AMG(-), positive control). After polymerization, the first three groups were covered with 1 mL supplemented αMEM (glucose-and-serum-free), while the positive control received 1 mL supplemented αMEM (serum-free) containing 5 g/L glucose. Hydrogels were incubated under near-anoxic conditions (pO_2 = 0.1%, pCO_2 = 5%, 37 °C) in a ProOx-C chamber (C-Chamber, C-374. Biospherix. New York, USA) with balanced nitrogen to mimic ischemia via oxygen and glucose deprivation (OGD).

Hydrogels were collected on days 1, 3, 7, 14, and 21. Each was incubated with Hoechst 33342 (HE, 1.5 µg/mL) for nuclear staining and concurrently digested with 1 mL Trypsin/EDTA solution (10 mg/mL trypsin, 0.4 mg/mL EDTA) at 37 °C under mechanical stirring (30 rpm) for 30 min to recover hMSCs. Propidium iodide (PI, 1.5 µg/mL) was then added, and hMSCs were filtered through a 70 µm strainer (Clearline. Dominique Dutscher. Brumath, France) to prevent clogging during flow cytometry-based cell quantification (Attune, Life Technologies, St Aubin, France). Viable cells were defined as HE^+/PI^-.

As no significant cell death occurred within 24 h (~96% viable, *Supplementary Figure S* 3), viability was normalized to day 1.

2. B. *In vivo* studies.

All procedures involving animal housing, handling, surgery, and welfare monitoring were conducted in accordance with European Directive 2010/63/EU. Experiments were approved by the Ethics Committee on Animal Research at Lariboisière/Villemin (Paris, France; APAFIS #45973-2023091810349531 v5).

2. B. 1. Ectopic implantation

Nine-week-old female nude mice (NMRI-nu(nu/nu). Janvier Labs. Le Genest-Saint-Isle, France) were acclimatized for one week before surgery. Mice received a subcutaneous injection of buprenorphine (Buprecare®, 0.1 mg/kg. Axience. Pantin, France), and the surgical sites were disinfected with povidone-iodine (Betadine®. Vetoquinol. Paris, France). Anaesthesia was induced with 2% isoflurane (Iso-Vet®. Piramal Healthcare. Northumberland, UK) in 50:50 O_2/air at 2 L/min and maintained throughout surgery. Four symmetrical incisions (7.5 mm) were made along the spine at hip and shoulder levels to create subcutaneous pouches, into which hydrogels were randomly implanted. Skin was closed with 4.0 polyglactin 910 sutures (Ethicon. Issy-les-Moulineaux, France), and postoperative analgesia (buprenorphine) was administered at 12 h and 24 h. Animal welfare was monitored throughout the study.

2. B. 2. AMG disappearance from the implantation site

AMG was fluorescently labelled and encapsulated in P20 and P40 microspheres as previously described. Three groups of starch-loaded hydrogels were prepared with either (i) 0.3 U encapsulated labelled AMG in P20 (Starch/LabAMG_P20) or (ii) P40 microspheres (Starch/LabAMG_P40), or (iii) 0.3 U free labelled AMG (1:5 labelled:non-labelled ratio; Starch/Free LabAMG). Hydrogels were implanted ectopically in mice (6 hydrogels per group, 4 groups per mouse). A fourth starch-loaded group containing a 1:1 mixture of non-labelled AMG_P20 and AMG_P40 (0.15 U each) confirmed that fluorescence originated solely from labelled AMG (*data not shown*). Higher AMG doses were used to ensure detectable fluorescent signals.

Fluorescence at the implantation sites was measured non-invasively under isoflurane anaesthesia on days 0, 1, 2, 3, 5, 7, 9, 12, 14, 18, 21, and 28 using an IVIS Lumina II system (Caliper Life Sciences. Villebon-sur-Yvette, France) and normalized to day 0.

2. B. 3. Residual active AMG released after explantation

Starch-loaded hydrogels containing Starch/AMG_P40 (0.03 U) or Starch/AMG(-) were implanted in mice and explanted on days 3 and 21. Residual glucose in the explants was first measured (*Supplementary Figure S 4. A*) and used as the basal level for subsequent calculations. To assess active AMG release, 200 µL maltodextrin solution (16% w/v citrate buffer) was added, and samples were incubated for 3 h at 50 °C. A standard curve was prepared concurrently by adding 200 µL maltodextrin to 200 µL Free AMG solutions of varying concentrations (100%, 50%, 25%, 10%, and 5% of encapsulated AMG load in hydrogel) to mimic the hydrogel volume. Released AMG activity was determined by calculating the glucose production rates and comparing them to the rates obtained from the standard curve.

2. C. Statistics

Numerical data are presented as means ± standard deviation. Statistical analyses were performed using *GraphPad Prism v8.0.2* (California Corporation, USA). At least three biological replicates per group were used for *in vitro* studies, six per group for the *in vivo* experiment, and four per group for the *ex vivo* study. The effects of group, incubation/implantation duration, and their interaction were

assessed by two-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test when significant. For single-factor analyses (e.g., group effect at a single time point or time effect within one group), the non-parametric Kruskal–Wallis test was applied, followed by Dunn's post-hoc test if significant. A p-value < 0.05 was considered statistically significant and annotated as follows: *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001; ****p < 0.0001.

3. Results

3. A. Optimal AMG nanoprecipitation

In order to maximize AMG encapsulation efficiency, AMG nanoprecipitation step was optimized. To this effect, three key factors were investigated: (X_1) the duration, (X_2) the salt concentration, and (X_3) the temperature (*Figure. 2 - A*). Model coefficients were determined by the least square regression method, and the predictive ability of the model was confirmed by ANOVA analysis (*Supplementary Figure S* 5). To strengthen the model, 3 additional test points were included in the final calculations, resulting in the surface responses (*Figure. 2 - B*) and the following equation (Y (%): nanoprecipitation efficiency):

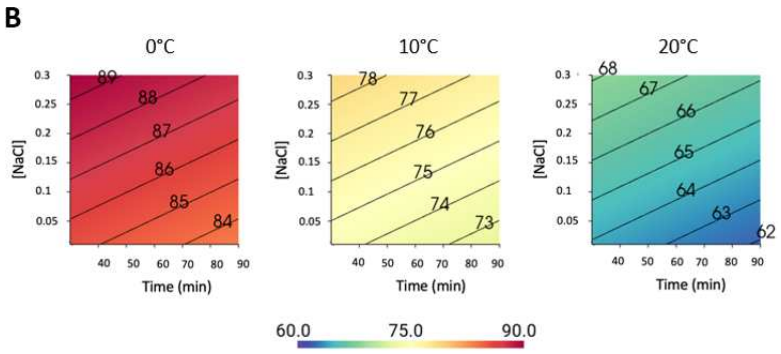
$$Y = 75.75 - 1\,X_1 + 2.13\,X_2 - 10.74\,X_3$$

The mathematical model demonstrated an optimal AMG nanoprecipitation efficiency of 89.6 $\pm$ 10%, reached for the following optimized conditions: 30min, 0.3M NaCl, 0°C. Within the studied experimental domain, temperature (X_3) was identified as the most influential parameter. To further explore this effect, nanoprecipitations were performed at −4 °C and compared to those performed at 0°C. Although, nanoprecipitation efficiency remained similar, conducting the process at −4 °C reduced variability (*Figure. 2 - C*). Consequently, all subsequent nanoprecipitations were carried out at −4 °C.

A

Experiment	Time (min, X_1)	NaCl concentration (M, X_2)	Temperature (°C, X_3)	Nanoprecipitation efficiency (%, Y)
1	30	0.01	0	88
2	90	0.01	0	73
3	30	0.3	0	101
				88
				86
				88
				87
4	90	0.3	0	95
5	30	0.01	20	66
6	90	0.01	20	60
7	30	0.3	20	69
				68
8	90	0.3	20	54
9	60	0.155	10	101
				88
				76
				86
				67
				76
				65
10	30	0.155	10	74
				56
11	90	0.155	10	75
12	60	0.01	10	89
				59
13	60	0.3	10	76
14	60	0.155	0	86
15	60	0.155	20	74
Test A	30	0.155	0	84
Test B	45	0.2275	0	90
Test C	60	0.3	0	83

B



C

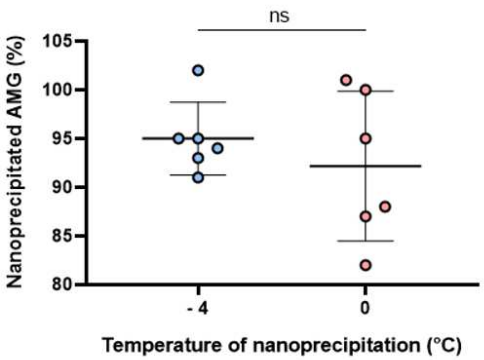


Figure. 2 Nanoprecipitation optimization of AMG. A. Results of the 15 experiments involved in the experimental design and their repetition. The 3 last points were used for the validation of the model. **B.** Response surface plots of AMG nanoprecipitation efficiency. C. Comparison of AMG nanoprecipitation efficiency at -4°C and 0°C**.**

3. B. AMG release profile from P20 or P40 loaded microspheres

To generate two distinct release profiles, AMG was subsequently encapsulated in microspheres composed of two different PLGA–P188–PLGA copolymers (P20 and P40) differing in PLGA molecular weight. AMG_P20 microspheres exhibited higher porosity, resulting in a more homogeneous distribution of the enzyme compared to AMG_P40 (*Figure. 3 – B.C*). However, no significant differences were observed in encapsulation efficiency (AMG_P20: 32 ± 5 % and AMG_P40: 36 ± 10 %) or microsphere diameter (AMG_P20: 28 ± 10 µm and AMG_P40: 31 ± 11 µm) (*Figure. 3 - A.*)

To confirm PLGA molecular weight effect on AMG delivery profiles, AMG release profiles were evaluated (*Figure. 3 - D*). They were monitored in pH 5.4 buffer, to preserve enzymatic activity for up to two months (*Supplementary Figure S 1*). Both microsphere types exhibited a burst release (~20% of total encapsulated active AMG) within the first 24 hours. Thereafter, AMG_P20 exhibited a continuous phase, reaching 76 ± 6% by day 7 followed by a slower release to reach a plateau of 86 ± 6% at Day 21. AMG_P40 released only 22 ± 6% at Day 7 followed by a continuous release to reach a plateau of 57 ± 11% at Day 49.

Upon starch addition, the comparison between P20 and P40 microspheres was further extended to the analysis of glucose release profiles. To assess AMG encapsulation effects, the glucose production profile from free AMG was included (*Supplementary Figure S 6*). AMG_P20-mediated glucose delivery was similar to that of Free AMG up to day 21, after which AMG_P20 released significantly higher amounts of glucose, whereas AMG_P40 exhibited a slower and more sustained release than AMG_P20. Thus, encapsulation effectively prolonged glucose delivery compared with free AMG *in vitro*.

A

Name	Diameter (µm)	Encapsulation efficiency of active AMG (%)
AMG_P20	28 ± 10	32 ± 5
AMG_P40	31 ± 11	36 ± 10

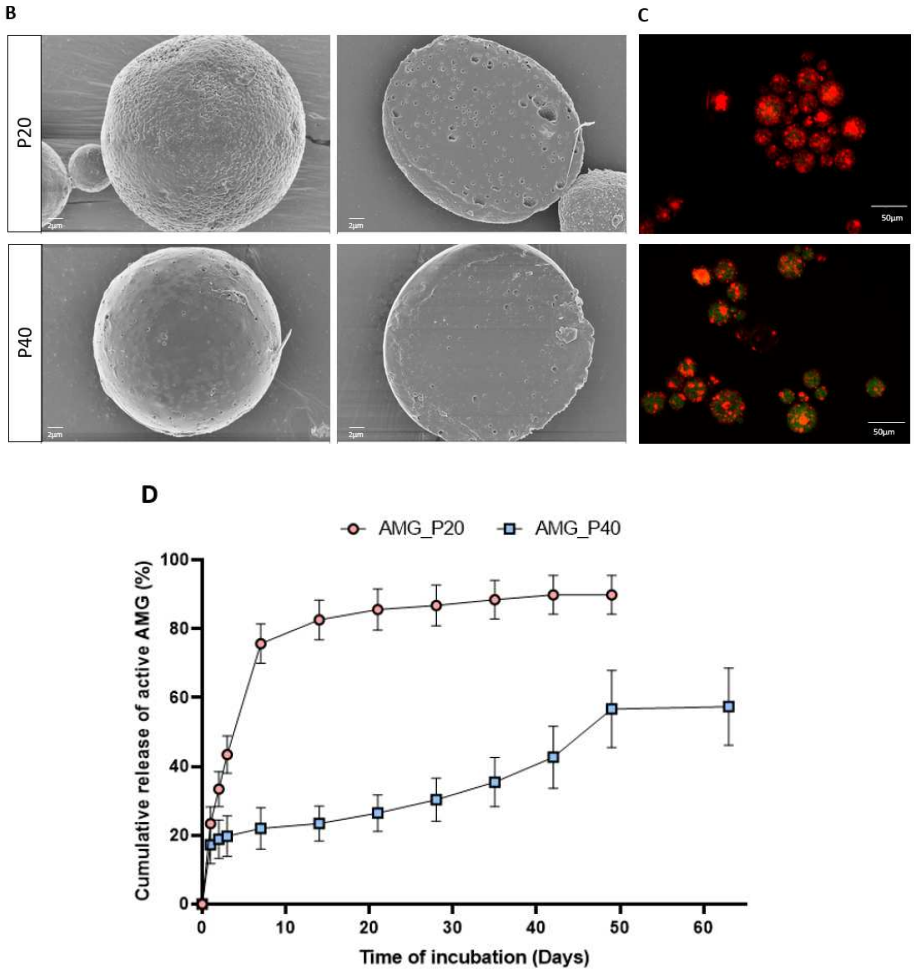


Figure. 3 Characterisation of AMG encapsulation in microspheres. A. Characteristics of microspheres: diameter (µm, *n=3* batches) and AMG encapsulation efficiency (%). AMG encapsulation efficiency was calculated on *n=10* batches. **B.** SEM images of the external and internal porosity of P20 and P40. **C.** Labelled AMG distribution within the microspheres. **D.** Release kinetics of AMG (37°C, pH=5.4, under stirring). Rounds: AMG_P20. Squares: AMG_P40. *n=3X4* batches.

3. C. Glucose delivery and cytocompatibility of AMG-loaded microspheres with hMSCs

To reproduce the nutritive biomaterial used for cell delivery, fibrin hydrogels were utilised as carriers for starch and AMG-loaded microspheres (*Figure. 4 - A*), and glucose production was assessed at physiological pH. The study focused on the impact of microsphere type and AMG dose on glucose release, by co-loading starch with two doses of encapsulated AMG (0.03 and 0.09 U/hydrogel) (*Figure. 4 - B*). No glucose was detected without AMG (Starch/Blank_µS). On day 28, P20 microspheres produced the highest glucose amounts, with 5.3 ± 0.1 mg at the low AMG dose (66% starch hydrolysis) and 6.5 ± 0.3 mg at the high AMG dose (81%). In contrast, P40 microspheres released 3.2 ± 0.3 mg (40%) and 4.9 ± 0.2 mg (61%), respectively. Thus, both microsphere type (P20 vs. P40) and AMG dose strongly influenced glucose production.

After confirming glucose production from encapsulated AMG, we next verified that the system did not induce acute cytotoxicity on hMSCs (*Figure. 4 - C*). To this aim, fibrin hydrogels containing 2 × 10^5 hMSCs were prepared with or without encapsulated AMG and compared to the positive control (supplemented with glucose) under OGD conditions. As expected, in the absence of AMG (Starch/Blank_µS), no glucose was detected and hMSC viability dropped to 8 ± 4% by day 14. In contrast, at the same time point, viability remained high in both encapsulated AMG groups (90 ± 11% for Starch/AMG_P20 and 75 ± 7% for Starch/AMG_P40), with viability levels comparable to the positive control.

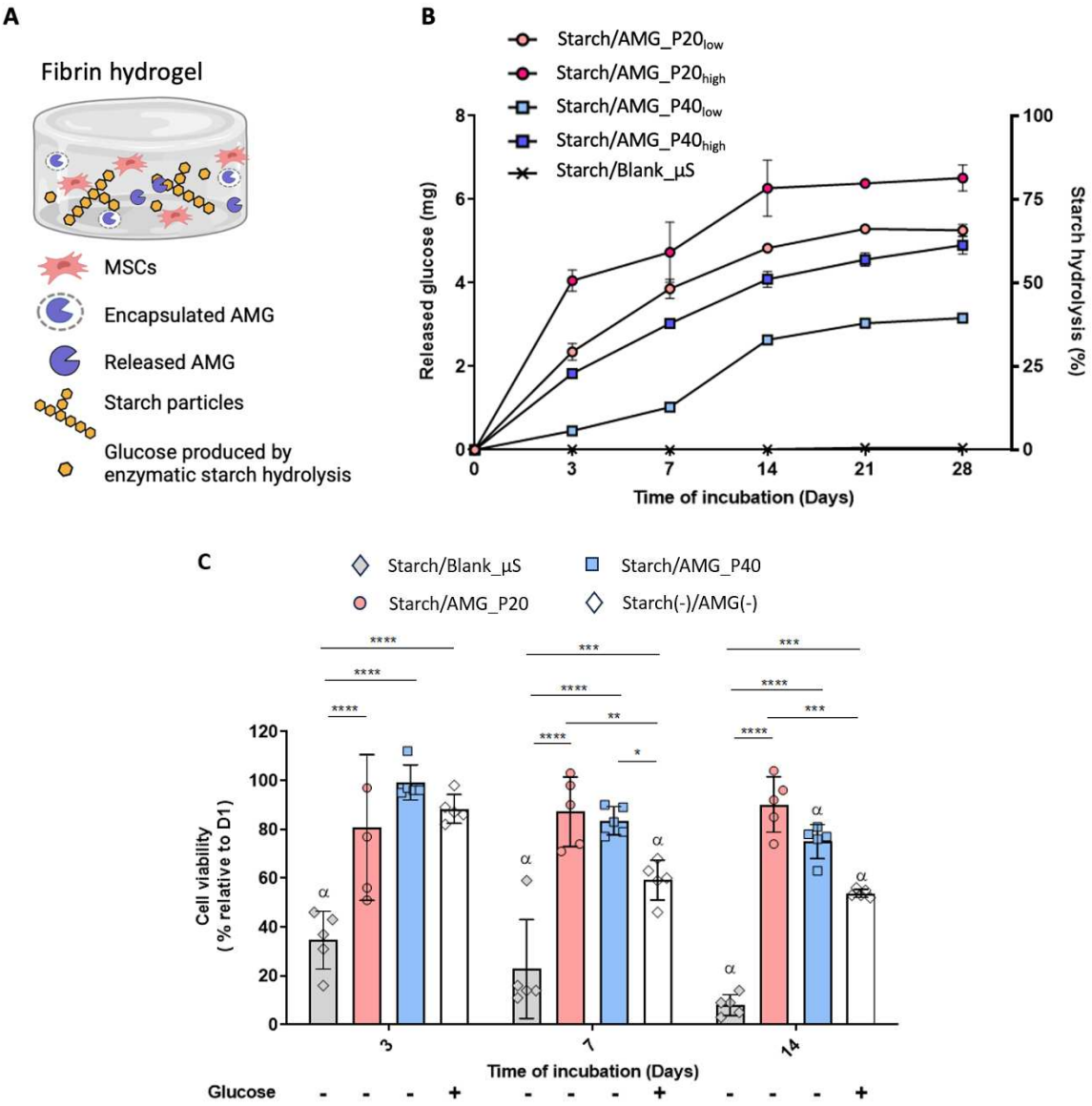


Figure. 4 Glucose release and hMSC viability within fibrin hydrogel. A. Schematic of fibrin-based hydrogel containing hMSC, starch, and encapsulated AMG (not to scale). **B.** Kinetics of glucose produced by encapsulated AMG-mediated starch hydrolysis. Two AMG doses were used (low and high), *n=4*. **C.** Cellular viability in OGD conditions, α : p value < 0.05 compared to D1, *n=5*.

3. D. Remaining active AMG at the implantation site over time

Finally, we assessed whether AMG encapsulation could limit enzyme disappearance from the implantation site. Starch-containing fibrin hydrogels with either encapsulated or free fluorescently labelled AMG (Starch/LabAMG_P20, Starch/LabAMG_P40, and Starch/Free LabAMG) were implanted subcutaneously in mice, and fluorescence was monitored at the implantation site (*Figure. 5 - A*). Starch/LabAMG_P20 and Starch/LabAMG_P40 maintained fluorescence levels comparable to day 0 until days 9 and 18 of implantation, respectively, in contrast to Starch/Free LabAMG, whose signal completely disappeared on day 9. The protective effect of encapsulation on AMG retention, relative to its free form, became apparent as early as day 7 for AMG_P20 and day 3 for AMG_P40. By day 21, residual fluorescence was 41 ± 13% for P20, 58 ± 18% for P40, and only 6 ± 3% for Free AMG.

To confirm that AMG remained functional after implantation, Starch/AMG_P40 hydrogels and negative controls (Starch/AMG(-)) were explanted on days 3 and 21 and subjected to 3-h release assays (*Figure. 5 - B*). Only AMG_P40 was analysed, as it exhibited the highest retention of labelled AMG. Active AMG was still detected in comparable levels after 3 and 21 days of implantation.

Altogether, both studies demonstrate that encapsulation preserves active AMG at the implantation site.

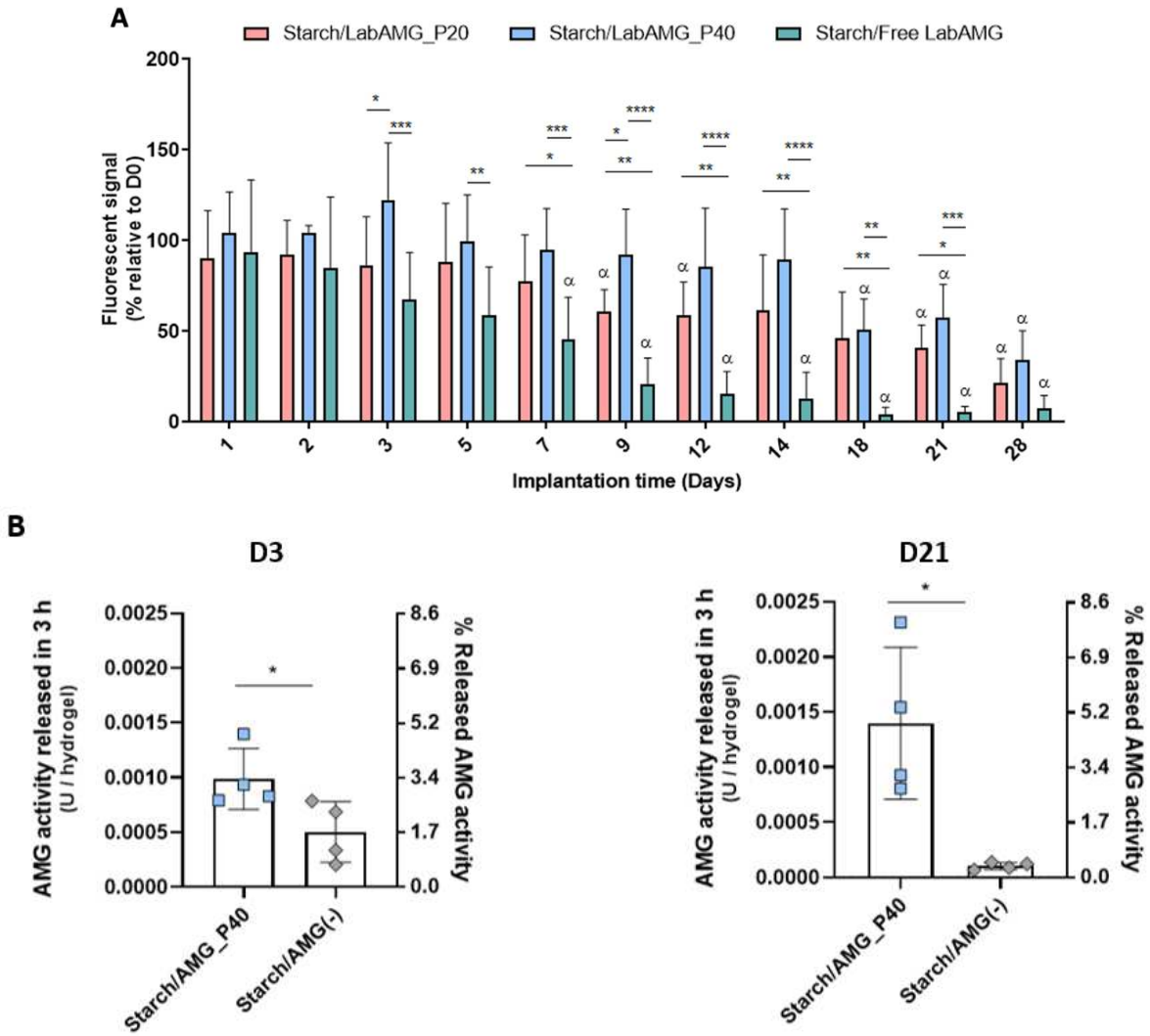


Figure. 5 Confinement of active AMG at the implantation site. A. Residual fluorescence efficiency of labelled AMG (encapsulated or not), measured at the subcutaneous implantation site, in nude over 4 weeks. α : p value < 0.05 compared to D0, *n=6*. **B.** Active AMG released from Starch/AMG(-) and explanted Starch/AMG_P40 hydrogels after 3h of incubation. The right axis represents the corresponding percentage of released activity, normalised to total encapsulated AMG activity. Explantations were performed on day 3 and 21, *n=4*.

4. Discussion

In our previous study, the *in vivo* disappearance of AMG from the implantation site was associated with the limited 7-day survival of hMSCs within the nutritive hydrogel (*1*). To address this limitation and take an initial step toward developing a novel nutritive hydrogel, AMG was encapsulated in PLGA–P188–PLGA microspheres.

Active nanoprecipitated AMG was successfully encapsulated through a s/o/w emulsion evaporation/extraction solvent process with a 35–40% encapsulation efficiency. The lost fraction may be explained by partial AMG diffusion into the aqueous phase during solvent extraction step (*32*), and by the copolymer hydrophile/lipophile balance resulting in lower retention of the enzyme in the PLGA-P188-PLGA matrix compared to PLGA polymer (*26*). The selection of a PLGA-P188-PLGA copolymer over

PLGA alone was motivated by previous studies showing that the addition of P188 enhances the release profiles of encapsulated proteins such as TGF-β (*33*) and lysozyme (*34*).

Moreover, by using different PLGA molecular weight, two distinct AMG release profiles were obtained *in vitro*, due to different contribution of diffusion and erosion in release mechanisms. Regarding AMG_P40, the progressive release profile exhibited a characteristic tri-phasic kinetics, similar to that commonly observed in PLGA microspheres (*35*). A diffusion-driven phase, including a burst release and a relative lag phase, occurred during the first weeks, followed by matrix erosion that accelerated AMG release. AMG release, then, plateaued at 57% by day 49, similarly to lysozyme in identical P40 microspheres, which plateaued at 53% by day 56 (*26*). This incomplete release is likely due to polymer erosion, which causes the matrix to collapse and trap AMG protein within. In contrast, the faster and complete release of AMG_P20 can be attributed to the higher hydrophilicity of the polymer, which results in a more homogeneous enzyme distribution within the matrix and the formation of more porous microparticles that facilitate protein diffusion (*26*). This is supported by the absence of a lag phase (*Figure. 3 - D)*. Furthermore, the complete release of active AMG observed with AMG_P20 demonstrates the ability of P20 microspheres to conserve enzymatic activity over time. Conversely, the incomplete release observed with AMG_P40 could potentially be improved by achieving a more uniform distribution of the enzyme within the microsphere *(35–37)*. A more even enzyme distribution would promote a more continuous release and minimize the risk of enzyme entrapment within the eroding matrix.

When encapsulated AMG was incorporated in a fibrin/starch hydrogel, *in vitro* glucose releases paralleled AMG release profiles: more rapid with AMG_P20 and more progressive with AMG_P40. In both formulations, glucose was released continuously for at least two weeks, supporting the ultimate objective of maintaining cell viability beyond the first week post-implantation. By contrast, previously reported glucose delivery systems designed to promote cell survival typically exhibited much shorter release durations *in vitro.* For instance, glucose release reached a plateau in less than 1 hour in our first-generation nutritive hydrogel (*1*), while 3 days were required in systems relying on enzymatic (β-glucosidase) cleavage of glucose/hyaluronic acid bonds in glucose/hyaluronic acid hydrogels (*38*), or on diffusion from glucose-loaded alginate microspheres (*39*). A release duration of 10 days was reported for starch/AMG-loaded alginate microspheres (*11*). Except for the glucose-loaded microspheres, where rapid diffusion accounted for the fast release, the shorter release times observed in other systems can be attributed to the absence of controlled enzyme release—highlighting the advantage of our current design. Moreover, under physiological pH and temperature, the encapsulated AMG hydrolyzed up to 80% of starch over two weeks, indicating that the tested range of doses is suitable as a starting point for future *in vivo* studies aimed at achieving complete degradation over several weeks. Achieving full degradation is crucial to minimize the potential physical hindrance of residual starch during tissue repair.

The suitability of our system for future *in vivo* applications is further supported by the absence of acute cytotoxicity observed *in vitro* when hMSCs were cultured within the nutritive hydrogel. Under OGD conditions, both encapsulated AMG formulations maintained hMSC viability above 75% throughout the study. Surprisingly the lowest AMG dose (0.03 U) was sufficient to sustain a glucose release compatible with cellular needs. While literature estimates the daily glucose consumption of 2×10^5 hMSCs to range between 0.3 and 0.4 mg/day under anoxic conditions (pO_2 = 0.1%) in the presence of 1 g/L glucose (*8,40*), low-dose AMG_P40 was nonetheless sufficient to sustain hMSC viability, despite

providing a glucose release rate of only 0.15 mg/day during the first week. These findings support the notion that hMSCs can modulate their glucose consumption in accordance with glucose availability, consistent with prior observations (*31*). Therefore, similarly to cellular preconditioning strategies (*41,42*), using low-dose encapsulated AMG to provide a minimal glucose supply may serve as an effective strategy to enhance cell survival through metabolic adaptation in glucose-limited condition, while preventing cytotoxic lactate accumulation.

Building on these *in vitro* findings, we next assessed whether microsphere encapsulation could effectively prolong the presence and activity of AMG at the implantation site. Encapsulation significantly extended AMG retention, with over 50% of labelled AMG retained for 2 weeks with AMG_P20 and 3 weeks with AMG_P40, compared to just 5 days for Free AMG. AMG_P40 tended to retain AMG at the implantation site more effectively than AMG_P20, consistent with its slower and more prolonged release profile. Encapsulation significantly improved AMG confinement, most likely as a result of the dual effect of limiting enzyme diffusion into surrounding tissue and providing protection against proteolytic degradation. Regarding AMG activity, it was still releasable from P40 microspheres up to day 21, demonstrating that the microspheres effectively retain and preserve AMG activity. In contrast to the *in vitro* active AMG release profile, the *ex vivo* measures of AMG activity appeared comparable whether the hydrogel was explanted on day 3 or day 21. However, the observed release rate may not fully represent the *in vivo* situation, as measurements were performed under elevated temperature conditions (50°C). Recently, a near-infrared fluorescent probe capable of detecting the activity of enzymes with similar activity to AMG was developed *(43).* Investigating its compatibility with our AMG system and assessing its practical applicability for subcutaneous site could provide a more valuable tool for monitoring AMG activity release *in vivo*. Additionally, quantifying residual starch in explanted hydrogels at different time points would provide complementary information on the kinetics of AMG-mediated starch hydrolysis *in vivo*.

Surprisingly, explanted Starch/AMG(-) hydrogels exhibited glycosidase activity (*i.e.,* the enzymatic hydrolysis of glycosidic bonds) *in vivo*, which has not been previously reported in the literature*(1,11,44).* A possible explanation is the presence of endogenous α-glucosidase (αGA) on the implantation site. Although primarily intracellular (cytoplasm or lysosome), αGA can be produced by immune cells such as macrophages *(45)* and may, thus, be released locally during the inflammatory response triggered by surgery. Macrophages, commonly present at subcutaneous implantation sites, can release lysosomal enzymes when activated *(46,47)* or intracellular enzymes during cell lysis *(48,49)*, although this has not been specifically demonstrated for αGA. This hypothesis could explain the decline in glycosidase activity observed in the negative control group on day 21, consistent with the resolution of the inflammatory response. Alternatively, negative controls glycosidase activity could result from AMG diffusion from Starch/AMG_P40 implants towards the Starch/AMG(-) controls, as both implants were implanted within each mouse. However, labelled AMG disappearance kinetics and the absence of a fluorescent signal in negative controls (*data not shown*) did not support this explanation.

More broadly, a delivery hydrogel is only meaningful once all of its components —such as starch loading and distribution within the matrix, fibrin degradation rate, or cell density— are rationally optimised. Thus, the optimised AMG formulation reported here serves as a pivotal first step toward designing efficient long-acting fibrin delivery hydrogels for improved hMSC survival.

5. Conclusion

In conclusion, AMG was encapsulated in PLGA-P188-PLGA microspheres within a fibrin/starch hydrogel. The microspheres retained active AMG locally for up to three weeks, overcoming the rapid disappearance observed with free AMG. These results pave the way for further optimisation toward an effective strategy to maintain hMSCs viability and functions in ischemic environments.

Acknowledgements

We would like to acknowledge Cedric Paniagua (SynBio3 platform, Max Mousseron Institute. Montpellier, France) for PLGA-P188-PLGA polymer supply and analysis, and Jeremie Riou for statistical analysis. We thank the Fondation de la Recherche Médicale grant, the French National Research Agency (ANR Starchbone ANR-20-CE19-0002-02) and DIM BIOCONV for their funding sources.

Conflict of interest statement

The authors declare no competing interests.

Author contributions

M.S. participated in the design and execution of *in vitro* and *in vivo* experiments of the present work, collected and analyzed data, and contributed to manuscript writing and statistical analysis. W.P. assisted with data analysis, P.E and B.W were involved in *in vivo* experiments. L.D supplied the starch particles, and V.J.M.C. managed the AMG nanoprecipitation optimisation and AMG encapsulation parts and contributed to data analysis, manuscript writing, and editing. P.H. designed and managed the project, provided financial support, and contributed to data analysis, manuscript writing, and editing.

References

1. Denoeud C, Luo G, Paquet J, Boisselier J, Wosinski P, Moya A, et al. Enzyme-controlled, nutritive hydrogel for mesenchymal stromal cell survival and paracrine functions. Commun Biol [Internet]. 14 déc 2023 [cité 9 juill 2025];6(1). Disponible sur: https://www.nature.com/articles/s42003-023-05643-y

2. De Luca M, Aiuti A, Cossu G, Parmar M, Pellegrini G, Robey PG. Advances in stem cell research and therapeutic development. Nat Cell Biol. juill 2019;21(7):801-11.

3. Matthay MA, Calfee CS, Zhuo H, Thompson BT, Wilson JG, Levitt JE, et al. Treatment with allogeneic mesenchymal stromal cells for moderate to severe acute respiratory distress syndrome (START study): a randomised phase 2a safety trial. Lancet Respir Med. févr 2019;7(2):154-62.

4. Yan W, Xia Y, Zhao H, Xu X, Ma X, Tao L. Stem cell-based therapy in cardiac repair after myocardial infarction: Promise, challenges, and future directions. J Mol Cell Cardiol. mars 2024;188:1-14.

5. Preda MB, Neculachi CA, Fenyo IM, Vacaru AM, Publik MA, Simionescu M, et al. Short lifespan of syngeneic transplanted MSC is a consequence of in vivo apoptosis and immune cell recruitment in mice. Cell Death Dis. 2 juin 2021;12(6):566.

6. Fu Z, Zhang Y, Geng X, Chi K, Liu C, Song C, et al. Optimization strategies of mesenchymal stem cell-based therapy for acute kidney injury. Stem Cell Res Ther. 30 avr 2023;14(1):116.

7. Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, Popp FC, Geissler EK, Schlitt HJ, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. Front Immunol. 2012;3:297.

8. Moya A, Paquet J, Deschepper M, Larochette N, Oudina K, Denoeud C, et al. Human Mesenchymal Stem Cell Failure to Adapt to Glucose Shortage and Rapidly Use Intracellular Energy Reserves Through Glycolysis Explains Poor Cell Survival After Implantation. Stem Cells. 1 mars 2018;36(3):363-76.

9. Deschepper M, Manassero M, Oudina K, Paquet J, Monfoulet LE, Bensidhoum M, et al. Proangiogenic and Prosurvival Functions of Glucose in Human Mesenchymal Stem Cells upon Transplantation. Stem Cells. 2013;31:526-35.

10. Deschepper M, Oudina K, David B, Myrtil V, Collet C, Bensidhoum M, et al. Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long-term, severe and continuous hypoxia. J Cell Mol Med. juill 2011;15(7):1505-14.

11. Huang C, Chang C, Yang P, Chiu H, Chen S, Hsu L. Injectable Glucose-Releasing Microgels Enhance the Survival and Therapeutic Potential of Transplanted MSCs Under Ischemic Conditions. Adv Healthc Mater. 26 sept 2024;2401724.

12. Korn C, Augustin HG. Mechanisms of Vessel Pruning and Regression. Dev Cell. juill 2015;34(1):5-17.

13. Correia CR, Santos TC, Pirraco RP, Cerqueira MT, Marques AP, Reis RL, et al. In vivo osteogenic differentiation of stem cells inside compartmentalized capsules loaded with co-cultured endothelial cells. Acta Biomater. avr 2017;53:483-94.

14. Calabrese G, Gulino R, Giuffrida R, Forte S, Figallo E, Fabbi C, et al. In Vivo Evaluation of Biocompatibility and Chondrogenic Potential of a Cell-Free Collagen-Based Scaffold. Front Physiol. 29 nov 2017;8:984.

15. Murray JE, Laurieri N, Delgoda R. Chapter 24. Proteins. In: Pharmacognosy : Fundamentals, Applications and Strategies [Internet]. Elsevier Inc.; 2017. Disponible sur: http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00024-X

16. de la Fuente M, Lombardero L, Gómez-González A, Solari C, Angulo-barturen I, Acera A, et al. Enzyme therapy: Current challenges and future perspectives. Int J Mol Sci. 2021;22(17):1-20.

17. Zaman R, Islam RA, Ibnat N, Othman I, Zaini A, Lee CY, et al. Current strategies in extending half-lives of therapeutic proteins. J Controlled Release. 2019;301(January):176-89.

18. Jarvi NL, Balu-Iyer SV. Immunogenicity Challenges Associated with Subcutaneous Delivery of Therapeutic Proteins. BioDrugs. mars 2021;35(2):125-46.

19. Serena TE. Development of a Novel Technique to Collect Proteases from Chronic Wounds. Adv Wound Care. déc 2014;3(12):729-32.

20. Huang CC, Chia WT, Chung MF, Lin KJ, Hsiao CW, Jin C, et al. An Implantable Depot That Can Generate Oxygen in Situ for Overcoming Hypoxia-Induced Resistance to Anticancer Drugs in Chemotherapy. J Am Chem Soc. 27 avr 2016;138(16):5222-5.

21. Hu J, Cheung NV. Methionine depletion with recombinant methioninase: In vitro and in vivo efficacy against neuroblastoma and its synergism with chemotherapeutic drugs. Int J Cancer. avr 2009;124(7):1700-6.

22. Huang Y, Gu J, Yan Z, Hu X, He D, Zhang Y, et al. Cytomembrane-mimicking nanocarriers with a scaffold consisting of a CD44-targeted endogenous component for effective asparaginase supramolecule delivery. Nanoscale. 2020;12(22):12083-97.

23. Phua SZF, Yang G, Lim WQ, Verma A, Chen H, Thanabalu T, et al. Catalase-Integrated Hyaluronic Acid as Nanocarriers for Enhanced Photodynamic Therapy in Solid Tumor. ACS Nano. 23 avr 2019;13(4):4742-51.

24. Zou P, Wang F, Wang J, Lu Y, Tran D, Seo SK. Impact of injection sites on clinical pharmacokinetics of subcutaneously administered peptides and proteins. J Controlled Release. août 2021;336:310-21.

25. Grosskopf AK, Ginart AA, Spinosa P, Shivva V. Pharmacokinetics-Based Design of Subcutaneous Controlled Release Systems for Biologics. CPT Pharmacomet Syst Pharmacol. avr 2025;14(4):668-80.

26. Le MQ, Gimel JC, Garric X, Nguyen-Pham TQ, Paniagua C, Riou J, et al. Modulation of protein release from penta-block copolymer microspheres. Eur J Pharm Biopharm. juill 2020;152:175-82.

27. Kandalam S, Sindji L, Delcroix GJR, Violet F, Garric X, André EM, et al. Pharmacologically active microcarriers delivering BDNF within a hydrogel: Novel strategy for human bone marrow-derived stem cells neural/neuronal differentiation guidance and therapeutic secretome enhancement. Acta Biomater. févr 2017;49:167-80.

28. Giteau A, Venierjulienne M, Marchal S, Courthaudon J, Sergent M, Monteromenei C, et al. Reversible protein precipitation to ensure stability during encapsulation within PLGA microspheres. Eur J Pharm Biopharm. sept 2008;70(1):127-36.

29. Valle GD, Vergnes B, Colonna P, Patria A. Relations between rheological properties of molten starches and their expansion behaviour in extrusion. J Food Eng. févr 1997;31(3):277-95.

30. Paquet J, Deschepper M, Moya A, Logeart-Avramoglou D, Boisson-Vidal C, Petite H. Oxygen Tension Regulates Human Mesenchymal Stem Cell Paracrine Functions. Stem Cells Transl Med. 1 juill 2015;4(7):809-21.

31. Gnecchi M, Melo LG. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells: Isolation, Expansion, Characterization, Viral Transduction, and Production of Conditioned Medium. In: Audet J, Stanford WL, éditeurs. Stem Cells in Regenerative Medicine [Internet]. Totowa, NJ: Humana

Press; 2009 [cité 6 sept 2025]. p. 281-94. (Walker JM, ed. Methods in Molecular Biology; vol. 482). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59745-060-7_18

32. Wischke C, Schwendeman SP. Principles of encapsulating hydrophobic drugs in PLA/PLGA microparticles. Int J Pharm. déc 2008;364(2):298-327.

33. Morille M, Van-Thanh T, Garric X, Cayon J, Coudane J, Noël D, et al. New PLGA–P188–PLGA matrix enhances TGF-β3 release from pharmacologically active microcarriers and promotes chondrogenesis of mesenchymal stem cells. J Controlled Release. août 2013;170(1):99-110.

34. Paillard-Giteau A, Tran VT, Thomas O, Garric X, Coudane J, Marchal S, et al. Effect of various additives and polymers on lysozyme release from PLGA microspheres prepared by an s/o/w emulsion technique. Eur J Pharm Biopharm. juin 2010;75(2):128-36.

35. Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review. Int J Pharm. août 2011;415(1-2):34-52.

36. Cai C, Mao S, Germershaus O, Schaper A, Rytting E, Chen D, et al. Influence of morphology and drug distribution on the release process of FITC-dextran-loaded microspheres prepared with different types of PLGA. J Microencapsul. juin 2009;26(4):334-45.

37. Wang M, Wang S, Zhang C, Ma M, Yan B, Hu X, et al. Microstructure Formation and Characterization of Long-Acting Injectable Microspheres: The Gateway to Fully Controlled Drug Release Pattern. Int J Nanomedicine. févr 2024;Volume 19:1571-95.

38. Gonzalez-Fernandez P, Simula L, Jenni S, Jordan O, Allémann E. Hyaluronan-based hydrogel delivering glucose to mesenchymal stem cells intended to treat osteoarthritis. Int J Pharm. 2024;657(March):0-6.

39. Gálvez P, Martín MJ, Calpena AC, Tamayo JA, Ruiz MA, Clares B. Enhancing effect of glucose microspheres in the viability of human mesenchymal stem cell suspensions for clinical administration. Pharm Res. 2014;31(12):3515-28.

40. Wosinski P. Développement d'un hydrogel capable d'augmenter la survie et la fonctionnalité des cellules stromales mésenchymateuses transplantées [Internet] [PhD thesis]. [Paris]: Université Paris Cité - B3OA lab; 2024. Disponible sur: https://theses.fr/2024UNIP5243

41. Won Kim H, Haider HK, Jiang S, Ashraf M. Ischemic Preconditioning Augments Survival of Stem Cells via miR-210 Expression by Targeting Caspase-8-associated Protein 2. J Biol Chem. nov 2009;284(48):33161-8.

42. Choudhery MS, Khan M, Mahmood R, Mohsin S, Akhtar S, Ali F, et al. Mesenchymal stem cells conditioned with glucose depletion augments their ability to repair-infarcted myocardium. J Cell Mol Med. oct 2012;16(10):2518-29.

43. Cai W, Sun W, Wang J, Huo X, Cao X, Tian X, et al. Rational design of α-glucosidase activated near-infrared fluorescent probe and its applications in diagnosis and treatment of diabetes. Sens Actuators B Chem. févr 2024;400:134878.

44. Zargarzadeh M, Silva AS, Nunes C, Coimbra MA, Custódio CA, Mano JF. Self-glucose feeding hydrogels by enzyme empowered degradation for 3D cell culture. Mater Horiz. 2022;9(2):694-707.

45. Yu SC, Liang JF, Li Y, Ma SY, Sun J, Li A, et al. Acid α-Glucosidase Impairs Diabetic Bone Regeneration via Altering Macrophage Polarization.

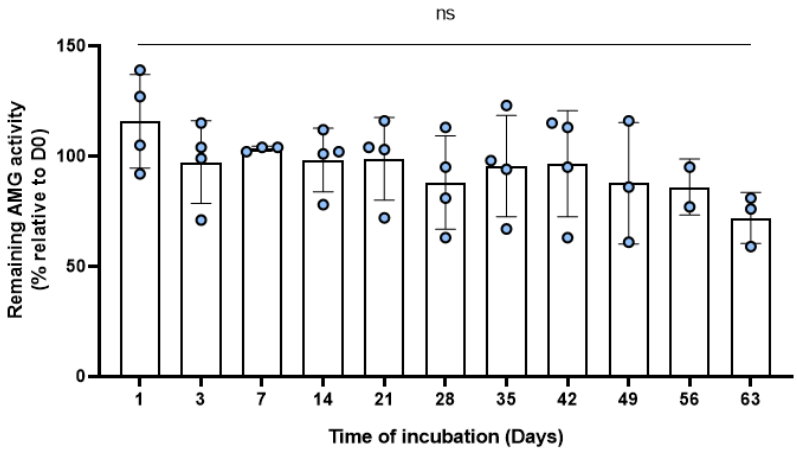
46. Hakala JK, Oksjoki R, Laine P, Du H, Grabowski GA, Kovanen PT, et al. Lysosomal Enzymes Are Released From Cultured Human Macrophages, Hydrolyze LDL In Vitro, and Are Present Extracellularly in Human Atherosclerotic Lesions. Arterioscler Thromb Vasc Biol. août 2003;23(8):1430-6.

47. Davies P, Allison AC. The macrophage as a secretory cell in chronic inflammation. Agents Actions. févr 1976;6(1-3):60-74.

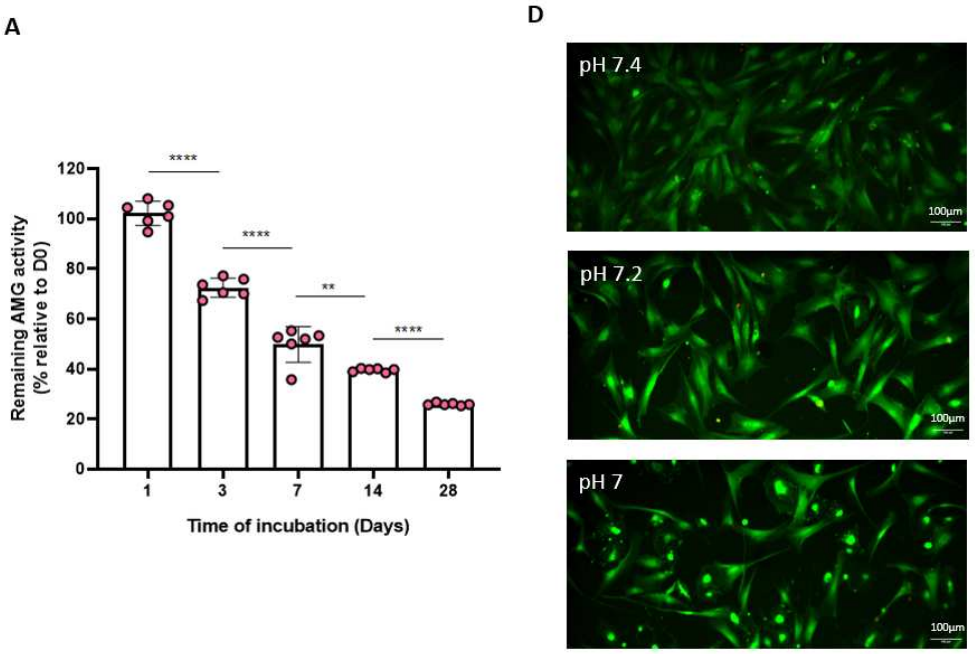
48. Alu A, Han X, Ma X, Wu M, Wei Y, Wei X. The role of lysosome in regulated necrosis. Acta Pharm Sin B. oct 2020;10(10):1880-903.

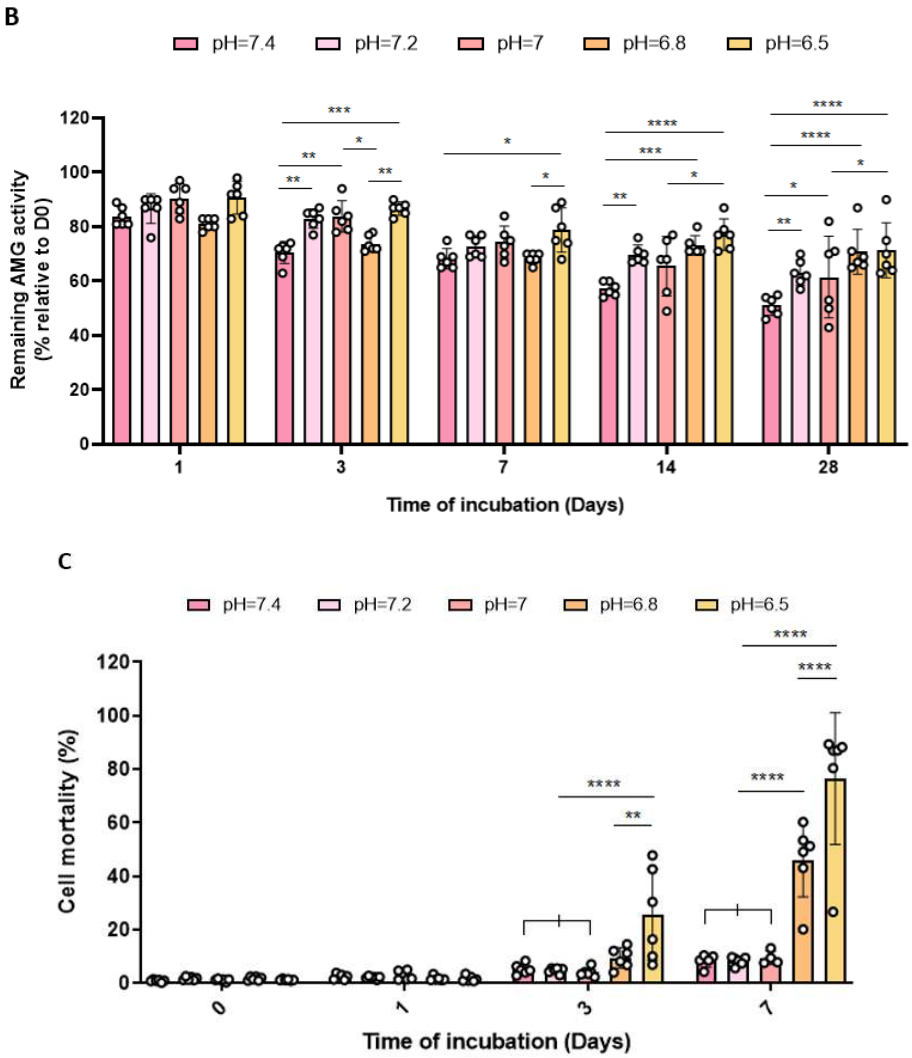
49. Thomas Reinhecke. On the road to inflammation: Linking lysosome disruption, lysosomal protease release and necrotic death of immune cells. Cell Cycle. juill 2013;12(13):1994-1994.

Supplementary data

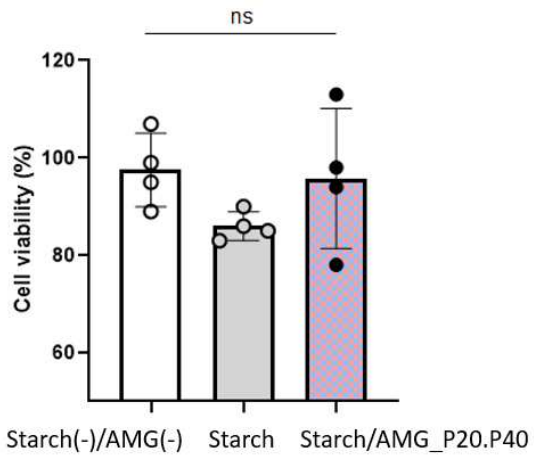


Supplementary Figure S 1. Active AMG stability in citrate buffer (0.1M, pH 5.4, 37°C) over a month. No significant differences were observed, *n=4*.

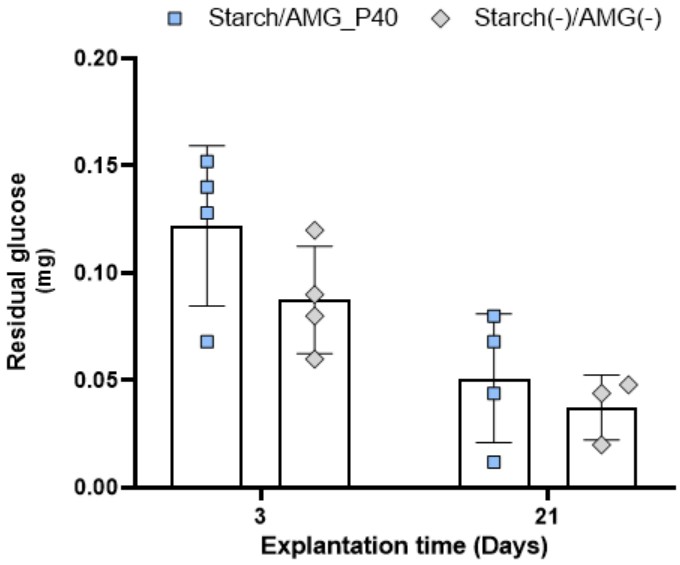




Supplementary Figure S 2. Effect of pH on AMG activity and hMSC viability *in vitro.* Stability of AMG activity **A.** in aMEM at pH 7.4, *n=8*, and **B.** in aMEM supplemented with MOPS/HEPES at different pH, *n=6*. **C.** hMSCs mortality in supplemented aMEM at different pH, *n=6*. **D.** Representative images of hMSC adhesion after 3 days of culture at pH 7.4, 7.2, and 7. Calcein/IP staining. scale: 100 µm, *n=6*. The 7.2 pH was chosen as it improved the stability of AMG activity, while not affecting hMSC survival nor adhesion.



Supplementary Figure S 3. Biocompatibility of starch and encapsulated AMG towards hMSCs within fibrin hydrogels. Three groups were tested: (i) negative control (Starch(-)/AMG(-)), (ii) Starch, and (iii) starch with a 1:1 mix of P20&P40 encapsulated AMG (Starch/AMG_P20.P40). Biocompatibility was assessed over 24 h under standard culture conditions (supplemented αMEM (pH7.2), 1 g/L glucose, pO_2 = 21%, 37°C), *n = 4*.



Supplementary Figure S 4. Residual glucose in explanted hydrogels. Starch/AMG_P40 and Starch/AMG(-) hydrogels were explanted on day 3 and 21. *n=4.* Explants were covered with 200µL citrate buffer (pH 5.4) under mechanical stirring overnight (450rpm). Supernatants were then removed to quantify total residual glucose (supernatant + hydrogel).

A

	Squares sum	Degrees of freedom	Mean square	Ratio	p value %	
Regression	2036.5	3	678.8	6.4	0.2385	**
Residuals	2536.4	24	105.7			
Lack of fit	803.1	11	73.0	0.5	83.8029	
Error	1733.4	13	133.3			
Total	4573.0	27				

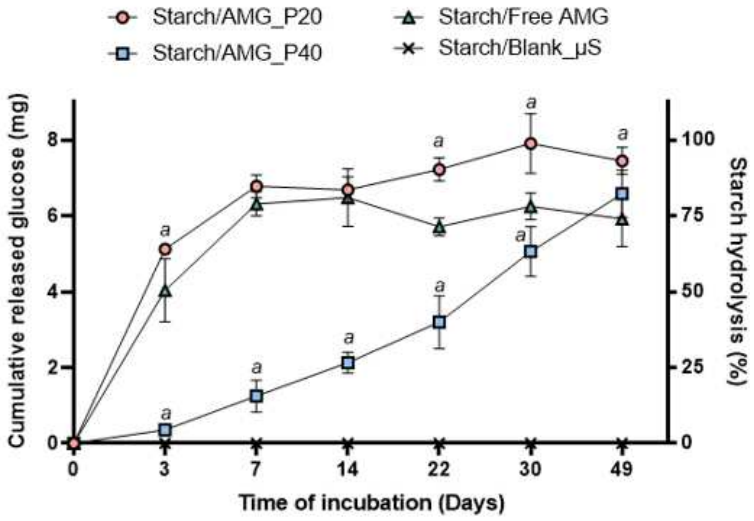
B

	Experimental conditions			Nanoprecipitation efficiency (%, Y)	
	Time (min)	[NaCl] (M)	Temperature (°C)	$Y_{Estimated}$ $(CI_{99})^{*}$	$Y_{Measured}$ (%)
Test A	30	0,155	0	87,70 (81,5 - 93,9)	84
Test B	45	0,2275	0	88,36 (82,2 - 94,5)	90
Test C	60	0,3	0	89,03 (82,8 - 95,3)	83

*99% confidence interval.

$IC_{99} = Y_{Estimated} \pm t_{\alpha/2,N-p}\sqrt{s^2(1 + d_A)}$ (d_A: variance function).

Supplementary Figure S 5. ANOVA analysis of AMG nanoprecipitation model. A. ANOVA analysis data**. B.** Verification of the model prediction with 3 test points.



Supplementary Figure S 6. Glucose delivery profiles and their corresponding percentage of hydrolysed starch mediated by encapsulated and non-encapsulated AMG at pH 5.4. Starch was hydrolysed by Rounds: Starch/AMG_P20, Squares: Starch/AMG_P40, and Triangles: Starch/Free AMG. Glucose delivery profiles were conducted over 49 days and under mechanical stirring at pH 5.4 (Citrate buffer 0.1M, 37°C). No hydrolysis was observed with negative control (Starch/Blank_µS, cross). a : p value <0.05 compared to free AMG on the same day, *n=5*.

CHAPITRE 7. ÉVALUATION DE L'IMPACT DES PARTICULES D'AMIDON ET DE L'AMG ENCAPSULÉE SUR LA SURVIE DES CSMS *IN VIVO*

Introduction

Nous avons montré dans le chapitre précédent que l'encapsulation de l'AMG permettait de préserver plus durablement l'activité enzymatique au sein de l'hydrogel après implantation, constituant ainsi une première avancée fonctionnelle de l'hydrogel nutritif. Toutefois, l'objectif ultime demeure de prolonger la viabilité des CSMs jusqu'à 21 jours *in vivo*. À cet égard, nous avons mis en évidence que l'hydrogel nutritif contenant l'AMG encapsulée (AMG_P20 ou AMG_P40) pouvait maintenir *in vitro* la viabilité des CSMs à plus de 75 % pendant deux semaines dans des conditions mimant l'ischémie. Dans le prolongement de ces résultats, le présent chapitre évalue la capacité du système nutritif à préserver la viabilité des CSMs *in vivo*, en recourant au même modèle murin sous-cutané que précédemment. Nous avons d'abord analysé l'effet de l'encapsulation de l'AMG sur la survie des CSMs. L'hypothèse sous-jacente était qu'en maintenant plus durablement l'AMG sur le site d'implantation (Chap. 6), l'apport local en glucose serait prolongé et la viabilité cellulaire mieux préservée. Comme la cinétique de libération de l'AMG, et par conséquent celle de la délivrance du glucose, diffère entre les microsphères P20 et P40, leur effet respectif sur la survie cellulaire a été étudié. Dans une seconde étape, nous avons évalué l'impact de la dose d'AMG encapsulée sur la survie cellulaire. Cette étude a porté uniquement sur l'AMG encapsulée dans les microsphères P40, qui avait montré un meilleur maintien de la viabilité cellulaire.

I. Matériels & Méthodes

Transduction des CSMs. Préalablement aux études de survie, des CSMs issues des trois mêmes donneurs que précédemment ont été transduites pour exprimer un signal bioluminescent (BLI) permettant le suivi de leur survie [205]. La transduction a été réalisée avec un vecteur lentiviral codant pour la luciférase de luciole et ZSGreen (pRRLsin-MND-Luc-IRES2-ZS Green-WPRE, Transbiomed, Bordeaux, France) [118], suivie d'une expansion des cellules. La cytométrie en flux a montré qu'environ 60 % des cellules étaient transduites efficacement. Ces cellules, désignées « CSMs-Luc », ont été cultivées jusqu'aux passages 4–5 et regroupées en proportions équivalentes avant leur incorporation en hydrogel de fibrine/amidon.

Évaluation de la survie des CSMs *in vivo.* Deux études de survie cellulaire ont été réalisées : dans la première, nous avons évalué l'effet de l'encapsulation sur la viabilité des CSMs ; dans la seconde, nous avons optimisé la dose d'AMG encapsulée. Dans chaque étude, les hydrogels de fibrine contenaient systématiquement des particules d'amidon Pdt_20_cb (8 mg, « Starch ») et des CSMs-Luc (2×10^5).

Dans la première étude, les hydrogels étaient supplémentés avec soit :

(i) l'AMG encapsulée (Starch/AMG_P20 et Starch/AMG_P40),
(ii) l'AMG libre (Starch/Free AMG),
(iii) les microsphères vides (Starch/Blank_µS, contrôle négatif).

La quantité d'AMG (libre ou encapsulée) correspondait à 0,03 U, et la charge en microsphères vides (mélange 1:1 de P20 et P40) a été ajustée de façon à correspondre à la quantité moyenne de microsphères AMG_P20 et AMG_P40.

Dans la seconde étude, 4 doses d'AMG_P40 ont été testées de 0,03U à 0,45U :

(i) Starch/0,03U,
(ii) Starch/0,15U,
(iii) Starch/0,3U,
(iv) Starch/0,45U.

Dans les deux études, les hydrogels ont été implantés en ectopique (protocole décrit au chapitre 6) chez 9 souris nude (NMRI-nu(nu/nu)), femelles et âgées de 9 semaines. Un hydrogel de chaque condition expérimentale était implanté par souris, ce qui représentait 9 hydrogels par groupe.

Aux jours 1, 7, 14 et 21 après l'implantation, les souris ont été anesthésiées à l'isoflurane et 100 µL de D-Luciférine (20 mg/mL, sel K+, FluoProbes®. Interchim. Montluçon, France) ont été injectés dans chaque implant[a], afin que les CSMs-Luc émettent un signal BLI suivi de manière non invasive par imagerie bioluminescente (Ivis. Lumina II. Caliper Life Sciences). Les acquisitions ont été réalisées toutes les 5 minutes jusqu'à l'obtention du pic d'intensité du signal pour chaque implant. Les régions d'intérêt ont été définies manuellement à l'aide du logiciel *Living Images® 3.2,* puis le signal de fond cutané a été soustrait des mesures. A chaque temps, le signal bioluminescent maximal de chaque implant a été normalisé par rapport à celui du jour 1, l'injection de luciférine ne pouvant se faire dès le jour d'implantation (J0) à cause des points de sutures post-chirurgie. La survie des CSM-Luc a été exprimée en pourcentage du signal BLI résiduel.

Analyse histologique des explants. À la fin de la première étude de survie (J29), les implants ont été explantés, fixés au paraformaldéhyde 4 % et inclus en paraffine. Les blocs ont été sectionnés en coupes

[a] La D-Luciférine va diffuser à travers les membranes cellulaires des CSMs transfectées pour produire de la luciférase. Une fois dans le cytoplasme, la D-Luciférine est oxydé par la luciférase intracellulaire, ce qui émet un signal bioluminescent.

de 5 µm, puis colorés au Lugol (KI 3,32 % + I_2 2,54 %) pour marquer l'amidon. Les microsphères n'étant plus visibles avec ce protocole, une méthode alternative a été utilisée pour la deuxième étude. Les implants, explantés au jour 22, ont ainsi été inclus dans une résine d'enrobage[a] (Shandon Cryomatrix, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) et sectionnés au cryotome (-20°C. Leica CM1860, Leica Biosystems. Nanterre, France) en coupes de 10 µm, avant d'être également colorés au Lugol.

Statistique et reproductibilité. Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart-type. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel *GraphPad Prism v8.0.2* (GraphPad Software, Californie, USA). Chaque condition expérimentale a été répétée au moins trois fois. Les effets de groupe et de temps, ainsi que leurs interactions ont été évalués par une ANOVA à deux facteurs, suivie d'un test post-hoc de Tukey. Les comparaisons avec les données obtenues à partir de l'hydrogel nutritif précédent ont été effectuées au moyen d'un test de Kruskal–Wallis, suivi d'un test post hoc de Dunn. Pour toutes les analyses, une p-value < 0,05 a été considérée comme significative, et annotée comme suit : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; **** : $p < 0,0001$.

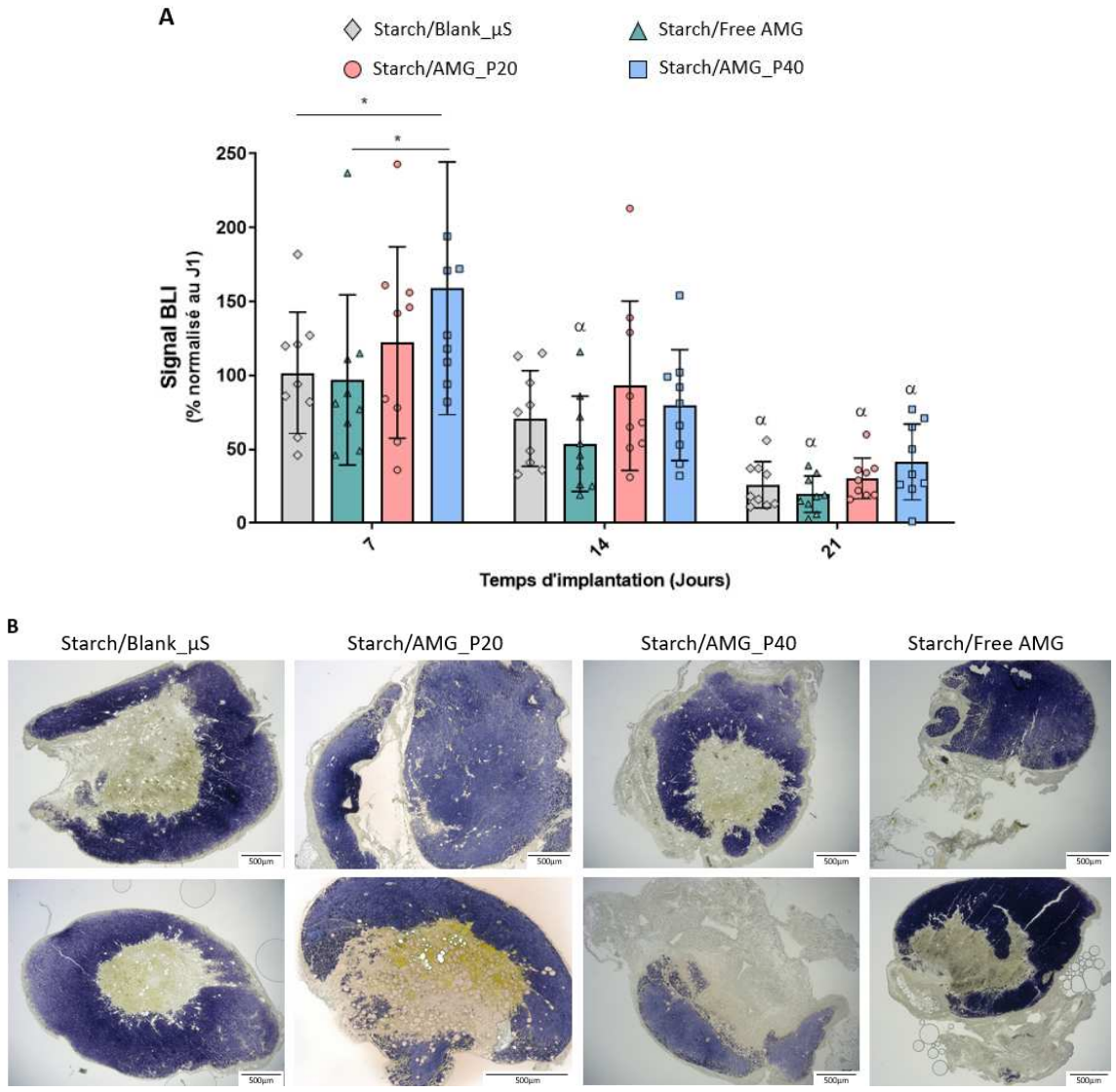
II. Résultats & Discussion - Évaluation de la survie des CSMs *in vivo*

Afin d'évaluer l'effet de l'encapsulation de l'AMG sur la viabilité des CSMs *in vivo*, quatre groupes d'hydrogels fibrine/amidon chargés en CSMs transfectées ont été implantés chez la souris et suivis au cours du temps par acquisition du signal BLI (*Figure 25. A*). Après une semaine, l'encapsulation dans les microsphères P40 a permis un signal BLI significativement plus élevé que celui observé avec l'AMG libre ou le contrôle. Toutefois, comme observé avec l'hydrogel nutritif précédent, l'intensité du signal BLI a fortement diminué au cours de la deuxième semaine. Plus généralement, durant les trois premières semaines, les hydrogels contenant l'AMG encapsulée (P20 et P40) ont montré une tendance à maintenir une bioluminescence plus élevée que les autres conditions, mais sans différence statistiquement significative en raison de la variabilité intergroupe. Il est intéressant de noter que le signal relativement élevé observé dans le groupe contrôle est cohérent avec l'activité glycosidase[b] mesurée *ex vivo* dans les contrôles négatifs au chapitre 6 (*Figure. 5 – B*, p104). Cela souligne la nécessité d'augmenter la dose d'AMG encapsulée afin de mieux distinguer son effet de l'activité glycosidase résiduelle. Ce besoin est également confirmé par la présence d'amidon résiduel dans les explants à J29 (*Figure 25. B*).

Pour répondre à cette limite, une deuxième étude a testé trois autres doses d'AMG encapsulée. Comme l'AMG_P40 avait présenté les résultats de survie les plus prometteurs, seule cette formulation a été retenue. Au 7^{e} jour, la dose la plus élevée (0,45U) a semblé améliorer la survie cellulaire, mais cette tendance ne s'est pas maintenue au cours des jours suivants (*Figure 25. C*). Globalement, l'augmentation de la dose d'AMG encapsulée n'a pas permis de prolonger la viabilité des CSMs. Par

[a] Résine d'OCT (Optimal Cutting Temperature).
[b] Enzymes capables de cliver des liaisons glycosidiques.

ailleurs, l'analyse des explants a montré que les microsphères étaient encore présentes au 22^{e} jour d'implantation en quantité proportionnelle à celle initialement incorporée, confirmant leur maintien dans l'hydrogel (*Figure 25. D*). Parallèlement, l'amidon a été progressivement dégradé avec l'augmentation de la dose d'AMG, ce qui atteste de son activité *in vivo*. En revanche, sa localisation en périphérie des explants suggère que le centre de l'hydrogel est moins bien alimenté en glucose. Cela pourrait favoriser la mortalité des CSMs centrales et met en évidence la nécessité d'optimiser la répartition de l'amidon dans l'hydrogel.



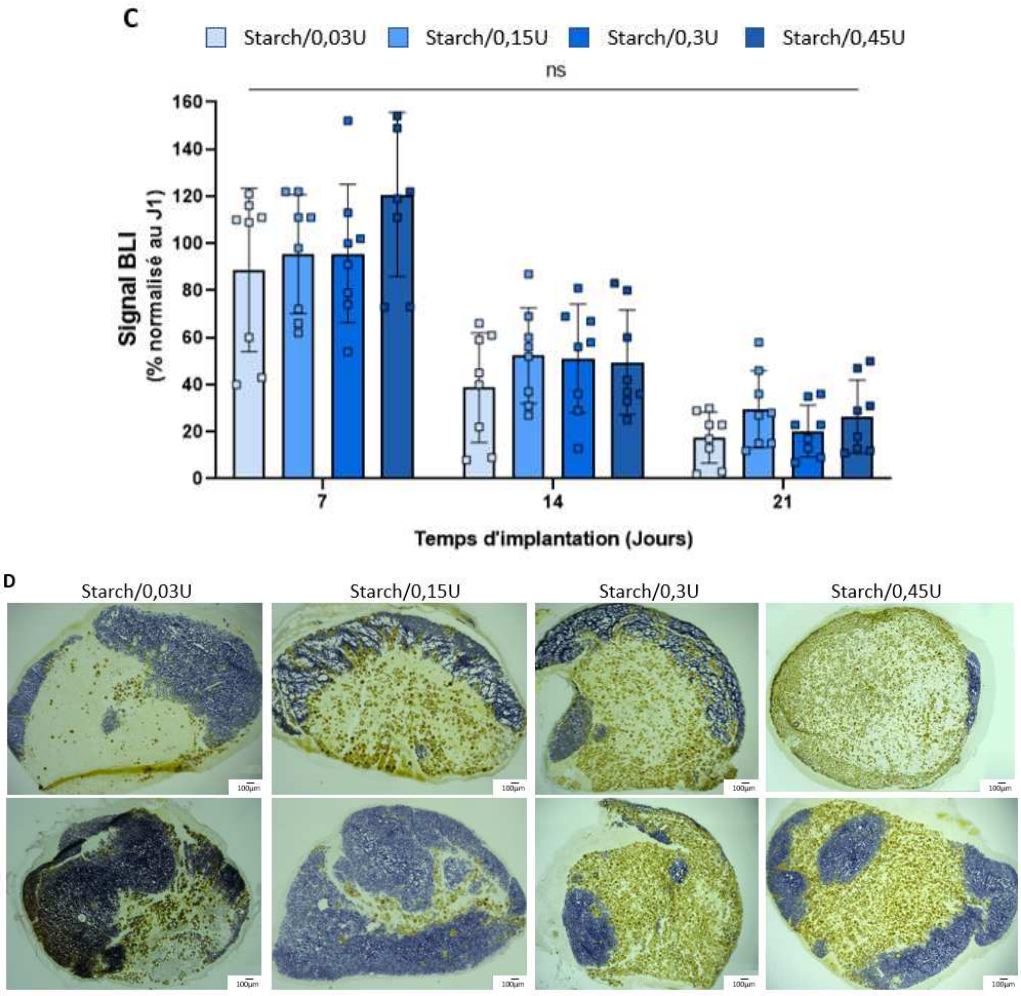


Figure 25. Survie *in vivo* des CSMs-Luc en hydrogel de fibrine/amidon en présence ou non d'AMG et coupes histologiques des explants avec marquage de l'amidon résiduel. La survie a été quantifiée par mesure d'un signal BLI. **A.** Survie des CSMs-Luc implantées dans différentes conditions : (i) sans enzyme (Starch/Blank_µS), (ii) avec de l'AMG libre (Starch/Free AMG), (iii) avec de l'AMG encapsulée dans les microsphères P20 (Starch/AMG_P20) ou (iv) P40 (Starch/AMG_P40), *n=9*. **B.** Coupes histologiques représentatives des implants, explantés au 29e jour. L'amidon apparait en violet (Lugol), échelle = 500µm, *n=2*. **C.** Survie des CSMs-Luc en présence de différentes concentrations d'AMG_P40 (Starch/0,03U ; Starch/0,15U ; Starch/0,3U et Starch/0,45U), *n=9*. **D.** Coupes histologiques représentatives des implants, explantés au 22e jour. L'amidon apparait en violet et les microsphères en jaune-marron (Lugol), échelle = 100µm, *n=2*.

Enfin, nous avons comparé les résultats issus de l'étude de l'impact de l'encapsulation sur la survie cellulaire (« Étude 2025 » ; groupes : Starch/Blank_ µS, Starch/AMG_P20, Starch/AMG_P40 et Starch/Free AMG ; *Figure 25. A)*, aux résultats de l'étude de viabilité cellulaire réalisée avec la première génération d'hydrogel nutritif [204] (« Étude 2019 » ; groupes : Glc free, 2 % starch/AMG et Glc 5,5 mM ; Chap. 3, *Figure 14, p59*)[a]. Au 14e jour d'implantation, deux points ressortent (*Tableau 12*) :

[a] Glc free : Hydrogel de fibrine + CSMs, 2 % starch/AMG : Hydrogel de fibrine/amidon + CSMs + AMG libre et Glc 5,5 mM : Hydrogel de fibrine + CSMs + glucose (5,5mM).

- Alors que dans l'Étude 2019, le contrôle négatif (Glc free) était comparable au groupe contenant l'AMG libre (2 % starch/AMG), son signal BLI est significativement plus faible que celui des quatre groupes de l'Étude 2025.
- Alors que les groupes contenant l'AMG libre dans les deux études (2 % starch/AMG et Starch/Free AMG) présentent des signaux BLI comparables, le signal du groupe de l'Étude 2019 (2 % starch/AMG) est significativement inférieur à ceux des groupes contenant l'AMG encapsulée (Starch/AMG_P20 et Starch/AMG_P40) de l'Étude 2025.

Ainsi, bien que l'absence d'un groupe contrôle sans amidon dans l'Étude 2025 et la variabilité inter-expérience empêchent de conclure formellement, la comparaison de ces données suggère deux tendances : (i) l'hydrogel de nouvelle génération présente une amélioration globale par rapport au précédent et (ii) l'AMG encapsulée tend à prolonger la viabilité cellulaire. Cette amélioration globale pourrait résulter à la fois du changement d'amidon et de sa formulation, qui offrent un réservoir de glucose plus important et limitent la diffusion hors de l'implant grâce à une moindre solubilité.

		Moyenne	Ecart-type	N
Étude 2019	Glc free	5,5	5,8	7
	2% starch / AMG	16	5,3	6
	Glc 5.5mM	8,5	4,4	6
Étude 2025	Starch/Blank_µS	71	32	9
	Starch/AMG_P20	93	57	9
	Starch/AMG_P40	80	38	9
	Starch/Free AMG	54	32	9

Tableau 12. Viabilité cellulaire au 14e jour d'implantation des hydrogels nutritifs de première et deuxième génération. Chaque hydrogel avait un volume de 200 µL et contenait 2×10^5 CSMs-Luc. La dernière colonne correspond au nombre d'échantillon. Les 3 premières lignes du tableau correspondent à l'étude de viabilité cellulaire réalisée avec l'hydrogel nutritif de première génération (Étude 2019) : Glc free = hydrogel de fibrine, 2 % starch/AMG = hydrogel de fibrine/amidon + AMG libre et Glc 5,5 mM = hydrogel de fibrine + glucose (5,5mM). Les 4 dernières lignes correspondent à l'étude de viabilité cellulaire réalisée avec l'AMG encapsulée (Étude 2025) : Starch/Blank_µS = hydrogel de fibrine/amidon + microsphères vides, Starch/AMG_P20 = hydrogel de fibrine/amidon + AMG_P20, Starch/AMG_P40 = hydrogel de fibrine/amidon + AMG_P40 et Starch/Free AMG = hydrogel de fibrine/amidon + AMG libre.

Conclusion

En conclusion, l'encapsulation de l'AMG tend à prolonger la viabilité des CSMs *in vivo*, avec un bénéfice plus marqué à court terme (7 jours) mais qui s'atténue ensuite, à l'instar de l'hydrogel nutritif de première génération. L'augmentation de la dose d'AMG encapsulée n'a pas permis d'améliorer les résultats, bien que l'activité enzymatique ait été confirmée par la dégradation de l'amidon. La répartition hétérogène de l'amidon au sein de l'implant pourrait avoir entrainé un apport inégal de glucose aux CSMs, favorisant ainsi la mortalité des CSMs les plus au centre de l'hydrogel. Enfin, bien que la comparaison avec l'hydrogel nutritif précédent repose sur deux expériences distinctes, elle confirme la tendance favorable de l'AMG encapsulée et suggère une amélioration globale du système. Cette amélioration est probablement liée au changement d'amidon (source et formulation) permettant un réservoir plus important en glucose.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Afin de soutenir la survie des CSMs après implantation en environnement ischémique, notre hydrogel nutritif devait répondre à trois critères principaux spécifiquement liés à son rôle nutritif :

1. Contenir un stock suffisant de glucose pour permettre une libération soutenue et compatible avec les besoins cellulaires sur la durée souhaitée (21 jours).
2. Assurer une libération continue de glucose sur plusieurs semaines afin de maintenir les cellules en vie jusqu'à la revascularisation du site.
3. Fournir le glucose à des doses physiologiques : suffisantes pour soutenir la consommation cellulaire, mais évitant toute cytotoxicité liée à l'hyperosmolarité.

Le premier critère (stock suffisant de glucose) a été satisfait *in vitro* et *in vivo* grâce au remplacement de l'amidon de blé solubilisé par les particules d'amidon de pomme de terre extrudé, permettant l'implantation d'un hydrogel contenant la quantité requise d'amidon. Concernant le 2^{e} critère (libération continue de glucose), une libération progressive de glucose a été permise *in vitro* par l'encapsulation de l'AMG. *In vivo*, la détection d'une AMG encore active à J21 indique que ce critère peut être atteint, sous réserve de la présence d'amidon hydrolysable au site d'implantation. Enfin, pour le 3^{e} critère (doses physiologiques de glucose), la libération contrôlée d'AMG et ultimement de glucose a permis de maintenir la viabilité des CSMs (>75%) *in vitro* pendant au moins 14 jours. *In vivo*, la diminution de la viabilité à J14 et le faible taux de glucose mesuré dans les hydrogels explantés (Chap. 6, *Supplementary Figure S 4, p114*) suggèrent que ce critère n'a probablement pas été atteint dans les conditions testées, et que des paramètres complémentaires doivent être optimisés pour maximiser l'efficacité nutritive de l'hydrogel.

Pris ensemble, ces résultats positionnent l'hydrogel comme support nutritif transitoire jusqu'à la revascularisation. Toutefois, l'atteinte *in vivo* du critère 3 semble dépendre de facteurs non strictement nutritifs : fuite potentielle de l'amidon, cinétique de dégradation de la matrice de fibrine, instabilité de l'activité AMG… Après avoir abordé le positionnement de l'hydrogel nutritif développé par rapport aux autres systèmes existants dans la littérature, la section suivante examinera ces facteurs déterminants afin d'orienter les ajustements de formulation nécessaires, et pouvoir *in fine* rendre l'hydrogel nutritif utilisable pour une grande diversité d'applications.

I. Comparaison avec la littérature

Tout d'abord, l'intégration d'une AMG encapsulée dans notre hydrogel nutritif a permis des améliorations notables par rapport à l'hydrogel de première génération et à la littérature, notamment

au niveau des durées de libération de glucose, de la viabilité cellulaire *in vitro* et de la persistance de l'AMG *in vivo* (*Figure 26*).

Ainsi, l'encapsulation de l'AMG dans l'hydrogel de fibrine/amidon a permis une délivrance continue de glucose jusqu'à 21 jours (AMG_P20) et 28 jours (AMG_P40). A titre de comparaison, les systèmes les plus performants rapportés dans la littérature, l'hydrogel de laminarine/AMG [196] et les microgels[a] d'alginate/amidon/AMG [126], n'ont pas dépassé 14 jours, soulignant le gain d'efficacité apporté par l'encapsulation.

De plus, les deux profils de délivrance de glucose obtenus (AMG_P20 et AMG_P40) ont permis, dans des conditions de carence en glucose et en oxygène (pO_2 = 0,1 %), de maintenir la viabilité de CSMs à plus de 75 % pendant 14 jours au sein des hydrogels nutritifs, contrairement aux microgels d'alginate/amidon/AMG [126], qui n'ont garanti une viabilité cellulaire que pendant 7 jours (pO_2 = 1 %). L'hydrogel de laminarine/AMG [196], quant à lui, a maintenu une viabilité similaire pendant 14 jours mais uniquement en présence d'O_2, illustrant ainsi le bénéfice apporté par notre système dans des conditions de stress métabolique.

In vivo, seul l'hydrogel nutritif contenant l'AMG_P40 a maintenu une survie cellulaire supérieure au contrôle négatif et à l'AMG libre durant la première semaine. De manière comparable, les microgels d'alginate/amidon/AMG [126] ont maintenu une viabilité cellulaire supérieure au contrôle pendant 7 jours, tandis que la viabilité avec l'hydrogel de laminarine/AMG [196] n'a pas été étudiée quantitativement.

Enfin, l'encapsulation de l'AMG a permis de maintenir son activité locale *in vivo* pendant 21 jours, alors que le maintien de l'activité enzymatique dans l'hydrogel laminarine/AMG [196] ou les microgels d'alginate/amidon/AMG [126] n'a pas été évalué. Plus généralement, bien que ce maintien de l'activité enzymatique constitue un paramètre essentiel pour la conception rationnelle de systèmes bioactifs, il demeure rarement quantifié *in vivo* dans les études de preuve de concept, ce qui entrave une optimisation fondée sur des bases mécanistiques. Par exemple, pour l'hydrogel de laminarine, la dégradation de la matrice par l'AMG encapsulée va entraîner très probablement la fuite de l'enzyme, tandis que pour les microgels d'alginate, leur formulation sous forme de microsphères risque de favoriser la diffusion de l'AMG en raison de leur grande surface de contact.

En l'absence d'une approche rationnelle, ces systèmes restent difficilement optimisables : sans mesure du maintien de l'activité enzymatique, il devient impossible d'identifier les leviers d'amélioration ou de comprendre les échecs observés. Ce constat est d'autant plus critique pour des systèmes complexes dont le design implique l'optimisation simultanée de multiples paramètres (ex : composition, architecture, cinétique de libération ou interactions enzyme–matrice). À l'inverse, une conception guidée par des critères mécanistiques, comme celle mise en œuvre ici, permet de relier la stabilité enzymatique aux performances du dispositif et d'orienter rationnellement son évolution.

[a] Microsphères d'alginate contenant amidon et AMG.

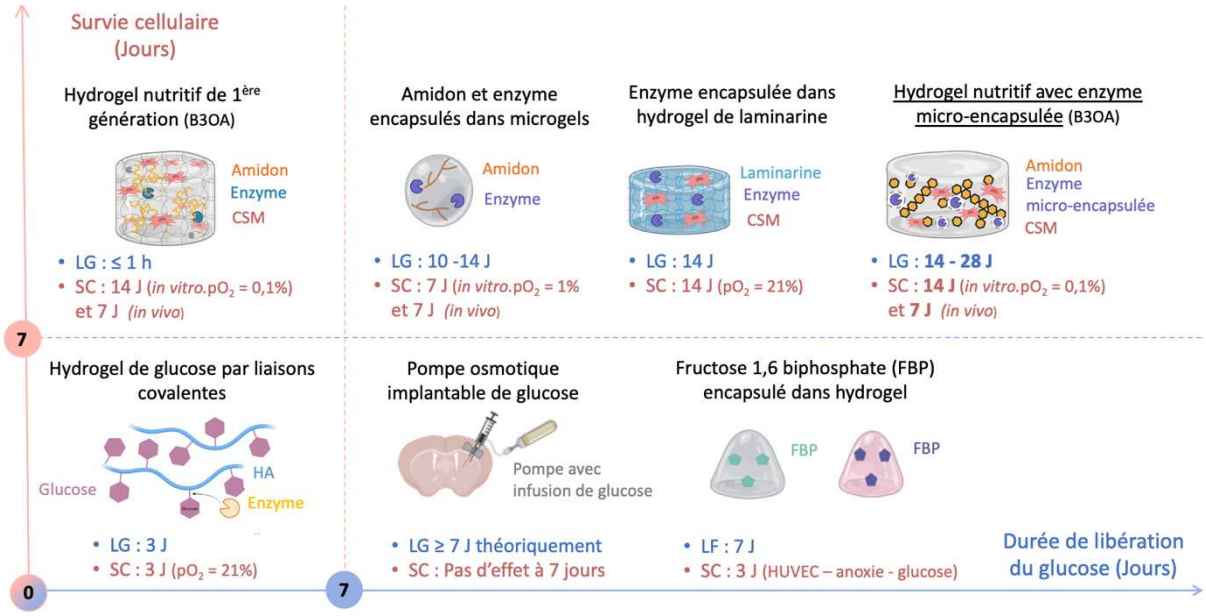


Figure 26. Comparaison de l'hydrogel nutritif intégrant l'AMG encapsulée avec les autres systèmes à libération de glucose visant à maintenir la viabilité cellulaire. Les différents systèmes sont classés selon leur durée de libération (en jours, en abscisses) et la période pendant laquelle ils permettent de maintenir la survie cellulaire (en jours, en ordonnées). **LG :** durée de libération de glucose. **LF :** durée de libération de FBP. **SC :** durée pendant laquelle le taux de survie cellulaire reste significativement supérieur à celui du contrôle (sans apport exogène de glucose). Sauf indication contraire, les cellules utilisées sont des CSMs humaines. Les références des différents systèmes sont données au chapitre 2.

II. Optimisation de l'hydrogel nutritif : quels autres paramètres améliorer ?

Comme expliqué en début de discussion, des paramètres de l'hydrogel non-spécifiquement liés à son rôle nutritif doivent encore être optimisés afin de permettre la délivrance de doses physiologiques de glucose *in vivo* et limiter ainsi la mortalité cellulaire observée lors de la 2e semaine d'implantation. Des pistes d'amélioration concernant le maintien de l'activité AMG, les vitesses de dégradation de l'amidon et de la matrice de fibrine ainsi que la densité cellulaire seront abordées dans les paragraphes ci-dessous.

II. 1. L'activité AMG

II. 1. a. La stabilité de l'AMG

Lors des études menées, nous avons observé une instabilité de l'activité de l'AMG libre en conditions physiologiques *in vitro* (37 °C et pH 7,4), perdant jusqu'à 75 % de son activité en 28 jours (Chap. 6,

Supplementary Figure S 2, p113). Si cette perte d'activité enzymatique est confirmée *in vivo*, elle pourrait avoir réduit la production de glucose à des doses en dessous de la quantité physiologique et contribuer ainsi indirectement à la mortalité cellulaire observée.

Parce que l'AMG est plus stable en milieu acide, la micro-acidification interne générée par la dégradation du PLGA [237] constituant les microsphères pourrait favoriser *in situ* le maintien de son activité par rapport à la forme libre. Concordant avec cette hypothèse, le suivi *ex vivo* de l'activité AMG (AMG_P40) après explantation indique une libération d'activité AMG globalement stable entre J3 et J21 (Chap.6, *Figure. 5, p104),* soit au-delà de la fenêtre de viabilité cellulaire observée *in vivo*, suggérant que l'activité AMG n'est pas le facteur limitant principal de la chute de survie lors de la seconde semaine d'implantation. Ce résultat doit néanmoins être interprété à l'aune des conditions expérimentales (libération de l'AMG réalisée à 50°C et variabilité du dosage accrue aux faibles activités AMG). Collectivement, ces données pointent plutôt vers d'autres facteurs limitants déjà identifiés, tels que l'accessibilité/la dégradation de l'amidon, la dynamique du réseau de fibrine, la consommation du glucose par les cellules de l'hôte, qu'il conviendra donc d'optimiser en priorité.

Néanmoins, une alternative consisterait à remplacer l'AMG par une enzyme dont le pH optimal se rapprocherait davantage des conditions physiologiques. A ce titre, l'α-glucosidase neutre, enzyme cytoplasmique ayant une activité enzymatique similaire[a] à celle de l'AMG, présente un pH optimal avoisinant 6 et a déjà démontré sa capacité à hydrolyser l'amidon en glucose [238]. De plus, dans une perspective translationnelle, son origine humaine pourrait la rendre moins immunogène que l'AMG d'origine fongique, faisant d'elle une candidate particulièrement prometteuse.

II. 1. b. La libération de l'activité AMG

Grâce à l'encapsulation, deux profils de libération de l'AMG ont pu être obtenus *in vitro* : AMG_P20, avec une libération quasi-complète de l'AMG sur 21 jours et AMG_P40, plus progressive, atteignant un plateau ≈ 57% d'AMG libérée en 49 jours. Toutefois, les essais de viabilité réalisés *in vitro* dans un système fermé ne rendent pas compte de la diffusion du glucose ni de l'AMG qui prévaut *in vivo* ; ils ne constituent donc pas un critère fiable pour sélectionner le profil de libération de l'AMG. Il est dès lors nécessaire d'évaluer *in vivo* plusieurs profils afin d'identifier celui qui assure une délivrance de glucose alignée avec la demande métabolique des cellules transplantées et la fenêtre de revascularisation. La cinétique retenue devra en outre être compatible avec une dégradation complète de l'amidon à l'échéance visée, afin de limiter l'encombrement stérique susceptible d'entraver la réparation tissulaire. De plus, la disponibilité d'une gamme de profils de libération rendrait l'hydrogel nutritif adaptable aux différentes indications visées (section III.2) et aux durées de soutien recherchées.

[a] L'α-glucosidase neutre et l'AMG hydrolysent toutes les deux les liaisons α(1-4) de polymère de glucose à partir de l'extrémité non réductrice.

Cette modulation du profil de libération de l'AMG peut être obtenue en agissant sur différents paramètres, tels que la taille des microsphères de PLGA-P188-PLGA (ex : modulation vitesse d'agitation) [239–241], leur porosité (ex : modulation de la masse moléculaire du PLGA) [239–242], ou plus généralement l'hydrophilie du copolymère [239,240]. Par ailleurs, le mélange des deux types de microsphères (P20 et P40) constitue une approche simple pour moduler la cinétique de libération de l'AMG. Par exemple, un mélange 1:1 de microsphères P20 et P40 a permis d'obtenir, *in vitro,* un profil de libération linéaire du lysozyme encapsulé, profil qui n'était pas observé lorsque les microsphères P20 ou P40 étaient utilisées seules[235].

Toutefois, ces raffinements de la libération de l'AMG supposent au préalable la possibilité de quantifier *in vivo* la fraction d'AMG active effectivement libérée de manière plus représentative que le dosage *ex vivo* utilisé.

II. 1. c. La méthode de dosage de l'activité AMG

Compte tenu des faibles activités AMG utilisées dans ce projet et de la variabilité accrue du dosage pour les plus faibles d'entre elles, il serait également utile d'accroître la sensibilité du test. Pour cela, nous pourrions augmenter la sensibilité de notre dosage aux faibles concentrations de glucose, en remplaçant l'automate Respons910 par une méthode fluorimétrique , plus sensible [244] (LQ 100 fois plus faible que celle de l'automate) ce qui permettrait un dosage plus précis des faibles activités AMG.

Le développement d'une méthode de suivi *in vivo* constituerait également un axe d'amélioration pertinent. Nous pourrions, à l'instar des injections de D-Luciférine, injecter au niveau des implants et aux temps souhaités un substrat modifié pour produire une molécule fluorescente lors de son hydrolyse, dont l'intensité du signal serait alors proportionnelle à l'activité enzymatique. Par exemple, et sous réserve qu'il soit dégradable par l'AMG, la sonde fluorescente HCBG [245] pourrait être un choix de substrat intéressant, car il (i) émet une fluorescence à 725 nm lors de son hydrolyse, évitant l'autofluorescence des tissus et (ii) est dégradable par les α-glucosidases, enzymes similaires à l'AMG.

II. 2. La vitesse de dégradation de l'amidon

La formulation de l'amidon (forme particulaire + solubilité partielle) a été retenue pour assurer une réserve suffisante de glucose sur 3 semaines en hydrogel. Néanmoins, la délivrance de glucose dépendant à la fois de l'AMG et de l'amidon, l'augmentation de la mortalité cellulaire observée *in vivo* nous conduit à interroger la cinétique de dégradation de ce dernier.

Pour la suivre, des hydrogels fibrine/amidon, avec ou sans AMG_P40, ont été implantés de manière ectopique puis explantés après 3, 7 et 21 jours. Les explants ont été incubés dans une solution concentrée d'AMG fraîche pour hydrolyser l'amidon résiduel, et en quantifier la fraction restante (*Figure 27*). Indépendamment de la présence d'AMG_P40, moins de 10 % d'amidon résiduel était mesuré à J3, résultat en contraste avec la mise en évidence histologique d'amidon encore visible à J21.

Cette disparition étonnamment rapide pourrait, si elle s'avérait confirmée, s'expliquer par la dégradation de l'amidon médiée par des enzymes endogènes (de l'hôte). En effet, la chirurgie induit une rupture des capillaires sanguins et une réaction inflammatoire locale, susceptible de libérer dans le microenvironnement des enzymes telles que des α-amylases circulantes [246] ou des α-glucosidases, lysosomales ou cytoplasmiques, libérées par des cellules inflammatoires (sécrétion d'enzymes lysosomales ou lyse cellulaire), même si leur présence extracellulaire en contexte inflammatoire reste peu documentée. Bien que cette hypothèse soit soutenue par la mise en évidence d'une activité glycosidase dans les implants dépourvus d'AMG (Chap.6, *Figure. 5 - B, p104*), il reste impossible d'écarter complètement d'autres facteurs relatifs soit à l'hydrogel implanté, tels que la fuite de l'amidon, malgré sa solubilité réduite, soit à la méthodologie employée pour dégrader l'amidon à partir de l'explant. Ainsi, l'accès de l'AMG (fraiche) à l'explant pourrait être entravé par la formation d'une capsule fibreuse péri-implantaire limitant la diffusion de l'enzyme au cœur de l'implant.

Pour élucider l'origine de ce phénomène, des explantations à des temps plus courts (1 h, 12 h, 24 h) et des implants placés dans des chambres fermées [123,126] permettront d'isoler les contributions respectives de la capsule et des enzymes de l'hôte. Enfin, la détection d'éventuels oligosaccharides issus de la dégradation de l'amidon (par exemple via un dosage DNS), ou l'utilisation de sondes fluorescentes spécifiques pour certaines enzymes (α-amylases ou α-glucosidases), pourrait préciser d'avantage l'origine enzymatique de cette disparition.

Si l'origine enzymatique endogène était confirmée, augmenter le stock d'amidon exposerait à une glucotoxicité (> 20g/L [212]) du fait de l'hydrolyse en moins de 3 jours observée dans nos implants. Des stratégies plus sûres seraient de ralentir la dégradation de l'amidon, soit en utilisant un amidon plus lentement dégradable (ex : modulation du rapport amylose/amylopectine [218]), ou en l'encapsulant dans des microsphères [126,197] séparément de l'AMG. Par ailleurs, pour s'affranchir de l'activité enzymatique endogène, le couple amidon/AMG pourrait être remplacé par de la laminarine associée à une exo-β(1-3)-glucanase capable de l'hydrolyser en glucose [247]. En effet, la laminarine est un polymère de glucose dont les liaisons β(1-3) et β(1-6) la rendraient, au vu des connaissances actuelles, moins sensible aux enzymes endogènes des mammifères que les liaisons α de l'amidon, ce qui en fait une candidate idéale, à condition qu'elle soit complètement hydrolysable en conditions physiologiques par son enzyme associée.

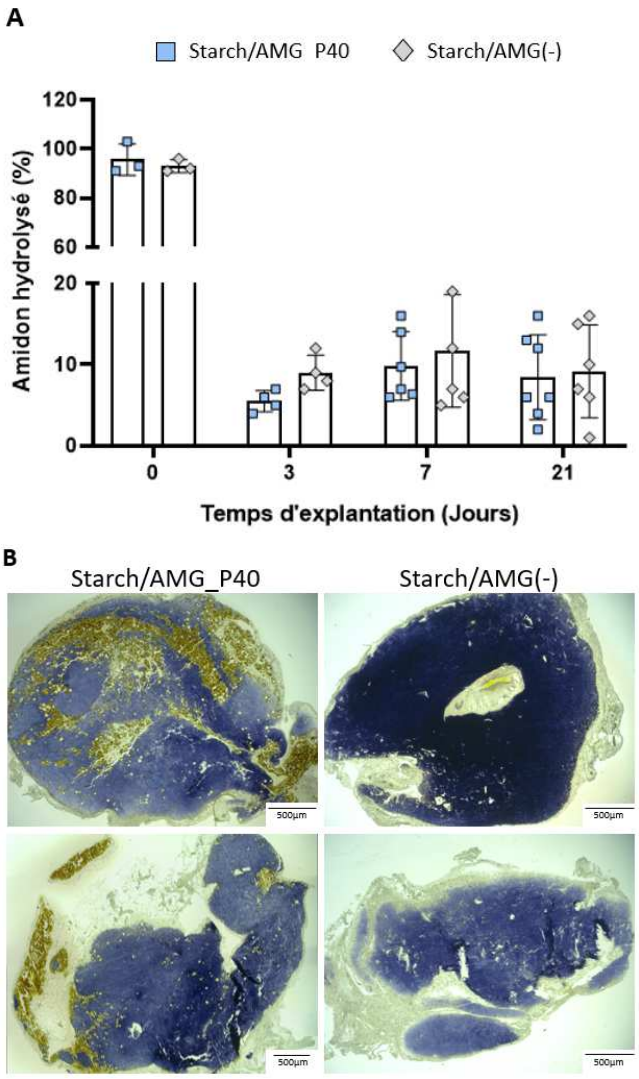


Figure 27. Amidon résiduel après explantation. A. Quantification de l'amidon résiduel, *n=4*. Des hydrogels fibrine/amidon, avec ou sans AMG_P40 (0.03U), ont été implantés de manière ectopique, explantés après 3, 7 et 21 jours, puis stockés à -80°C jusqu'au jour des analyses. Les explants ont ensuite été immergés dans 200µL d'une solution d'AMG (100U/mL) et incubés à 50°C pendant 3h afin d'hydrolyser l'amidon restant. Les 2 groupes d'hydrogels non-implantés (J0) ont permis de vérifier que la durée de réaction suffisait à hydrolyser 100% de l'amidon initial. **B**. Coupe histologique des explants à J21, échelle = 500µm, *n=2 explants/condition*. Les explants ont été fixés au paraformaldéhyde 4 %, inclus en paraffine, sectionnés en coupes de 10µm et colorés au Lugol. L'amidon apparait en violet et les microsphères en jaune-marron.

II. 3. La vitesse de dégradation du réseau de fibrine

Lors de nos expériences, une dégradation de la matrice de fibrine suffisamment marquée pour altérer le volume et la tenue mécanique de l'hydrogel, a été observée au bout de 21 jours *in vitro* et 7 jours *in vivo.* Or, à l'instar de l'amidon, une dégradation trop rapide du réseau de fibrine constituant l'hydrogel peut empêcher la production de doses physiologiques de glucose en entraînant la fuite ou l'isolement (*Figure 27, image en bas à gauche*) de ses composants (amidon, AMG et CSMs).

Sur le plan mécanistique, la dégradation du réseau de fibrine peut être médiée par l'action d'enzymes sécrétées notamment par les CSMs [248,249], telles que les métalloprotéinases matricielles et, de manière indirecte, les activateurs du plasminogène (tPA/uPA) via la génération de plasmine. Par conséquent, l'accélération de la dégradation observée *in vivo* s'explique très probablement par l'augmentation de l'activité protéolytique liée au contexte inflammatoire post-chirurgical et à l'infiltration de l'implant par des cellules de l'hôte [250].

S'agissant de la viabilité cellulaire, l'anoïkis (mort cellulaire déclenchée par la perte d'adhésion cellulaire [251]), rend vraisemblablement compte de la hausse de la mortalité cellulaire *in vitro* (80% de CSMs mortes à J21 contre 25% à J14)[a] observée concomitamment avec la nette résorption du réseau de fibrine. Sous réserve de confirmation expérimentale, l'impact de l'anoïkis pourrait être réduit *in vivo* du fait de supports d'adhésion alternatifs fournis par les tissus environnants aux CSMs.

Enfin, la vitesse de dégradation de l'hydrogel devra être optimisée afin de limiter la fuite ou l'isolement (*Figure 27, image en bas à gauche*) de ses composants *in vivo* (amidon, AMG encapsulée et CSMs). Idéalement, la dégradation du réseau de fibrine coïnciderait avec l'arrivée des néovaisseaux, permettant aux CSMs de devenir indépendantes de l'apport exogène en glucose. Dans cette optique, une tentative de contrôle de la cinétique de résorption de la fibrine *in vivo* par l'ajout d'une concentration cinq fois plus élevée d'aprotinine[b] s'est révélée infructueuse[153], probablement en raison de sa diffusion hors de l'implant. En revanche, l'ajout de facteur XIII à la formulation mérite d'être étudié, car il agit au cours de la polymérisation en stabilisant la fibrine par la formation de liaisons covalentes résistantes [252], constituant ainsi une piste prometteuse avant de recourir à des matrices alternatives présentant une dégradation plus lente (ex : Chitosan, collagène, alginate) [253,254].

II. 4. Le choix des CSMs (densité et immunogénicité)

Enfin, lors de nos expériences, nous avons retenu une densité de 10^6 cellules/mL (2×10^5 CSMs par hydrogel), identique à celle utilisée dans la première génération d'hydrogel nutritif et fréquemment rapportée dans la littérature [255–257]. Cette densité pourrait être toutefois optimisée car elle impacte directement la survie [258,259] et la fonctionnalité des CSMs [260] en influençant la concentration locale en signaux intercellulaires et en nutriments disponibles. De plus, l'hydrogel nutritif devant permettre à terme un maintien efficace de la survie et de la prolifération des CSMs en hydrogel, la densité cellulaire initiale devra probablement être également réduite *in fine*.

Par ailleurs, malgré les propriétés immunomodulatrices des CSMs et l'utilisation de souris immunodéprimées (NMRI-nu (nu/nu), dépourvues de lymphocytes T fonctionnels) destinée à limiter les réactions de rejet des cellules humaines transplantées, la contribution de l'immunité innée à la mortalité cellulaire observée *in vivo* ne peut être totalement exclue. Aucun signe clinique de réaction

[a] Le point à J21 a été enlevé de l'étude de viabilité cellulaire *in vitro* présentée au Chapitre 6 (*Figure 4*) à cause du biais engendré par la dégradation massive de l'hydrogel.
[b] Antiprotéolytique.

aiguë n'a toutefois été observé chez les animaux. Des essais complémentaires réalisés avec des CSMs d'origine murine permettraient de vérifier cette hypothèse.

Plus généralement, une analyse histologique d'implants explantés à différents temps, orientée vers l'identification des cellules immunitaires présentes dans les explants, offrirait une meilleure compréhension de la réponse partielle immunitaire induite par notre système (CSMs et fibrinogène d'origine humaine, AMG d'origine fongique, etc.) et de sa contribution, directe ou indirecte, à la mortalité des CSMs après implantation.

III. Défis et perspectives des hydrogels nutritifs

Enfin, l'utilisation d'hydrogels nutritifs nécessite d'anticiper à terme certains risques inhérents aux stratégies d'apport de glucose en contexte ischémique et offre de nombreuses possibilités en matière de thérapies cellulaires.

III. 1. Les défis inhérents aux hydrogels nutritifs

III. 1. a. Défi d'une compétition métabolique pour le glucose

L'analyse histologique des explants utilisés dans les études de survie cellulaire *in vivo* a révélé une infiltration cellulaire jusqu'au centre des implants fibrineux (*Figure 28*). Cette observation indique que les cellules endogènes (immuno-marqueur des CSMs humaines resté négatif) ont donc accès au glucose libéré localement, ce qui expose les CSMs transplantées à une compétition métabolique importante.

Afin de dissocier l'efficacité intrinsèque du système de délivrance de glucose de cette consommation concurrentielle, nous pourrions évaluer la survie des CSMs transplantées dans des implants isolés au sein de chambres fermées [123,126]. Une telle configuration permettrait, dans un premier temps, de confirmer que la production locale de glucose par l'hydrogel suffit à maintenir la viabilité des CSMs transplantées, établissant ainsi une preuve de concept indépendamment de la consommation par les tissus environnants.

Toutefois, à terme, la consommation de glucose par les cellules de l'hôte et ses répercussions sur leur fonctionnalité devront probablement être prises en compte. En effet, l'objectif final étant de maintenir la viabilité des CSMs jusqu'à la revascularisation du tissu, la présence de cellules endothéliales vivantes et fonctionnelles est essentielle. Ajuster la production de glucose (augmentation de la quantité d'amidon et/ou d'AMG) pour soutenir leur activité métabolique pourrait ainsi accélérer la résolution de l'ischémie.

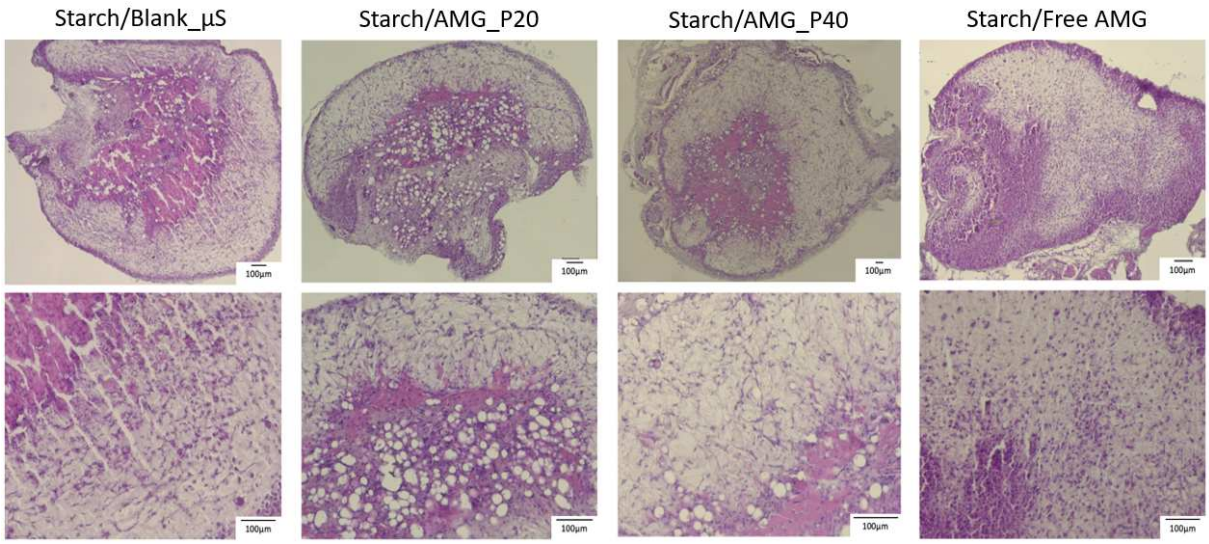


Figure 28. Coupes histologiques représentatives des hydrogels fibrine/amidon/CSMs avec ou sans AMG explantés au 29e jour d'implantation. Des hydrogels composés de fibrine, d'amidon et de CSMs contenant de l'AMG encapsulée (Starch/AMG_P20 ou Starch/AMG_P40), libre (Starch/Free AMG) ou absente (Starch/Blank_µS) ont été implantés en sous-cutané chez la souris afin d'évaluer l'effet de l'encapsulation sur la survie des CSMs (étude décrite au Chapitre 7). Au terme de l'étude, les implants ont été récupérés, fixés dans du paraformaldéhyde à 4 %, inclus en paraffine, puis coupés en sections de 5 µm et colorés à l'Hématoxyline-Éosine. Les noyaux des cellules apparaissent en violet, la fibrine (au centre des hydrogels) en rose fuchsia, tandis que l'amidon, non coloré, demeure blanc. Les « trous » ronds observés dans les 3 premières conditions correspondent à l'emplacement des microsphères, probablement arrachées lors du traitement histologique. Les images de la 2e ligne correspondent à un agrandissement des images de la 1ère ligne. L'absence de CSMs viables a été confirmée par la négativité de la coloration à l'hβ2-MG[a] (spécifique des cellules humaines), indiquant que les cellules observées correspondent aux cellules de l'hôte.

III. 1. b. Défi de l'accumulation d'acide lactique par la glycolyse.

Lors de l'expérience de survie cellulaire *in vitro*, une diminution notable du pH, stabilisé autour de 6,9 dès la première semaine de culture, a été observée. Cette acidification du milieu s'explique principalement par l'accumulation d'acide lactique, sous forme {lactate + H^+} sécrété par les CSMs au cours de la glycolyse, et, dans une moindre mesure, par la dégradation du PLGA des microsphères. Alors qu'à des concentrations physiologiques le lactate a démontré avoir un effet positif sur la prolifération des CSMs [261], l'accumulation de {lactate + H^+} au-dessus d'un certain seuil, peut toutefois avoir plusieurs effets délétères :

- L'acidification intracellulaire et extracellulaire, dont le mécanisme est décrit au chapitre 1 (II. 2. c). A titre d'exemple, nous avons constaté que l'acidification extracellulaire devenait délétère pour la viabilité des $CSMs_{MoelleOsseuse}$ à partir d'un pH de 6,8**,** entraînant un taux de

[a] Human β2 microglobulin

mortalité de 46 % après 7 jours de culture (culture 2D, pO_2 = 21 %) (Chap. 6, *Supplementary Figure S 2, p113*).

- La dégradation du PLGA contenu dans le copolymère PLGA-P188-PLGA. Elle est favorisée par l'autocatalyse acide et pourrait potentiellement être accélérée par l'acidification locale. Or, cette érosion interne des microsphères risque de piéger l'AMG au sein de sa structure érodée, empêchant alors sa libération.
- L'inhibition de la glycolyse [262,263]. La conversion du pyruvate en lactate par la LDH[a] permet de régénérer le NAD^+ à partir du NADH, indispensable à la poursuite de la glycolyse anaérobie, selon l'équation $Pyruvate + NADH \rightleftharpoons Lactacte + NAD^+$. Lors d'une glycolyse anaérobie intense et prolongée, le lactate s'accumule plus vite qu'il n'est éliminé, rendant la réaction du pyruvate vers le lactate thermodynamiquement moins favorable. Comme le NAD^+ est consommé directement par la glycolyse et que sa régénération devient insuffisante, le rapport NADH/NAD^+ augmente, ce qui ralentit et peut ultimement bloquer la glycolyse.

Dans notre modèle *in vivo,* la diffusion rapide du lactate hors de l'hydrogel rend l'apparition de ces effets peu probable. Cependant, ces observations soulèvent des questions quant à l'utilisation de ce système dans d'autres modèles. En effet, plusieurs études rapportent une acidification extracellulaire par accumulation de {lactate + H^+} à l'échelle tissulaire après une ischémie, qui, dans les cas d'ischémie prolongée ou sévère, contribuerait à la mortalité cellulaire observée (ischémie cardiaque[264] ou cérébrale[265]). Dans de telles conditions, le maintien de la viabilité des CSMs transplantées, via le soutien de la glycolyse, pourrait être limité (glycolyse inhibée), voir aggraver la situation (augmentation de l'acidification).

Ces observations mettent en évidence la nécessité d'adapter les stratégies d'apport de glucose aux conditions physiopathologiques spécifiques des tissus ischémiques. Elles ouvrent également la voie à l'exploration d'autres contextes thérapeutiques, dans lesquels un hydrogel nutritif pourrait soutenir la survie et la fonction des CSMs.

III. 2. Les perspectives d'utilisation des hydrogels nutritifs

L'utilisation thérapeutique des CSMs s'effectue, en effet, fréquemment dans des environnements tissulaires appauvris en glucose et en oxygène, en raison d'une vascularisation altérée ou d'une dégénérescence tissulaire limitant la diffusion des nutriments. Dans ce contexte, les hydrogels nutritifs offrent de nombreuses perspectives d'application (*Figure 29*).

[a] : Lactate DeHydrogenase

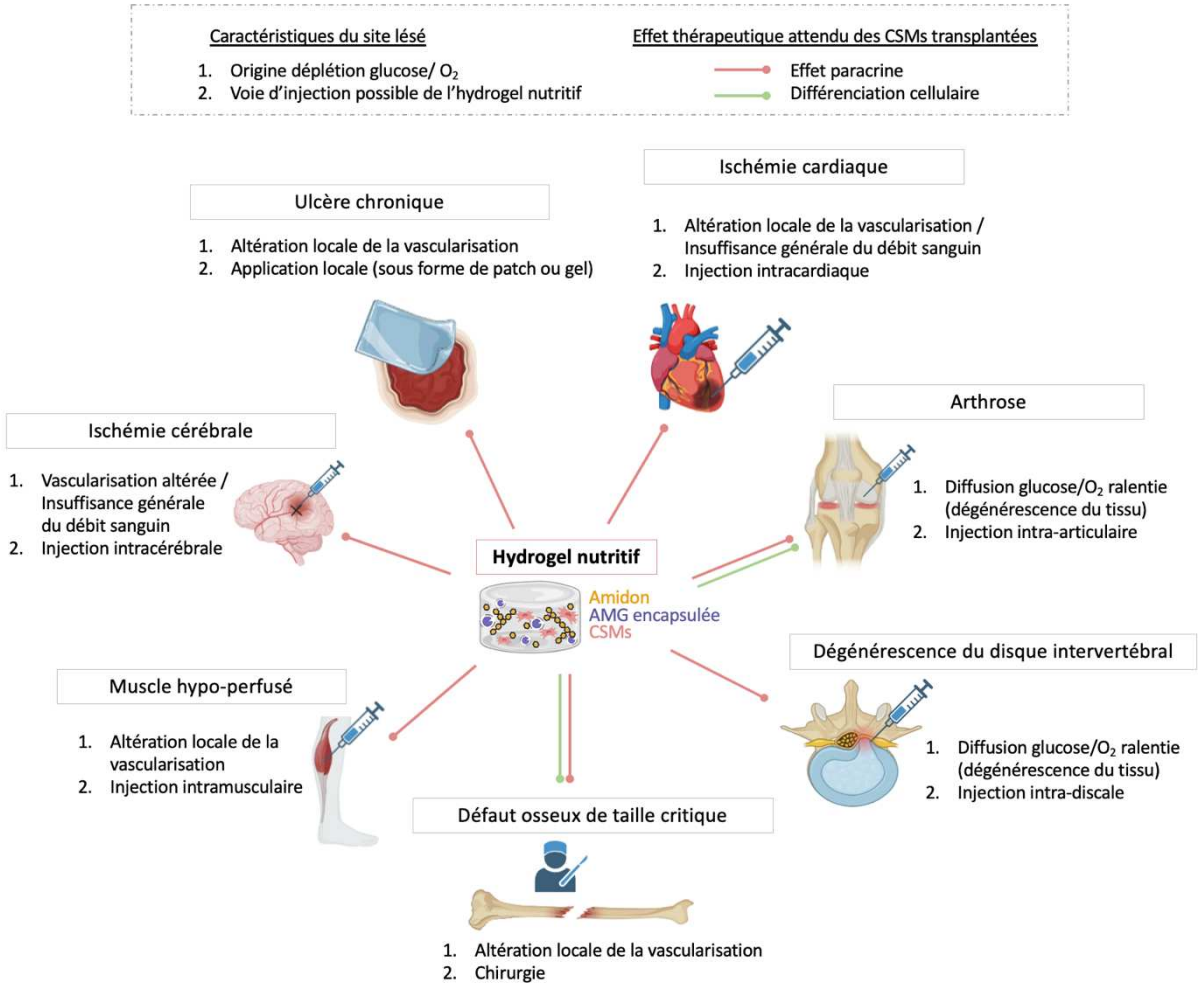


Figure 29. Exemples d'applications thérapeutiques nécessitant un soutien métabolique des CSMs pouvant être comblé par l'hydrogel nutritif. L'application thérapeutique est décrite par 1) l'origine de la déplétion en glucose/O_2 et par 2) la voie d'injection possible de l'hydrogel nutritif. Les flèches indiquent l'effet thérapeutique attendu des CSMs transplantées. Les références des applications évoquées sont les suivantes [56,59,112,166,266,267].

Conçu à l'origine pour la réparation osseuse, thématique de recherche de notre laboratoire, notre hydrogel nutritif devra être rendu injectable afin de pouvoir être utilisé dans d'autres contextes thérapeutiques. Pour cela, il devra présenter une force de poussée inférieure à 25 N lors de l'extrusion à travers une seringue de petit diamètre (supérieur à 20 G) [268]. La taille des particules d'amidon devra donc être réduite. Bien que les microsphères de PLGA aient déjà démontré leur injectabilité chez l'homme (aiguille 21-25G)[269], l'ajout du P188 requiert une confirmation expérimentale. En pratique, les hydrogels de fibrine, à l'instar de notre hydrogel nutritif, peuvent être injectés puis polymérisés *in situ* à l'aide d'une seringue bicamérale, dans laquelle le fibrinogène et la thrombine sont maintenus séparés dans deux chambres distinctes, comme dans le dispositif commercialisé par Baxter (TISSEL®). A titre d'exemple, l'hydrogel nutritif de première génération, contenant l'amidon de blé solubilisé, présentait déjà une bonne injectabilité, avec une force de poussée inférieure à 3 N à travers une seringue de calibre 22 G [270].

Enfin, la mort cellulaire massive observée après implantation n'est pas spécifique aux CSMs. Elle touche également de nombreux autres types cellulaires utilisés en ingénierie tissulaire, tels que les hépatocytes [271], chondrocytes [272], cardiomyocytes [273,274], ou encore les myoblastes [275]. Ces observations soulignent l'intérêt potentiel des hydrogels nutritifs pour améliorer la survie cellulaire dans divers contextes de transplantation, à condition d'identifier la cause de cette mortalité et de vérifier la possibilité de maintenir la viabilité de ces cellules en conditions de privation d'O_2 par l'apport de glucose.

Conclusion des travaux de thèse

Pour conclure, mon projet doctoral s'inscrit dans une logique d'optimisation d'un hydrogel nutritif précédemment développé au laboratoire et conçu pour assurer l'apport en glucose nécessaire au maintien de la viabilité de $CSMs_{MoelleOsseuse}$ humaines transplantées dans un contexte d'ischémie. Le glucose étant libéré par hydrolyse de l'amidon sous l'action de l'AMG, l'hypothèse initiale de ce travail était que la disparition rapide de l'AMG observée *in vivo* (en 7 jours) entraînait un arrêt de la production de glucose et contribuait ainsi à l'augmentation de la mortalité cellulaire constatée au cours de la 2^{e} semaine post-implantation.

Le premier objectif du projet a donc consisté à optimiser la formulation de l'amidon afin d'assurer une réserve en glucose suffisante pour subvenir aux besoins énergétiques de 2×10^5 CSMs incorporées dans un hydrogel de fibrine sur une période de 21 jours, durée jugée compatible avec le déclenchement de la différenciation cellulaire et la stimulation de l'angiogenèse. La solubilité trop élevée de l'amidon de blé initial ne permettant pas d'atteindre la charge souhaitée en hydrogel, un amidon de pomme de terre extrudé, entièrement dégradable et sous forme particulaire (<150 µm), a été sélectionné afin de garantir l'incorporation du stock d'amidon visé dans la matrice de fibrine.

Le **deuxième objectif** visait à encapsuler l'AMG dans des microsphères de copolymère (PLGA-P188-PLGA) afin d'en contrôler la libération dans le temps et d'améliorer sa persistance au site d'implantation. Pour ce faire, une méthode de dosage de l'activité enzymatique, plus sensible et reproductible que le kit commercial usuel, a été développée afin de garantir le contrôle des étapes d'encapsulation. Après optimisation de l'étape de nanoprécipitation, l'AMG a été encapsulée dans deux types de microsphères (P20 et P40), différant par le poids moléculaire du copolymère. Les études *in vitro* ont mis en évidence deux profils distincts de libération : (i) une libération quasi-complète de l'AMG en 21 jours (P20) et (ii) une libération plus progressive atteignant un plateau à 49 jours (P40). En présence d'amidon et de CSMs dans l'hydrogel, ces deux cinétiques de libération de l'AMG ont permis une production de glucose suffisante *in vitro* pour maintenir plus de 75 % de viabilité cellulaire après 14 jours en conditions de privation de glucose et d'oxygène. Par ailleurs, l'encapsulation de l'enzyme a permis à l'activité de l'AMG de persister sur le site d'implantation sous-cutané pendant 21 jours, contrairement à l'enzyme libre disparue du site après 9 jours, validant ainsi une étape clé de l'hypothèse de départ.

Enfin, le **troisième objectif** portait sur l'évaluation *in vivo* de ces nouvelles formulations d'amidon et d'AMG par rapport à la survie des CSMs. L'AMG encapsulée dans les microsphères P40 a permis un nombre de CSMs vivantes plus élevé à J7 par rapport aux hydrogels sans enzyme ou contenant l'enzyme sous forme libre. Cependant, à l'instar de la première génération d'hydrogel, une baisse notable de la viabilité a été observée durant la deuxième semaine. Un essai d'augmentation de la quantité d'AMG encapsulée a été mené, mais n'a pas conduit à une amélioration significative de la survie cellulaire. Des études complémentaires suggèrent une disparition étonnamment rapide de l'amidon *in vivo* susceptible d'expliquer ces résultats. Les travaux futurs devront ainsi se concentrer sur l'identification des causes de cette disparition, puis sur la caractérisation et l'optimisation de la cinétique de dégradation *in vivo* de l'amidon.

Ainsi, bien que des améliorations complémentaires soient encore nécessaires pour atteindre une efficacité optimale du système, ce travail constitue une première étape vers l'optimisation du concept d'hydrogel nutritif et le maintien de la viabilité à long terme des CSMs transplantées

Références

1. Henig I, Zuckerman T. Hematopoietic Stem Cell Transplantation—50 Years of Evolution and Future Perspectives. *Rambam Maimonides Med J*. 2014;5(4):e0028. doi:10.5041/RMMJ.10162

2. Kohlhauser M, Luze H, Nischwitz SP, Kamolz LP. Historical Evolution of Skin Grafting—A Journey through Time. *Medicina (Mex)*. 2021;57(4):348. doi:10.3390/medicina57040348

3. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation. *N Engl J Med*. 1994;331(14):889-895.

4. Gille J, Behrens P, Schulz AP, Oheim R, Kienast B. Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Implantation: A Clinical Follow-Up at 15 Years. *CARTILAGE*. 2016;7(4):309-315. doi:10.1177/1947603516638901

5. European Medicines Agency recommends approval of combined advanced-therapy product. European Medicines Agency. April 26, 2013. https://www.ema.europa.eu/en/news/european-medicines-agency-recommends-approval-combined-advanced-therapy-product

6. Mitra A, Barua A, Huang L, Ganguly S, Feng Q, He B. From bench to bedside: the history and progress of CAR T cell therapy. *Front Immunol*. 2023;14(1188049):1-14. doi:10.3389/fimmu.2023.1188049

7. First two CAR-T cell medicines recommended for approval in the European Union. European Medicines Agency. June 29, 2018. https://www.ema.europa.eu/en/news/first-two-car-t-cell-medicines-recommended-approval-european-union

8. *Global Personalized Cell Therapy Market Research Report: By Application (Cancer, Cardiovascular Diseases, Neurological Disorders, Immunological Diseases, Genetic Disorders), By Cell Source (Autologous, Allogeneic, Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)), By Cell Type (T Cells, Natural Killer (NK) Cells, Dendritic Cells, Mesenchymal Stem Cells, Adipose-Derived Stem Cells), By Manufacturing Platform (Viral Vectors, Transposons, CRISPR-Cas9, Cell Expansion and Engineering), By Route of Administration (Intravenous, Intratumoral, Intradermal, Intracerebral, Intrasynovial) and By Regional (North America, Europe, South America, Asia Pacific, Middle East and Africa) - Forecast to 2032*. Wise Guy Reports; 2024. Accessed April 14, 2025. https://www.wiseguyreports.com/reports/cell-theraputics-market

9. 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*. 2015;39(4):807-817. doi:10.1007/s00264-015-2716-8

10. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE MARROW AND SPLEEN CELLS. *Cell Prolif*. 1970;3(4):393-403. doi:10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x

11. Mizukami A, Swiech K. Mesenchymal Stromal Cells: From Discovery to Manufacturing and Commercialization. *Stem Cells Int*. 2018;2018:1-13. doi:10.1155/2018/4083921

12. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991;9(5):641-650. doi:10.1002/jor.1100090504

13. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-395. doi:10.1080/14653240500319234

14. Viswanathan S, Shi Y, Galipeau J, et al. Mesenchymal stem versus stromal cells: International Society for Cell & Gene Therapy (ISCT®) Mesenchymal Stromal Cell committee position statement on nomenclature. *Cytotherapy*. 2019;21(10):1019-1024. doi:10.1016/j.jcyt.2019.08.002

15. Melief SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE, Roelofs H. Adipose Tissue-Derived Multipotent Stromal Cells Have a Higher Immunomodulatory Capacity Than Their Bone Marrow-Derived Counterparts. *Stem Cells Transl Med*. 2013;2(6):455-463. doi:10.5966/sctm.2012-0184

16. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905

17. Bellagamba BC, Grudzinski PB, Ely PB, Nader PDJH, Nardi NB, Da Silva Meirelles L. Induction of Expression of CD271 and CD34 in Mesenchymal Stromal Cells Cultured as Spheroids. *Stem Cells Int*. 2018;2018:1-14. doi:10.1155/2018/7357213

18. Simmons P, Torok-Storb B. CD34 expression by stromal precursors in normal human adult bone marrow. *Blood*. 1991;78(11):2848-2853. doi:10.1182/blood.V78.11.2848.2848

19. Lin CS, Ning H, Lin G, Lue TF. Is CD34 truly a negative marker for mesenchymal stromal cells? *Cytotherapy*. 2012;14(10):1159-1163. doi:10.3109/14653249.2012.729817

20. Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(2):126-131. doi:10.1038/nrm3049

21. Craig DJ, James AW, Wang Y, Tavian M, Crisan M, Péault BM. Blood Vessel Resident Human Stem Cells in Health and Disease. *Stem Cells Transl Med*. 2022;11(1):35-43. doi:10.1093/stcltm/szab001

22. Han Y, Li X, Zhang Y, Han Y, Chang F, Ding J. Mesenchymal Stem Cells for Regenerative Medicine. *Cells*. 2019;8(8):886. doi:10.3390/cells8080886

23. Orbay H, Tobita M, Mizuno H. Mesenchymal Stem Cells Isolated from Adipose and Other Tissues: Basic Biological Properties and Clinical Applications. *Stem Cells Int*. 2012;2012:461718. doi:10.1155/2012/461718

24. Jin H, Bae Y, Kim M, et al. Comparative Analysis of Human Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Umbilical Cord Blood as Sources of Cell Therapy. *Int J Mol Sci*. 2013;14(9):17986-18001. doi:10.3390/ijms140917986

25. Semon JA, Maness C, Zhang X, et al. Comparison of human adult stem cells from adipose tissue and bone marrow in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. 2014;5(1):2. doi:10.1186/scrt391

26. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: Superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum*. 2005;52(8):2521-2529. doi:10.1002/art.21212

27. Ribeiro A, Laranjeira P, Mendes S, 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. *Cell Res Ther*. 2013;4(5):125. doi:10.1186/scrt336

28. Heo JS, Choi Y, Kim HS, Kim HO. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *Int J Mol Med*. 2016;37(1):115-125. doi:10.3892/ijmm.2015.2413

29. Loukogeorgakis SP, De Coppi P. Stem cells from amniotic fluid – Potential for regenerative medicine. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2016;31:45-57. doi:10.1016/j.bpobgyn.2015.08.009

30. Vangsness Jr. CT, Sternberg, H, Harris L. Umbilical Cord Tissue Offers the Greatest Number of Harvestable Mesenchymal Stem Cells for Research and Clinical Application A Literature Review of Different Harvest Sites. 2015;31(9):1836-1843.

31. R. Fazzina, P. Iudicone, D. Fioravanti, G. Bonanno, P. Totta, I. G. Zizzari & L. Pierelli. Potency testing of mesenchymal stromal cell growth expanded in human platelet lysate from different human tissues. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):122. doi:10.1186/s13287-016-0383-3

32. Wang Q, Yang Q, Wang Z, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from fetal-bone marrow, adipose tissue, and Warton's jelly as sources of cell immunomodulatory therapy. *Hum Vaccines Immunother*. 2016;12(1):85-96. doi:10.1080/21645515.2015.1030549

33. Petrenko Y, Vackova I, Kekulova K, et al. A comparative Analysis of Multipotent Mesenchymal Stromal cells derived from Different Sources, with a Focus on neuroregenerative potential. *Sci Rep*. 2020;10:4290.

34. Li C yu, Wu X yun, Tong J bei, et al. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):55. doi:10.1186/s13287-015-0066-5

35. Li X, Bai J, Ji X, Li R, Xuan Y, Wang Y. Comprehensive characterization of four different populations of human mesenchymal stem cells as regards their immune properties, proliferation and differentiation. *Int J Mol Med*. 2014;34(3):695-704. doi:10.3892/ijmm.2014.1821

36. Trivanović D, Jauković A, Popović B, et al. Mesenchymal stem cells of different origin: Comparative evaluation of proliferative capacity, telomere length and pluripotency marker expression. *Life Sci*. 2015;141:61-73. doi:10.1016/j.lfs.2015.09.019

37. Cheng H, Qiu L, Ma J, et al. Replicative senescence of human bone marrow and umbilical cord derived mesenchymal stem cells and their differentiation to adipocytes and osteoblasts. *Mol Biol Rep*. 2011;38(8):5161-5168. doi:10.1007/s11033-010-0665-2

38. Jiang B, Yan L, Wang X, et al. Concise Review: Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Pluripotent Cells, an Unlimited and Quality-Controllable Source for Therapeutic Applications. *Stem Cells*. 2019;37(5):572-581. doi:10.1002/stem.2964

39. Kang R, Zhou Y, Tan S, et al. Mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells retain adequate osteogenicity and chondrogenicity but less adipogenicity. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):144. doi:10.1186/s13287-015-0137-7

40. Trivedi P, Hematti P. Derivation and immunological characterization of mesenchymal stromal cells from human embryonic stem cells. *Exp Hematol*. 2008;36(3):350-359. doi:10.1016/j.exphem.2007.10.007

41. Volarevic V, Markovic BS, Gazdic M, et al. Ethical and Safety Issues of Stem Cell-Based Therapy. *Int J Med Sci*. 2018;15(1):36-45. doi:10.7150/ijms.21666

42. Chen W, Lv L, Chen N, Cui E. Immunogenicity of mesenchymal stromal/stem cells. *Scand J Immunol*. 2023;97(6):e13267. doi:10.1111/sji.13267

43. Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*. 2003;75(3):389-397. doi:10.1097/01.TP.0000045055.63901.A9

44. Trivedi P, Hematti P. Derivation and immunological characterization of mesenchymal stromal cells from human embryonic stem cells. *Exp Hematol*. 2008;36(3):350-359. doi:10.1016/j.exphem.2007.10.007

45. Liu Z, Fan H, Jiang S. $CD4^+$ T-cell subsets in transplantation. *Immunol Rev*. 2013;252(1):183-191. doi:10.1111/imr.12038

46. Abu-El-Rub E, Sequiera GL, Sareen N, et al. Hypoxia-induced 26S proteasome dysfunction increases immunogenicity of mesenchymal stem cells. *Cell Death Dis*. 2019;10(2):90. doi:10.1038/s41419-019-1359-x

47. Golpanian S, DiFede DL, Khan A, et al. Allogeneic Human Mesenchymal Stem Cell Infusions for Aging Frailty. *J Gerontol Ser A*. 2017;72(11):1505-1512. doi:10.1093/gerona/glx056

48. Sanabria-de La Torre R, Quiñones-Vico MI, Fernández-González A, et al. Alloreactive Immune Response Associated to Human Mesenchymal Stromal Cells Treatment: A Systematic Review. *J Clin Med*. 2021;10(13):2991. doi:10.3390/jcm10132991

49. Lanzoni G, Linetsky E, Correa D, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells for COVID-19 acute respiratory distress syndrome: A double-blind, phase 1/2a, randomized controlled trial. *Stem Cells Transl Med*. 2021;10(5):660-673. doi:10.1002/sctm.20-0472

50. Munir H, McGettrick HM. Mesenchymal Stem Cell Therapy for Autoimmune Disease: Risks and Rewards. *Stem Cells Dev*. 2015;24(18):2091-2100. doi:10.1089/scd.2015.0008

51. Brody M, Agronin M, Herskowitz BJ, et al. Results and insights from a phase I clinical trial of Lomecel-B for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2023;19(1):261-273. doi:10.1002/alz.12651

52. Li N, Hua J. Interactions between mesenchymal stem cells and the immune system. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(13):2345-2360. doi:10.1007/s00018-017-2473-5

53. Németh K, Leelahavanichkul A, Yuen PST, et al. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2–dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*. 2009;15(1):42-49. doi:10.1038/nm.1905

54. Lopez-Santalla M, Mancheño-Corvo P, Menta R, et al. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Modulate Experimental Autoimmune Arthritis by Modifying Early Adaptive T Cell Responses. *Stem Cells*. 2015;33(12):3493-3503. doi:10.1002/stem.2113

55. Li W, Ren G, Huang Y, et al. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death Differ*. 2012;19(9):1505-1513. doi:10.1038/cdd.2012.26

56. Li M, Luo X, Lv X, et al. In vivo human adipose-derived mesenchymal stem cell tracking after intra-articular delivery in a rat osteoarthritis model. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):160. doi:10.1186/s13287-016-0420-2

57. Granero-Moltó F, Weis JA, Miga MI, et al. Regenerative Effects of Transplanted Mesenchymal Stem Cells in Fracture Healing. *Stem Cells*. 2009;27(8):1887-1898. doi:10.1002/stem.103

58. Kimura K, Kishida T, Wakao J, et al. Tumor-homing effect of human mesenchymal stem cells in a TH-MYCN mouse model of neuroblastoma. *J Pediatr Surg*. 2016;51(12):2068-2073. doi:10.1016/j.jpedsurg.2016.09.041

59. Schol J, Sakai D, Warita T, et al. Homing of vertebral-delivered mesenchymal stromal cells for degenerative intervertebral discs repair – an in vivo proof-of-concept study. *JOR SPINE*. 2023;6(1):e1228. doi:10.1002/jsp2.1228

60. Ullah M, Liu DD, Thakor AS. Mesenchymal Stromal Cell Homing: Mechanisms and Strategies for Improvement. *iScience*. 2019;15:421-438. doi:10.1016/j.isci.2019.05.004

61. Liu Q, Zhang X, Zhu T, Xu Z, Dong Y, Chen B. Mitochondrial transfer from mesenchymal stem cells: Mechanisms and functions. *Mitochondrion*. 2024;79:101950. doi:10.1016/j.mito.2024.101950

62. Velarde F, Ezquerra S, Delbruyere X, Caicedo A, Hidalgo Y, Khoury M. Mesenchymal stem cell-mediated transfer of mitochondria: mechanisms and functional impact. *Cell Mol Life Sci*. 2022;79(3):177. doi:10.1007/s00018-022-04207-3

63. Islam MN, Das SR, Emin MT, et al. Mitochondrial transfer from bone-marrow–derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat Med*. 2012;18(5):759-765. doi:10.1038/nm.2736

64. Wang J, Meng S, Chen Y, et al. MSC-mediated mitochondrial transfer promotes metabolic reprograming in endothelial cells and vascular regeneration in ARDS. *Redox Rep*. 2025;30(1):2474897. doi:10.1080/13510002.2025.2474897

65. Mori D, Miyagawa S, Kawamura T, et al. Mitochondrial Transfer Induced by Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cell Transplantation Improves Cardiac Function in Rat Models of Ischemic Cardiomyopathy. *Cell Transplant*. 2023;32. doi:10.1177/09636897221148457

66. Wei B, Ji M, Lin Y, et al. Mitochondrial transfer from bone mesenchymal stem cells protects against tendinopathy both in vitro and in vivo. *Stem Cell Res Ther*. 2023;14(1):104. doi:10.1186/s13287-023-03329-0

67. Li H, Wang C, He T, et al. Mitochondrial Transfer from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Motor Neurons in Spinal Cord Injury Rats via Gap Junction. *Theranostics*. 2019;9(7):2017-2035. doi:10.7150/thno.29400

68. Mitroulis I, Kalafati L, Bornhäuser M, Hajishengallis G, Chavakis T. Regulation of the Bone Marrow Niche by Inflammation. *Front Immunol*. 2020;11:1540. doi:10.3389/fimmu.2020.01540

69. Dalton S. Linking the Cell Cycle to Cell Fate Decisions. *Trends Cell Biol*. 2015;25(10):592-600. doi:10.1016/j.tcb.2015.07.007

70. Viti F, Landini M, Mezzelani A, Petecchia L, Milanesi L, Scaglione S. Osteogenic Differentiation of MSC through Calcium Signaling Activation: Transcriptomics and Functional Analysis. Gronthos S, ed. *PLOS ONE*. 2016;11(2):e0148173. doi:10.1371/journal.pone.0148173

71. Wang Y, Chen CS. Cell adhesion and mechanical stimulation in the regulation of mesenchymal stem cell differentiation. *J Cell Mol Med*. 2013;17(7):823-832. doi:10.1111/jcmm.12061

72. Xu L, Liu Y, Sun Y, et al. Tissue source determines the differentiation potentials of mesenchymal stem cells: a comparative study of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):275. doi:10.1186/s13287-017-0716-x

73. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: *in vitro* cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Prolif*. 1987;20(3):263-272. doi:10.1111/j.1365-2184.1987.tb01309.x

74. Kuznetsov SA, Krebsbach PH, Satomura K, et al. Single-Colony Derived Strains of Human Marrow Stromal Fibroblasts Form Bone After Transplantation In Vivo. *J Bone Miner Res*. 1997;12(9):1335-1347. doi:10.1359/jbmr.1997.12.9.1335

75. Park M, Kim YH, Woo SY, et al. Tonsil-derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate CCl4–induced Liver Fibrosis in Mice via Autophagy Activation. *Sci Rep*. 2015;5(1):8616. doi:10.1038/srep08616

76. Ye J, Su X, Stoltz J -F., De Isla N, Zhang L. Signalling pathways involved in the process of mesenchymal stem cells differentiating into hepatocytes. *Cell Prolif*. 2015;48(2):157-165. doi:10.1111/cpr.12165

77. Almalki SG, Agrawal DK. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation*. 2016;92(1-2):41-51. doi:10.1016/j.diff.2016.02.005

78. Singaravelu K, Padanilam BJ. In Vitro Differentiation of MSC into Cells with a Renal Tubular Epithelial-Like Phenotype. *Ren Fail*. 2009;31(6):492-502. doi:10.1080/08860220902928981

79. Pacary E, Legros H, Valable S, et al. Synergistic effects of CoCl2 and ROCK inhibition on mesenchymal stem cell differentiation into neuron-like cells. *J Cell Sci*. 2006;119(13):2667-2678. doi:10.1242/jcs.03004

80. Diao Y, Ma Q, Cui F, Zhong Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: Osteogenesis *in vivo* as seed cells for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2009;91A(1):123-131. doi:10.1002/jbm.a.32186

81. Cellule souche. Studysmarter. https://www.studysmarter.fr/resumes/biologie/svt/cellule-souche/

82. Vanden Berg-Foels WS. *In Situ* Tissue Regeneration: Chemoattractants for Endogenous Stem Cell Recruitment. *Tissue Eng Part B Rev*. 2014;20(1):28-39. doi:10.1089/ten.teb.2013.0100

83. Harrell CR, Djonov V, Volarevic V. The Cross-Talk between Mesenchymal Stem Cells and Immune Cells in Tissue Repair and Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2021;22(5):2472. doi:10.3390/ijms22052472

84. Tao H, Han Z, Han ZC, Li Z. Proangiogenic Features of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Applications. Gaetani R, ed. *Stem Cells Int*. 2016;2016(1):1314709. doi:10.1155/2016/1314709

85. Rehman J, Traktuev D, Li J, et al. Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells. *Circulation*. 2004;109(10):1292-1298. doi:10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1

86. Ogata K, Katagiri W, Hibi H. Secretomes from mesenchymal stem cells participate in the regulation of osteoclastogenesis in vitro. *Clin Oral Investig*. 2017;21(6):1979-1988. doi:10.1007/s00784-016-1986-x

87. Watt SM, Gullo F, Van Der Garde M, et al. The angiogenic properties of mesenchymal stem/stromal cells and their therapeutic potential. *Br Med Bull*. 2013;108(1):25-53. doi:10.1093/bmb/ldt031

88. Bian D, Wu Y, Song G, Azizi R, Zamani A. The application of mesenchymal stromal cells (MSCs) and their derivative exosome in skin wound healing: a comprehensive review. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):24. doi:10.1186/s13287-021-02697-9

89. Zhao K, Kong C, Shi N, Jiang J, Li P. Potential angiogenic, immunomodulatory, and antifibrotic effects of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in systemic sclerosis. *Front Immunol*. 2023;14:1125257. doi:10.3389/fimmu.2023.1125257

90. Usunier B, Benderitter M, Tamarat R, Chapel A. Management of Fibrosis: The Mesenchymal Stromal Cells Breakthrough. *Stem Cells Int*. 2014;2014:1-26. doi:10.1155/2014/340257

91. Essai clinique NCT04476901 - Administration of Allogeneic-MSC in Patients with Non-Ischemic Dilated Cardiomyopathy (DCMII). ClinicalTrial.gov. https://clinicaltrials.gov/study/NCT04476901?intr=mesenchymal%20stem%20cell&aggFilters=status:not%20rec&cond=cardiovascular&page=1&rank=9

92. Essai clinique NCT04434768 - Evaluate the Safety and Explore Efficacy of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Acute Ischemic Stroke. ClinicalTrial.gov. https://clinicaltrials.gov/study/NCT04434768?intr=mesenchymal%20stem%20cell&aggFilters=status:not%20rec&cond=cardiovascular&page=3&rank=26

93. Essai clinique NCT06129175 - UCMSCs as Treatment for Patients With Acute Ischemic Stroke (Stroke Neuroncell-EX). ClinicalTrial.gov. https://clinicaltrials.gov/study/NCT06129175?intr=mesenchymal%20stem%20cell&aggFilters=status:not%20rec&cond=cardiovascular&page=2&rank=19

94. Essai clinique NCT05468502 - Phase I/IIa Clinical Trial of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Injection in the Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF). ClinicalTrial.gov. https://clinicaltrials.gov/study/NCT05468502?intr=mesenchymal%20stem%20cell&aggFilters=status:not%20rec&cond=Pulmonary&page=1&rank=4

95. Essai clinique NCT06230822 - Safety, Tolerability and Efficacy of VUM02 Injection in Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) (DEVIF-I). ClinicalTrial.gov. https://clinicaltrials.gov/study/NCT06230822?intr=mesenchymal%20stem%20cell&aggFilters=status:not%20rec&cond=Pulmonary&page=2&rank=14

96. Essai clinique NCT06492798 - Effectiveness and Safety of Mesenchymal Stem Cell Therapy in Long COVID Patients. ClinicalTrial.gov. https://clinicaltrials.gov/study/NCT06492798?intr=mesenchymal%20stem%20cell&aggFilters=status:not%20rec&cond=Pulmonary&rank=10

97. Essai clinique NCT03673748 - Treatment of Lupus Nephritis With Allogeneic Mesenchymal Stem Cells (MSV_LE). ClinicalTrial.gov. https://clinicaltrials.gov/study/NCT03673748?intr=mesenchymal%20stem%20cell&aggFilters=status:not%20rec&cond=autoimmune&rank=2

98. Essai clinique NCT06058078 - RY_SW01 Cell Injection Therapy in Active Lupus Nephritis. ClinicalTrial.gov. https://clinicaltrials.gov/study/NCT06058078?intr=mesenchymal%20stem%20cell&aggFilters=status:not%20rec&cond=autoimmune&rank=10

99. Essai clinique NCT06407297 - UCMSCs Combined With Standard Therapy for the Treatment of Newly Diagnosed Type 1 Diabetes. ClinicalTrial.gov. https://clinicaltrials.gov/study/NCT06407297?intr=mesenchymal%20stem%20cell&aggFilters=status:not%20rec&cond=autoimmune&page=2&rank=20

100. Essai clinique NCT05094011 - Evaluating Safety, Tolerability, and Efficacy of Autologous MitoCell Transplantation in Subjects With Idiopathic Parkinson's Disease. ClinicalTrial.gov. https://clinicaltrials.gov/study/NCT05094011?intr=mesenchymal%20stem%20cell&aggFilters=status:not%20rec&cond=Parkinson&rank=2

101. Essai clinique NCT06910384 - A Study of STRO4 in Patients Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). ClinicalTrial.gov. https://clinicaltrials.gov/study/NCT06910384?intr=mesenchymal%20stem%20cell&aggFilters=status:not%20rec&cond=neurodegenerative&page=2&rank=15

102. Alofisel. Takeda.com. https://www.takeda.com/newsroom/newsreleases/2021/takeda-receives-approval-to-manufacture-and-market-alofisel-darvadstrocel-in-japan-for-treatment-of-complex-perianal-fistulas-in-patients-with-non-active-or-mildly-active-luminal-crohns-disease/

103. Medipost. Ministry of Food and Drug Safety.kr. https://www.mfds.go.kr/eng/brd/m_30/view.do?seq=69798&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=1

104. Pharmcell. Ministry of Food and Drug Safety.kr. https://www.mfds.go.kr/eng/brd/m_30/view.do?seq=70957&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=1

105. Anterogen. Ministry of Food and Drug Safety.kr. https://www.mfds.go.kr/eng/brd/m_30/view.do?seq=71337&srchFr=&srchTo=&srchWord=&srchTp=&itm_seq_1=0&itm_seq_2=0&multi_itm_seq=0&company_cd=&company_nm=&page=1

106. Corestem. Ministry of Food and Drug Safety.kr. https://www.mfds.go.kr/eng/brd/m_30/view.do?seq=70956

107. Levin J. Osiris Receives Second Approval for Life-Saving Stem Cell Drug; Prochymal Granted Marketing Consent by New Zealand. Fiercebiotech.com. June 14, 2012. https://www.fiercebiotech.com/biotech/osiris-receives-second-approval-for-life-saving-stem-cell-drug-prochymal-granted-marketing

108. Ryoncil. Ryoncil.com. https://www.ryoncil.com

109. Muttigi M. Stemirac : une thérapie prometteuse à base de cellules souches pour les lésions de la moelle épinière. Mindfulcells.com. September 19, 2023. https://mindfulcells.com/stemirac-a-promising-stem-cell-therapy-for-spinal-cord-injury/#h-stemirac-pmda-approval

110. Stempeucel. Stempeutics.com. https://www.stempeutics.com/stempeucel

111. Temcell HS inj. JCRPharm.com. https://www.jcrpharm.co.jp/en/site/en/biopharmaceutical/global.html

112. Yan W, Xia Y, Zhao H, Xu X, Ma X, Tao L. Stem cell-based therapy in cardiac repair after myocardial infarction: Promise, challenges, and future directions. *J Mol Cell Cardiol*. 2024;188:1-14. doi:10.1016/j.yjmcc.2023.12.009

113. Preda MB, Neculachi CA, Fenyo IM, et al. Short lifespan of syngeneic transplanted MSC is a consequence of in vivo apoptosis and immune cell recruitment in mice. *Cell Death Dis*. 2021;12(6):566. doi:10.1038/s41419-021-03839-w

114. Fu Z, Zhang Y, Geng X, et al. Optimization strategies of mesenchymal stem cell-based therapy for acute kidney injury. *Stem Cell Res Ther*. 2023;14(1):116. doi:10.1186/s13287-023-03351-2

115. Eggenhofer E, Benseler V, Kroemer A, et al. Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. *Front Immunol*. 2012;3:297. doi:10.3389/fimmu.2012.00297

116. Wang L, Fan H, Zhang ZY, et al. Osteogenesis and angiogenesis of tissue-engineered bone constructed by prevascularized β-tricalcium phosphate scaffold and mesenchymal stem cells. *Biomaterials*. 2010;31(36):9452-9461. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.08.036

117. Gao S, Ding J, Xiao HJ, et al. Anti-inflammatory and Anti-apoptotic Effect of Combined Treatment with Methylprednisolone and Amniotic Membrane Mesenchymal Stem Cells After Spinal Cord Injury in Rats. *Neurochem Res*. 2014;39(8):1544-1552. doi:10.1007/s11064-014-1344-9

118. Becquart P, Cambon-Binder A, Monfoulet LE, et al. Ischemia Is the Prime but Not the Only Cause of Human Multipotent Stromal Cell Death in Tissue-Engineered Constructs *In Vivo*. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(19-20):2084-2094. doi:10.1089/ten.tea.2011.0690

119. Place TL, Domann FE, Case AJ. Limitations of oxygen delivery to cells in culture: An underappreciated problem in basic and translational research. *Free Radic Biol Med*. 2017;113:311-322. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.10.003

120. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. 2000;407(6801):249-257. doi:10.1038/35025220

121. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol*. 2000;88(4):1474-1480. doi:10.1152/jappl.2000.88.4.1474

122. Yang Y, Lee EH, Yang Z. Hypoxia-Conditioned Mesenchymal Stem Cells in Tissue Regeneration Application. *Tissue Eng Part B Rev*. 2022;28(5):966-977. doi:10.1089/ten.teb.2021.0145

123. Moya A, Paquet J, Deschepper M, et al. Human Mesenchymal Stem Cell Failure to Adapt to Glucose Shortage and Rapidly Use Intracellular Energy Reserves Through Glycolysis Explains Poor Cell Survival After Implantation. *Stem Cells*. 2018;36(3):363-376. doi:10.1002/stem.2763

124. Deschepper M, Oudina K, David B, et al. Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long-term, severe and continuous hypoxia. *J Cell Mol Med*. 2011;15(7):1505-1514. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01138.x

125. Deschepper M, Manassero M, Oudina K, et al. Proangiogenic and Prosurvival Functions of Glucose in Human Mesenchymal Stem Cells upon Transplantation. *Stem Cells*. 2013;31:526-535.

126. Huang C, Chang C, Yang P, Chiu H, Chen S, Hsu L. Injectable Glucose-Releasing Microgels Enhance the Survival and Therapeutic Potential of Transplanted MSCs Under Ischemic Conditions. *Adv Healthc Mater*. Published online September 26, 2024:2401724. doi:10.1002/adhm.202401724

127. Liu Y, Ma T. Metabolic regulation of mesenchymal stem cell in expansion and therapeutic application. *Biotechnol Prog*. 2015;31(2):468-481. doi:10.1002/btpr.2034

128. Zhang Y, Marsboom G, Toth PT, Rehman J. Mitochondrial Respiration Regulates Adipogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. Kerkis I, ed. *PLoS ONE*. 2013;8(10):e77077. doi:10.1371/journal.pone.0077077

129. Hsu SH, Chen CT, Wei YH. Inhibitory Effects of Hypoxia on Metabolic Switch and Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2013;31(12):2779-2788. doi:10.1002/stem.1441

130. Pattappa G, Heywood HK, De Bruijn JD, Lee DA. The metabolism of human mesenchymal stem cells during proliferation and differentiation. *J Cell Physiol*. 2011;226(10):2562-2570. doi:10.1002/jcp.22605

131. Paquet J, Deschepper M, Moya A, Logeart-Avramoglou D, Boisson-Vidal C, Petite H. Oxygen Tension Regulates Human Mesenchymal Stem Cell Paracrine Functions. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4(7):809-821. doi:10.5966/sctm.2014-0180

132. Ejtehadifar M, Shamsasenjan K, Movassaghpour A, et al. The Effect of Hypoxia on Mesenchymal Stem Cell Biology. *Adv Pharm Bull*. 2015;5(2):141-149. doi:10.15171/apb.2015.021

133. Kwon SY, Chun SY, Ha YS, et al. Hypoxia Enhances Cell Properties of Human Mesenchymal Stem Cells. *Tissue Eng Regen Med*. 2017;14(5):595-604. doi:10.1007/s13770-017-0068-8

134. Jagannathan L, Cuddapah S, Costa M. Oxidative Stress Under Ambient and Physiological Oxygen Tension in Tissue Culture. *Curr Pharmacol Rep*. 2016;2(2):64-72. doi:10.1007/s40495-016-0050-5

135. Carreau A, Hafny-Rahbi BE, Matejuk A, Grillon C, Kieda C. Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med*. 2011;15(6):1239-1253. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01258.x

136. Nascimento-Filho CHV, Glinos AT, Jang Y, Goloni-Bertollo EM, Castilho RM, Squarize CH. From Tissue Physoxia to Cancer Hypoxia, Cost-Effective Methods to Study Tissue-Specific O2 Levels in Cellular Biology. *Int J Mol Sci*. 2022;23(10):5633. doi:10.3390/ijms23105633

137. Zhang J. Oxygen Tension Variation in Ischemic Gastrocnemius Muscle, Marrow, and different Hypoxic Conditions In Vitro. *Med Sci Monit*. 2014;20:2171-2176. doi:10.12659/MSM.892354

138. Obradovic H, Krstic J, Trivanovic D, et al. Improving stemness and functional features of mesenchymal stem cells from Wharton's jelly of a human umbilical cord by mimicking the native, low oxygen stem cell niche. *Placenta*. 2019;82:25-34. doi:10.1016/j.placenta.2019.05.005

139. Lempesis IG, Hoebers N, Essers Y, et al. Physiological Oxygen Levels Differentially Regulate Adipokine Production in Abdominal and Femoral Adipocytes from Individuals with Obesity Versus Normal Weight. *Cells*. 2022;11(22):3532. doi:10.3390/cells11223532

140. Nuschke A, Rodrigues M, Wells AW, Sylakowski K, Wells A. Mesenchymal stem cells/multipotent stromal cells (MSCs) are glycolytic and thus glucose is a limiting factor of in vitro models of MSC starvation. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7(1):179. doi:10.1186/s13287-016-0436-7

141. Mylotte LA, Duffy AM, Murphy M, et al. Metabolic Flexibility Permits Mesenchymal Stem Cell Survival in an Ischemic Environment. *Stem Cells*. 2008;26(5):1325-1336. doi:10.1634/stemcells.2007-1072

142. Lu B, Zhao Q, Cai Z, et al. Regulation of Glucose Metabolism for Cell Energy Supply In Situ via High-Energy Intermediate Fructose Hydrogels. *Small*. 2024;20(19):1-15. doi:10.1002/smll.202309060

143. Denoeud C, Luo G, Paquet J, et al. Enzyme-controlled, nutritive hydrogel for mesenchymal stromal cell survival and paracrine functions. *Commun Biol*. 2023;6(1). doi:10.1038/s42003-023-05643-y

144. TeSlaa T, Ralser M, Fan J, Rabinowitz JD. The pentose phosphate pathway in health and disease. *Nat Metab*. 2023;5(8):1275-1289. doi:10.1038/s42255-023-00863-2

145. He M, Zhou X, Wang X. Glycosylation: mechanisms, biological functions and clinical implications. *Signal Transduct Target Ther*. 2024;9(1):194. doi:10.1038/s41392-024-01886-1

146. Li R, Kato H, Fumimoto C, et al. Essential Amino Acid Starvation-Induced Oxidative Stress Causes DNA Damage and Apoptosis in Murine Osteoblast-like Cells. *Int J Mol Sci*. 2023;24(20):15314. doi:10.3390/ijms242015314

147. Li R, Kato H, Nakata T, et al. Essential amino acid starvation induces cell cycle arrest, autophagy, and inhibits osteogenic differentiation in murine osteoblast. *Biochem Biophys Res Commun*. 2023;672:168-176. doi:10.1016/j.bbrc.2023.06.055

148. 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*. 2011;2011:1-12. doi:10.4061/2011/429187

149. Zhang S, Peng X, Yang S, et al. The regulation, function, and role of lipophagy, a form of selective autophagy, in metabolic disorders. *Cell Death Dis*. 2022;13(2):132. doi:10.1038/s41419-022-04593-3

150. Feng Y, Chen Y, Wu X, et al. Interplay of energy metabolism and autophagy. *Autophagy*. 2024;20(1):4-14. doi:10.1080/15548627.2023.2247300

151. Liu S, Yao S, Yang H, Liu S, Wang Y. Autophagy: Regulator of cell death. *Cell Death Dis*. 2023;14(10):648. doi:10.1038/s41419-023-06154-8

152. Ben. ATP et filières énergétiques au service de la performance musculaire. dravelnutrition. https://www.dravelnutrition.fr/img/cms/BLOG/aerobie-atp.jpg

153. Wosinski P. *Développement d'un hydrogel capable d'augmenter la survie et la fonctionnalité des cellules stromales mésenchymateuses transplantées*. PhD thesis. Université Paris Cité - B3OA laboratory; 2024. https://theses.fr/2024UNIP5243

154. M. Tóth O, Menyhárt Á, Frank R, Hantosi D, Farkas E, Bari F. Tissue Acidosis Associated with Ischemic Stroke to Guide Neuroprotective Drug Delivery. *Biology*. 2020;9(12):460. doi:10.3390/biology9120460

155. Lindquist BE. Spreading depolarizations pose critical energy challenges in acute brain injury. *J Neurochem*. 2024;168(5):868-887. doi:10.1111/jnc.15966

156. Hagberg H. Intracellular pH during ischemia in skeletal muscle: relationship to membrane potential, extracellular pH, tissue lactic acid and ATP. *Pfl□gers Arch Eur J Physiol*. 1985;404(4):342-347. doi:10.1007/BF00585346

157. Nedergaard M, Kraig RP, Tanabe J, Pulsinelli WA. Dynamics of interstitial and intracellular pH in evolving brain infarct. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol*. 1991;260(3):R581-R588. doi:10.1152/ajpregu.1991.260.3.R581

158. Han B, Wang H chao, Li H, et al. Nucleus Pulposus Mesenchymal Stem Cells in Acidic Conditions Mimicking Degenerative Intervertebral Discs Give Better Performance than Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cells Tissues Organs*. 2014;199(5-6):342-352. doi:10.1159/000369452

159. Li H, Liang C, Tao Y, et al. Acidic pH conditions mimicking degenerative intervertebral discs impair the survival and biological behavior of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med*. 2012;237(7):845-852. doi:10.1258/ebm.2012.012009

160. Hazehara-Kunitomo Y, Hara ES, Ono M, et al. Acidic Pre-Conditioning Enhances the Stem Cell Phenotype of Human Bone Marrow Stem/Progenitor Cells. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5):1097. doi:10.3390/ijms20051097

161. Hu X, Yu SP, Fraser JL, et al. Transplantation of hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells improves infarcted heart function via enhanced survival of implanted cells and angiogenesis. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2008;135(4):799-808. doi:10.1016/j.jtcvs.2007.07.071

162. Won Kim H, Haider HK, Jiang S, Ashraf M. Ischemic Preconditioning Augments Survival of Stem Cells via miR-210 Expression by Targeting Caspase-8-associated Protein 2. *J Biol Chem*. 2009;284(48):33161-33168. doi:10.1074/jbc.M109.020925

163. Jiang B, Xiao W, Shi Y, Liu M, Xiao X. Heat shock pretreatment inhibited the release of Smac/DIABLO from mitochondria and apoptosis induced by hydrogen peroxide in cardiomyocytes and C2C12 myogenic cells. *Cell Stress Chaperones*. 2005;10(3):252. doi:10.1379/CSC-124R.1

164. Kondo-Nakamura M, Shintani-Ishida K, Uemura K, Yoshida K ichi. Brief exposure to carbon monoxide preconditions cardiomyogenic cells against apoptosis in ischemia–reperfusion. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;393(3):449-454. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.017

165. Du WJ, Li JK, Wang QY, Hou JB, Yu B. Lithium Chloride Preconditioning Optimizes Skeletal Myoblast Functions for Cellular Cardiomyoplasty in vitro via Glycogen Synthase Kinase-3β/β-Catenin Signaling. *Cells Tissues Organs*. 2009;190(1):11-19. doi:10.1159/000167699

166. Jiang E yan, Wang K, Zhang Q zhou, et al. H_2O_2 preconditioning enhances the transplantation-mediated therapeutic effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after traumatic brain injury. *Int Immunopharmacol*. 2025;161:115018. doi:10.1016/j.intimp.2025.115018

167. Kim SH, Moon HH, Kim HA, Hwang KC, Lee M, Choi D. Hypoxia-inducible Vascular Endothelial Growth Factor-engineered Mesenchymal Stem Cells Prevent Myocardial Ischemic Injury. *Mol Ther*. 2011;19(4):741-750. doi:10.1038/mt.2010.301

168. Li W, Ma N, Ong LL, et al. Bcl-2 Engineered MSCs Inhibited Apoptosis and Improved Heart Function. *Stem Cells*. 2007;25(8):2118-2127. doi:10.1634/stemcells.2006-0771

169. Milojevic S, Newton JM, Cummings JH, et al. Amylose as a coating for drug delivery to the colon: Preparation and in vitro evaluation using glucose pellets. *J Controlled Release*. 1996;38(1):85-94. doi:10.1016/0168-3659(95)00113-1

170. Franc A, Muselík J, Sabadková D, Neumann D. Preparation of pellets with controlled release of glucose as prevention of hypoglycaemia in paediatric patients. *Eur J Pharm Sci*. 2015;75:72-80. doi:10.1016/j.ejps.2015.03.007

171. Sabadková D, Franc A, Muselík J, Neumann D. Coated pellets with delayed-release glucose for prevention of hypoglycemic episodes. *Acta Pharm*. 2016;66(2):257-267. doi:10.1515/acph-2016-0017

172. Lin CC, Metters AT. Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006;58(12-13):1379-1408. doi:10.1016/j.addr.2006.09.004

173. Kanyuck KM, Mills TB, Norton IT, Norton-Welch AB. Release of glucose and maltodextrin DE 2 from gellan gum gels and the impacts of gel structure. *Food Hydrocoll*. 2022;122(July 2021):107090. doi:10.1016/j.foodhyd.2021.107090

174. Kanyuck KM, Mills TB, Norton IT, Norton-Welch AB. Swelling of high acyl gellan gum hydrogel: Characterization of network strengthening and slower release. *Carbohydr Polym*. 2021;259:117758. doi:10.1016/j.carbpol.2021.117758

175. Gonzalez-Fernandez P, Simula L, Jenni S, Jordan O, Allémann E. Hyaluronan-based hydrogel delivering glucose to mesenchymal stem cells intended to treat osteoarthritis. *Int J Pharm*. 2024;657(March):0-6. doi:10.1016/j.ijpharm.2024.124139

176. Smith BT, Santoro M, Grosfeld EC, et al. Incorporation of fast dissolving glucose porogens into an injectable calcium phosphate cement for bone tissue engineering. *Acta Biomater*. 2017;50:68-77. doi:10.1016/j.actbio.2016.12.024

177. Hakami A, Rizzo SA, Bartley OJM, et al. Graft ischemia post cell transplantation to the brain: Glucose deprivation as the primary driver of rapid cell death. *Neurotherapeutics*. 2025;22(2):e00518. doi:10.1016/j.neurot.2024.e00518

178. Dressler D, Berweck S, Chatzikalfas A, et al. Intrathecal Baclofen therapy in Germany: Proceedings of the IAB—Interdisciplinary Working Group for Movement Disorders Consensus Meeting. *J Neural Transm*. 2015;122(11):1573-1579. doi:10.1007/s00702-015-1425-1

179. Sukul VV. Intrathecal Pain Therapy for the Management of Chronic Noncancer Pain. *Neurosurg Clin N Am*. 2019;30(2):195-201. doi:10.1016/j.nec.2018.12.010

180. Payne M, Pooke F, Wilkinson TM, et al. Single-arm, first-in-human feasibility study results for an ultra-low-cost insulin pump.

181. Lu B, Zhao Q, Cai Z, et al. Regulation of Glucose Metabolism for Cell Energy Supply In Situ via High-Energy Intermediate Fructose Hydrogels. *Small*. 2024;20(19):1-15. doi:10.1002/smll.202309060

182. Sun Y, Zhao X, Zhang Q, Yang R, Liu W. An immunoregulatory and metabolism-improving injectable hydrogel for cardiac repair after myocardial infarction. *Regen Biomater*. 2025;12. doi:10.1093/rb/rbae131

183. Ehringer WD, Chiang B, Chien S. The uptake and metabolism of fructose-1,6- diphosphate in rat cardiomyocytes.

184. Wheeler TJ, Chien S. Characterization of the high-affinity uptake of fructose-1,6-bisphosphate by cardiac myocytes. *Mol Cell Biochem*. 2012;366(1-2):31-39. doi:10.1007/s11010-012-1279-x

185. Zhang S, Sun J, Feng D, et al. Unlocking the potentials of cyanobacterial photosynthesis for directly converting carbon dioxide into glucose. *Nat Commun*. 2023;14(1). doi:10.1038/s41467-023-39222-w

186. Niederholtmeyer H, Wolfstädter BT, Savage DF, Silver PA, Way JC. Engineering Cyanobacteria To Synthesize and Export Hydrophilic Products. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(11):3462-3466. doi:10.1128/aem.00202-10

187. Wang X, Luo H, Wang Y, et al. Direct conversion of carbon dioxide to glucose using metabolically engineered Cupriavidus necator. *Bioresour Technol*. 2022;362:127806. doi:10.1016/j.biortech.2022.127806

188. Chen H, Cheng Y, Tian J, et al. Dissolved oxygen from microalgae-gel patch promotes chronic wound healing in diabetes. *Sci Adv*. 2020;6(20). doi:10.1126/sciadv.aba4311

189. Liu Y, Zhong D, He Y, et al. Photoresponsive Hydrogel-Coated Upconversion Cyanobacteria Nanocapsules for Myocardial Infarction Prevention and Treatment. *Adv Sci*. 2022;9(30). doi:10.1002/advs.202202920

190. Williams KM, Wang H, Paulsen MJ, et al. Safety of photosynthetic *Synechococcus elongatus* for *in vivo* cyanobacteria–mammalian symbiotic therapeutics. *Microb Biotechnol*. 2020;13(6):1780-1792. doi:10.1111/1751-7915.13596

191. Lu H, Yuan W, Zhou J, Chong PLG. Glucose Synthesis in a Protein-Based Artificial Photosynthesis System. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015;177(1):105-117. doi:10.1007/s12010-015-1731-y

192. Cohen JE, Goldstone AB, Paulsen MJ, et al. An innovative biologic system for photon-powered myocardium in the ischemic heart. *Sci Adv*. 2017;3(6). doi:10.1126/sciadv.1603078

193. Stapleton LM, Farry JM, Zhu Y, et al. Microfluidic encapsulation of photosynthetic cyanobacteria in hydrogel microparticles augments oxygen delivery to rescue ischemic myocardium. *J Biosci Bioeng*. 2023;135(6):493-499. doi:10.1016/j.jbiosc.2023.03.001

194. Xiao Y, He Y, Zhong D, et al. Effect of Engineered Cyanobacterial Capsules on a Neurogenic Bladder after Spinal Cord Injury. *ACS Nano*. 2025;19(12):11841-11860. doi:10.1021/acsnano.4c14140

195. Xu Y, Rahman M, Wang Z, et al. Glycogen Engineering Improves the Starvation Resistance of Mesenchymal stem cells and their Therapeutic Efficacy in Pulmonary Fibrosis. *Cold Spring Harbor Laboratory*. Preprint posted online February 27, 2025. doi:10.1101/2025.02.21.639504

196. Zargarzadeh M, Silva AS, Nunes C, Coimbra MA, Custódio CA, Mano JF. Self-glucose feeding hydrogels by enzyme empowered degradation for 3D cell culture. *Mater Horiz*. 2022;9(2):694-707. doi:10.1039/d0mh01982h

197. Humbert P, Vemmer M, Giampà M, Bednarz H, Niehaus K, Patel AV. Co-encapsulation of amyloglucosidase with starch and Saccharomyces cerevisiae as basis for a long-lasting CO2 release. *World J Microbiol Biotechnol*. 2017;33(4):71. doi:10.1007/s11274-017-2237-2

198. Panula-Perälä J, Šiurkus J, Vasala A, Wilmanowski R, Casteleijn MG, Neubauer P. Enzyme controlled glucose auto-delivery for high cell density cultivations in microplates and shake flasks. *Microb Cell Factories*. 2008;7:1-12. doi:10.1186/1475-2859-7-31

199. Lourdin D. L'amidon et les matériaux, où en est-on ? *L'Actualité Chim*. 2016;411:43-42.

200. Amaraweera SM, Gunathilake C, Gunawardene OHP, et al. Development of Starch-Based Materials Using Current Modification Techniques and Their Applications: A Review. *Molecules*. 2021;26(22):6880. doi:10.3390/molecules26226880

201. Li S, Dan X, Chen H, et al. Developing fibrin-based biomaterials/scaffolds in tissue engineering. *Bioact Mater*. 2024;40:597-623. doi:10.1016/j.bioactmat.2024.08.006

202. Hu L, Zhou J, He Z, et al. In Situ-Formed Fibrin Hydrogel Scaffold Loaded With Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Promotes Skin Wound Healing. *Cell Transpl*. 2023;32:9636897231156215. doi:10.1177/09636897231156215

203. Wolberg AS. Fibrinogen and fibrin: synthesis, structure, and function in health and disease. *J Thromb Haemost*. 2023;21(11):3005-3015. doi:10.1016/j.jtha.2023.08.014

204. Denoeud C, Luo G, Paquet J, et al. Enzyme-controlled, nutritive hydrogel for mesenchymal stromal cell survival and paracrine functions. *Commun Biol*. 2023;6(1):1266. doi:10.1038/s42003-023-05643-y

205. Logeart-Avramoglou D, Oudina K, Bourguignon M, et al. In Vitro and In Vivo Bioluminescent Quantification of Viable Stem Cells in Engineered Constructs. *Tissue Eng Part C Methods*. 2010;16(3):447-458. doi:10.1089/ten.tec.2009.0004

206. Hare JM, Traverse JH, Henry TD, et al. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Escalation Study of Intravenous Adult Human Mesenchymal Stem Cells (Prochymal) After Acute Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(24):2277-2286. doi:10.1016/j.jacc.2009.06.055

207. Chong EA, Gerson JN, Landsburg DJ, et al. Outcomes in Aggressive B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas with Anti-CD19 CAR T-Cell (CTL019) Products Not Meeting Commercial Release Specifications. *Blood*. 2019;134(Supplement_1):594-594. doi:10.1182/blood-2019-131078

208. Chong EA, Levine BL, Grupp SA, et al. CAR T cell viability release testing and clinical outcomes: is there a lower limit? *Blood*. 2019;134(21):1873-1875. doi:10.1182/blood.2019002258

209. Liu H, Liu S, Qiu X, et al. Donor MSCs release apoptotic bodies to improve myocardial infarction via autophagy regulation in recipient cells. *Autophagy*. 2020;16(12):2140-2155. doi:10.1080/15548627.2020.1717128

210. Yan K, Han L, Xu S, et al. The Effect of Age on the Regenerative Potential of Adipose Stem-cell-derived Apoptotic Extracellular Vesicles in Rat Skin Wound Healing. *Int J Med Sci*. 2024;21(8):1529-1540. doi:10.7150/ijms.94755

211. Wang R, Fu J, He J, et al. Apoptotic mesenchymal stem cells and their secreted apoptotic extracellular vesicles: therapeutic applications and mechanisms. *Stem Cell Res Ther*. 2025;16(1):78. doi:10.1186/s13287-025-04211-x

212. Luo G. *Investigating the Role of Glucose on Mesenchymal Stemm Cell-Mediated Tissue Engineering*. PhD thesis. Université Paris Cité - B3OA laboratory; 2021. https://theses.fr/2021UNIP7300

213. Correia CR, Santos TC, Pirraco RP, et al. In vivo osteogenic differentiation of stem cells inside compartmentalized capsules loaded with co-cultured endothelial cells. *Acta Biomater*. 2017;53:483-494. doi:10.1016/j.actbio.2017.02.007

214. Calabrese G, Gulino R, Giuffrida R, et al. In Vivo Evaluation of Biocompatibility and Chondrogenic Potential of a Cell-Free Collagen-Based Scaffold. *Front Physiol*. 2017;8:984. doi:10.3389/fphys.2017.00984

215. Niemeyer P, Kasten P, Simank HG, et al. Transplantation of mesenchymal stromal cells on mineralized collagen leads to ectopic matrix synthesis in vivo independently from prior in vitro differentiation. *Cytotherapy*. 2006;8(4):354-366. doi:10.1080/14653240600845187

216. Korn C, Augustin HG. Mechanisms of Vessel Pruning and Regression. *Dev Cell*. 2015;34(1):5-17. doi:10.1016/j.devcel.2015.06.004

217. Valle GD, Vergnes B, Colonna P, Patria A. Relations between rheological properties of molten starches and their expansion behaviour in extrusion. *J Food Eng*. 1997;31(3):277-295. doi:10.1016/S0260-8774(96)00080-5

218. Lescher A, Kansou K, Della Valle G, Petite H, Lourdin D. Evaluation of extruded starch foam for glucose-supplying biomaterials. *Carbohydr Polym*. 2024;340:122319. doi:10.1016/j.carbpol.2024.122319

219. Miller GL. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Anal Chem*. 1959;31(3):426-428. doi:10.1021/ac60147a030

220. Huang X, Liu H, Ma Y, Mai S, Li C. Effects of Extrusion on Starch Molecular Degradation, Order–Disorder Structural Transition and Digestibility—A Review. *Foods*. 2022;11(16):2538. doi:10.3390/foods11162538

221. Leloup VM, Colonna P, Buleon A. Influence of amylose-amylopectin ratio on gel properties. *J Cereal Sci*. 1991;13(1):1-13. doi:10.1016/S0733-5210(09)80023-4

222. Velasquez D, Pavon-Djavid G, Chaunier L, Meddahi-Pellé A, Lourdin D. Effect of crystallinity and plasticizer on mechanical properties and tissue integration of starch-based materials from two botanical origins. *Carbohydr Polym*. 2015;124:180-187. doi:10.1016/j.carbpol.2015.02.006

223. Panja S, Dietrich B, Adams DJ. Controlling Syneresis of Hydrogels Using Organic Salts. *Angew Chem Int Ed*. 2022;61(4):e202115021. doi:10.1002/anie.202115021

224. Luo Z, He X, Fu X, Luo F, Gao Q. Effect of Microwave Radiation on the Physicochemical Properties of Normal Maize, Waxy Maize and Amylomaize V Starches. *Starch - Stärke*. 2006;58(9):468-474. doi:10.1002/star.200600498

225. Luo Z, Fu X, He X, Luo F, Gao Q, Yu S. Effect of Ultrasonic Treatment on the Physicochemical Properties of Maize Starches Differing in Amylose Content. *Starch - Stärke*. 2008;60(11):646-653. doi:10.1002/star.200800014

226. Murray JE, Laurieri N, Delgoda R. Chapter 24. Proteins. In: *Pharmacognosy : Fundamentals, Applications and Strategies*. Elsevier Inc.; 2017. doi:10.1016/B978-0-12-802104-0.00024-X

227. Zaman R, Islam RA, Ibnat N, et al. Current strategies in extending half-lives of therapeutic proteins. *J Controlled Release*. 2019;301(January):176-189. doi:10.1016/j.jconrel.2019.02.016

228. Megazyme. ASSAY OF AMYLOGLUCOSIDASE using p-NITROPHENYL β-MALTOSIDE plus Thermostable β-Glucosidase (protocol). Published online 2018. https://prod-docs.megazyme.com/documents/Assay_Protocol/R-AMGR3_DATA.pdf

229. Enzymatic Assay of Amyloglucosidase. Merck. Accessed August 20, 2025. https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/technical-documents/protocol/protein-biology/enzyme-activity-assays/enzymatic-assay-of-amyloglucosidase

230. Camus G. La cinétique des enzymes michaeliennes et l'équation de Michaelis-Menten. Planet-Vie. 2012. https://planet-vie.ens.fr/thematiques/cellules-et-molecules/enzymologie/la-cinetique-des-enzymes-michaeliennes-et-l-equation

231. INTERNATIONAL COUNCIL FOR HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. BIOANALYTICAL METHOD VALIDATION AND STUDY SAMPLE ANALYSIS M10. Published online 2022. https://database.ich.org/sites/default/files/M10_Guideline_Step4_2022_0524.pdf

232. Chiu CL, Hecht V, Duong H, Wu B, Tawil B. Permeability of Three-Dimensional Fibrin Constructs Corresponds to Fibrinogen and Thrombin Concentrations. *BioResearch Open Access*. 2012;1(1):34-40. doi:10.1089/biores.2012.0211

233. Sui J, Pragnere S, Kurniawan NA. Revisiting the biophysical aspects of extracellular-matrix-mimicking hydrogels: what cells see *vs.* what cells feel. *Biomater Sci*. 2025;13(19):5297-5324. doi:10.1039/D5BM00210A

234. Rojas-Murillo JA, Simental-Mendía MA, Moncada-Saucedo NK, et al. Physical, Mechanical, and Biological Properties of Fibrin Scaffolds for Cartilage Repair. *Int J Mol Sci*. 2022;23(17):9879. doi:10.3390/ijms23179879

235. Le MQ, Gimel JC, Garric X, et al. Modulation of protein release from penta-block copolymer microspheres. *Eur J Pharm Biopharm*. 2020;152:175-182. doi:10.1016/j.ejpb.2020.05.009

236. Kandalam S, Sindji L, Delcroix GJR, et al. Pharmacologically active microcarriers delivering BDNF within a hydrogel: Novel strategy for human bone marrow-derived stem cells neural/neuronal differentiation guidance and therapeutic secretome enhancement. *Acta Biomater*. 2017;49:167-180. doi:10.1016/j.actbio.2016.11.030

237. Morille M, Van-Thanh T, Garric X, et al. New PLGA–P188–PLGA matrix enhances TGF-β3 release from pharmacologically active microcarriers and promotes chondrogenesis of mesenchymal stem cells. *J Controlled Release*. 2013;170(1):99-110. doi:10.1016/j.jconrel.2013.04.017

238. De Burlet G, Sudaka P. Propriétés catalytiques de l'α-glucosidase neutre du rein humain. *Biochimie*. 1977;59(1):7-14. doi:10.1016/S0300-9084(77)80080-1

239. Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A. The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems—A review. *Int J Pharm*. 2011;415(1-2):34-52. doi:10.1016/j.ijpharm.2011.05.049

240. Wang M, Wang S, Zhang C, et al. Microstructure Formation and Characterization of Long-Acting Injectable Microspheres: The Gateway to Fully Controlled Drug Release Pattern. *Int J Nanomedicine*. 2024;Volume 19:1571-1595. doi:10.2147/IJN.S445269

241. Klose D, Siepmann F, Elkharraz K, Krenzlin S, Siepmann J. How porosity and size affect the drug release mechanisms from PLGA-based microparticles. *Int J Pharm*. 2006;314(2):198-206. doi:10.1016/j.ijpharm.2005.07.031

242. Kohno M, Andhariya JV, Wan B, et al. The effect of PLGA molecular weight differences on risperidone release from microspheres. *Int J Pharm*. 2020;582:119339. doi:10.1016/j.ijpharm.2020.119339

243. Cai C, Mao S, Germershaus O, et al. Influence of morphology and drug distribution on the release process of FITC-dextran-loaded microspheres prepared with different types of PLGA. *J Microencapsul*. 2009;26(4):334-345. doi:10.1080/02652040802354707

244. Invitrogen. Amplex Red Glucose/Glucose Oxidase Assay Kit. Published online 2006.

245. Cai W, Sun W, Wang J, et al. Rational design of α-glucosidase activated near-infrared fluorescent probe and its applications in diagnosis and treatment of diabetes. *Sens Actuators B Chem*. 2024;400:134878. doi:10.1016/j.snb.2023.134878

246. Division of General Internal Medicine and Geriatrics, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN, USA, Kumar V, Gromski MA, et al. Serum amylase and lipase levels in healthy volunteers assessed by multiple commercial analyzers: Variability with established reference values. *Jpn J Gastroenterol Res*. 2021;1(3). doi:10.52768/jjgastro/1011

247. PDF.

248. Neuss S, Schneider RKM, Tietze L, Knüchel R, Jahnen-Dechent W. Secretion of Fibrinolytic Enzymes Facilitates Human Mesenchymal Stem Cell Invasion into Fibrin Clots. *Cells Tissues Organs*. 2010;191(1):36-46. doi:10.1159/000215579

249. Lozito TP, Jackson WM, Nesti LJ, Tuan RS. Human mesenchymal stem cells generate a distinct pericellular zone of MMP activities via binding of MMPs and secretion of high levels of TIMPs. *Matrix Biol*. 2014;34:132-143. doi:10.1016/j.matbio.2013.10.003

250. Miles LA, Parmer RJ. Angry macrophages patrol for fibrin. *Blood*. 2016;127(9):1079-1080. doi:10.1182/blood-2016-01-687673

251. Mei J, Jiang X, Tian H, et al. Anoikis in cell fate, physiopathology, and therapeutic interventions. *MedComm*. 2024;5(10):e718. doi:10.1002/mco2.718

252. Lorand L. Factor XIII: Structure, Activation, and Interactions with Fibrinogen and Fibrin. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936(1):291-311. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03516.x

253. Reddy MSB, Ponnamma D, Choudhary R, Sadasivuni KK. A Comparative Review of Natural and Synthetic Biopolymer Composite Scaffolds. *Polymers*. 2021;13(7):1105. doi:10.3390/polym13071105

254. Pollot BE, Rathbone CR, Wenke JC, Guda T. Natural polymeric hydrogel evaluation for skeletal muscle tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018;106(2):672-679. doi:10.1002/jbm.b.33859

255. De Mori A, Aydin N, Lostia G, Manca A, Blunn G, Roldo M. Influence of Cell Seeding Density and Material Stiffness on Chondrogenesis of Human Stem Cells Within Soft Hydrogels, Without the Use of Exogenous Growth Factors. *Gels*. 2025;11(3):213. doi:10.3390/gels11030213

256. Hui TY, Cheung KMC, Cheung WL, Chan D, Chan BP. In vitro chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen microspheres: Influence of cell seeding density and collagen concentration. *Biomaterials*. 2008;29(22):3201-3212. doi:10.1016/j.biomaterials.2008.04.001

257. Chen X, Foote AG, Thibeault SL. Cell density, dimethylsulfoxide concentration and needle gauge affect hydrogel-induced bone marrow mesenchymal stromal cell viability. *Cytotherapy*. 2017;19(12):1522-1528. doi:10.1016/j.jcyt.2017.08.016

258. Mohand-Kaci F, Assoul N, Martelly I, Allaire E, Zidi M. Optimized Hyaluronic Acid–Hydrogel Design and Culture Conditions for Preservation of Mesenchymal Stem Cell Properties. *Tissue Eng Part C Methods*. 2013;19(4):288-298. doi:10.1089/ten.tec.2012.0144

259. Mauck RL, Seyhan SL, Ateshian GA, Hung CT. Influence of Seeding Density and Dynamic Deformational Loading on the Developing Structure/Function Relationships of Chondrocyte-Seeded Agarose Hydrogels. *Ann Biomed Eng*. 2002;30(8):1046-1056. doi:10.1114/1.1512676

260. Erickson IE, Kestle SR, Zellars KH, et al. High mesenchymal stem cell seeding densities in hyaluronic acid hydrogels produce engineered cartilage with native tissue properties. *Acta Biomater*. 2012;8(8):3027-3034. doi:10.1016/j.actbio.2012.04.033

261. Sun H, Zhang X, Dai J, et al. Sodium lactate promotes stemness of human mesenchymal stem cells through KDM6B mediated glycolytic metabolism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020;532(3):433-439. doi:10.1016/j.bbrc.2020.08.061

262. Quinn WJ, Jiao J, TeSlaa T, et al. Lactate Limits T Cell Proliferation via the NAD(H) Redox State. *Cell Rep*. 2020;33(11):108500. doi:10.1016/j.celrep.2020.108500

263. Rovetto MJ, Lamberton WF, Neely JR. Mechanisms of glycolytic inhibition in ischemic rat hearts. *Circ Res*. 1975;37(6):742-751. doi:10.1161/01.RES.37.6.742

264. Anversa P, Kajstura J. Myocyte Cell Death in the Diseased Heart. *Circ Res*. 1998;82(11):1231-1233. doi:10.1161/01.RES.82.11.1231

265. Kalimo H, Rehncrona S, Söderfeldt B, Olsson Y, Siesjö BK. Brain Lactic Acidosis and Ischemic Cell Damage: 2. Histopathology. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1981;1(3):313-327. doi:10.1038/jcbfm.1981.35

266. Viateau V, Guillemin G, Bousson V, et al. Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: A study on sheep. *J Orthop Res*. 2007;25(6):741-749. doi:10.1002/jor.20352

267. Huerta CT, Ortiz YY, Li Y, et al. Novel Gene-Modified Mesenchymal Stem Cell Therapy Reverses Impaired Wound Healing in Ischemic Limbs. *Ann Surg*. Published online June 19, 2023. doi:10.1097/SLA.0000000000005949

268. Affolter KE, Schmidt RL, Matynia AP, Adler DG, Factor RE. Needle Size Has Only a Limited Effect on Outcomes in EUS-Guided Fine Needle Aspiration: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Dig Dis Sci*. 2013;58(4):1026-1034. doi:10.1007/s10620-012-2439-2

269. Park K, Skidmore S, Hadar J, et al. Injectable, long-acting PLGA formulations: Analyzing PLGA and understanding microparticle formation. *J Controlled Release*. 2019;304:125-134. doi:10.1016/j.jconrel.2019.05.003

270. Boisselier J. *Mise en œuvre d'un système de confinement et de délivrance moléculaire pour la production in situ de glucose au sein d'un hydrogel conçu pour l'ingénierie tissulaire*. PhD thesis - Biomatériaux. Université de Cergy Pontoise; 2016. https://theses.hal.science/tel-01468451

271. Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A, Langer R. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg*. 1988;23(1):3-9. doi:10.1016/S0022-3468(88)80529-3

272. Judas F, Rosa S, Teixeira L, Lopes C, Ferreira Mendes A. Chondrocyte Viability in Fresh and Frozen Large Human Osteochondral Allografts: Effect of Cryoprotective Agents. *Transplant Proc*. 2007;39(8):2531-2534. doi:10.1016/j.transproceed.2007.07.028

273. Reinecke H, Murry CE. Taking the Death Toll After Cardiomyocyte Grafting: A Reminder of the Importance of Quantitative Biology. *J Mol Cell Cardiol*. 2002;34(3):251-253. doi:10.1006/jmcc.2001.1494

274. Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol*. 2007;25(9):1015-1024. doi:10.1038/nbt1327

275. Fan Y, Maley M, Beilharz M, Grounds M. Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy. *Muscle Nerve*. 1996;19(7):853-860. doi:10.1002/(SICI)1097-4598(199607)19:7%3C853::AID-MUS7%3E3.0.CO;2-8

Publications associées à la thèse

Article

Nutritive Hydrogel Incorporating a Micro-Encapsulated Amyloglucosidase: Toward Prolonged Metabolic Support of Transplanted Mesenchymal Stromal Cells Via Glucose Supply. MAGNIN Samantha, WOSINSKI Pauline, BAKARI William, LOURDIN Denis, POTIER Esther, VENIER-JULIENNE Marie-Claire, PETITE Herve. (A soumettre)

Development of a fully hydrolasable nutritive hydrogel for fuellling human mesenchymal stromal cells energetic needs in ischemia for 21 days. WOSINSKI Pauline, MAGNIN Samantha, XIAN Guoyan, LUO Guotian, VENIER-JULIENNE Marie-Claire, POTIER Esther, PETITE Herve. (A soumettre)

Revue

What are the strategies to overcome the limitations of the therapeutic use of enzymes *in vivo*? MAGNIN Samantha, WOSINSKI Pauline, VENIER-JULIENNE Marie-Claire, PETITE Herve. (A soumettre)

Communications Orales

Development of a controlled glucose release system to ensure survival of transplanted mesenchymal stromal cells. MAGNIN Samantha, WOSINSKI Pauline, BAKARI William, LOURDIN Denis, VENIER-JULIENNE Marie-Claire, PETITE Hervé. Journées BIOMAT, organisées par l'Association française pour le développement des biomatériaux. Arcachon, France. 2025

Nutritive Hydrogel Incorporating a Micro-Encapsulated Amyloglucosidase: Toward Prolonged Metabolic Support of Transplanted Mesenchymal Stromal Cells Via Glucose Supply. MAGNIN Samantha, WOSINSKI Pauline, BAKARI William, LOURDIN Denis, VENIER-JULIENNE Marie-Claire, PETITE Hervé. Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS). Wuhan, Chine. 2025

Nutritive Hydrogel Incorporating a Micro-Encapsulated Amyloglucosidase: Toward Prolonged Metabolic Support of Transplanted Mesenchymal Stromal Cells Via Glucose Supply. MAGNIN Samantha, WOSINSKI Pauline, BAKARI William, LOURDIN Denis, VENIER-JULIENNE Marie-Claire, PETITE Hervé. Symposium “Road to 2030”(INSERM). Paris, France. 2025