

Unité CSPBAT (Chimie, Structure et Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques)  
UMR CNRS 7244  
Laboratoire des Biomatériaux et Polymères de Spécialité  
UFR SMBH, Université Paris 13

Centre de Transfusion Sanguine des Armées

Etablissement Français du Sang

## **THÈSE**

Présentée par

**Frédéric BOLLOTTE**

Pour l'obtention du grade de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS 13**

Ecole Doctorale Galilée

Spécialités : Santé, Médecine, Biologie Humaine

**Préparation d'extraits plaquettaires de grade clinique en vue  
d'une utilisation en bio-ingénierie cellulaire et tissulaire**

Soutenue le 21 décembre 2012

### **Jury**

Pr BURNOUF Thierry

Dr UZAN Georges

Dr RENDU Francine

Dr HUART Jean-Jacques

Pr MIGONNEY Véronique

Pr LUTOMSKI Didier

Pr LATAILLADE Jean-Jacques

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse

Directeur de thèse

**L'ENSEMBLE DES TRAVAUX PRESENTES  
DANS CE MANUSCRIT REVET UN  
CARACTERE CONFIDENTIEL**

## **REMERCIEMENTS**

Au terme de ce travail, je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce projet.

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements à Didier Lutomski et Jean-Jacques Lataillade qui m'ont permis de réaliser cette thèse au sein de leurs laboratoires avec la liberté d'action qu'il m'a été donné.

Mes remerciements s'adressent ensuite au Dr Jean-Jacques Huart d'avoir participé à cette collaboration qui fut un élément clef pour la mise en place de cette étude. Je remercie également tout le personnel de L'EFS Nord-de-France qui m'a été d'une aide précieuse pour notamment l'obtention des PSL indispensable à l'étude.

Je remercie tout particulièrement mes collègues du CTSA et du LBPS : à ma petite Elo qui a réussi à me supporter durant tant d'année dans ce bureau, aux filles sans qui les batailles de gants et d'eau auraient été sans saveur et pourtant idéal pour souffler. A Cédric et Massimo pour ces discussions graveleuses passé 19h.

Ces années de thèse furent riches en rebondissements que ce soit personnel ou professionnel, que ce soit pour le meilleur comme pour le pire. Mais ces années ont été synonyme de changement, de transition. Le plus important est qu'elles ont permis d'aboutir à la finalisation d'un projet.

A ma famille

# **SOMMAIRE**

# SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTE DES FIGURES .....</b>	<b>XVII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX .....</b>	<b>XX</b>
<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>XXII</b>
<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>2</b>
<b>1 LES PRODUITS TRANSFUSIONNELS .....</b>	<b>2</b>
1.1 LES CONCENTRES PLAQUETTAIRES .....	2
1.1.1 <i>La plaquette sanguine</i> .....	2
1.1.2 <i>Le concentré de plaquettes sanguines</i> .....	4
1.1.3 <i>Les plasmas thérapeutiques</i> .....	5
1.1.3.1 Le plasma .....	5
1.1.3.2 Le plasma à usage thérapeutique .....	6
1.1.3.2.1 Le plasma viro-inactivé par solvant-détergent .....	7
1.1.3.2.2 Le plasma viro-inactivé par bleu de méthylène (technique Theraflex®) .....	7
1.1.3.2.3 Le plasma viro-inactivé à l'amotosalen (technique intercept®) .....	9
1.1.3.2.4 Le plasma sécurisé par quarantaine .....	10
1.1.3.2.5 Le plasma viro-atténué par pasteurisation .....	10
1.1.3.2.6 Le plasma lyophilisé .....	10
1.2 ETAPES DE PREPARATION NECESSAIRES A LA PRODUCTION DE CONCENTRES PLAQUETTAIRES ET DE PLASMA .....	11
1.2.1 <i>Le prélèvement</i> .....	11
1.2.2 <i>La centrifugation</i> .....	12
1.2.3 <i>Séparation des produits sanguins</i> .....	13
1.2.4 <i>La déleucocytation des produits sanguins labiles</i> .....	14
1.2.4.1 La déleucocytation augmente la qualité de conservation .....	14
1.2.4.2 La déleucocytation entraîne une diminution des risques transfusionnels .....	14
1.2.4.2.1 Le système HLA .....	15
1.2.4.2.2 Le frisson hyperthermique .....	16
1.2.4.2.3 La transmission de micro-organismes intra-cellulaires .....	16
<i>Le Cytomégalo virus (CMV ou HHV5)</i> .....	17
<i>Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)</i> .....	17
<i>Autres transmissions</i> .....	17
1.2.5 <i>L'addition de solutions de conservation et la déplasmatisation</i> .....	18
1.2.6 <i>Le fractionnement du plasma</i> .....	19
1.3 LA SECURISATION DES DONS .....	21
1.3.1 <i>Qualification biologique des dons de sang</i> .....	21

1.3.1.1	Objectifs de la qualification biologique des dons .....	21
1.3.1.2	Une sécurisation évolutive vis-à-vis des maladies transmissibles .....	22
1.3.1.3	Quelques dates clés de l'amélioration de la qualification du don .....	22
1.3.1.4	Analyses et dépistages permettant la qualification biologique des dons.....	23
1.3.1.5	Sécurisation par traitement pro-actif.....	25
1.3.1.5.1	Les méthodes d'inactivation des agents pathogènes.....	26
1.3.1.5.1.1	L'inactivation des agents pathogènes dans les concentrés plaquettaires par amotosalen (système Intercept®).....	26
1.3.1.5.1.2	L'inactivation des agents pathogènes dans les concentrés plaquettaires par riboflavine (système Mirasol®) 28	
1.3.1.5.1.3	L'inactivation des agents pathogènes dans le plasma par pasteurisation.....	30
1.3.1.5.1.4	L'inactivation des agents pathogènes dans le plasma par traitement au Bleu de Méthylène ....	31
<b>2</b>	<b>INTERET DES PLAQUETTES EN THERAPIE CELLULAIRE .....</b>	<b>32</b>
2.1	LE PLASMA RICHE EN PLAQUETTES HUMAINES .....	32
2.1.1	<i>Quelques utilisations du PRP</i> .....	33
2.1.1.1	Utilisations directes .....	33
2.1.1.1.1	Élaboration de ces produits riches en facteurs de croissance.....	34
2.1.1.1.2	PDGF (platelet-derived growth factor).....	36
2.1.1.1.3	TGF- $\beta$ (transforming growth factor-beta) .....	36
2.1.1.2	Utilisations indirectes du PRP .....	37
<b>3</b>	<b>LES CELLULES SOUCHES MULTIPOTENTES MESENCHYMATEUSES .....</b>	<b>39</b>
3.1	LES MULTIPOTENT ADULT PROGENITOR CELLS.....	39
3.2	LES CELLULES SOUCHES MESENCHYMATEUSES HUMAINES.....	40
3.2.1	<i>Hétérogénéité des CSMh</i> .....	41
3.2.2	<i>Phénotype des CSMh de la moelle osseuse</i> .....	41
3.2.3	<i>Propriétés biologiques des cellules stromales mésenchymateuses</i> .....	44
3.2.3.1	Auto-renouvellement et prolifération des CSMh.....	44
3.2.3.2	Soutien de l'hématopoïèse.....	44
3.2.3.3	Propriétés immunomodulatrices .....	44
3.2.3.4	Utilisations thérapeutiques .....	45
3.2.3.4.1	L'implantation locale .....	46
3.2.3.4.2	La transplantation systémique .....	46
3.2.3.4.3	La thérapie cellulaire combinée à la thérapie génique.....	47
3.2.3.4.4	L'ingénierie tissulaire.....	47
3.2.3.5	La production de CSMh à usage clinique .....	48
	<b>OBJECTIFS DU TRAVAIL .....</b>	<b>50</b>
	<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>52</b>
<b>1</b>	<b>LES PRODUITS BIOLOGIQUES MATIERE PREMIERE .....</b>	<b>52</b>
1.1	LES PRODUITS TRANSFUSIONNELS .....	52
1.1.1	<i>Obtention des produits transfusionnels</i> .....	52

1.1.1.1	Prélèvement d'un Concentré de plaquettes par apherèse .....	52
1.1.1.1.1	Prélèvement d'un plasma et d'un buffy coat .....	53
1.1.1.1.2	Obtention d'un mélange de concentrés de plaquettes.....	53
1.1.1.2	Transformation des produits transfusionnels .....	53
1.1.1.2.1	Déplasmatisation .....	53
	Matériels.....	53
	Procédure .....	54
	Déplasmatisation totale .....	54
	Déplasmatisation partielle .....	54
1.1.1.2.2	Cryoprécipitation.....	54
	Matériels.....	54
	Protocole .....	55
1.1.1.2.3	Obtention d'une solution plasmatique.....	55
	Matériels.....	55
	Protocole .....	55
1.1.1.2.4	Obtention d'une solution d'extrait plaquettaire (SEP) .....	55
	Matériels.....	55
	Protocole .....	56
1.1.1.3	Viro-inactivation des produits transfusionnels .....	56
1.1.1.3.1	Viro-inactivation par pasteurisation .....	56
1.1.1.3.2	Viro-inactivation au bleu de méthylène.....	57
	Matériels.....	57
	Protocole .....	57
<b>2</b>	<b>ISOLEMENT DES CELLULES STROMALES MESENCHYMATEUSES A PARTIR DE MOELLE OSSEUSE .....</b>	<b>57</b>
2.1	EXTRACTION CELLULAIRE : DE LA CRETE ILIAQUE A LA SUSPENSION CELLULAIRE .....	57
2.2	EVALUATION IN VITRO DU SUBSTITUT DE SVF SUR UNE CULTURE DE CSM .....	59
2.2.1	<i>Etude de la prolifération des CSM</i> .....	59
2.2.1.1	L'ensemencement en primo-culture .....	60
2.2.1.2	Arrêt des cultures et numération cellulaire .....	60
2.2.1.2.1	Protocole de décollement par trypsine-EDTA.....	61
2.2.1.3	Réensemencement cellulaire et réalisation des passages successifs de culture.....	61
2.2.2	<i>Etude de la clonogénicité des CSM</i> .....	62
2.2.2.1	Le test des CFU-F.....	62
2.2.2.2	Mise en place de l'étude de la clonogénicité .....	63
	Protocole d'arrêt, de fixation et de coloration des cultures de CFU-F.....	63
2.2.3	<i>Etude du phénotypage des cellules après passage</i> .....	63
2.2.3.1	Principe de l'étude du phénotype membranaire par la cytométrie de flux.....	64
<b>3</b>	<b>ANALYSES PROTEOMIQUES .....</b>	<b>67</b>
3.1	DETERMINATION DE LA CONCENTRATION PROTEIQUE : METHODE DE BRADFORD .....	67
	Matériels.....	67
	Protocoles.....	68

Préparation de la gamme étalon .....	68
Préparation des échantillons.....	68
Dosage protéique par spectrométrie.....	68
3.2 L'ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE (2-DE) .....	68
Matériels.....	70
3.2.1 Première dimension : isoélectrofocalisation (IEF).....	71
Protocoles.....	72
Etape de réhydratation des gels.....	72
Etape de la migration .....	72
3.2.2 Deuxième dimension : SDS-PAGE.....	73
Protocoles.....	73
Préparation des gels .....	73
Migration dans la seconde dimension .....	74
3.2.3 Analyse d'images des gels 2D.....	75
<b>4 PREPARATION D'UN NOUVEAU SUBSTITUT DU SVF A PARTIR DE PRODUITS PLAQUETTAIRES ET PLASMATIQUES .....</b>	<b>75</b>
4.1 TRAITEMENT DE CONCENTRES DE PLAQUETTES D'APHERESE.....	75
4.1.1 Evaluation des différents produits de substitution du SVF.....	77
Matériels.....	78
Protocole .....	78
4.2 CONCEPTION DE LA SOLUTION D'EXTRAITS PLAQUETTAIRES ET PLASMATIQUES (SEPP).....	79
4.2.1 Evaluation de la concentration protéique des produits de substitution du SVF.....	79
4.2.2 Préparation d'un nouveau produit de substitution de SVF basé sur un ratio standardisé de protéines plasmatiques et plaquettaires .....	80
4.2.3 Evaluation d'un nouveau produit de substitution de SVF basé sur un ratio standardisé de protéines plasmatiques et plaquettaires .....	81
Matériels.....	81
Protocole .....	81
4.3 SECURISATION DE LA SEPP .....	82
4.3.1 Sécurisation de la partie plasmatique et sa cryoprécipitation .....	82
4.3.2 Evaluation de la sécurisation de la partie plasmatique et sa cryoprécipitation .....	84
Matériels.....	84
Protocole .....	85
<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>87</b>
<b>1 TESTS CELLULAIRES ET CARACTERISATION DE DIFFERENTS SUPPLEMENTS DE MILIEU DE CULTURE ELABORES A PARTIR D'UN PRODUIT PLAQUETTAIRE.....</b>	<b>87</b>
1.1 TESTS CELLULAIRES DES DIFFERENTS SUPPLEMENTS DE MILIEU DE CULTURE ELABORES A PARTIR DE PRODUITS PLAQUETTAIRES.....	87
1.1.1 Prolifération cellulaire.....	87
1.1.2 Clonogénicité .....	91

1.1.3	<i>Phénotype cellulaire des CSM</i> .....	92
1.1.4	<i>Discussion intermédiaire</i> .....	95
1.2	CARACTERISATION DE DIFFERENTS SUPPLEMENTS DE MILIEU DE CULTURE ELABORES A PARTIR D'UN PRODUIT PLAQUETTAIRE .....	95
1.2.1	<i>Dosages protéiques des différents suppléments de milieu de culture élaborés à partir d'un produit plaquettaire</i> .....	95
1.2.2	<i>Analyses protéomiques des différents suppléments de milieu de culture élaborés a partir d'un produit plaquettaire</i> .....	96
1.2.3	<i>Discussion et orientation</i> .....	98
<b>2</b>	<b>MISE AU POINT D'UN PRODUIT DE SUPPLEMENTATION DE MILIEU DE CULTURE A PARTIR DE PRODUITS PLAQUETTAIRES ET PLASMATIQUES .....</b>	<b>99</b>
2.1.1	<i>Détermination de la concentration d'utilisation du produit</i> .....	99
2.1.1.1	Effet sur la prolifération des CSM.....	99
2.1.1.2	Effet sur la clonogénicité des CSM .....	101
2.1.1.3	Effet sur le phénotype des CSM .....	101
2.1.1.4	Vers la conception d'une préparation d'extrait plaquettaire en équivalent de protéines.....	102
2.1.1.5	Discussion et orientation .....	103
2.1.2	<i>Mise au point d'un nouveau produit de supplémentation de milieu de culture à partir de PSL : La SEPP</i> 104	
2.1.2.1	Concentration protéique des solutions plasmatiques et plaquettaires .....	104
2.1.2.2	Concentration des lots d'extraits plaquettaires .....	104
2.1.2.3	Aspect qualitatif du milieu de culture.....	105
2.1.2.4	Prolifération des CSM en présence du concept de solution d'extraits plaquettaires et plasmatiques. 106	
2.1.2.4.1	Source plaquettaire : le CPA .....	106
2.1.2.4.2	Source plaquettaire : le MCP.....	108
2.1.2.5	Etude de la clonogénicité des CSM en présence du nouveau concept de solution d'apport de croissance 109	
2.1.2.5.1	Taux de clonogénicité en fonction des extraits de lysat plaquettaire provenant de CPA.....	109
2.1.2.5.2	Taux de clonogénicité en fonction des extraits de lysat plaquettaire provenant de MCP .....	111
2.1.2.6	Etude phénotypique des cellules.....	113
2.1.2.6.1	Phénotype de type CSM après conditionnement par les SEPP.....	113
2.1.2.6.2	Phénotype cellulaire après conditionnement en SEPP' .....	113
2.1.2.7	Discussion sur ce nouveau concept et orientation .....	116
2.2	SECURISATION DES PRODUITS DE SUPPLEMENTATION .....	117
2.2.1	<i>Evaluation de la sécurisation et de la cryoprécipitation de la partie plasmatique</i> .....	118
2.2.1.1	Volume des différentes solutions plasmatiques et leurs concentrations .....	118
2.2.1.2	Prolifération des CSM en présence de SEPP aux multiples composantes plasmatiques.....	119
2.2.1.3	Etude de la clonogénicité.....	125
2.2.1.4	Etude phénotypique .....	126
2.2.1.5	Conclusion et discussion .....	133
	<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>135</b>

<b>1</b>	<b>UN COMPOSE RICHE EN FACTEURS DE CROISSANCE.....</b>	<b>136</b>
<b>2</b>	<b>UNE SOLUTION DE SUPPLEMENTATION PERTINENTE POUR LA PRODUCTION DE CSM A USAGE THERAPEUTIQUE .....</b>	<b>137</b>
<b>3</b>	<b>UNE HOMOGENEITE DES LOTS DE SEPP .....</b>	<b>138</b>
<b>4</b>	<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>138</b>
	<b>BREVET .....</b>	<b>141</b>
	<b>ARTICLE 1 .....</b>	<b>142</b>
	<b>ARTICLE 2 .....</b>	<b>150</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>160</b>
	<b>FICHE TECHNIQUE.....</b>	<b>191</b>
	<b>PREPARATION DU MIX DE LYSATS PLAQUETTAIRES (LPMIX) .....</b>	<b>191</b>
	Matériels.....	191
	Protocole .....	191

# **LISTE DES ABREVIATIONS**

## LISTE DES ABREVIATIONS

ACD-A:	<i>acid citrate dextrose-A</i>
ADP:	adenosine diphosphate
ADN:	acide désoxyribonucléique
ALAT:	<i>alanine amino transferase</i>
ANSM:	Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
ARN:	acide ribonucléique
ATP:	adénosine-5'-triphosphate
BC:	<i>buffy coat</i>
BM:	bleu de méthylène
BMP:	<i>bone morphogenetic proteins</i>
CD:	cluster de différenciation
CFU-F:	<i>colony forming units – fibroblast</i>
CGR:	concentré de globules rouges
CHAPS:	3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate
CMH:	complexe majeur d'histocompatibilité
CMN:	cellule mononucléée
CP:	concentré de plaquettes
CPA:	concentré de plaquettes d'aphérèse
CryoPRP:	cryoprécipité de PRP
CryoP:	cryoprécipité de plasma
CSHh:	cellules souches hématopoïétiques humaines
CSMh:	cellules stromales mésenchymateuses humaines
CTSA:	Centre de transfusion sanguine des armées
DMU:	dispositif médical à usage unique
DO:	densité optique
DTT:	dithiothreitol
EBV:	virus Epstein-Barr
EFS:	Etablissement français du sang
EGF:	<i>epithelial growth factor</i>
EMA:	<i>European Medicines Agency</i>

FGF:	<i>fibroblast growth factor</i>
FITC:	isothiocyanate de fluorescéine
FNHTR:	<i>febrile non hemolytic transfusion reaction</i>
G-CSF:	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF:	<i>granulocyte monocyte colony-stimulating factor</i>
GMP:	<i>good manufacturing practice</i>
GvH:	<i>graft versus host</i>
HA:	hydroxyapatite
HHV:	<i>human herpesvirus</i>
HLA:	<i>human leucocytes antigens</i>
HTLV:	<i>human T-cell leukemia/lymphoma virus</i>
IEF:	isoélectrofocalisation
IFN- $\gamma$ :	<i>interferon-gamma</i>
Ig:	immunoglobuline
IGF:	<i>insulin-like growth factor</i>
IL:	interleukine
InVS:	Institut national de veille sanitaire
IPG:	<i>immobilized pH gradient</i> (gradient de pH immobilisé)
ISCT:	<i>International Society for Cellular Therapy</i>
LFA-3:	<i>lymphocyte function associated antigen – 3</i>
LFB:	Laboratoire français du Fractionnement et des Biotechnologies
LIF:	<i>leukemia Inhibitory Factor</i>
L-PRF:	<i>leucocyte and platelet-rich fibrin</i>
L-PRP:	<i>leukocyte and platelet-rich plasma</i>
Lp:	lysat plaquettaire
M-CSF:	<i>macrophage/monocyte colony-stimulating factor</i>
MAPC:	<i>multipotent adult progenitor cells</i>
MDS:	médicaments dérivés du sang
MCP:	mélange de concentrés de plaquettes
MEM $\alpha$ :	milieu essentiel minimum
Mr:	masse moléculaire relative
MSC:	<i>marrow stromal cells</i>
MTI:	médicaments de thérapie innovante

NGFR:	<i>nerve growth factor receptor</i>
NK:	<i>natural killer</i>
Norm.:	normal
OPEX:	opérations extérieures
PEAA:	PBS-EDTA-ACD-A-Albumine
P-PRF:	<i>pure platelet-rich fibrin</i>
PAGE:	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PAS:	<i>platelet additive solution</i>
Past.:	pasteurisé
PBS:	<i>phosphate buffer saline</i>
PDGF:	<i>platelet-derived growth factor</i>
PFC-IA:	plasma frais congelé viro-inactivé par amotosalen
PFC-Se:	plasma frais congelé sécurisé
PC5:	phycoérythrine - Cyanine-5
PE:	phycoérythrine
pI:	point isoélectrique
PLYO:	plasma lyophilisé
PPP:	plasma pauvre en plaquettes
PRP:	plasma riche en plaquettes
PTH:	prothèse total de hanche
PVA-IA:	plasma viro-inactivé par amotosalen
PVA-BM:	plasma viro-inactivé par bleu de méthylène
PVA-SD:	plasma viro-inactivé par solvant/détergent
QBD:	qualification biologique des dons de sang
RBC:	<i>red blood cell</i>
rpm:	rotation/minute
SAGM:	<i>saline Adenine Glucose Mannitol</i>
SCF:	<i>stem cell factor</i>
SD:	solvent/détergent
SDS:	dodécylsulfate de sodium
SEP:	solution d'extraits plaquettaires
SEPP:	solution d'extraits plaquettaires et plasmatiques
SIDA:	syndrome de l'immunodéficience acquise

S/PRP:	surnageant de cryoprécipité de PRP
SNcryoP:	surnageant de cryoprécipité de plasma
Strips:	bandelette d'isoélectrofocalisation
STRO-1:	<i>stromal-1</i>
SVF:	sérum de veau fœtal
TACO:	<i>transfusion-associated circulatory overload</i>
TBS:	<i>tris buffered saline</i>
TCA:	acide trichloroacétique
TEMED:	tétraméthyl-éthylènediamine
TGF- $\beta$ :	<i>transforming growth factor - beta</i>
Thy-1:	<i>thymocyte differentiation antigen – 1</i>
TnBP:	tri-n-butyl phosphate
TNF- $\alpha$ :	<i>tumor necrosis factor – alpha</i>
TRALI:	<i>transfusion-related acute lung injury</i>
Tris:	tris-(hydroxyméthyl) aminoéthane
Triton X-100:	polyoxyéthylène p-t-octyl phénol
UV:	ultraviolet
VCAM :	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VEGF:	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VHA:	virus de l'hépatite A
VHB:	virus de l'hépatite B
VHC:	virus de l'hépatite C
Vhs:	volts par heure
VIH:	virus de l'immunodéficience humaine
vWF:	<i>von Willebrand Factor</i>
WNV:	<i>West Nile Virus</i>

**LISTE DES FIGURES  
ET TABLEAUX**

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Caractéristiques ultrastructurales d'une plaquette .....	3
Figure 2 : Composition schématique du plasma humain révélant sa diversité tant qualitative que quantitative en protéines .....	6
Figure 3 : Système <i>Theraflex</i> ® .....	8
Figure 4 : Système <i>Intercept</i> ® .....	9
Figure 5 : Poche de sang après centrifugation.....	13
Figure 6°: <i>Compomat</i> ® G4 .....	13
Figure 7 : Le système HLA .....	16
Figure 8 : Schéma représentant le fractionnement possible pour l'isolement de diverses protéines plasmatiques à partir de cryoprécipitation plasmatique.....	20
Figure 9 : Mécanisme d'action de l'amotosalen.....	27
Figure 10: Action de la riboflavine par destruction des acides nucléiques .....	29
Figure 11 : Les différentes appellations du plasma en fonction de sa portion cellulaire .....	33
Figure 12 : Formation d'un PRF .....	35
Figure 13 : Schéma illustrant les différentes lignées cellulaires issues des CSMh.....	40
Figure 14 : Régulation de l'activité immunomodulatrice des CSMh.....	45
Figure 15 : Anatomie de l'articulation os iliaque/fémur .....	58
Figure 16 : Accroissement de la population et arrêt par inhibition de contact.....	59
Figure 17 : Principe de l'étude des CFU-f .....	62
Figure 18 : Intérêt du marquage cytométrique à 3 couleurs.....	64
Figure 19 : Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle.....	69
Figure 20 : Récapitulatif des solutions de supplémentation obtenues à partir d'un CPA.....	76
Figure 21 : Expansion des CSM en primoculture dans les différentes conditions.....	88
Figure 22 : Expansion des CSM au cour du passage 1 .....	89
Figure 23 : Expansion des CSM au cour du passage 2 .....	90
Figure 24 : Intensité moyenne de fluorescence des cytochromes associés à l'expression de protéines membranaires des CSM 1 après le second passage sous les différentes conditions de supplémentation .....	93

Figure 25 : Intensité moyenne de fluorescence des cytochromes associés à l'expression de protéines membranaires des CSM 2 après le second passage sous les différentes conditions de supplémentation .....	93
Figure 26 : Pourcentage de la population de CSM 1 exprimant les clusters de différenciation en fonction des conditions de culture .....	94
Figure 27 : Pourcentage de la population de CSM 2 exprimant les clusters de différenciation en fonction des conditions de culture .....	94
Figure 28 : Protéines identifiées sur les deux types de profil protéique. A: profil plasmatique du PRP3; B: profil plaquettaire du PRP2 .....	97
Figure 29 : Densité cellulaire des CSM après confluence en primoculture en fonction de différentes concentrations de Lpmix modifié.....	100
Figure 30°: Expansion de CSM au passage 1 en fonction de différentes concentrations de Lpmix modifié.....	100
Figure 31°: Histogramme représentant le MFI des CSM après culture au passage 1 sur différents marqueurs membranaires en fonction des conditions de culture .....	101
Figure 32 : Histogramme représentant le pourcentage de CSM exprimant différents marqueurs membranaires en fin d'expansion au passage 1 en fonction des conditions de culture .....	102
Figure 33°: Observation de CSM cultivée en LPmix versus SEPP (x 40).....	105
Figure 34°: Prolifération en primoculture de CSM sous différentes conditions de SEPP .....	106
Figure 35°: Densité cellulaire durant le passage 1 sous différentes conditions de SEPP .....	107
Figure 36°: Densité cellulaire durant la primoculture sous différentes conditions de SEPP' .....	108
Figure 37°: Densité cellulaire durant le passage 1 sous différentes conditions de SEPP'.....	108
Figure 38°: Densité cellulaire durant le passage 2 sous différentes conditions de SEPP'.....	109
Figure 39°: Graphiques en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant les différents marqueurs membranaires durant le passage 1 sous conditions SEPP et témoins ..	112
Figure 40°: Graphiques en radar représentant le phénotype des cellules cultivées en primoculture sous différentes conditions de SEPP' .....	114
Figure 41°: Graphiques en radar représentant le phénotype des cellules cultivées au passage 1 sous différentes conditions de SEPP' .....	115
Figure 42°: Graphiques en radar représentant le phénotype des cellules cultivées au passage 2 sous différentes conditions SEPP' .....	116
Figure 43 : Densité cellulaire à confluence en primoculture et temps d'incubation pour l'obtention de la confluence .....	121

Figure 44 : Densité cellulaire à confluence au cour du passage 1 et temps d’incubation pour l’obtention de la confluence .....	123
Figure 45 : Graphique en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant le CD146 à la fin de la primoculture selon les conditions de culture.....	126
Figure 46 : Graphique en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant le CD146 à la fin du passage 1 selon les conditions de culture.....	127
Figure 47 : Graphique en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant le CD200 à la fin de la primoculture selon les conditions de culture.....	128
Figure 48 : Graphique en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant le CD200 à la fin du passage 1 selon les conditions de culture.....	128
Figure 49 : Graphique en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant le CD271 à la fin de la primoculture selon les conditions de culture.....	129
Figure 50 : Graphique en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant le CD271 à la fin du passage 1 selon les conditions de culture.....	130
Figure 51 : Graphique en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant Stro1 à la fin de la primoculture selon les conditions de culture.....	130
Figure 52 : Graphique en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant Stro1 à la fin du passage 1 selon les conditions de culture.....	131
Figure 53 : Graphique en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant MSCA1 à la fin de la primoculture selon les conditions de culture.....	131
Figure 54 : Graphique en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant MSCA1 à la fin du passage 1 selon les conditions de culture.....	132

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1°: Propriétés physiques des différents constituants du sang .....	12
Tableau 2°: Art. D. 1221-6 du code de la santé publique .....	24
Tableau 3°: Inactivation des pathogènes par traitement à l'amotosalen et UVA .....	28
Tableau 4°: Inactivation des pathogènes par traitement à la Riboflavine et UVA .....	30
Tableau 5 : Liste des marqueurs de surface des CSMh.....	43
Tableau 6°: Composition de la solution PEAA (PBS-EDTA-ACD-A-Albumine).....	58
Tableau 7°: Composition du tampon cytométrie.....	65
Tableau 8 : Liste des anticorps utilisés lors du marquage phénotypique .....	67
Tableau 9 : Gamme étalon pour le dosage de protéines.....	68
Tableau 10 : Programme de migration des protéines dans des strips 3-10 pour un gel analytique .....	73
Tableau 11°: Composition du gel d'électrophorèse SDS-PAGE (valeur pour 1 gel) .....	74
Tableau 12 : Programme de la seconde migration sur gel de gradient d'acrylamide de 20x20,5 et 1mm d'épaisseur.....	75
Tableau 13 : Composition des milieux de cultures .....	77
Tableau 14 : Les différents ratios protéiques réalisés .....	80
Tableau 15 : Les différentes solutions de supplémentation issues de la viro-inactivation du plasma et de sa cryoprécipitation .....	83
Tableau 16 : Statistique des différentes expansions cellulaire du passage 1 en fonction des conditions et du moment de l'arrêt (Jfixe et confluence).....	90
Tableau 17 : Statistique des différentes expansions cellulaire du passage 2 en fonction des conditions et du moment de l'arrêt (Jfixe et confluence).....	91
Tableau 18 & 19°: Tableaux récapitulatifs des CFU-F : nombre de clones pour cent cellules ensemencées.....	92
Tableau 20 : Concentration protéique des différents suppléments plaquettaire .....	96
Tableau 21 : Exemples de gels 2D obtenus en fonction des séries et du pH d'étude.....	97
Tableau 22°: Pourcentage de CFU-F au passage 1 pour chaque souche cellulaire.....	101
Tableau 23°: Extrapolation des concentrations en protéines dans le milieu de culture en fonction du pourcentage de complémentation en Lpmix modifié.....	103
Tableau 24°: Concentration protéiques des solutions qui constitueront les SEPP et SEPP' .	104

Tableau 25°: Concentration finale en protéines de chaque lot d'extrait de lysat plaquettaire	105
Tableau 26 : Etude de la clonogénicité des CSM dans les différentes conditions de SEPP au le premier passage .....	110
Tableau 27 : Etude de la clonogénicité des CSM dans les différentes conditions sur 2 passages successif .....	111
Tableau 28 : Volumes et concentrations des différents composants des SEPP .....	119
Tableau 29 : Comparaison statistique des différentes expansions cellulaire à confluence en fonction des conditions et de leurs temps d'incubation en primoculture .....	122
Tableau 30 : Comparaison statistique des différentes expansions cellulaire à confluence en fonction des conditions et de leurs temps d'incubation au cour du passage 1 .....	124
Tableau 31 : Pourcentage de CFU-F de la population cellulaire au cour du passage 1 en fonctions des conditions de supplémentation .....	125

## AVANT-PROPOS

Ces dernières décennies, des progrès considérables ont été réalisés en culture cellulaire. Malgré ces avancées, de nombreux types cellulaires sont encore difficilement cultivables. De plus, l'utilisation de cellules humaines à des fins thérapeutiques nécessite encore de faire sauter des verrous en particulier en matière de sécurité.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés à la mise au point d'un substitut du sérum de veau foetal (SVF), riche en facteurs de croissance qui sont essentiels pour la prolifération cellulaire *in vitro*. Le SVF était jusqu'à présent intéressant tant d'un point de vue expérimental pour des études fondamentales en thérapie cellulaire que pour son rapport qualité/prix. Néanmoins son utilisation pour des activités cliniques est discutée et critiquée.

L'objectif de ce travail de thèse est la mise au point d'un produit innovant et répondant aux attentes des normes sanitaires en vigueur. Ce travail est le fruit d'une coopération entre l'Université Paris 13 (Laboratoire des Biomatériaux et Polymères de Spécialité), le Centre de Transfusion Sanguine des Armées (CTSA, Département Recherches et Thérapie Cellulaire) et l'Etablissement Français du Sang nord de France (EFS Nord de France). Ces deux derniers sont des acteurs majeurs dans le domaine de la transfusion sanguine française. Ces deux institutions sont spécialisées dans la préparation des Produits Sanguins Labiles (PSL) et ont chacune un savoir-faire et une expérience sur ce type de produit. L'EFS est plus axée sur la préparation « industrielle » des PSL. Le CTSA a une activité de recherche en thérapie cellulaire. La mise en commun de leurs compétences, en collaboration avec le Laboratoire des Biomatériaux et Polymères, a permis l'élaboration d'un nouveau concept de supplémentation de culture pour cellules souches à partir de produits transfusionnels.

Notre approche innovante consiste à utiliser la composition protéique de produits plaquettaires et plasmatiques issus de la transfusion pour générer un produit riche en facteurs de croissance présentant l'avantage de favoriser la croissance *in vitro* de cellules stromales mésenchymateuses humaines (CSMh). Ces travaux ont débouché sur une demande de dépôt de brevet et m'ont permis d'être signataire de deux articles annexés à ce document de thèse.

Ce manuscrit de thèse est organisé en trois parties :

- La première partie présente l'état de l'art sur les produits transfusionnels plaquettaires et plasmatiques utilisés comme matière première pour mon travail expérimental. L'utilisation des plaquettes en dehors de la transfusion est ensuite détaillée, les plaquettes étant l'élément central de mon travail. Enfin sont présentées des notions générales sur les cellules souches, en particulier les cellules souches mésenchymateuses, cellules dont le milieu de culture nécessite un apport en facteurs de croissance et en protéines.
- La deuxième partie présente les matériels et méthodes mis à contribution dans cette thèse et les différents protocoles expérimentaux réalisés pour aboutir à la mise au point du produit final de substitution du SVF.
- La dernière partie présente les résultats des différentes expériences réalisées tout au long de cette thèse pour aboutir à un produit composé de protéines plaquettaires et plasmatiques capable de répondre aux normes européennes pour la production des produits de thérapie cellulaire à usage clinique.

Enfin, une discussion/conclusion générale clôture le manuscrit.

**INTRODUCTION**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

## 1 Les produits transfusionnels

La transfusion ou thérapeutique transfusionnelle repose sur l'utilisation de produits sanguins labiles ou PSL. Ces PSL sont des produits issus du sang de donneurs, destinés à être transfusés à un patient receveur. Il peut s'agir de sang total, de plasma et de cellules sanguines (globules rouges, plaquettes). Deux types de dons existent : le don de sang total et le don de produits spécifiques par aphérèse.

- Le don de sang total correspond au prélèvement d'environ 480 ml de sang veineux et permet la préparation d'un concentré de globules rouges (CGR), d'une unité de 280 ml de plasma destinée au fractionnement et d'un concentré de plaquettes standard.
- Le don d'aphérèse permet le prélèvement de tous types de produits sanguins : CGR, plasma, plaquettes, granulocytes. L'avantage de la technique d'aphérèse réside dans l'obtention d'un composant sanguin prélevé en plus grande quantité chez un donneur unique. Deux types de dons d'aphérèse existent, les dons simples comme le concentré de plaquettes d'aphérèse (CPA), plasma, granulocytes et l'aphérèse de globules rouges et les dons doubles associant deux des constituants cités précédemment (sauf pour les granulocytes).

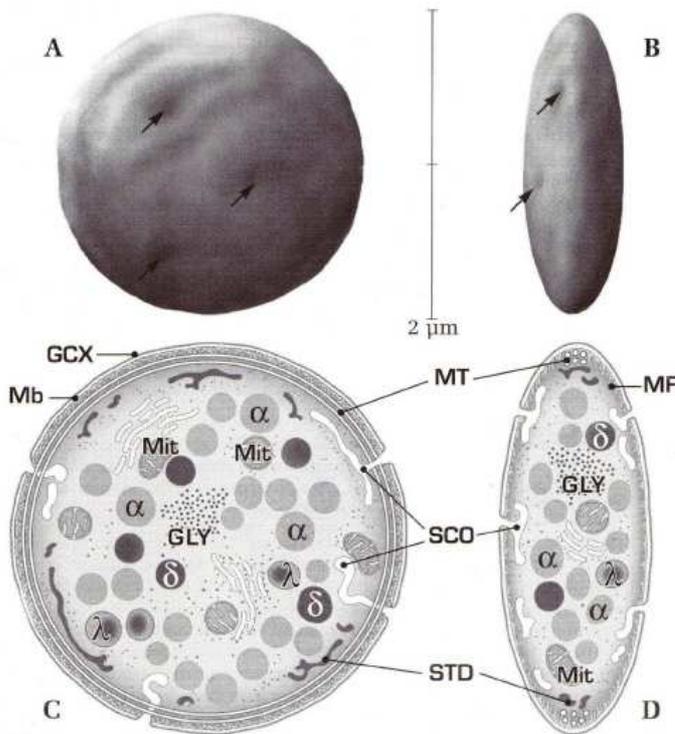
Nous nous focaliserons sur les plaquettes sanguines et le plasma, matières premières à partir desquelles a été élaboré notre substitut de SVF.

### 1.1 Les concentrés plaquettaires

#### 1.1.1 La plaquette sanguine

Les plaquettes sanguines, aussi appelées thrombocytes, sont des fragments anucléés de mégacaryocytes. Issues de la lignée hématopoïétique, elles sont formées dans la moelle osseuse puis libérées dans les sinusoides. D'un diamètre de 1.5 à 4  $\mu\text{m}$  avec une épaisseur de 0.5 à 2  $\mu\text{m}$ , elles sont présentes au repos dans le sang circulant sous la forme discoïde, mais changent de morphologie une fois activées pour devenir sphériques avec apparition de pseudopodes (Klinger and Jelkmann 2002; Hartwig 2006). Elles contiennent dans leur cytoplasme un nombre important de granules de sécrétion spécialisés comme les granules

alpha, contenant des molécules impliquées dans l'hémostase, des facteurs de croissance dont des facteurs pro et anti-angiogéniques, et des médiateurs de l'inflammation (Debili and Vainchenker 2008) (Figure 1)



**Figure 1 : Caractéristiques ultrastructurales d'une plaquette**

(A) et (B) plaquettes en microscopie électronique à balayage. Les flèches représentent des dépressions correspondant à l'émergence vers l'extérieur du système canaliculaire ouvert. (C) et (D) coupe équatoriale et longitudinale d'une plaquette : la zone périphérique est formée du glycocalix (GCX), de la membrane plasmique trilaminare (Mb) et d'une zone sous membranaire riche en microfilaments (MF). Le cytoplasme de la plaquette contient des filaments d'actine, les microtubules (MT) et des grains de glycogène (GLY). Les organelles contenues dans le cytoplasme sont les mitochondries (Mit), les granules alpha ( $\alpha$ ), les granules denses ( $\delta$ ), et les lysosomes ( $\lambda$ ). Les systèmes membranaires de la plaquette sont le système canaliculaire ouvert (SCO) relié à la surface et le système tubulaire dense (STD). (Boneu 1997).

Chez un sujet sain, le sang présente une concentration en plaquettes comprise entre 150000 et 400000/mm<sup>3</sup>. Deux tiers de la masse plaquettaire circulent dans le sang, le tiers restant est séquestré dans la rate et peut être libéré pour contrôler un saignement excessif. La durée de vie d'une plaquette est comprise entre 7 et 12 jours. Les plaquettes non utilisées dans l'hémostase sont éliminées par phagocytose par des macrophages localisés dans le foie, la moelle osseuse et la rate.

Les plaquettes jouent un rôle majeur dans le maintien de l'intégrité vasculaire lors d'un processus d'hémostase primaire, mais interviennent également dans l'angiogenèse, l'inflammation et la réaction immunitaire innée. L'hémostase primaire se déclenche après lésion de la paroi vasculaire. L'adhésion des plaquettes avec le sous-endothélium lésé est médiée notamment par le complexe glycoprotéique GPIb-V-IX qui se lie au facteur de Von Willebrand (vWF) lors du *rolling* plaquettaire (Andrews, Lopez et al. 1997). Cette interaction aboutit à l'activation des plaquettes et se traduit par un changement morphologique, accompagné de la sécrétion des granules  $\alpha$  et des granules dense. Les molécules

thrombogènes sécrétées telles que la sérotonine, le fibrinogène, la thrombospondine, le vWF ou l'adénosine diphosphate (ADP) vont provoquer à la fois la vasoconstriction de l'endothélium, le recrutement et l'agrégation des plaquettes circulant au niveau de la lésion. L'activation des facteurs de la coagulation et la conversion de la prothrombine en thrombine vont permettre le clivage du fibrinogène en fibrine formant un réseau « emmaillotant » les plaquettes (Troxler, Dickinson et al. 2007). La formation du clou plaquettaire aura pour but d'obstruer la brèche vasculaire. Lors de cette phase, les plaquettes libèrent des facteurs de croissance tel que PDGF, VEGF, EGF, TGF $\beta$ -1 qui vont recruter les fibroblastes au niveau de la zone lésée, les faire proliférer pour coloniser la plaie et stimuler la sécrétion matricielle ; favoriser la migration par chimiotactisme et la prolifération des cellules endothéliales et épithéliales (Liu et al., 2002°;Fréchette et al., 2005). Ces facteurs vont également aider à l'activation des polynucléaires et macrophages. Des médiateurs inflammatoires sont également libérés (IL-1, PAF-4), ces derniers vont permettre le recrutement et l'activation des leucocytes (Caruelle et al., 2000).

### 1.1.2 Le concentré de plaquettes sanguines

Outil majeur dans la thérapeutique transfusionnelle, plus de 250000 concentrés de plaquettes sont transfusés annuellement en France (ANSM, 2010). 60 % de ces concentrés sont préparés à partir d'aphérèse permettant l'obtention de CPA (concentré de plaquettes d'aphérèse) et les 40% restant sont des mélanges de concentrés plaquettaires standards (MCP) provenant de dons de sang total. Ces produits sont délivrés en cas de thrombopénie.

Un concentré de plaquettes est obtenu à partir de 450 à 500 ml de sang collecté, après extraction de la partie globulaire et plasmatique, aboutissant à un *buffy coat* qui n'est autre qu'un concentré de plaquettes (CP) après déleucocytation. Le mélange à d'autres CP de différents dons va permettre la constitution d'un MCP dont la richesse est entièrement liée au nombre de dons appariés (réglementairement de 2 à 12). Généralement, entre quatre et six CP constituent un MCP générant une suspension moyenne de 3 à 4 x 10<sup>11</sup> plaquettes par don.

L'aphérèse permet d'obtenir des quantités plus importantes en plaquettes, de l'ordre de 5 x 10<sup>11</sup> plaquettes par don à partir d'un seul donneur.

Tout comme leurs homologues globulaires, les concentrés de plaquettes sont déleucocytés au moment du don. Les MCP sont soumis à l'adjonction de solution additive de conservation (SSP+ de MacoPharma ou Intersol de Fenwall). Les CPA tendent à subir une adjonction de solution additive en remplacement du plasma entraînant ainsi leur déplasmatisation.

Malgré la forte demande en CP, leur disponibilité est limitée par deux facteurs : la durée de vie courte et ses conditions de stockage contraignantes.

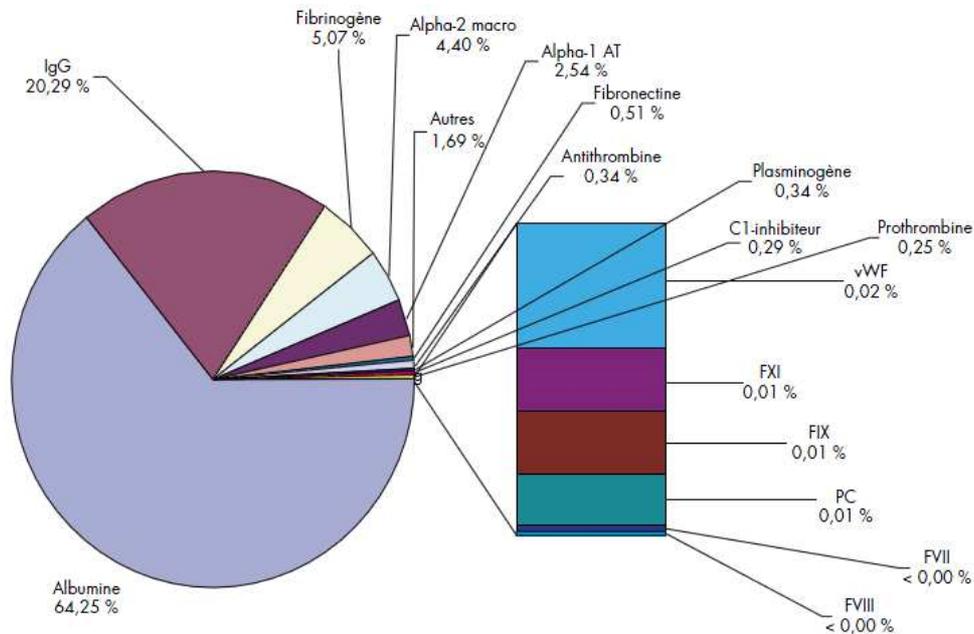
- Une courte durée de vie : Les concentrés de plaquettes périssent 5 jours après le don, or ils ne sont disponibles que 24 à 36 heures après celui-ci (temps d'analyse, préparation et mise à disposition).
- Des conditions de stockage contraignantes : conservé obligatoirement sous agitation continue en enceinte spécifique, celle-ci doit être thermostatée entre 20 et 24°C. Une température inférieure à 18°C altère la qualité fonctionnelle des plaquettes, notamment la protéine membranaire Gp1b, ligand du facteur Willebrand (Ni and Freedman, 2003). La conservation au-dessus de 24°C augmente le risque de prolifération bactérienne.

### **1.1.3 Les plasmas thérapeutiques**

#### **1.1.3.1 Le plasma**

Le plasma est la partie liquide qui constitue le sang. Le plasma sanguin est de couleur jaune. Il représente environ 55% du volume total de sang et a un pH compris entre 7,35 et 7,45. C'est la partie intravasculaire des fluides extracellulaires. Il est principalement constitué d'eau à 91,5% en guise de solvant, le reste étant une variété de solutés 7% de protéines (albumine, globulines, fibrinogène et autres) et 1,5% de différents autres solutés (nutriments, hormones, gaz dissous, électrolytes). Les protéines plasmatiques sont composées en moyenne de 55% d'albumine, de 38% de globulines, de 7% de fibrinogène et de quantités infimes d'hormones, de protéines et d'enzymes (Figure 2). Ces différents types de protéines exercent certes chacune des rôles importants mais dans l'ensemble, les protéines ont un rôle majeur au niveau du maintien du volume de liquide qui circule dans les vaisseaux sanguins. En effet, lors des échanges capillaires, une certaine quantité de liquide sort du circuit sanguin vers le milieu interstitiel. Du fait de leurs hauts poids moléculaires et la perméabilité des capillaires, les protéines présentes dans le sang tendent à rester dans la circulation; elles exercent alors une force osmotique qui favorise le retour du liquide vers les capillaires. Le plasma transporte tous les nutriments absorbés au niveau du tube digestif, des hormones fabriquées par les glandes endocrines, des cytokines, des enzymes libérés lors de destruction cellulaire, des gaz dissous issus des processus de la ventilation pulmonaire. De nombreux électrolytes y sont également présents et jouent un rôle important dans le maintien de l'équilibre hydrique (en association avec les protéines plasmatiques), dans l'équilibre acido-basique de l'organisme

ainsi que dans d'autres équilibres physiologiques (pouvoir tampon pour le maintien du pH). Les principaux cations sont les  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{H}^+$  et les principaux anions sont les  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{---}$ ,  $\text{SO}_4^{---}$ .



**Figure 2 : Composition schématique du plasma humain révélant sa diversité tant qualitative que quantitative en protéines**  
(Burnouf 2007)

L'albumine protéine majoritaire, est présente à une concentration de l'ordre de 40 g/L tandis que certains facteurs de coagulation représentent moins de 1 mg/L.

### 1.1.3.2 Le plasma à usage thérapeutique

Les plasmas thérapeutiques sont, contrairement aux autres PSL, conservés à l'état congelé et délivrés à l'état liquide. Ils doivent être utilisés au plus tard 6 heures après décongélation.

Le plasma est indiqué (arrêté du 3 décembre 1991) pour des situations de coagulopathies graves avec effondrement de tous les facteurs de coagulation, d'hémorragies aiguës avec déficit global des facteurs de coagulation et de déficits complexes rares en facteur de coagulation (fractions coagulantes spécifiques non disponible). Depuis 2002, le purpura thrombotique thrombocytopenique, le syndrome hémolytique et urémique de l'adulte sont également des indications.

Contrairement aux autres PSL, les plasmas thérapeutiques délivrés en France sont viro-atténués. Trois principales techniques sont mises sur le marché : le plasma viro-inactivé par solvant détergent (PVA-SD), le plasma viro-inactivé par le bleu de méthylène (PVA-BM) et

le plasma viro-inactivé par l'amotosalen (PVA-IA). Il existe un dernier type de plasma thérapeutique : le plasma sécurisé par quarantaine. Un dernier procédé de viro-atténuation du plasma est en cour de validation par l'ANSM : le plasma pasteurisé.

#### ***1.1.3.2.1 Le plasma viro-inactivé par solvant-détergent***

L'inactivation virale par solvant-détergent (SD) a dans un premier temps été employée en 1985 pour le traitement des médicaments dérivés du sang avant d'être utilisée pour le plasma frais congelé (Burnouf et al., 1987), (Horowitz et al., 1985a). L'inactivation est réalisée après décongélation du plasma avec un solvant Tri-n-butyl phosphate (TnBP) et un détergent (Triton X100<sup>®</sup>). Efficace sur les virus enveloppés potentiellement présents dans le plasma (VIH 1 et 2, HTLV-I/II, virus de l'hépatite B et C, WNV, DENV, le cytomégalovirus (Horowitz et al., 1992°; Piët et al., 1990; Burnouf et al., 2013). Ce traitement reste sans action sur les virus non enveloppés.

Cependant, certaines protéines plasmatiques sont altérées par ce traitement, c'est le cas du facteur V, le facteur Von Wilbrand (vWF), ou encore de cytokines tel que TNF $\alpha$ , Il-8 ou encore Il-10 où leur concentration est amoindrit (Theusinger et al., 2011).

#### ***1.1.3.2.2 Le plasma viro-inactivé par bleu de méthylène (technique Theraflex<sup>®</sup>)***

Le bleu de méthylène (BM) est connu pour sa propriété à dégrader les acides nucléiques par un processus photochimique (Figure 3). Utilisé en transfusion au début des années 90 (Lambrecht et al., 1991), le traitement au bleu de méthylène est également efficace sur les virus à enveloppe comme le traitement solvant-détergent (Müller-Breitkreutz and Mohr, 1998), (Abe et al., 2000), ainsi que pour le West Nile Virus (Mohr et al., 2004). Par contre, son efficacité est plus ou moins variable sur les virus non enveloppés, inefficace contre le virus de l'hépatite A (VHA) mais agissant contre le parvovirus B19 (Mohr et al., 1997). Le BM a une efficacité anti-parasitaire, notamment sur le *Trypanosoma cruzi*, agent de la maladie du Chagas (Gironés et al., 2006).

Ce traitement entraîne, tout comme le traitement solvant-détergent, des altérations de protéines plasmatiques, telles que les facteurs de coagulation V, VIII, XI et le fibrinogène (Garwood et al., 2003). Ce procédé fera l'objet d'un autre chapitre ultérieurement.

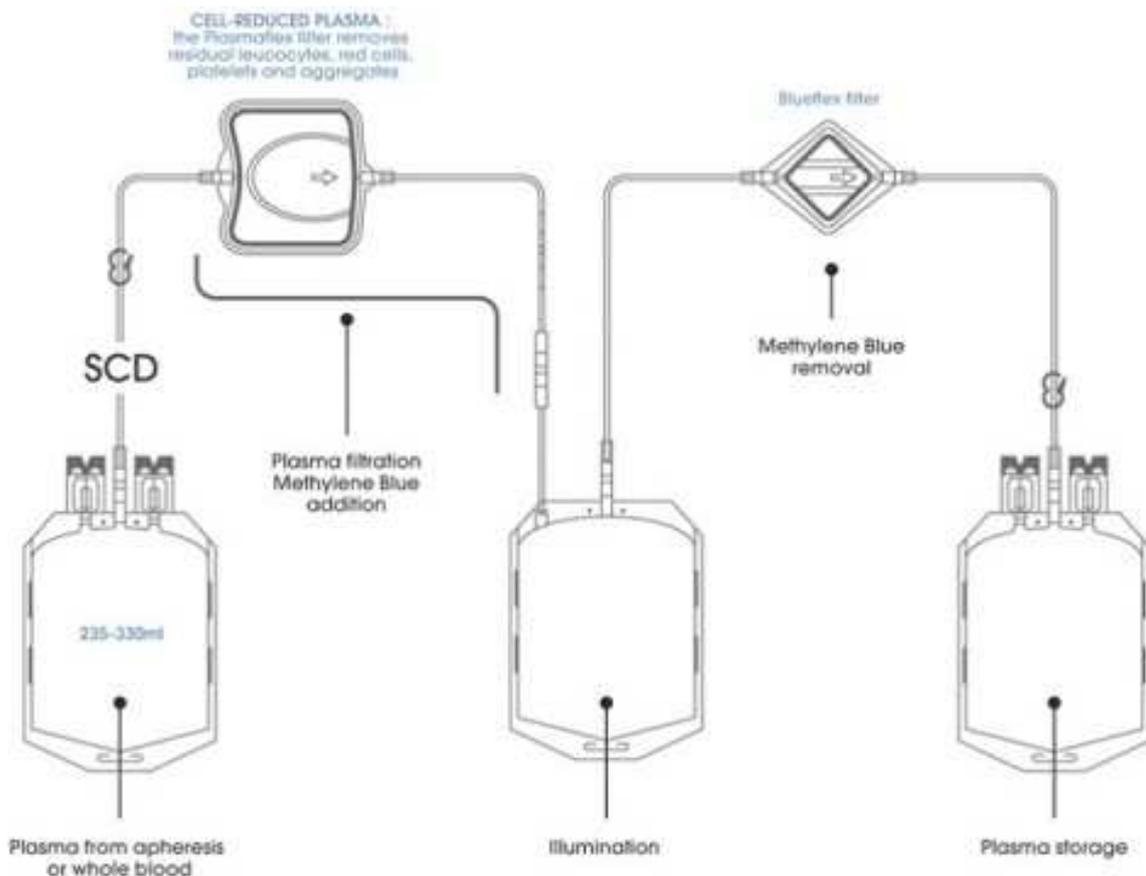


Figure 3 : Système *Theraflex*®

Cependant, l'ANSM a demandé l'arrêt progressif de l'utilisation du PVA-BM par un communiqué publié le 12 octobre 2011.

Dans ce communiqué, trois informations sont à souligner :

- « l'Afssaps (nouvellement ANSM) a mis en évidence des manifestations allergiques rares survenant lors de la transfusion du plasma BM (1 cas sur environ 16 000 poches de plasmas transfusées). Ces manifestations sont plus fréquentes qu'avec les autres types de plasma. »
- « le contrôle continu de la qualité des produits sanguins labiles, réalisé conjointement par l'Afssaps et l'EFS, a permis d'identifier une plus grande variabilité de la concentration en fibrinogène dans le plasma BM que dans les autres plasmas thérapeutiques. L'abandon du plasma BM est ainsi une mesure qui répond à une logique de sécurité renforcée mais aussi à l'optimisation de la qualité des produits de transfusion. »

- « l'Afssaps a décidé de demander le retrait du plasma BM de la liste des produits sanguins autorisés. Afin de garantir totalement la couverture des besoins en plasma, la substitution du plasma BM par les deux autres types de plasma est organisée de manière progressive jusqu'au mois de mars 2012, en étroite collaboration avec l'EFS. »

### ***1.1.3.2.3 Le plasma viro-inactivé à l'amotosalen (technique intercept®)***

L'amotosalen est un psoralène synthétique (psoralen S-59) créé pour inactiver les pathogènes potentiellement présents dans les produits (Figure 4). Ce composé hydrophile a une forte affinité avec les acides nucléiques, s'intercalant entre ceux-ci. Après exposition aux UVA, il forme une liaison stable entre les chaînes d'acides nucléiques. Le traitement à l'amotosalen est efficace sur tous types de virus enveloppés, et a une action variable sur les non enveloppés (Alter, 2008; Wollowitz, 2001). Traitement anti-parasitaire contre le *Plasmodium falciparum* (paludisme), et le *Babesia microti* (babésiose) (Grellier et al., 2008) ou encore le *Trypanosoma cruzi* (Van Voorhis et al., 2003).



**Figure 4 : Système Intercept®**

Ce processus de viro-inactivation entraîne également une altération de certaines protéines du plasma (facteurs VIII et fibrinogène), (Osselaer et al., 2008).

#### ***1.1.3.2.4 Le plasma sécurisé par quarantaine***

Le plasma sécurisé est réalisé sur un don de plasmaphérèse. Comme tout don de plasma, il est stocké et congelé, mais il est gardé au minimum 60 jours, le principe étant qu'au bout de ce laps de temps, le donneur qui a fourni le plasma renouvelle son don. Si le deuxième don est négatif aux tests sérologiques de qualification, alors le produit issu du premier don sera « libéré » et apte à être transfusé. Cette procédure permet de s'affranchir de la fenêtre sérologique silencieuse. Ce produit a été supprimé en 2010.

#### ***1.1.3.2.5 Le plasma viro-atténué par pasteurisation***

Ce procédé consiste à utiliser un *pool* de 100 dons de plasma et à les faire chauffer pendant 10 heures à 60 °C. Des tests ont montré son efficacité sur les virus enveloppés et non enveloppés (Burnouf-Radosevich et al., 1993). Ce procédé est en cours de validation par l'ANSM et il fera l'objet d'un chapitre spécifique.

#### ***1.1.3.2.6 Le plasma lyophilisé***

Le plasma lyophilisé (PLYO) est préparé préférentiellement à partir de plasma frais congelé traité par l'amotosalen (PFC-IA). Il peut aussi être préparé à partir de plasma sécurisé par quarantaine (PFCSe) mais ce type de préparation est suspendu depuis 2010. Le plasma lyophilisé est aujourd'hui distribué aux unités médico-chirurgicales militaires déployées en Opérations Extérieures (OPEX) pour répondre aux contraintes logistiques du contexte opérationnel et à la nécessité de disposer, sans délai, de plasma thérapeutique pour le traitement des blessés hémorragiques. En milieu civil, le PLYO pourrait être utilisé par les établissements de santé présentant des difficultés logistiques majeures ne permettant pas d'assurer une chaîne du froid négative ou dans les situations d'extrême urgence avec nécessité d'un apport de plasma thérapeutique sans délai. Dans cette deuxième indication, le PLYO devrait être utilisé en attendant que le plasma frais congelé soit décongelé et disponible, nécessitant entre 45 minutes et 1h30 de décongélation, le PLYO pouvant être disponible en quelques minutes.

Le PLYO est obtenu par lyophilisation à partir d'un mélange de PFC-IA issus d'aphérèse, provenant de 10 donneurs différents au maximum, de groupes sanguins A, B, et AB, exempts d'anticorps immuns anti-A ou anti-B, conservés à une température inférieure ou égale à -

25°C. Le mélange, dans des proportions choisies, permet d'obtenir un plasma à usage universel pour le groupage sanguin.

Le PLYO se présente sous la forme d'une poudre dont l'humidité résiduelle ne dépasse pas 2%. Il est conditionné en flacon de verre stérile et apyrogène et conservé à température ambiante. Sa péremption est fixée à 2 ans. Il est aujourd'hui autorisé à être fabriqué par le seul CTS des Armées.

## **1.2 Etapes de préparation nécessaires à la production de concentrés plaquettaires et de plasma**

Au cours de ces travaux de thèse, différents procédés propres à l'élaboration des PSL ont été utilisés. Cette partie décrit les différents principes et technologies utilisées pour préparer ces produits.

Le sang total est la matière première des PSL. Ces derniers correspondent à un concentré d'un des éléments qui compose le sang (érythrocytes, thrombocytes, granulocytes et plasma). Les PSL sont donc l'aboutissement de procédés de préparation qui tendent à concentrer le produit actif et n'apporter au malade que ce dont il a besoin.

Les principales étapes de préparation sont les suivantes:

- Le prélèvement
- La déleucocytation
- La centrifugation
- La séparation
- Ajout de solution de conservation
- Le fractionnement du plasma

### **1.2.1 Le prélèvement**

Il utilise un dispositif à usage unique ou dispositif médical à usage unique (DMU). Etant de matière plastique, ce dernier est déformable, peut être manipulé tout en restant clos. Il permet de réaliser l'étape de déleucocytation et les étapes de transformation telles que l'ajout de solution de conservation. Une désinfection rigoureuse et méthodique du site de ponction garantit une absence de contamination bactérienne du produit.

### 1.2.2 La centrifugation

La centrifugation est un procédé physique permettant de séparer des constituants de taille et de masse très variables contenus dans un liquide, depuis des molécules jusqu'à des cellules entières. En faisant tourner l'échantillon, la force centrifuge est mise en jeu, qui se caractérise par une accélération qui s'exerce radialement vers l'extérieur de l'axe de rotation. L'accélération obtenue, notée  $g$ , est fonction de la vitesse angulaire de rotation et de la distance à l'axe de rotation dont la formule est la suivante :

$$g = w^2 r = 1,119 \times 10^{-5} \times r \times n^2$$

$w$  : vitesse angulaire (rad/s);  $r$  : distance à l'axe de rotation ;  $n$  : nombre de rotations par minute (rpm);

Largement utilisée dans la préparation des PSL à partir de dons de sang total, ce même principe est appliqué lors de l'aphérèse (éluatriation) séparant ainsi les différents composants du sang (exemple de machine à aphérèse : MSC+ de chez Haemonetics). La densité des cellules, leurs formes, la densité du liquide, la température et la force centrifuge relative va permettre la séparation en phase des éléments du sang (Tableau 1).

	Volume moyen ( $\mu\text{m}^3$ )	Diamètre ( $\mu\text{m}$ )	Densité (g/ml)
Plasma			1,026
Plaquettes	9	2-4	1,058
Leucocytes	230-470	7.5-30	1,062-1,089
Erythrocytes	87	7	1,1

**Tableau 1°: Propriétés physiques des différents constituants du sang**

Ainsi, une fois centrifugée, la poche de sang se retrouve composée de trois couches (Erythrocytaire, leuco-plaquettaire et plasmatique ; Figure 5).



**Figure 5 : Poche de sang après centrifugation**

(Photo de gauche : posée sur une presse manuelle ; photo de droite : les trois phases du sang)

### 1.2.3 Séparation des produits sanguins

Cette étape succède à la centrifugation, mais uniquement de la poche de sang total. L'objectif est de prélever individuellement chaque constituant du sang dans des poches de recueil (poche de plasma, de CGR et une poche contenant le *buffy coat* (couche leuco-plaquettaire). Généralement l'étape est semi-automatisée (Compomat<sup>®</sup> G4, Fresenius Kabi, Allemagne) (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**), permettant l'ajout automatique d'une solution de conservation dans les concentrés globulaires. Cette étape permet également de standardiser les poches contenant la couche leuco-plaquettaire (volume, hématocrite, quantité d'hémoglobine résiduelle), nécessaires pour l'obtention de mélange de concentré de plaquettes (MCP) standard.



**Figure 6°: Compomat® G4**

### **1.2.4 La déleucocytation des produits sanguins labiles**

Elle consiste à éliminer la majeure partie des leucocytes par filtration sélective de ces derniers, tout en préservant les autres éléments cellulaires ou plasmatiques. En France, la déleucocytation est réalisée systématiquement sur tous les produits cellulaires depuis 1998, puis depuis 2001 pour les produits plasmatiques (Ministère des Affaires Sociales, de la Santé et de la Ville, 1998). Le taux de leucocytes résiduels ne doit pas dépasser  $1 \times 10^6$  cellules par don pour les produits cellulaires,  $1 \times 10^6/l$  pour le plasma destiné au fractionnement,  $1 \times 10^4/l$  pour l'usage thérapeutique (Ministère des Affaires Sociales, de la Santé et de la Ville, 1994). La déleucocytation joue sur deux paramètres, une meilleure conservation des dons cellulaires et une diminution des risques liés à la transfusion chez le receveur notamment sur le risque de transmission de la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob.

#### **1.2.4.1 La déleucocytation augmente la qualité de conservation**

La déleucocytation d'un CGR ou d'un don de plaquettes entraîne la diminution des concentration d'ATP, de glucose et diminue la production en lactate, améliorant ainsi sur la conservation des cellules, (Pietersz et al., 1989°; Riedner et al., 1990). Les enzymes leucocytaires ont un effet délétère sur les cellules d'intérêts, entraînant une hémolyse de ces dernières (Högman et al., 1978a). Une filtration précoce permet donc de prévenir ces lyses (Högman and Meryman, 1999). Cependant la déplétion en leucocytes se faisant par filtration, elle entraîne une diminution de l'hémoglobine des CGR et du nombre de plaquettes initiales (Masse, 1993). La conséquence de ce procédé est d'entraîner une augmentation du nombre de poches transfusées chez un patient.

#### **1.2.4.2 La déleucocytation entraîne une diminution des risques transfusionnels**

La déleucocytation minimise le risque d'accidents transfusionnels (effet iatrogènes) tel que l'allo-immunisation via le système HLA (*human leucocyte antigen*), des réactions d'intolérance de type frissons et hyperthermie, des transmissions directes de micro-organismes variés, des réactivations virales, des réactions du greffon contre l'hôte (GvH) aiguës chez les receveurs immuno-incompétents ou encore un état d'immuno-suppression post-transfusionnel (Lane, 1994).

#### **1.2.4.2.1 Le système HLA**

Découvert en 1954 par Dausset (Dausset, 1958) sur les cellules leucocytaires, puis par une équipe de Leiden (Van Rood and Van Leeuwen, 1963), le système HLA est une composante du système CMH (complexe majeur d'histocompatibilité), le système protéique impliqué dans la reconnaissance du soi et du non soi par le système immunitaire (Figure 7).

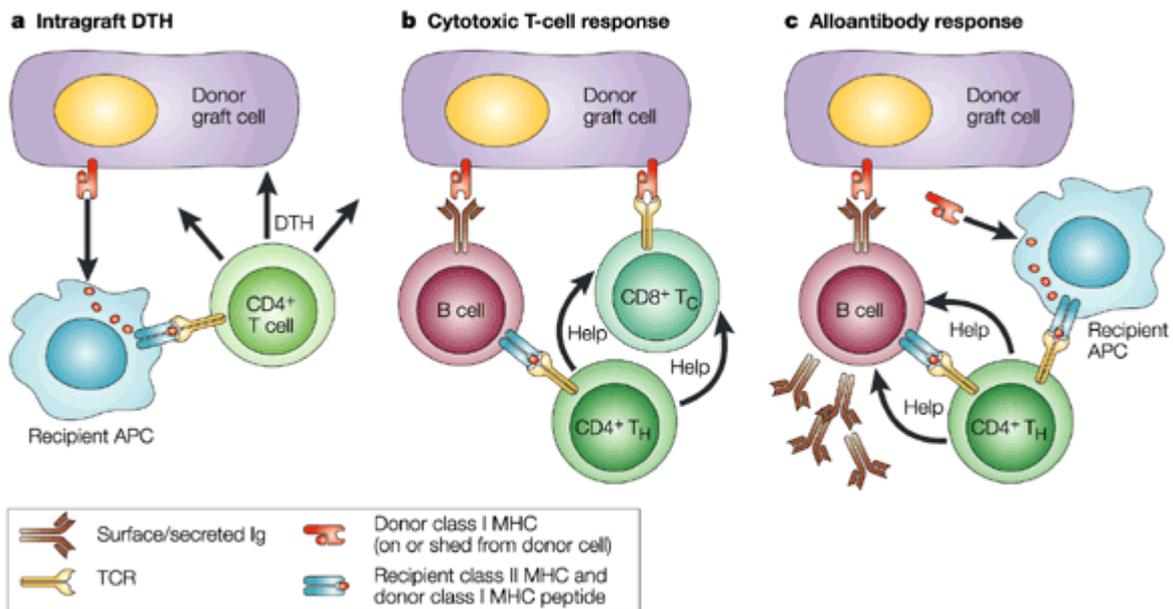
Il existe deux types de classe de HLA : classe I et classe II.

La classe I regroupe des molécules présentes sur la quasi-totalité des cellules nucléées de l'organisme. Les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques ou encore les macrophages sont les plus riches de ces molécules de HLA de classe I (de même pour les cellules épithéliales et endothéliales).

La classe II, exprimée essentiellement par les cellules du système immunitaire (lymphocytes B, monocytes, cellules macrophagiques et dendritiques), sert notamment à ces cellules pour présenter les peptides antigéniques spécifiques du corps étranger aux lymphocytes T, générant ainsi la réponse immunitaire dite spécifique.

Le système HLA est à l'origine des allo-immunisations en transfusion, étant une molécule antigénique présente sur les leucocytes, le HLA du donneur, différent de celui du receveur, entraînera une forte réaction immunitaire à l'encontre du HLA étranger, entraînant ainsi des transfusions inefficaces. Les complications connues dues au système HLA sont le TRALI (*transfusion-related acute lung injury*), un syndrome de détresse respiratoire aigu post-transfusionnel et le TACO (*transfusion-associated circulatory overload*), un œdème aigu pulmonaire de surcharge (Holness et al., 2004°; Popovsky et al., 1983°; Stainsby et al, 2006).

Le système HLA n'étant pas présent sur les cellules anucléées comme les érythrocytes. La déleucocytation permet de rendre le produit transfusionnel transparent au système immunitaire du receveur.



Nature Reviews | Immunology

**Figure 7 : Le système HLA**  
(Bradley et al. 2002)

#### 1.2.4.2.2 Le frisson hyperthermique

Le syndrome « frissons-hyperthermie » ou FNHTR (*Febrile Non Hemolytic Transfusion Reaction*) est une élévation de la température de minimum 1°C au cours de la transfusion du CGR chez le patient. Aucune étude n'a réellement montré une réelle corrélation entre un produit transfusé non déleucocyté et l'apparition de la réaction d'intolérance, mais malgré tout une réduction sensible de leur fréquence d'apparition avec la transfusion de CGR déleucocyté a été constatée (Rennie et al., 2001).

#### 1.2.4.2.3 La transmission de micro-organismes intra-cellulaires

Hormis l'allo-immunisation, les leucocytes peuvent être des vecteurs viraux. La déleucocytation est alors préventive pour la transmission de virus intraleucocytaires tels que le CMV (cytomégalovirus) et les virus HTLV (Human T cell leukemia /lymphoma Virus). Mais elle permet également de diminuer la transmission de virus intra ou extracellulaire en diminuant la charge virale (virus des hépatites, VIH, HHV6 (Human herpesvirus 6)).

### *Le Cytomégalo­virus (CMV ou HHV5)*

Virus à ADN du sous-groupe des *bé­ta herpesviridae*, comme tous les virus Herpès, il est présent durant toute la vie de l'hôte infecté, demeurant sous une forme endormie ou latente (hormis la période de primo infection) dû aux systèmes immunitaires de l'hôte infecté. De transmission très facile sous forme libre dans les sécrétions corporelles (salive, lait, urine, etc...), une grande partie de la population mondiale de nos jours est infectée par ce virus (Emery et al., 1999).

Dans le sang, il n'est généralement pas sous sa forme libre, mais logé au sein des leucocytes (polynucléaires ou monocytes selon la phase d'infection), (Taylor-Wiedeman et al., 1991), (Taylor-Wiedeman et al., 1993).

Même la transmission du CMV par transfusion chez un receveur immunocompétent n'entraîne pas de symptôme ou alors entraîne un syndrome mononucléosique sans réelle conséquence (prévalence de l'ordre de 1 à 2%), (Klemola and Kääriäinen, 1965; Wilhelm et al., 1986). Ce sont surtout pour les populations à risque que la prévention est nécessaire. Les populations à risque sont surtout les nouveau-nés prématurés, les patients atteints de leucémies aiguës ou encore les patients traités par allogreffes de cellules souches hématopoïétiques, les personnes immunodéprimées (VIH ou traitement de transplantation). Ces populations peuvent être atteintes de symptômes graves voire létaux dus à l'infection par CMV (Ljungman and Plotkin, 1995).

### *Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)*

Responsable du SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise), ce virus infecte notamment les lymphocytes T CD4+ et macrophages (Nájera et al., 1987). Ces lymphocytes, au rôle central dans le système immunitaire spécifique, diminuent en nombre à cause de l'infection rendant le système de défense de l'hôte inefficace, le sujet devenant alors sensible à toutes infections bactériennes et virales.

La déleucocytation entraînant la diminution drastique des globules blancs, dont les lymphocytes T auxiliaires, permettrait donc de diminuer la charge virale du produit (sous réserve d'une contamination), (Rawal et al., 1991).

### *Autres transmissions*

Le virus Epstein-Barr (EBV), de la famille des *herpesviridae*, dont le symptôme le plus courant est la mononucléose infectieuse, est contenu dans les lymphocytes B (Crawford et al., 1978). 80 à 90 % de la population mondiale adulte est porteuse. Même si l'infection post-

transfusionnelle par l'EBV est généralement asymptomatique, il en est tout autrement chez les receveurs immunodéprimés. La déleucocytation réduirait également la charge virale de ce dernier (aucune étude à ce jour).

Il en est de même pour les virus HTLV contenus dans les lymphocytes T, pour lesquels la déleucocytation, même insuffisante pour éliminer la présence du virus (Pennington et al., 2002), pourrait réduire l'incidence de la transmission.

La déleucocytation permet de lutter contre la transmission de la bactérie *Yersinia enterocolitica*, de la famille des entérobactéries, qui est à l'origine de septicémies mortelles. Même si les cas d'infection sont rares, environ la moitié d'entre elles sont mortelles (Guinet et al., 2011). La bactérie alors phagocytée par les leucocytes peut résister à ces derniers, la conservation à 4°C des CGR va empêcher l'action des phagocytes et une fois que ces derniers disparaîtront, les bactéries se retrouveront libres dans le CGR et se multiplieront. La filtration des leucocytes contaminés diminue donc l'infection par la bactérie et la présence de leurs endotoxines.

Les bénéfices de la déplétion en leucocytes sont donc multiples : prévention de l'allo-immunisation anti-HLA et réactions de type frissons-hyperthermie, amélioration de la survie du greffon, prévention de la transmission de virus ou bactérien.

### **1.2.5 L'addition de solutions de conservation et la déplasmatisation**

L'addition de solution de conservation et la déplasmatisation ont pour but d'améliorer et de prolonger la conservation des produits sanguins cellulaires s'appliquant tant aux concentrés de globules rouges qu'aux mélanges de concentrés standards de plaquettes et aux concentrés de plaquettes issus d'aphérèse.

Concernant les concentrés globulaires, Simon a montré en 1962 que l'ajout d'adénine dans le sang total permet de prolonger la durée de conservation (Simon, 1962). Toutefois, c'est en 1978 que la solution de conservation est devenue opérationnelle (Högman et al., 1978b°; Högman et al., 1978a°; Beutler and West, 1979) et en 1983 la solution SAGM (*saline Adenine Glucose Mannitol*) fut officialisée (Högman et al., 1983). Grâce à cette solution de conservation, les CGR voient leur temps d'utilisation doublé (42 jours contre 21 jours) (Nakao et al., 1962°; Herve et al., 1980).

Pour les concentrés plaquettaires, les premières solutions de conservation des plaquettes ont été développées dès la fin des années 1980 (Holme et al., 1987), et leur usage commence à se généraliser (De Wildt-Eggen and Gulliksson, 2003). Ces solutions de conservation ou *platelet*

*additive solution* (PAS) (InterSol Solution, Fenwal (France) ; T-sol, Baxter (France) ; SSP, Macopharma (France) ; Plasma-Lyte A, Baxter (France), Composol, Fresenius Kabi (Allemagne)) permettent d'accroître la qualité des plaquettes transfusées (Van der Meer, 2007a°; Chandra et al., 2011). Les PAS sont composées d'acétate pour l'apport énergétique dont la consommation génère du bicarbonate conférant un pouvoir tampon. Le glucose peut être un composé mais son utilisation génère une diminution du pH. D'autres substances tampons comme le phosphate composent ces PAS (Ringwald et al., 2006) comme la L-carnitine qui permet d'abaisser le métabolisme plaquettaire tout en inhibant l'apoptose. Ces qualités associées à l'absence de plasma font que ces solutions additives de plaquettes tendent à devenir indissociables des futurs produits plaquettaires. En effet, la substitution d'une partie du plasma par une solution de conservation entraîne une diminution des réactions post-transfusionnelles liées (Oksanen et al., 1994; De Wildt-Eggen et al., 2000; Azuma et al., 2009), les produits plaquettaires n'étant plus que composés que de 30 à 35% de plasma. Bien qu'il n'existe pas d'étude faisant le lien direct entre les diminutions entre les incidents de type TRALI (*Transfusion-related Acute Lung Injury*) et le remplacement du plasma par la solution additive, on peut s'attendre à une diminution de ces incidents (Irsch & Lily Lin 2011). La qualité fonctionnelle des concentrés plaquettaires sous solution additive est conservée *in vitro* et ne semble pas diminuée *in vivo* (Van der Meer, 2007b). L'utilisation de solution additive a un autre avantage, les nouveaux systèmes d'inactivation virale ne sont utilisables que sur des concentrés de plaquettes en solution de conservation (Lin et al., 1997; Hechler et al., 2012).

### 1.2.6 Le fractionnement du plasma

Tous les dons ne sont pas destinés à être utilisés en produits transfusionnels. Il est possible d'en extraire des protéines d'intérêt pour fabriquer des médicaments, les Médicaments Dérivés du Sang (MDS). Ces médicaments sont élaborés à partir de mélanges de plasma par fractionnement physico-chimique (Cohn et al., 1944; Kistler and Nitschmann, 1962). La Figure 8 représente les procédures de fractionnements successifs pour obtenir l'isolement de facteurs de coagulation tels que les facteurs VIII et IX (Burnouf, 2007).

En France, le LFB est le seul établissement autorisé à extraire ces protéines à partir de plasma collecté en France par l'EFS.

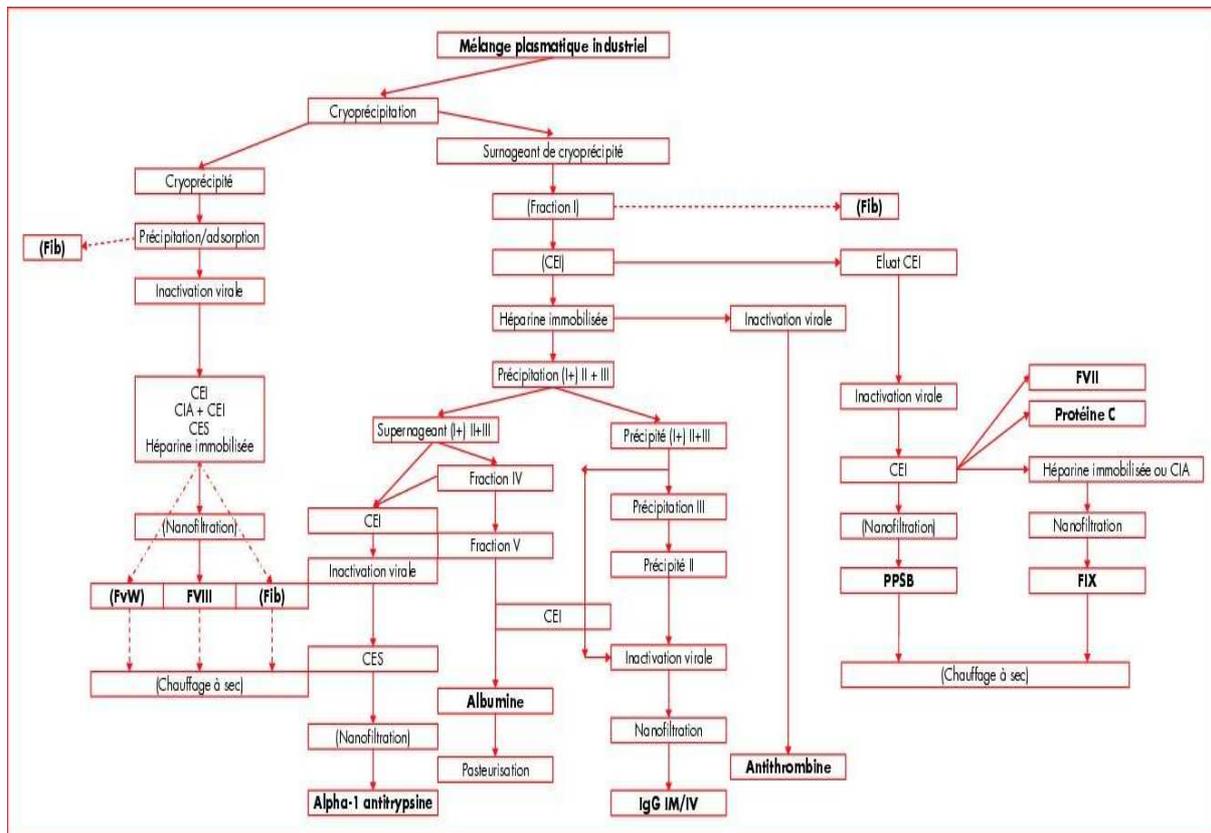
Il est ainsi possible de fabriquer des facteurs de la coagulation tels que le :

- Facteur VIII anti-hémophilique A
- Facteur IX anti-hémophilique B

- Facteur von Willebrand
- Fibrinogène
- Complexe prothrombinique
- Facteur VII, XI ou encore XIII

mais également des immunoglobulines humaines et de l'albumine.

La première étape de fractionnement du plasma est la cryoprécipitation permettant de séparer la composante plasmatique en deux. Ce fractionnement est dû à une décongélation lente à +4°C du produit plasmatique qui entraîne la cryoprécipitation de certaines protéines dont le Facteur VIII, le fibrinogène et le facteur von Willebrand. Le surnageant du cryoprécipité contient notamment de l'albumine, de l' $\alpha$ -1-antitrypsine, des facteurs de coagulation et IgG.



**Figure 8 : Schéma représentant le fractionnement possible pour l'isolement de diverses protéines plasmatiques à partir de cryoprécipitation plasmatique.**  
(Burnouf 2007)

## **1.3 La sécurisation des dons**

### **1.3.1 Qualification biologique des dons de sang**

La qualification biologique des dons de sang (QBD) désigne aujourd'hui, un ensemble d'analyses biologiques effectuées sur un échantillon de sang prélevé chez un donneur. Les caractéristiques du don et des produits qui en découlent sont définies et il on peut alors savoir si ce don et les produits qui en découlent seront ou non utilisables en thérapeutique. En matière de sécurité transfusionnelle, la QBD répond à la règle du « tout ou rien ».

#### **1.3.1.1 Objectifs de la qualification biologique des dons**

La QBD permet :

- de définir les caractéristiques immuno-hématologiques du don et du donneur, de les confronter avec les données antérieures éventuelles du donneur et s'assurer de la compatibilité immunohématologique des PSL transfusés
- d'assurer la sécurité vis-à-vis des agents transmissibles par le sang dépistés, de comparer les résultats aux éventuels dons antérieurs du même donneur
- de réaliser ces analyses dans le temps, compatibles avec l'utilisation optimale des différents PSL et avec une fiabilité maximale
- de valoriser les différents PSL en fonction de leurs caractéristiques immuno-hématologiques (étape de qualification), et de leurs caractéristiques sérologiques établies lors des dépistages
- d'informer et d'orienter le donneur (caractéristique phénotypique rare, sérologies positives)
- de participer à l'hémovigilance en cas de séroconversion
- de participer à la vigilance des circuits en cas de discordance de résultats chez un donneur antérieurement connu
- de prendre en compte des données de résultats de la qualification pour le suivi épidémiologique régional et national des donneurs, sous la responsabilité de l'InVS, afin d'enrichir les éléments participant à la sécurité transfusionnelle et participer aux améliorations à mettre en place

### **1.3.1.2 Une sécurisation évolutive vis-à-vis des maladies transmissibles**

Les tests de dépistage des maladies transmissibles par le sang ne s'appliquent qu'à peu d'agents, à l'origine de pathologies infectieuses chroniques. Pour ces maladies, les patients ne sont que peu, voire pas du tout immunisés, avec des incubations longues et silencieuses méconnues du donneur, et une circulation de l'agent infectieux dans le sang ou les cellules sanguines. Tous ces critères font que ces maladies ont une forte probabilité de transmission de cet agent. Beaucoup de ces agents sont d'origine virale. C'est surtout grâce à ces dépistages et aux veilles épidémiologiques que certaines épidémies ont pu être ainsi mises en évidence et que des mesures préventives ont pu être prises, par exemple pour l'épidémie de West Nile Virus aux Etats-Unis en 1999, (Jia et al., 1999), et l'épidémie du virus du chikungunya sur l'île de la Réunion en 2006 (Paganin et al., 2006). De même, le dépistage préventif de la maladie de Chagas et du virus de la dengue ont fait leur apparition en 2006-2007 pour éviter toute contamination par les PSL (Liumbruno et al., 2008; Bianco, 2008; Mohammed et al., 2008).

Avec les avancées technologiques et l'ouverture au grand public des lignes commerciales notamment aériennes à travers l'ensemble du globe, de nouvelles menaces de maladies sont apparues. Depuis la seconde moitié du XXème siècle, la sécurité de la transfusion de PSL n'a cessé de s'améliorer.

### **1.3.1.3 Quelques dates clés de l'amélioration de la qualification du don**

1952 : détection du groupe sanguin ABO et dépistage de la Syphilis

1959 : détection des anticorps immuns Anti-A et Anti-B

1971 : dépistage de l'antigène HBs du virus de l'hépatite B (Alter et al., 1972)

1985 : détection des anticorps anti-VIH (Peterman et al., 1987)

1986 : détection des anticorps anti-paludéens spécifique du paludisme

1988 : détection du virus de l'hépatite C par le dosage de ALAT (Alanine Amino Transferase) et amélioration de la détection de l'hépatite B par la détection des anticorps anti-HBc (Alter et al., 1981)(Koziol et al.)

1990 : amélioration de la détection du virus de l'hépatite C (Anticorps anti-VHC) (Alter et al., 1989)

1991 : détection des anticorps du virus HTLV en métropole

2001 : Dépistage des génomes viraux du VIH1 et du VHC (NAT : nucleic acid amplification testing) (Roth et al., 1999; Burnouf and Radosевич, 2000)

2004 : dépistage génomique temporaire du WNV

2005 : dépistage du génome viral du virus de l'hépatite B (Lefrère et al., 1999)

2006 : dépistage de m'Anti-T indicateur de la maladie de Chagas (Blejer et al., 1999) et dépistage génomique du virus du chikungunya

2007 : dépistage des anticorps dirigés contre le virus de la dengue

2008 : Dosage de l'hémoglobine et hémogramme lors du don de sang

2010 : dépistage génomique viral du VHB

#### **1.3.1.4 Analyses et dépistages permettant la qualification biologique des dons**

Selon le code de la santé publique (Art. D. 1221-6) (Tableau 2), certaines analyses sont obligatoires sur tous les dons, d'autres analyses sont réalisées en fonction des données de l'entretien pré-don.

Selon l'article art. D. 1221-7, le sang et ses composants ne peuvent être utilisés en vue de préparer des produits sanguins labiles destinés à un usage thérapeutique direct que si les résultats des tests de dépistage sont négatifs. L'article art. D. 1221-8 permet des dérogations possibles pour le sang ou ses composants prélevés en vue de préparer des PSL destinés à la transfusion autologue.

Les analyses biologiques et tests de dépistage suivants sont effectués sur chaque prélèvement de sang ou de composant du sang destiné à la préparation de produits sanguins labiles à usage thérapeutique direct ainsi que sur chaque donneur avant tout prélèvement de cellules souches hématopoïétiques ou de cellules somatiques mononucléées destinées à la réalisation de préparations cellulaires :

1° La détermination des groupes sanguins érythrocytaires, qui comprend :

a) La détermination du groupe dans le système ABO ;

b) La détermination du groupe Rh D (RH1) et, en cas de Rh D négatif (RH :-1), la détermination des autres antigènes du système rhésus : C (RH2), E (RH3), c (RH4) et e (RH5) ;

2° La recherche des anticorps anti-érythrocytaires pouvant avoir une incidence clinique transfusionnelle ;

3° La détection des anticorps anti-A et anti-B immuns ;

4° Le dosage de l'hémoglobine ou la détermination de l'hématocrite ;

5° Les tests et analyses biologiques suivants en vue du dépistage de maladies transmissibles :

a) Le dépistage sérologique de la syphilis, la recherche de l'infection par l'agent de la syphilis peut être réalisée en différé, dans les heures ouvrables suivant le prélèvement de cellules souches hématopoïétiques ou de cellules somatiques mononucléées destinées à la réalisation de préparations cellulaires ;

b) La détection de l'antigène HBs ;

c) La détection des anticorps anti-VIH 1 et anti-VIH 2 ;

d) La détection des anticorps anti-VHC ;

e) La détection des anticorps anti-HTLV-I et anti-HTLV-II ;

f) La détection des anticorps antipaludéens chez les donneurs ayant séjourné dans une zone d'endémie dans les conditions fixées par l'arrêté prévu à l'article [R. 1221-5](#) ;

g) La détection des anticorps anti-HBc.

**Tableau 2°: Art. D. 1221-6 du code de la santé publique**

### 1.3.1.5 Sécurisation par traitement pro-actif

La sécurité des produits sanguins labiles s'est développée grâce à la mise en œuvre de plusieurs mesures nécessaires et complémentaires. Mais malgré la « sélection » médicale et biologique du donneur, les tests de dépistage des différents virus transmissibles (par l'étude de la présence d'anticorps et plus récemment génomique), la déleucocytation systématique des PSL, il persiste un risque résiduel d'infection (Barbara, 2004b; Barbara, 2004a). Ce risque varie en fonction du type de PSL, risque bactérien avec les concentrés de plaquettes conservés à 22°C (Benjamin, 2005) ou parasitaires avec les CGR. Le risque persiste également avec des virus connus dont on ne dispose pas de test de dépistage utilisables en transfusion (souche virale variante non dépistable, mauvaise sensibilité de test, examen pratiqué dans la fenêtre sérologique du donneur, ou patient immuno-silencieux).

La mise en place de tests sérologiques et de dépistage génomique viral a cependant démontré son efficacité. En 2003, selon l'InVS, le risque de transmission du VIH par transfusion est de l'ordre de 1/3150000 dons, 1/10000000 pour le VHC, 1/640000 pour le VHB (Pillonel and Laperche, 2005) mais il persiste malgré tout un risque d'infection. De même le risque de contamination bactérienne de la poche de prélèvement persiste malgré les précautions prises au moment du prélèvement qui est une étape propice à la contamination (désinfection du site de phlébotomie, diversion des premiers millilitres de sang (35 ml), déleucocytation) notamment pour les concentrés plaquettaires conservé à 22°C, température idéale pour le développement bactérien (Hillyer et al., 2003).

Les modifications épidémiologiques mondiales et les voyages jouent un rôle important dans l'émergence de nouveaux virus émergents, comme ce fut le cas pour le WNV, le virus du chikungunya ou encore le coronavirus de la grippe aviaire responsable du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) apparu en Chine en 2002. La possibilité de transmission par transfusion d'un prion pathologique, variant de la maladie de Creutzfeld-Jacob, reste une menace potentielle, puisqu'il n'existe ni test de dépistage chez le donneur, ni méthode d'élimination dans les PSL (Blajchman et al., 2004; McCutcheon et al., 2011). De plus le risque infectieux est accru chez les receveurs atteints d'un syndrome immunodéficitaire primaire ou secondaire (Allain et al., 2005).

Les tests actuellement utilisés sont limités en partie par la fenêtre sérologique d'apparition des anticorps, du faible nombre de copies virales que les tests peuvent détecter, de la survenue de

virus, de bactéries ou protozoaires émergents. Pour pallier à ces limitations, une inactivation des pathogènes dans les produits sanguins labiles est utilisée. Il s'agit de méthodes proactives qui ont déjà fait leurs preuves sur certains produits, à savoir le plasma, avec pour la plupart d'entre elles une absence de toxicité et d'effet secondaire majeur des plasmas thérapeutiques et autres MDS. Cependant d'après les dernières recommandations de l'ANSM, le traitement au bleu de méthylène du plasma a été arrêté progressivement jusqu'à son arrêt définitif depuis le 1 mars 2012 à cause de certains effets secondaires.

#### ***1.3.1.5.1 Les méthodes d'inactivation des agents pathogènes***

Il existe deux types de méthodes d'inactivation des pathogènes pour les PSL, les techniques photochimiques et les techniques biochimiques (Solheim, 2008).

L'inactivation virale a démarré avec le plasma thérapeutique il y a presque une vingtaine d'années, mais les procédés n'ont pas pu être étendus aux concentrés plaquettaires et globulaires car les substances utilisées (tri-n-butyl phosphate/triton, bleu de méthylène) détruisaient les cellules sanguines. D'autres procédés ont ensuite fait leur apparition et ont permis d'envisager l'inactivation des produits sanguins cellulaires.

##### **1.3.1.5.1.1 L'inactivation des agents pathogènes dans les concentrés plaquettaires par amotosalen (système Intercept®)**

L'amotosalen est un psoralène synthétique (S-59-HCl) sensible aux UVA. La molécule est un intercalant des acides nucléiques. Il va alors s'établir des liaisons réversibles avec l'ADN ou l'ARN des pathogènes. Puis ces liaisons deviennent irréversibles après illumination par des UVA formant ainsi des adduits qui interrompent les acides nucléiques toutes les 83 paires de bases empêchant toute répllication et synthèse protéique (Wollowitz, 2004) (Figure 9).

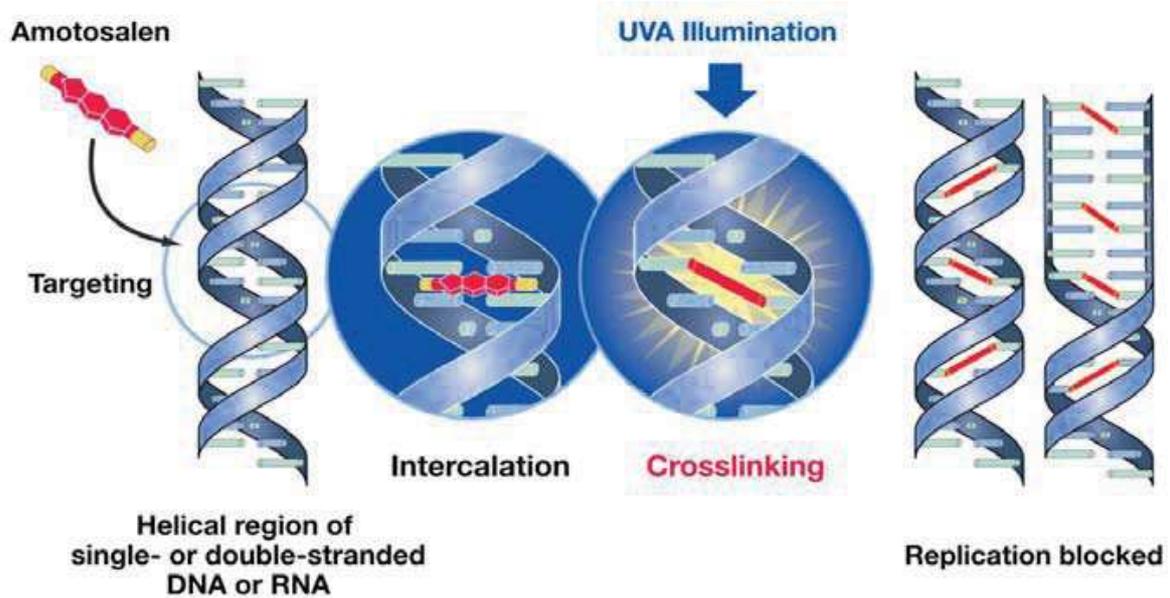


Figure 9 : Mécanisme d'action de l'amotosalen

Ce traitement inactive efficacement un grand nombre de virus enveloppés et non enveloppés, de bactéries Gram + et Gram - et parasites (Lin et al., 2005; Lin et al., 2004; Sawyer et al., 2007) (Tableau 3). Ce procédé permet également d'inactiver les lymphocytes résiduels (Grass et al., 1998), qui lorsqu'ils ne sont pas inactivés par irradiation gamma, sont responsables de la très grave réaction du greffon contre l'hôte chez les receveurs immunodéprimés. Le traitement au psoralène s'est avéré plus efficace que l'irradiation gamma pour la prévention de la GvH (Grass et al., 1999). Ce procédé a été validé par l'ANSM depuis peu pour le traitement du plasma thérapeutique. Le traitement entraîne la diminution du taux de facteurs de la coagulation et de leurs inhibiteurs naturels dans des proportions acceptables (Hambleton et al., 2002).

Viral Pathogens	Genome	Enveloped	Infectivity Log Reduction Amotosalen/UV-A Platelets
Human immunodeficiency 1/2	ss-RNA	+	>6.2 cell free; >6.1 cell associated
Human T-cell lymphotropic III	ss-RNA	+	4.7/5.1 cell associated
Hepatitis B	ds-DNA	+	>5.5
Hepatitis C	ss-RNA	+	>4.5
West Nile	ss-RNA	+	>6.0
Human erythro B19	ss-DNA	-	4.0-4.9
Cytomegalo	ds-DNA	+	>5.9 ± 0.3 cell associated
Microbial Pathogens	Gram	Aerobes Vs Anaerobes	Infectivity Log Reduction Amotosalen/UV-A Platelets
<i>Escherichia coli</i>	Neg	Aerobe	>6.4 ± 0.1
<i>Serratia marcescens</i>	Neg	Aerobe	>6.7 ± 0.1
<i>Klebsiella pneumonia</i>	Neg	Aerobe	>5.6 ± 0.2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Neg	Aerobe	4.5 ± 0.2
<i>Salmonella choleraesuis</i>	Neg	Aerobe	>6.2 ± 0.1
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Neg	Aerobe	>5.9 ± 0.2
<i>Enterobacter cloacae</i>	Neg	Aerobe	5.9 ± 0.1
<i>Staphylococcus aureus</i>	Pos	Aerobe	6.6 ± 0.1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Pos	Aerobe	>6.6 ± 0.1
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Pos	Aerobe	>6.8 ± 0.1
<i>Listeria monocytogenes</i>	Pos	Aerobe	>6.3 ± 0.1
<i>Corynebacterium minutissimum</i>	Pos	Aerobe	>6.3 ± 0.1
<i>Bacillus cereus</i>	Pos	Aerobe	>5.5 ± 0.2
<i>Lactobacillus species</i>	Pos	Facultative anaerobe	>6.4 ± 0.1
<i>Propionibacterium acnes</i>	Pos	Facultative anaerobe	>6.2 ± 0.2
<i>Clostridium perfringens</i>	Pos	Anaerobe	>6.5 ± 0.2
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Pos	Anaerobe	>6.0 ± 0.4
Microbial Pathogens	Class	Infectivity Log Reduction Amotosalen/UV-A Platelets	
<i>Treponema pallidum</i>	Spirochete	6.8-7.0	
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Spirochete	>6.9 ± 0.1	
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Protozoa	>5.3	
<i>Plasmodium falciparum</i>	Protozoa	>7.0	
<i>Leishmania mexicana</i>	Protozoa	>5.0	
<i>Leishmania major</i>	Protozoa	>4.5	

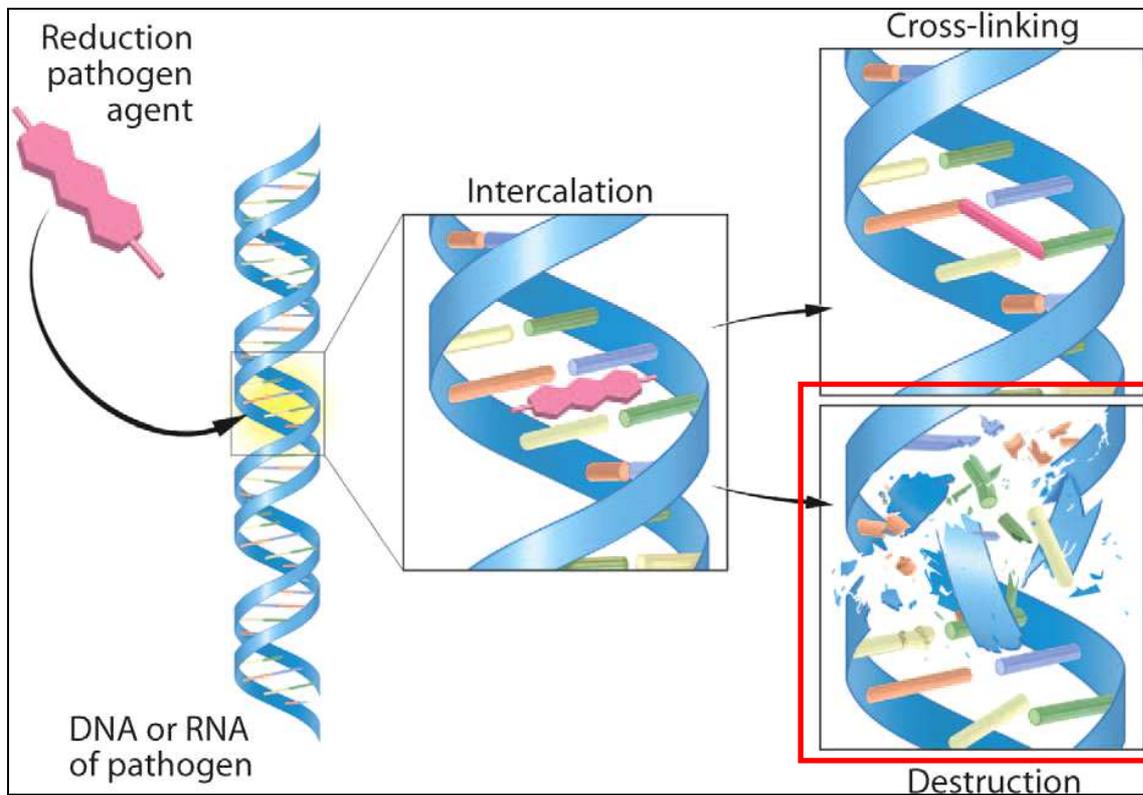
Tableau 3°: Inactivation des pathogènes par traitement à l'amotosalen (Bryant & Klein 2007)

### 1.3.1.5.1.2 L'inactivation des agents pathogènes dans les concentrés plaquettaires par riboflavine (système Mirasol®)

La riboflavine (ou vitamine B2) est très répandue dans les aliments naturels (céréales, levure de bière, foie, œufs et lait). Elle résulte de la combinaison d'une flavine (colorant jaune) avec un ribose.

La riboflavine a une structure moléculaire à 3 cycles (comme l'amotosalen) qui s'intercale entre les bases des acides nucléiques. La riboflavine est sensible à la lumière (UVA-UVB-UVC), ce qui va entraîner une photolyse par transfert d'électrons et réaction d'oxydation entraînant les cassures des ADN et ARN des pathogènes (Ruane et al., 2004) (Figure 10). La riboflavine, fixée sur la guanine, va oxyder cette dernière par transfert d'électron. Il va y avoir également formation de superoxyde, générant des radicaux de peroxyde et d'hydroxyle altérant également les acides nucléiques (Dardare and Platz, 2002). La riboflavine et ses

produits de dégradation, à savoir le luminochrome et la luminoflavine, ne sont pas toxiques, ces trois produits étant naturellement présents dans la nourriture et autres produits naturels (Hardwick et al., 2004). Le retrait ou l'adsorption de la riboflavine et de ses produits de dégradation n'est donc pas nécessaire avant injection du PSL. Tout comme l'amotosalen, la riboflavine montre un large spectre d'action sur les virus, les bactéries, les parasites et leucocytes résiduels (Goodrich, 2000) (Tableau 4). Cette viro-inactivation modifie peu les fonctions plaquettaires et leur taux de survie après transfusion reste quasi identique à un produit non traité (Reikvam et al., 2010). Des essais cliniques de phase III se sont déroulés entre 2005 et 2009 (2010), et ce traitement est actuellement autorisé dans différents pays européens tels que la Belgique ou la Pologne.



**Figure 10: Action de la riboflavine par destruction des acides nucléiques**

Viral Pathogens	Genome	Enveloped	Infectivity Log Reduction Riboflavin/UV-A Platelets
Human immunodeficiency 1/2	ss-RNA	+	5.93 ± 0.20 cell associated and cell free; 4.46 ± 0.39 intracellular
West Nile	ss-RNA	+	5.19 ± 0.50
PPV (surrogate for human erythro B19)	ss-DNA	-	≥5.03
Microbial Pathogens	Gram	Aerobes Vs Anaerobes	Infectivity Log Reduction Riboflavin/UV-A Platelets
<i>Escherichia coli</i>	Neg	Aerobe	≥4.38
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Pos	Aerobe	≥4.5
Microbial Pathogen	Class		Infectivity Log Reduction Riboflavin/UV-A Platelets
<i>Leishmania donovani infantum</i>	Protozoa		≥5.0

Tableau 4°: Inactivation des pathogènes par traitement à la Riboflavine (Bryant & Klein 2007)

#### 1.3.1.5.1.3 L'inactivation des agents pathogènes dans le plasma par pasteurisation

La pasteurisation est un traitement de chauffage de 10 heures à 60 °C à l'état liquide (Heimburger and Karges, 1989). L'inactivation virale est obtenue par la dénaturation des composés viraux par la chaleur inhibant notamment la réplication du pathogène. Traitement dénaturant des protéines, la pasteurisation requiert des stabilisants pour confiner dans des limites de 10 % à 30 % les pertes de l'activité biologique, restreindre le potentiel de dénaturation protéique et l'apparition d'agrégats (Mac Leod et al., 1984). Les agents protecteurs peuvent être spécifiques de certains constituants plasmatiques ; c'est le cas du caprylate de sodium et du tryptophanate de sodium, qui, par fixation sur la protéine, évitent la dénaturation thermique de l'albumine (Gellis and Neefe, 1948). D'autres, comme des sucres (sucrose) (Heimburger and Karges, 1989), des polyols (sorbitol) (Mac Leod et al., 1984), ou des acides aminés (lysine, glycine, arginine) (Horowitz et al., 1985b; Hilfenhaus et al., 1987), exercent une stabilisation globale de l'activité biologique des facteurs de coagulation, des inhibiteurs de protéases, ou des anticoagulants, ou inhibent les processus d'agrégation thermo-induits (immunoglobulines G).

Ce traitement a démontré une capacité à inactiver différents types viraux enveloppés ou non tel que le VIH, les virus de l'hépatite B et C (VHB et VHC) (Heimburger and Karges, 1989; Nowak et al., 1993; Gröner, 2008), le parvovirus B19 (Burnouf-Radosevich et al., 1993; Blümel et al., 2002).

#### **1.3.1.5.1.4 L'inactivation des agents pathogènes dans le plasma par traitement au Bleu de Méthylène**

Le bleu de méthylène (BM) ou chlorure de méthylthioninium appartient à la famille des phénotiazines, molécules couramment utilisées en pharmacologie comme antipsychotique.

Connu comme colorant dont le spectre d'adsorption se trouve entre 550 et 700 nm, il est sujet à une multitude d'applications dans de nombreux domaines : colorant alimentaire, antiseptique, indicateur d'oxydoréduction, colorant histologique (teintant notamment le collagène). Il permet le traitement de la méthémoglobinémie grâce à ses propriétés d'agent réducteur, mais est également utilisé en thérapie photo-dynamique pour certains cancers et autre infections (Mito et al., 2012; Tardivo et al., 2005; Lyon et al., 2012; Ascencio et al., 2007).

Cette propriété photosensible est due à la structure chimique des phénotiazines. Cette thérapie photo-dynamique est basée sur la capacité de ces molécules, une fois excitée énergétiquement par la source lumineuse, à générer des formes actives de l'oxygène, extrêmement électrophiles. Cette oxygène activé ou singulet va oxyder les biomolécules les plus proches au niveau des doubles liaisons. Le BM présentant une affinité pour les acides nucléiques, se fixant sur la base azotée guanine (Farjami et al., 2010) et s'intercale dans la double hélice. L'ADN sera alors dénaturé de manière irréversible par l'oxygène actif, générant des problèmes de réplication et autre dommages structuraux et fonctionnels des protéines virales (Owada et al., 2000). Quand le BM est dans un état excité, il peut rester sous un état dit triplet (n'activant pas l'oxygène). Une interaction directe avec des molécules adjacentes conduit à un transfert d'électrons ou abstraction d'un hydrogène allylique de molécules insaturées pouvant conduire à la formation d'espèce radicalaire. C'est ce principe de photoexcitabilité qui est utilisé pour la viro-atténuation du plasma.

Le BM est particulièrement efficace contre les virus enveloppés, leur enveloppe semblant présenter une haute affinité pour le colorant, le concentrant ainsi au niveau des virus les rendant donc sensible à l'inactivation. Ce procédé s'est révélé particulièrement efficace contre les rétrovirus du VIH, VHC et VHB, et autre virus de la famille herpesviridae (Owada et al., 2000; Müller-Breitkreutz and Mohr, 1998). Certains virus non-enveloppés se sont avérés sensibles aux BM comme le parovirus B19 (Williamson et al., 2003).

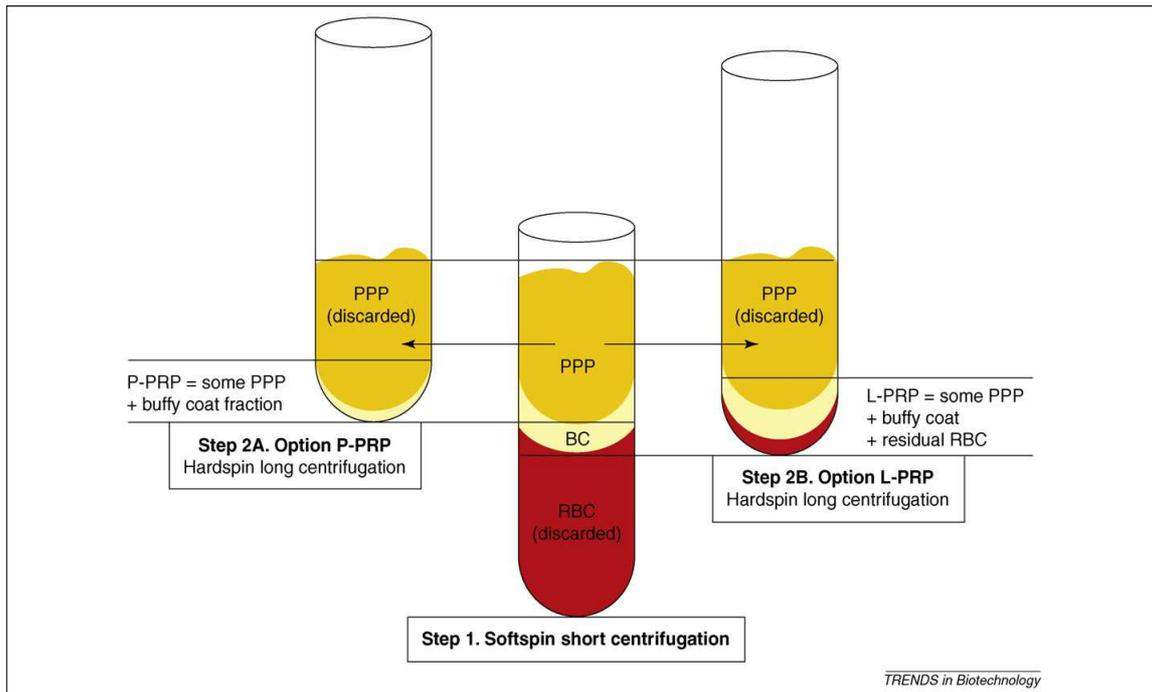
## 2 Intérêt des Plaquettes en Thérapie Cellulaire

Les PSL sont destinés en majeure partie à la transfusion. Alors que le plasma thérapeutique se congèle et peut être stocké durant un an et que les CGR ont une durée de conservation de 42 jours, une fenêtre d'utilisation relativement importante, qu'en est-il pour les concentrés plaquettaires ? Les CPA et MCP ont une validité de cinq jours, dont deux jours nécessaires à leur préparation. Ces produits n'ont donc qu'une fenêtre d'utilisation de trois jours. Le stockage à long terme de concentrés plaquettaires est aujourd'hui impossible bien que des études soient en cours sur leur lyophilisation ou leur zéodratation (Joshi et al., 2012).

Malgré ces difficultés, depuis une dizaine d'années, les plaquettes sont utilisées pour de nouvelles applications: la réparation tissulaire et la culture cellulaire à usage thérapeutique chez l'Homme. Certains dispositifs commerciaux permettent au lit du patient de préparer à partir de sang total un PRP autologue injectable à visée de réparation osseuse en stomatologie (Daif, 2012).

### **2.1 Le plasma riche en plaquettes humaines**

Le plasma riche en plaquettes ou PRP est une désignation généralisée d'un plasma contenant une forte quantité de plaquettes sanguines (Redler et al., 2011), mais le terme n'englobe pas uniquement les CPA et autres MCP. Un PRP peut être obtenu à partir d'un tube de sang sous anticoagulant centrifugé (Figure 11), mais ce dernier n'a pas de finalité transfusionnelle. La concentration en plaquettes est autour d'un milliard de plaquettes par ml (Weibrich et al., 2004).



**Figure 11 : Les différentes appellations du plasma en fonction de sa portion cellulaire**  
(Dohan Ehrenfest et al., 2009)

PPP: plasma pauvre en plaquette.

BC: de couleur blanchâtre, contient la majorité des plaquettes et des leucocytes.

RBC: hématies.

PRP: après centrifugation: plasma riche en fibrine + une partie du buffy coat (sans leucocyte).

L-PRP: après centrifugation: plasma riche en fibrine + buffy coat (entier) + un peu d'hématies.

## 2.1.1 Quelques utilisations du PRP

### 2.1.1.1 Utilisations directes

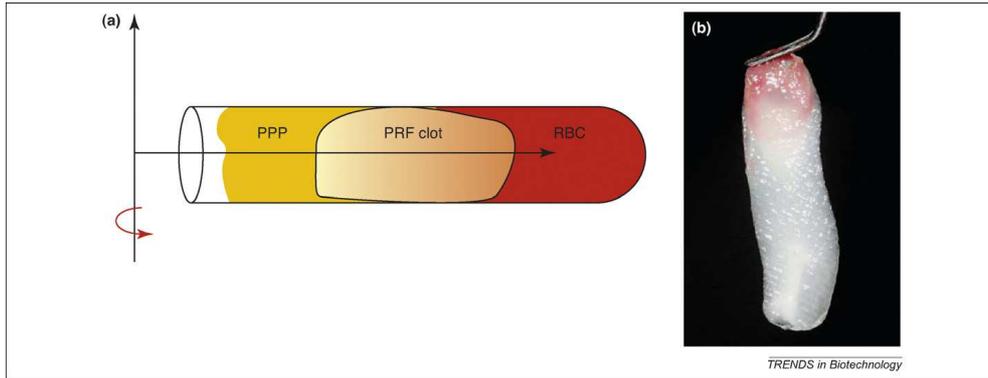
Ces dernières décennies, les propriétés du PRP ont suscité un intérêt dans d'autres domaines que celui de la transfusion. Sa forte concentration en plaquettes est corrélée à une concentration élevée en facteurs de croissances (PDGF- $\beta$ , b-FGF, VEGF, IGF-1, TGF- $\beta$ ) (Luttenberger et al., 2000; Spencer et al., 1993; Czynski et al., 1984); des molécules bioactives comme la sérotonine, l'histamine, la dopamine, les adénosines, les catécholamines. Le PRP possède également des propriétés gélifiantes par la présence des facteurs de coagulation composant le plasma lui-même. C'est dans le milieu des années 80 que les premiers articles sur une nouvelle utilisation du PRP firent leur apparition, notamment en chirurgie maxillo-faciale pour ses effets pro-cicatrisant (Matras, 1985). Cette technique est aujourd'hui toujours d'actualité avec la mise sur le marché d'appareils de plus en plus sophistiqués (Marx et al.,

1998; Watt-Smith, 2005). Le PRP est utilisé comme colle biologique dans le but de stimuler et améliorer la cicatrisation de tissus par effusion lente des facteurs de croissance. Parmi les premières applications, nous pouvons souligner celles de Whitman et collaborateurs utilisant un PRP comme substitut des colles de fibrine dont la complexité et les coûts de production limitent leur utilisation à grande échelle (Whitman et al., 1997; Gibble and Ness, 1990). D'autres domaines d'application ont récemment vu le jour : traumatologies sportives (Sánchez et al., 2007; De Vos et al., 2010; Sánchez et al., 2009), traitement de l'arthrose (Sánchez et al., 2008; Kon et al., 2011) ou encore la chirurgie plastique (Bhanot and Alex, 2002; Ebisawa et al., 2008), et bien d'autre aussi bien chez l'homme que l'animal. Le PRP a par ailleurs des propriétés bactériostatiques, mises en évidence sur le Staphylocoque epidermidis et le Staphylocoque aureus, réduisant ainsi les risques de contamination microbienne de la zone traitée, intéressant notamment en chirurgie orthopédique (Bielecki et al., 2007).

Ces différentes applications citées, mise à part la transfusion, utilisent des PRP autologues. Quelques compagnies pharmaceutiques ont mis sur le marché des kits de préparation de PRP comme le Plateltex® par Bratislava (Slovaquie), SmartPREP® par Harvest Corp (USA), Density Platelet Gel Kit B par Atanasio medical IBF France ou encore Vivostat®.

### ***2.1.1.1.1 Élaboration de ces produits riches en facteurs de croissance***

La préparation de ces produits se fait à partir d'un prélèvement de sang périphérique sous anticoagulant. L'échantillon va alors subir une centrifugation pour séparer les différents constituants du sang comme pour la préparation des PSL. (Dohan Ehrenfest et al., 2009). Certaines équipes prélèvent l'échantillon de sang sans anticoagulant; pendant la centrifugation, l'échantillon va coaguler et former un caillot de fibrine riche en facteurs de croissance (fibrin rich platelet ou PRF clot) (Choukroun et al., 2006) (Figure 12).



**Figure 12 : Formation d'un PRF**

(Choukroun et al., 2006)

La centrifugation d'un tube de sang va entraîner la séparation du plasma, des plaquettes-leucocytes et des globules rouges. L'absence d'anticoagulant va entraîner la formation d'un caillot de fibrine emprisonnant les plaquettes

PPP: platelet poor plasma ; PRF : platelet rich fibrin ; RBC: red blood cells.

Après cette étape de centrifugation du sang sous anticoagulant, celui-ci est séparé en trois phases : un surnageant composé de plasma pauvre en plaquette (PPP), le « buffy coat » qui constitue la phase intermédiaire dans laquelle les plaquettes et les leucocytes sont concentrés et le culot de globules rouges (GR). Le PRP peut alors être prélevé en mélangeant une partie du PPP avec le buffy coat. La différence avec les MCP est la présence des leucocytes.

Généralement les plaquettes sont activées par addition de thrombine bovine et/ou de chlorure de calcium. L'activation entraînant la dégranulation des granules  $\alpha$  et la libération des protéines de coagulation et autres facteurs de croissance, calcium, ADP et sérotonine. Le fibrinogène va alors se polymériser et gélifier le PRP. Cette approche aboutit à la formation d'une trame de fibrine aux propriétés hémostatiques et adhésives particulièrement intéressantes qui est utilisé en chirurgie comme « colle biologique » capable de libérer de façon lente et prolongée des facteurs de croissance.

Nombreuses sont les applications de ces produits en réparation tissulaire et notamment osseuse. Les acteurs principaux sont les facteurs de croissance qui stimulent la prolifération et différenciation cellulaire. Ne seront détaillés ci-dessous les principaux facteurs de croissance d'intérêt pour la prolifération des cellules souches mésenchymateuses (CSM).

### **2.1.1.1.2 PDGF (platelet-derived growth factor)**

Le PDGF est une glycoprotéine cationique ayant une masse moléculaire d'environ 30 kDa et composée de deux sous-unités liées de façon covalente, désignée comme les chaînes A (16-18 kDa) et B (de 14,5 à 16 kDa). Il est contenu dans les granules  $\alpha$  des plaquettes et sécrété lors de l'activation de celles-ci. Il est aussi sécrété par les macrophages et les ostéoblastes. Dans les plaquettes, environ 70 % du PDGF est présent sous la forme de l'hétérodimère AB. Il stimule la multiplication des CSM, des fibroblastes, des ostéoblastes, des chondrocytes, des cellules endothéliales ou des cellules musculaires lisses vasculaires. C'est un facteur chimiotactique puissant pour les cellules fibroblastiques et les cellules polynucléaires impliquées dans les processus de réparation tissulaire. Il stimule la synthèse de collagène, de phospholipides, d'esters de cholestérol, de glycogène, de prostaglandines ainsi que la synthèse d'autres facteurs de croissance (Intini, 2009). Identifié à forte concentration au niveau du site de fracture osseuse chez la souris et l'Homme (Andrew et al., 1995; Fujii et al., 1999), l'injection localisée de PDGF est bénéfique pour la régénération osseuse ou dans les défauts parodontaux (Cho et al., 1995; Park et al., 2000). Néanmoins, l'injection d'une forte dose peut inhiber le processus de régénération osseuse (Marden et al., 1993; Nevins et al., 2005). *In vivo*, le PDGF semble interagir avec le TGF- $\beta$ 1 (Transforming Growth Factor- $\beta$ 1) qui est également libéré par les plaquettes au niveau du tissu endommagé.

### **2.1.1.1.3 TGF- $\beta$ (transforming growth factor-beta)**

TGF- $\beta$  est un facteur de croissance multifonctionnel synthétisé par plusieurs types de cellules. Les plaquettes sont une source majeure de TGF- $\beta$  en circulation (Blakytyn et al., 2004). Les rôles du TGF- $\beta$  sont la stimulation de l'angiogenèse ainsi que la croissance, la stimulation et la production de la matrice extra-cellulaire par les cellules mésenchymateuses. Il est également un agent chimiotactique important pour les neutrophiles, les macrophages et les fibroblastes (Cromack et al., 1990; Fava et al., 1991). TGF- $\beta$  existe sous cinq isoformes faisant partie de la superfamille des TGF- $\beta$ . Les études *in vitro* montrent que TGF- $\beta$  est mitogénique pour les fibroblastes, mais inhibe la prolifération d'autres cellules dont les kératinocytes (Werner and Grose, 2003). Les études *in vivo* démontrent le potentiel de formation osseuse de TGF- $\beta$ , dans des défauts osseux créés chirurgicalement (Cochran and Wozney, 1999). D'autres études suggèrent un effet bénéfique de TGF- $\beta$  lorsqu'il est utilisé dans les procédures de régénération tissulaire guidée pour augmenter et accélérer la formation osseuse (Ruskin et al., 2000). Les études actuelles montrent que TGF- $\beta$  induit la prolifération de plusieurs types de cellules sans

avoir la capacité d'initier la formation osseuse (Lieberman et al., 2002; Oreffo, 2004). Cliniquement, certains auteurs observent qu'une administration systémique de TGF- $\beta$  peut causer des effets secondaires indésirables, alors que l'administration locale semble significativement plus sécuritaire (Luginbuehl et al., 2004).

### **2.1.1.2 Utilisations indirectes du PRP**

Même si la transfusion de plaquettes est une thérapie cellulaire à part entière, les propriétés des plaquettes se sont montrées très intéressantes pour produire des cellules en culture *in vitro* pouvant potentiellement répondre à toutes les attentes dans ce domaine : Forte prolifération cellulaire, temps de culture diminués, sécurité accrue.

La « culture cellulaire » utilise un ensemble de techniques pour faire croître des cellules hors de l'organisme. Le milieu de culture utilisé est un milieu nutritif comprenant des sels minéraux, des acides aminés, vitamines, sources énergétiques, molécules tampon et autres. Il est possible d'accroître le taux de croissance de ces cellules en supplémentant le milieu en facteurs de croissance et en protéines diverses contenues dans le sérum d'animaux (boeuf, cheval) (Takaoka and Katsuta, 1975).

Il existe deux façons de supplémenter un milieu de culture en facteurs de croissance. L'une consiste à composer « manuellement » le milieu avec différents facteurs protéiques (Chase et al., 2010), conditionnés sous forme très purifiée. Chaque protéine est ainsi ajoutée individuellement à la concentration souhaitée. L'avantage de ce processus est de connaître précisément la composition du milieu (milieu défini). Ces facteurs sont, généralement, des protéines issues de l'industrie de la biotechnologie (Sigma Aldrich, Invitrogen). Mais en contre partie, le milieu créé se révèle avoir un coût relativement élevé.

La seconde façon de supplémenter un milieu de culture est l'ajout d'un mélange de facteurs de croissance et de protéines (Von Seefried and MacMorine, 1976). Le produit le plus couramment utilisé de nos jours est le sérum de veau fœtal (SVF). Le SVF est riche en nombreux facteurs de croissance et autres nutriments et pauvre en facteurs inhibiteurs de croissance idéale pour la culture de cellules eucaryotes. Contrairement au procédé précédant, la composition de ce supplément n'est pas connue précisément, le milieu devient empirique nécessitant la sélection de lots efficaces pour tel ou tel type cellulaire. Ce produit se révèle par contre être d'un rapport qualité/prix avantageux.

La thérapie cellulaire utilisant les CSM (Caplan, 2007), nécessite une étape de culture *in vitro* pour amplifier le nombre de cellules. Pour cela le SVF n'est pas le candidat idéal du fait de sa production en « lots », issus d'un mélange de prélèvements multiples et du risque de transmission d'agents infectieux d'origine animale (ex : BVDV, vCJD) (Cobo et al., 2006; Dietz et al., 2007; Doerr et al., 2003). Il fut prouvé que chaque lot de sérum est hétérogène en termes d'efficacité de prolifération cellulaire et de qualité des cellules produites (Honn et al., 1975). Malgré la validation de lots utilisables en condition clinique (contrôles qualité très poussés et coûteux), le risque nul n'existe pas, entraînant ainsi des risques de contamination. Certaines études démontrent même que du matériel cellulaire cultivé en présence de SVF a entraîné une xeno-immunisation contre des protéines animales chez le receveur (Spees et al., 2004; Selvaggi, Walker, and Fleisher, 1997; Tuschong et al., 2002). Ainsi, son utilisation est fortement critiquée par de nombreuses associations de santé publique de divers pays spécialisées dans ce domaine (Jochems et al., 2002). Même d'un point de vue éthique, le SVF serait critiquable quant à son mode de production. L'EMA (European Medicines Agency) préconise dans les bonnes pratiques de fabrication (Good manufacturing practice ou GMP) une utilisation d'un milieu de culture sans sérum bovin pour assurer la qualité du produit injecté dès que le produit est destiné à l'Homme (EUROPEAN COMMISSION, 2011) (Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), 2012).

Le SVF reste cependant encore utilisé pour la culture de cellules humaines *ex vivo* avant administration, puisqu'il n'existe pas encore d'alternative efficace et reconnue ayant un rapport qualité/prix comparable.

Depuis presque trois décennies, quelques équipes se sont intéressées à la recherche d'une nouvelle source de facteurs de croissance (Eastment and Sirbasku, 1978). Des recherches se sont orientées vers le sérum humain (Avgoustiniatos et al., 2012; Tekkate et al., 2012), mais le sérum d'un adulte s'est avéré moins efficace que le SVF. Le sérum de sang de cordon ombilical apparaît être très intéressant mais les stocks sont très limités.

Plus récemment, il est apparu qu'un milieu supplémenté par du PRP cryolysé permet une prolifération accrue des CSM humaines, comparé à un milieu supplémenté en SVF (Doucet et al., 2005). Dans ces conditions, le temps nécessaire pour obtenir un nombre important de cellules en vue d'une utilisation clinique est plus court qu'avec un milieu supplémenté en SVF. Dans cette étude le PRP appelé lysat plaquettaire (Lp) est issu d'un PSL humain, il

répond donc aux normes sanitaires en vigueur vis-à-vis de la transmission d'agents pathogènes.

La méthode développée par Doucet et ses collaborateurs en 2005, consiste à effectuer un cycle de congélation et décongélation à -80 °C pour obtenir un plasma riche en plaquettes lysées contenant les facteurs de croissance libérés par les plaquettes. Contrairement à la méthode d'activation plaquettaire par ajout de thrombine bovine et/ou de chlorure de calcium, la cryolyse produit un lysat plaquettaire qui reste sous forme liquide et dont les facteurs de croissance sont directement utilisables en culture cellulaire.

C'est cette utilisation des plaquettes pour la culture cellulaire qui a guidé mon travail de thèse. Mon objectif a été d'optimiser les performances de ce substitut plaquettaire en vue d'une utilisation pour la culture des CSM à visée thérapeutique.

### **3 Les cellules souches multipotentes mésenchymateuses**

#### **3.1 Les Multipotent Adult Progenitor Cells**

Les MAPC (multipotent adult progenitor cells) sont des cellules souches très primitives de type embryonnaire découverte en 2002 à partir de la moelle osseuse humaine et murine (Jiang et al., 2002; Verfaillie, 2005). Comparables aux cellules souches mésenchymateuses et hématopoïétiques, elles diffèrent des CSM à l'échelle transcriptomique (Ulloa-Montoya et al., 2007). Cette population de cellules souches multipotentes a un potentiel de prolifération et de différenciation plus large que celui des CSM. En plus d'être capables de se différencier en cellules endoblastiques (hépatocytes) (Schwartz et al., 2002), mésoblastiques (endothéliales et hématologiques) (Reyes et al., 2002), les MAPC peuvent se différencier *in vitro* en cellules neurales. En raison de leurs spécificités, les MAPC sont décrites comme étant les ancêtres de toutes les populations hématopoïétiques et mésenchymateuses présentes dans la moelle osseuse humaine (Coulombel, 2003; Verfaillie, 2005). De plus, ces cellules semblent pouvoir être cultivées *in vitro* de manière infinie (>100 doublements) sur un support recouvert de fibronectine, dans un milieu de culture très pauvre en sérum et en présence d'EGF et de PDGF à une très faible densité cellulaire (Verfaillie et al., 2003). L'existence de ces cellules a cependant été controversée et les résultats expérimentaux remis en question.

### 3.2 Les cellules souches mésenchymateuses humaines

C'est en 1976 que pour la première fois Freidenstein et ses collaborateurs, ont isolé de la moelle osseuse de rat les premières cellules progénitrices du tissu squelettique (Friedenstein et al., 1976). Ces cellules stromales de type fibroblastique cultivées à faible dilution sont capables de former des colonies nommées dans un premier temps CFU-F (Colony Forming Units-fibroblast) puis Marrow Stromal Cells (MSC) pour leurs rôles de soutien dans les structures mésenchymateuses. En 1991, elles sont renommées « Mesenchymal Stem Cells (MSC) » par Arnold Caplan (Caplan, 1991) pour leur capacité à se différencier en tous types de cellules de la lignée mésenchymateuse (Figure 13). Ce n'est que très récemment (en 2005) que l'International Society for Cellular Therapy (ISCT) a recommandé comme désignation officielle « Multipotent Mesenchymal Stromal Cells » en gardant l'acronyme MSC (Horwitz et al., 2005).

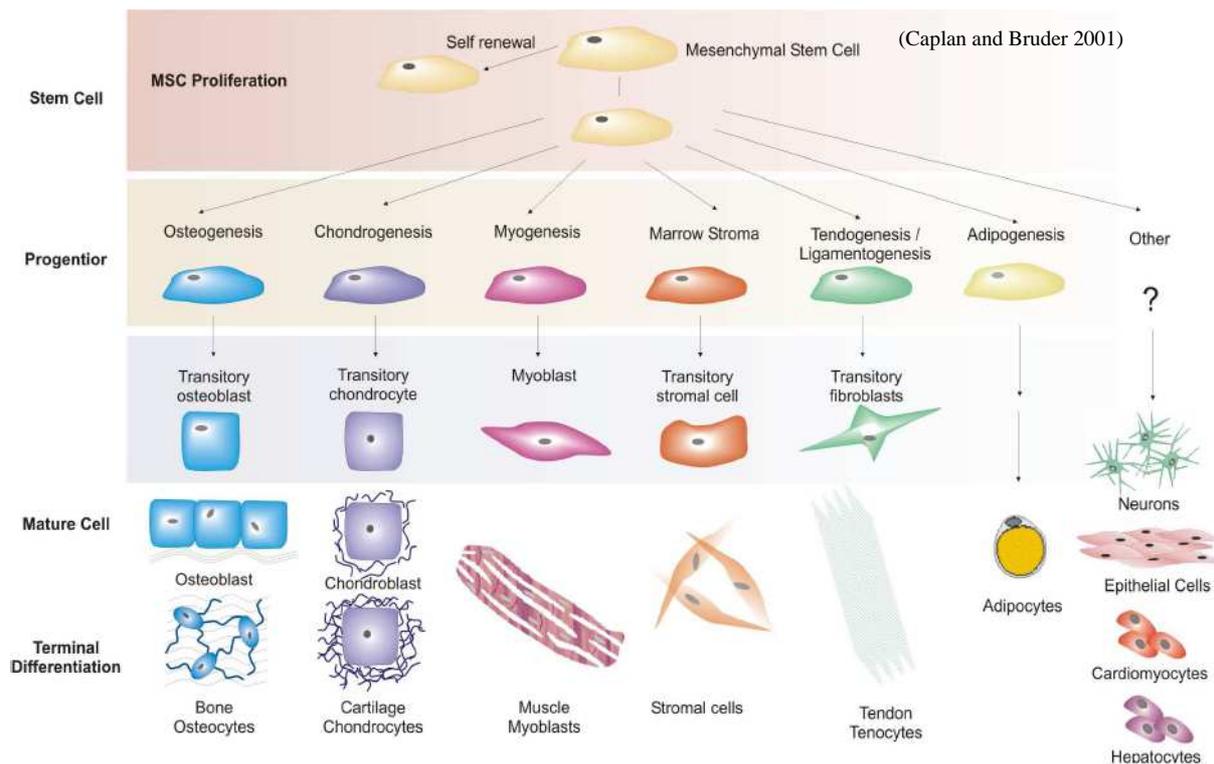


Figure 13 : Schéma illustrant les différentes lignées cellulaires issues des CSMh

Les CSMh sont présentes principalement dans la moelle osseuse ( $1/10^4$  à  $1/10^5$  des cellules de la moelle osseuse) chez l'adulte (Caplan and Bruder, 2001). Elles ont été mises en évidence dans de nombreux autres tissus : le tissu foetal, le placenta, la paroi du cordon ombilical (gelée de Wharton), le système vasculaire (Abedin et al., 2004), le tissu adipeux (Dicker et al.,

2005), le périoste (Nakahara et al., 1990; Fukumoto et al., 2003), le cartilage (Alsalameh et al., 2004), le liquide synovial (Jones et al., 2004), les muscles (Young et al., 2001), les tendons (Salingcarnboriboon et al., 2003) et le rein (Dekel et al., 2006). En culture, les CSMh sont obtenues à partir de la fraction adhérente des cellules de la moelle osseuse (Pountos and Giannoudis, 2005). Ces cellules multipotentes avec une forte propension à s'autorenouveler (clonogéniques) font partie des cellules souches adultes qui se multiplient très efficacement en culture, en conservant intact leur « potentiel souche ». En effet, il fut montré qu'elles sont capables, en fonction des conditions de culture, de se différencier en ostéoblastes (Luria et al., 1987; Owen and Friedenstein, 1988), en chondroblastes, en adipocytes et même en myoblastes (Wakitani et al., 1995; Kassem, 2004). Toutes ces caractéristiques font des CSMh de véritables candidates pour une utilisation thérapeutique en médecine régénératrice (Pittenger et al., 1999).

### **3.2.1 Hétérogénéité des CSMh**

Les CSMh adultes présentent une hétérogénéité en raison de la diversité des tissus auxquels elles appartiennent, de l'âge du donneur, mais également de leur taille, de leur morphologie et de leurs potentiels de différenciation ou de prolifération (Aubin, 1998; Phinney et al., 1999; Colter et al., 2001; D'Ippolito et al., 2004). C'est pour ces raisons principales que le terme de cellules stromales de moelle osseuse est plus approprié pour désigner l'ensemble des cellules adhérentes de la moelle osseuse (Bianco et al., 2001).

### **3.2.2 Phénotype des CSMh de la moelle osseuse**

Comme toutes les autres cellules, les CSMh présentent de nombreux marqueurs de surface cellulaire. Mais, à ce jour, il n'existe aucun marqueur spécifique pour l'identification des CSMh. Leur identification se fait par la mise en évidence de la présence ou non d'un ensemble de marqueurs de surface et de certaines fonctions caractéristiques.

Les CSMh peuvent être caractérisées et identifiées par:

- un phénotype fibroblastoïde et une capacité à adhérer à surface plastique de culture (Friedenstein et al., 1968)
- un pouvoir clonogénique leur permettant de former en culture des colonies cellulaires (CFU-F) dérivées d'une seule cellule (D'Ippolito et al., 1999; Owen et al., 1987; Quirici et al., 2002)

- l'absence d'expression de marqueurs de type hématopoïétique CD3, CD4, CD45, CD14, CD11a et CD34 (Koç and Lazarus, 2001) (Pittenger and Martin, 2004) permettant de les distinguer des cellules hématopoïétiques par cytométrie de flux
- l'expression de ligands également présents sur la surface des cellules matures des lignées hématopoïétiques, incluant ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ALCAM-1, CD72, et LFA-3 (Majumdar et al., 1998; Minguell et al., 2001) soulignant ainsi l'étroite interaction entre ces deux types cellulaires
- la sécrétion de nombreuses cytokines (Kim et al., 2005), de facteurs de croissance, de molécules adhérentes et de protéines de la matrice extracellulaire (Silva et al., 2003) (Guo et al., 2000) jouant un rôle dans leur pouvoir immunomodulateur
- l'expression de nombreuses intégrines jouant un rôle important dans la mobilité des CSMh (Docheva et al., 2007)
- les CSMh ont une faible immunogénicité qui se traduit par l'absence d'expression d'antigènes HLA de classe II. Cependant, cette expression est inductible en particulier par l'interféron  $\gamma$  (Le Blanc et al., 2003)
- l'expression d'antigènes membranaires CD90, CD10, CD73, CD105, STRO-1, HLA-DR (Pittenger et al., 1999; Jones et al., 2002)

La liste des marqueurs de surface des CSMh étant longue, le Tableau 5 reprend l'essentiel des marqueurs importants (liste non exhaustive).

<b>Les Marqueurs des CSMh</b>			
<b>Type de Marqueurs</b>	<b>Expression POSITIVE</b>	<b>Expression NEGATIVE</b>	<b>Références</b>
<b>Antigènes spécifiques</b>	SH2, SH3, SH4, STRO-1, MAB1740, smooth muscle actin		(Haynesworth, Baber, and Caplan, 1992)
<b>Marqueurs de surfaces et cytoplasmiques</b>	CD29 (intégrine $\beta$ 1), CD44 (H-CAM, Pgp-1), CD49a, (VLA-1), CD51, CD54 (ICAM-1), CD58, CD71, CD73 (SH3), CD90 (Thy-1), CD102, CD105 (endogline,SH2), CD106 (VCAM-1), CDw119, CD120a (TNFR-1),b, CD123, CD124, CD126 (IL6R), CD127, CD140a, CD166 (ALCAM), P75, TGFb1R, TGFbIIR, HLA-A,B,C, SSEA-3, YS08, YS14, YS18 vimentine, ténascine, ostéocalcine	CD3, CD4, CD6, CD8, CD9, CD10, CD11a,b, CD13 (aminopeptidase N), CD14 (LPS-R), CD15, CD18, CD20, CD21, CD25, CD31 (PECAM-1), CD34, CD36, CD38, CD45, CD48, CD49d, CD50, CD62E,L,S, CD68, CD80, CD86, CD90 (Thy-1), CD95, CD117, CD133 (prominin-like 1), CD135, CD144, SSEA-1	(Minguell, 2001) (Haynesworth, Baber, and Caplan, 1992) (Sillaber et al., 1999) (Barry et al., 2001) (Dennis et al., 2002) (Jones et al., 2002) (Baddoo et al., 2003) (Meirelles Lda and Nardi, 2003) (Tuli et al., 2003) (Boiret et al., 2005) (Wang et al., 2006) (Yoon et al., 2005) (Izadpanah et al., 2005)
<b>Matrices extracellulaires</b>	Collagen type I,II,III,IV,V et VI, Fibronectin, Laminin, Hyaluronan, Proteoglycans, Alkaline phosphatase		(Vilamitjana-Amedee et al., 1993) (Minguell, Erices, and Conget, 2001)
<b>Molécules d'adhésion</b>	intégrines: $\alpha$ v $\beta$ 3, $\alpha$ v $\beta$ 5 chaînes intégrines: $\alpha$ 1, $\alpha$ 2, $\alpha$ 3, $\alpha$ 4, $\alpha$ 5, $\alpha$ v, $\beta$ 1, $\beta$ 3, $\beta$ 4 ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ALCAM-1, LFA-3, I-selectin, endogline, CD44		(Minguell, Erices, and Conget, 2001)
<b>Cytokines, facteurs de croissance et autres sécrétions</b>	IL1 $\alpha$ , IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, LIF, SCF, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, bone morphogenic protein receptor type IA (BMPRIA), $\alpha$ -L-iduronidase, arylsulfatase-A et B, glucocerebrosidase, adrenoleukodystrophy protein		(Minguell, Erices, and Conget, 2001) (Koc et al., 1999)
<b>Récepteurs à cytokines et facteurs de croissance</b>	IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, LIF-R, SCF-R, G-CSFR, TNF-1R, TNF-2R, TGF- $\beta$ 1R, TGF- $\beta$ 2R, bFGF-R, PDGF-R, EGF-R		(Minguell, Erices, and Conget, 2001)

Tableau 5 : Liste des marqueurs de surface des CSMh

### 3.2.3 Propriétés biologiques des cellules stromales mésenchymateuses

#### 3.2.3.1 Auto-renouvellement et prolifération des CSMh

Comme toute cellule souche adulte, les CSMh ont comme principale propriété de s'autorenouveler (Carlo-Stella et al., 1993) et d'être multipotentes (Deans and Moseley, 2000; Caplan and Dennis, 2006). La mise en évidence d'un pouvoir de prolifération élevé (Pittenger et al., 1999) permet *in vitro* une amplification importante des CSMh. Cette amplification peut atteindre un nombre de doublements supérieur à 50 mais au-delà, de nombreuses publications décrivent l'apparition d'anomalies morphologiques, une perte de leur phénotype et de leur caractère souche avec une entrée en sénescence (Bonab et al., 2006; Wagner et al., 2008).

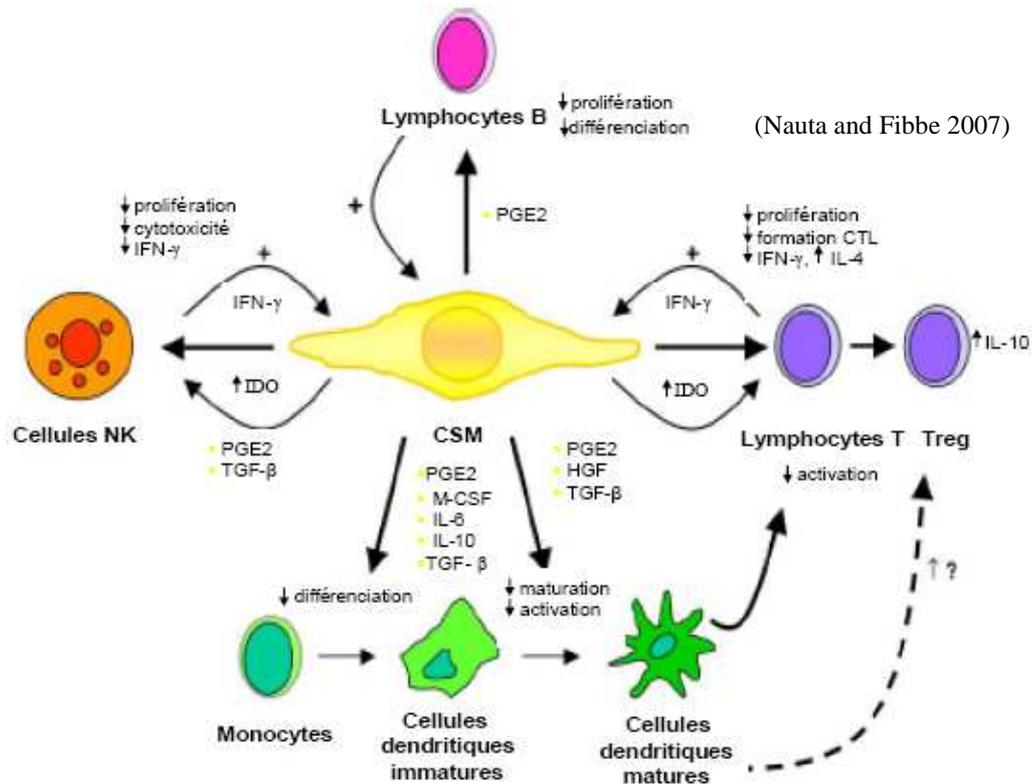
#### 3.2.3.2 Soutien de l'hématopoïèse

Les CSMh peuvent sécréter un grand nombre de cytokines et de facteurs de croissance, par exemple, des interleukines IL-1 $\alpha$ , 6, 7, 8, 11, 12, 14, 15, le Monocyte-Colony Stimulating Factor (M-CSF), le Leukemia Inhibitory Factor (LIF), le Stem Cell Factor (SCF), le Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) et le granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) (Minguell, Erices et al. 2001). Grâce à cette propriété de sécrétion, les CSMh participent à la survie, la prolifération et la différenciation des précurseurs hématopoïétiques (CSHh) caractérisant son rôle de soutien de l'hématopoïèse (Minguell et al., 2001; Almeida-Porada et al., 2000). Les CSMh peuvent également participer à la régulation de la mégacaryocytopoïèse par la sécrétion de thrombopoïétine (Cheng et al., 2000). Ainsi les CSM constituent avec les ostéoblastes, les ostéoclastes et les adipocytes, les principales cellules stromales de la niche hématopoïétique endostéale.

#### 3.2.3.3 Propriétés immunomodulatrices

Les CSMh sécrètent de nombreux facteurs solubles, aux effets dose-dépendant inhibiteurs sur la prolifération des lymphocytes T, B, NK et des cellules dendritiques (Maitra et al., 2004; Bhatia and Hare, 2005; Lazarus et al., 2005) (Figure 14). Cette propriété immunosuppressive couplée à l'absence d'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II permet l'utilisation des CSMh dans certaines stratégies thérapeutiques. En effet, les CSHh associées à des CSMh autologues permettent d'améliorer la prise de la greffe et d'éviter un rejet allogénique (Battiwalla and Hematti, 2009; Jones and McTaggart, 2008). *In vivo*, l'injection de CSMh dans le cas de la maladie du greffon contre l'hôte permet au

patient de bénéficier d'un effet immunosuppresseur puissant (Le Blanc et al., 2004; Yañez et al., 2006).



**Figure 14 : Régulation de l'activité immunomodulatrice des CSMh**

CTL = Lymphocytes T cytotoxiques ; HGF = « hepatocyte growth factor  $\beta$  » ; IDO = « indoleamine 2,3-dioxygénase » ; PGE2 = prostaglandine E2 ; TGF- $\beta$  ».

### 3.2.3.4 Utilisations thérapeutiques

Les propriétés biologiques précédemment décrites font des CSMh un outil thérapeutique intéressant pour la thérapie cellulaire, l'ingénierie tissulaire, la thérapie génique ou encore le traitement de pathologies immunitaires ou inflammatoires (Bartmann et al., 2007; Sensebé and Bourin, 2011). Définies en Europe comme médicament de thérapie innovante (MTI ou advanced therapy medicinal products), elles ont été utilisées pour la première fois en 1995 pour traiter la GvH au cours de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. On retrouve aujourd'hui près de 140 essais cliniques en cours dans le monde selon les registres du site *ClinicalTrials.gov* dont 22 concernent les maladies auto-immunes (Jorgensen et al., 2011).

L'utilisation clinique des CSMh est effective ou envisagée dans 4 domaines principaux (Kassem and Abdallah, 2008) :

#### **3.2.3.4.1 *L'implantation locale***

Le premier essai chez l'Homme a été réalisé pour le traitement de perte de substance osseuse de grande taille à la suite de divers traumatismes. L'injection locale de CSMh autologues associée à la greffe d'un biomatériau en hydroxyapatite a permis aux patients une bonne reconstruction des membres atteints (Quarto et al., 2001). D'autres études cliniques utilisent les CSMh comme cellules progénitrices des chondrocytes pour le traitement des défauts du cartilage (Wakitani et al., 1994; Diduch et al., 2000). Récemment, des essais ont permis d'évaluer l'efficacité de l'utilisation de CSMh seules ou associées à des CSHh dans le traitement de patients atteints d'insuffisance cardiaque (Ohnishi et al., 2007), d'ischémie vasculaire secondaire et de maladies artérielles périphériques (Tateishi-Yuyama et al., 2002) ou coronaires (Wollert et al., 2004; Tse et al., 2007). Cependant, ces résultats doivent être confirmés par des essais cliniques randomisés avec un nombre suffisant de patients. Notons aussi l'utilisation des CSMh dans le traitement de brûlures cutanées par irradiation suite à une exposition localisée aux rayonnements ionisants (rayons X ou gamma) (Lataillade et al., 2007; Lataillade et al., 2010).

#### **3.2.3.4.2 *La transplantation systémique***

La thérapie cellulaire par des CSMh allogéniques est réalisée pour différentes pathologies ostéoarticulaires. Parmi les différences thérapies, nous pouvons citer celle effectuée par l'équipe d'Horwitz pour le traitement d'enfants atteints d'ostéogenèse imparfaite (Horwitz et al., 2002). Cette maladie génétique se caractérise par une fragilité osseuse due à une anomalie de la production du collagène. Par ailleurs, des rapports mettent en valeur des améliorations chez des patients atteints d'ostéopétroses (Tolar et al., 2006) ou du syndrome de Hurler, maladie génétique dégénérative liée à un déficit enzymatique qui est responsable de l'accumulation de glycosaminoglycane (Koç and Lazarus, 2001). Nous pouvons rappeler aussi l'utilisation de la propriété immunomodulatrice des CSM amplifiées *in vitro* et utilisées dans le traitement de la GvH pour améliorer la greffe des CSHh (Le Blanc et al., 2004; Yañez et al., 2006). Enfin des essais cliniques sont également en cours dans les maladies auto-immunes comme la maladie de Crohn, la sclérodermie, la sclérose latérale amyotrophique et la sclérose en plaque (Ciccocioppo et al., 2011; Zhou et al., 2010; Uccelli et al., 2012; Zaforskaya et al., 2012; Auletta et al., 2012).

#### ***3.2.3.4.3 La thérapie cellulaire combinée à la thérapie génique***

Les CSMh peuvent être facilement transduites par des virus et sont donc des candidates de choix pour la thérapie génique. Elles pourront en fonction du gène transfecté, exprimer des protéines permettant l'amélioration de la survie des cellules, un avantage sélectif ou encore une propriété propre à un tissu. Par exemple, des CSM transfectées avec le gène de la BMP-4 humaine ont conduit à une augmentation de la formation osseuse chez la souris (Zhang et al., 2004). Autre exemple, En ophtalmologie, l'injection intraoculaire de CSM génétiquement modifiées pour produire des facteurs de neuroprotection a permis de ralentir la dégénérescence rétinienne dans un modèle de rat atteint de rétinopathie pigmentaire héréditaire (Arnhold et al., 2007). Dans une approche de thérapie cellulaire de réparation tissulaire cardiaque, la transduction du gène anti-apoptotique Akt a permis la restauration de 80% du tissu cardiaque lésé ainsi qu'une normalisation de la fonction cardiaque dans un modèle d'ischémie cardiaque (Mangi et al., 2003).

#### ***3.2.3.4.4 L'ingénierie tissulaire***

L'ingénierie tissulaire a pour objectif thérapeutique de développer des substituts biologiques capables de recréer, de régénérer ou de restaurer la fonction d'un tissu lésé (Langer and Vacanti, 1993). En médecine régénératrice des tissus ostéoarticulaires, elle associe les propriétés physicochimiques et biomécaniques d'un biomatériau combiné à des cellules réparatrices, possédant un caractère souche pour construire un tissu vivant tridimensionnel. Si les biomatériaux doivent présenter des propriétés différentes en fonction du tissu à régénérer, les cellules réparatrices majoritairement utilisées en ingénierie tissulaire sont les CSMh (Vinatier et al., 2011). Les premières utilisations cliniques de l'ingénierie tissulaire pour la réparation de défauts osseux de grande taille (de 4 à 7cm) au niveau des os des membres sont décrites en 2001 par Quarto et ses collaborateurs (Quarto et al., 2001). Les auteurs ont comblé le défaut osseux avec une céramique poreuse contenant les cellules stromales de moelle osseuse, préalablement amplifiées en culture et déposées la veille de l'implantation sur la céramique. Les analyses radiologiques, microtomographiques et angiographiques, réalisées chez ces mêmes patients, 6 à 7 ans postopératoires, révèlent une cicatrisation complète avec persistance d'un canal médullaire au sein de l'implant, et établissement d'une nouvelle vascularisation. Dans un autre cas un grillage de titane, élaboré suivant la morphologie du patient, est rempli par des blocs de céramique recouverts de BMP-7 et de cellules stromales de moelle osseuse autologues puis implantées dans un muscle dorsal du patient afin d'initier

la néoformation osseuse et la néovascularisation. Après 7 semaines, le greffon mandibulaire est mis en place avec le pédicule vasculaire. Le patient a retrouvé une mastication au bout de 4 semaines (Warnke et al., 2006).

### 3.2.3.5 La production de CSMh à usage clinique

Les CSMh sont actuellement cultivés *in vitro*, en présence de SVF à 10-20% dans des conditions de grade clinique. Le SVF utilisé est systématiquement contrôlé et sélectionné pour garantir à la fois une croissance optimale et la bio-sécurité des CSMh. En dépit des contrôles effectués, l'utilisation du SVF soulève certaines préoccupations de la part des autorités de régulation comme l'ANSM. L'administration de produits d'origine animale à l'Homme pourrait théoriquement entraîner la transmission de prions ou de zoonoses connues ou inconnues (Selvaggi, et al., 1997; Tuschong et al., 2002). De même, des peptides ou des protéines bovines peuvent être internalisés par les CSMh en culture et déclencher une réponse immunitaire de l'hôte (Bernardo et al., 2007). Ces sujets de préoccupation poussent la recherche à envisager la substitution du SVF par un produit de qualité équivalente et d'origine humaine (autologue ou allogénique) pour la production de CSMh de grade clinique.

Comme énoncé précédemment, le PRP utilisé en lysat de plaquettes pour remplacer le SVF pour la culture de CSMh semble être une alternative intéressante. Les résultats montrent que les CSMh isolées à partir de prélèvement de moelle osseuse, cultivées en présence de PRP *vs.* SVF, présentent un phénotype, une morphologie et un potentiel de différenciation comparable, tout en conservant une activité immunomodulatrice. Par ailleurs, la culture de CSMh en milieu supplémenté en PRP permet une meilleure clonogénicité ainsi que de meilleures capacités prolifératives offrant ainsi une expansion plus efficace, donc un gain de temps considérable pour l'obtention de CSMh de grade clinique. Cet avantage est probablement dû à la forte concentration en facteurs de croissance (PDGF, TGF- $\beta$ 1, le b-FGF, l'IGF-1, et le VEGF) par comparaison au SVF (Bernardo et al., 2007). Après une polémique suite à l'examen de surveillance demandé par l'AFSSAPS mettant en évidence des anomalies cytogénétiques, les récentes analyses du caryotype des CSMh ont permis de ne détecter aucune aberration chromosomique après une période prolongée de culture (Sensebé et al., 2012) (AFSSAPS, 2009).

Compte tenu de la variabilité de composition protéique du Lp d'un donneur à l'autre, pouvant engendrer des variabilités dans la production de cellules, tout comme le SVF, la mise au point

d'un procédé reproductible et standardisé de préparation s'est avéré indispensable et a fait l'objet de mon travail de thèse.

## OBJECTIFS DU TRAVAIL

L'objectif principal de cette thèse a été d'élaborer une solution de facteurs de croissance à partir de plaquettes et de plasma humains standardisée et sécurisée pour remplacer le SVF pour la culture des CSM dans le respect des normes imposées par l'ANSM et l'EMA.

Dans un premier temps, l'intérêt fut d'augmenter la qualité du produit de supplémentation en termes de rendement de prolifération en instaurant un dosage précis pour son utilisation. Les solutions plaquettaires et plasmatiques ont été ensuite mélangées selon leur contenu en protéines en respectant des ratios définis. Le mélange des deux à un certain ratio a permis d'acquérir un produit efficace pour la culture des CSM tout en assurant une meilleure homogénéité dans les produits. Cette façon de procéder a permis d'élargir l'éventail de choix sur la matière première. Jusqu'à présent les lysats produits avaient pour matière principale le des plaquettes d'aphérèse. L'utilisation des MCP a permis d'augmenter la source de matière première et a nécessité une mise au point spécifique.

Dans un second temps la prise en compte de la sécurité du produit a nécessité l'utilisation de matière première viro-inactivée. La solution plasmatique fut viro-inactivée soit par bleu de méthylène soit par pasteurisation.

Au total, ce travail a permis d'élaborer une prémisse d'un produit novateur issu des biotechnologies transfusionnelles appliqué à la thérapie cellulaire pouvant potentiellement répondre au cahier des charges de l'EMA et l'ANSM sur les exigences de produits ancillaires utilisé pour la production de produits de thérapie cellulaire ou de MTI.

**Ce produit a fait l'objet d'un dépôt de brevet et tout ce qui est décrit ci-après revêt un caractère confidentiel.**

## **MATERIELS ET METHODES**

## MATERIELS ET METHODES

### 1 Les produits biologiques matière première

Les produits qui ont été élaborés au cours de ce travail de thèse, l'ont été à partir de divers produits biologiques humains issus de la transfusion, prélevés au Centre de Transfusion de l'EFS Nord de France et au CTS des Armées :

- Les produits plaquettaires sont issus soit de CPA non déplasmatisés soit de MCP en solution de stockage de plaquettes SSP+ ; les produits plasmatiques sont issus de don de sang total et traités ou non par inactivation au bleu de méthylène ou pasteurisation.
- Les CSM proviennent de prélèvements d'os spongieux coxo-fémoral réalisés à l'occasion de pose de prothèse totale de hanche après consentement du patient réalisés à l'HIA Percy à Clamart.

#### 1.1 Les produits transfusionnels

##### 1.1.1 Obtention des produits transfusionnels

###### 1.1.1.1 Prélèvement d'un Concentré de plaquettes par aphérèse

Les plaquettes sont directement séparées du reste des éléments figurés du sang par un séparateur de cellules de type Fenwall Autophérèsis C, Haemonetics MCS+ ou Trima Accel. L'anticoagulant ajouté est l'ACD (acid-citrate-dextrose), son ratio est compris entre 8 et 12% ; une solution additive de conservation type SSP+ peut être ajoutée au produit prélevé. Le volume de CPA prélevé n'excède pas 350 ml (hors anticoagulant). Une numération plaquettaire (MAXM, Beckman Coulter, France) est réalisée pour titrer le produit, la concentration moyenne en plaquettes d'un CPA (ou PRP) est au minimum de  $2.10^{11}$  plaquettes pour être validé. L'ordre de grandeur moyen de la concentration en plaquettes par CPA est de  $4,8 \pm 1.10^{11}$ .

#### ***1.1.1.1.1 Prélèvement d'un plasma et d'un buffy coat***

Le prélèvement est réalisé à l'aide d'un DMU de type NPT6286LA (Macopharma, France) correspondant à un kit de poches quadruples dont la poche de prélèvement contient 66,5ml de CPD. Les différents composants du sang sont séparés après centrifugation à 5300g pendant 13 minutes sur un automate de séparation type Compomat® G4 permettant l'obtention d'un CGR, d'un buffy coat et d'une poche de plasma qui sera déleucocytée par filtration par simple gravité (filtre Plasmaflex Miniplas®). La poche de plasma est centrifugée à 5000g pendant 15 minutes pour éliminer les résidus globulaires et plaquettaires, puis décantée manuellement afin de récupérer le plasma dans une poche de recueil. L'opération est renouvelée une fois avant de congeler le plasma à -35°C.

#### ***1.1.1.1.2 Obtention d'un mélange de concentrés de plaquettes***

5 poches de buffy coat de même groupe sanguin sont connectées à une poche d'une solution de SSP+ (Orbisac caridian BCT, CaridianBCT Corporate headquarters, USA) et à un kit Tacsì comprenant un filtre à déleucocytation (Terumo, USA). L'ensemble est centrifugé dans une centrifugeuse automatisée Tacsì (Terumo, USA) pour obtenir une poche de MCP déleucocytée. Un échantillon est prélevé pour réaliser une numération plaquettaire du produit final ; en moyenne un MCP comprend  $3,7 \pm 1,0 \cdot 10^{11}$  plaquettes dans un volume d'environ 250 ml. Les poches de MCP ainsi préparées sont conservées sous agitation à 22°C.

### **1.1.1.2 Transformation des produits transfusionnels**

#### ***1.1.1.2.1 Déplasmatisation***

La déplasmatisation consiste à éliminer la partie plasmatique d'un concentré plaquettaire (CPA ou MCP). La quantité de plasma éliminée est remplacée par une solution de stockage de plaquette SSP+.

#### ***Matériels***

- Poche de recueil (Macopharma, France)
- Centrifugeuse Kr4i Rotor Rp4 (thermo Scientifique, France)
- Solution de NaCl glucose Biowash (Bioluz, France)
- Solution SSP+ (Macopharma, France)
- Presse à plasma manuel (Terumo medical corporation, USA)

- Soudeuse stérile de tubulures: Sterile Tubing Welders (Terumo medical corporation, USA)

## ***Procédure***

### ***Déplasmatisation totale***

La poche de concentré de plaquettes (CPA ou MCP) est centrifugée sur Kr4i Rotor Rp4 (5000g, 15 min, 22°C, pente de freinage = 0, pente d'accélération = 8). La poche est ensuite transférée sur une presse manuelle à plasma après avoir été couplée à une poche de recueil par une connexion stérile par soudure à chaud des tubulures (système clos), pour permettre le transfert du surnageant de plasma dans la poche de recueil. Les plaquettes sont remises en suspension avec 250ml de solution NaCl glucosée en poche (Macopharma) par connexion stérile. Un massage doux de la poche est appliqué de façon à dissocier, sans les activer, les plaquettes compressées par la centrifugation. La procédure est renouvelée deux fois pour une complète déplasmatisation. La dernière remise en suspension est réalisée dans 250 ml de SSP (Macopharma, France).

### ***Déplasmatisation partielle***

La poche de concentré de plaquettes (CPA ou MCP) est centrifugée sur Kr4i Rotor Rp4 (5000g, 15 min, 22°C, pente de freinage = 0, pente d'accélération = 8). Une fois connectée à une poche de recueil et mise sous presse, les 2/3 de plasma sont éliminés (estimation par pesée) et un volume équivalent en solution SSP+ est ajouté.

#### ***1.1.1.2 Cryoprécipitation***

La cryoprécipitation consiste à fractionner en deux parties une solution protéique représentée ici par un plasma en jouant sur la solubilisation des protéines à des températures basses.

## ***Matériels***

- Centrifugeuse Kr4i Rotor Rp4
- Soudeuse stérile de tubulures
- Presse à plasma manuelle
- Poche de recueil 400 ml (Macopharma, France)

### ***Protocole***

La cryoprécipitation peut être réalisée sur une poche plasma congelé ou une poche de concentré de plaquettes issu de CPA ou MCP.

Les poches sont décongelées lentement sur un lit de glace de façon à générer un cryoprécipité.

Les poches sont ensuite centrifugées (2000g, 15 min, 22°C, Pente de freinage = 0, Pente d'accélération = 8) puis connectées stérilement à une poche de recueil et mises sous presse de façon à transférer l'intégralité du surnageant dans la poche de recueil, seul le cryoprécipité reste dans la poche de départ.

Le cryoprécipité est un produit en très faible quantité de l'ordre de quelques grammes, celui-ci sera re-suspendu dans une solution de SSP+ de 10 à 30 ml pour être récupéré.

#### ***1.1.1.2.3 Obtention d'une solution plasmatique***

Cette opération consiste à obtenir après filtration un plasma issu d'un don de plasma. Cette opération peut être également réalisée à partir d'un surnageant de cryoprécipité du plasma.

### ***Matériels***

- Unité de filtration Nalgène®

### ***Protocole***

Le plasma provenant d'un don de sang total est décongelé puis filtré à 0.22 µm (Nalgene®), permettant ainsi l'obtention d'une solution plasmatique.

#### ***1.1.1.2.4 Obtention d'une solution d'extrait plaquettaire (SEP)***

Cette opération consiste à obtenir une solution enrichie uniquement en protéines plaquettaires. Cette opération peut se faire à partir d'un CPA ou d'un MCP.

### ***Matériels***

- Centrifugeuse Kr4i Rotor Rp4
- Centrifugeuse Eppendorf 5430
- Poches de NaCl glucosé (Macopharma, France)
- Poche de solution de stockage de plaquettes de type intersol® (Fenwal, USA)

### ***Protocole***

La poche de concentré de plaquettes contenant environ  $5.10^{11}$  plaquettes est centrifugée sur Kr4i Rotor Rp4 (5000g, 15 min, 22°C, pente de freinage = 0, pente d'accélération = 8). La poche est ensuite transférée sur une presse manuelle à plasma après avoir été couplée à une poche de recueil par connexion stérile pour permettre le transfert du surnageant de plasma dans la poche de recueil. Les plaquettes sont remises en suspension dans 250ml de solution NaCl glucosée en poche (Macopharma) par connexion stérile et massage doux de la poche pour re-suspendre les plaquettes sans les activer. La procédure est renouvelée deux fois pour une complète déplasmatisation. La dernière remise en suspension est réalisée dans 30 ml d'Intersol®.

La suspension plaquettaire est congelée à -35°C pour générer la cryolyse des plaquettes. Après décongélation à 37°C, le lysat obtenu est centrifugé à 7000g pendant 10 minutes et le surnageant est récupéré. L'opération est renouvelée deux fois suivi d'une filtration du surnageant à 0.22 µm (Nalgene®). Ce procédé permet l'obtention d'une solution d'extrait plaquettaire ou SEP.

### **1.1.1.3 Viro-inactivation des produits transfusionnels**

#### ***1.1.1.3.1 Viro-inactivation par pasteurisation***

La viroinactivation par pasteurisation est réalisée par l'EFS Nord de France.

Pour obtenir un plasma pasteurisé, un lot de 100 poches de plasma congelées de 600 ml sont pré-décongelées 5 heures à température ambiante avant d'être mélangées dans une cuve caloporteur avec une eau à +30°C sous agitation progressive. Une fois décongelé totalement, un premier stabilisant (Acide Citrique (62,5g/l), Citrate Trisodique (71,5g/l), L.Arginine (140g/l), L. Lysine (140g/l) et Gluconate de calcium (50,2g/l) dans eau ppi) est ajouté à raison de 37ml/kg, puis du saccharose et du sorbitol comme stabilisants également (respectivement 566g et 1410,5g par litre de plasma). L'ensemble est chauffé à +30°C pendant une heure sous agitation pour faciliter la dissolution des additifs et l'homogénéisation. Le taux de citrate est ajusté à 20mM. Le plasma est ensuite porté à 60°C +/- 1°C pendant 10 heures sous agitation. Une fois refroidi à +30°C, le plasma est clarifié par filtration (filtre Rigimesh inox 70µm), ultrafiltré, concentré et dialysé pour éliminer les stabilisants. Le tout est re-concentré, remis au volume initial avant d'être de nouveau filtré en série pour clarifier l'ensemble (1,2µm puis 0,45µm). Le plasma pasteurisé est réparti en poches de recueil de manière aseptique (filtration à 0,22µm), avant d'être congelé à -35°C.

### ***1.1.1.3.2 Viro-inactivation au bleu de méthylène***

#### ***Matériels***

- Kit Theraflex® (Macopharma, France)
- Illuminateur Macotronic (Macopharma, France)

#### ***Protocole***

Une poche de plasma mise au volume d'une unité pédiatrique est connectée à un kit Theraflex (Macopharma, France). Le plasma est alors passé à travers un filtre de déleucocytation plasmaflex PLAS4 avant de passer à travers une pastille de bleu de méthylène. Le plasma mélangé au BM à raison de 1  $\mu$ M de moyenne, se retrouve dans une poche d'illumination. Après avoir déconnecté le filtre et le compartiment de la pastille de BM, la poche est illuminée avec l'illuminateur Macotronic (Macopharma, France) 20 minutes à + 20°C à une longueur d'onde de 560 nm (énergie total émise : 180 J/cm<sup>2</sup>). Le plasma illuminé est transféré dans la poche de stockage après être passé à travers le filtre Blueflex éliminant le bleu de méthylène résiduel et ces dérivés dus à l'illumination. La poche de stockage est ensuite dissociée du reste du kit et stockée à -35°C.

## **2 Isolement des cellules stromales mésenchymateuses à partir de moelle osseuse**

Le matériel biologique utilisé pour évaluer nos produits de substitution du SVF est la cellule stromale mésenchymateuse (CSM) humaine de la moelle osseuse. Les CSM sont isolées à partir de déchets opératoires à l'occasion de la pose d'une prothèse totale de hanche (PTH) chez un patient quelque soit son sexe.

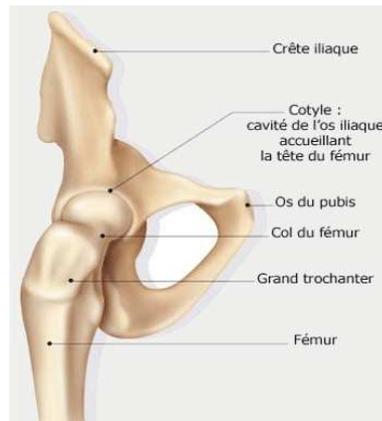
Toutes les personnes ayant subi cette opération ont été informées par un consentement éclairé sur le devenir possible de leurs déchets opératoires pour la recherche.

### ***2.1 Extraction cellulaire : de la crête iliaque à la suspension cellulaire***

La pose d'une prothèse totale de hanche est notamment prescrite lors d'une fracture du col du fémur. Pour la pose de cette PTH, le chirurgien doit façonner le cotyle (ou acetabulum) à

l'aide d'une fraise spécifique pour pouvoir installer le cotyle métallique de la prothèse (Figure 15). Le fraisage creuse le cotyle du patient, générant des débris d'os spongieux enrichis en moelle osseuse contenant des CSM.

La récupération du matériel s'effectue au bloc opératoire en respectant les consignes sanitaires. Les résidus de fraisage sont transférés de manière le plus stérilement possible dans un flacon en verre stérile de 500 ml contenant 100 ml de PEAA dont la composition est détaillée dans le Tableau 6.



**Figure 15 : Anatomie de l'articulation os iliaque/fémur**

<http://www.nodashi.com/tag/medecine/page/2/>

Produits	Volume (VF = 500ml)	Concentration finale dans le milieu
<b>PBS 1X</b>	<b>462,5 ml</b>	
<b>EDTA (100 mM)</b>	<b>5 ml</b>	<b>1 mM</b>
<b>ACD-A</b> <b>Acide citrique (8g/l),</b> <b>Citrate de sodium (22g/l),</b> <b>Dextrose (24.5g/l)</b>	<b>20 ml</b>	<b>Acide citrique 0.32g/l</b> <b>Citrate de sodium</b> <b>0.88g/l</b> <b>Dextrose 0.98g/l</b>
<b>Albumine 20%</b>	<b>12.5 ml</b>	<b>0.5%</b>
<b>Ciprofloxacine (2mg/ml)</b>	<b>2,5 ml</b>	<b>0,5%</b>

**Tableau 6°: Composition de la solution PEAA (PBS-EDTA-ACD-A-Albumine)**

Les CSM sont isolées des débris d'os spongieux en secouant énergiquement le flacon contenant les débris d'os et laissant décanter 20 minutes à température ambiante (TA). Le

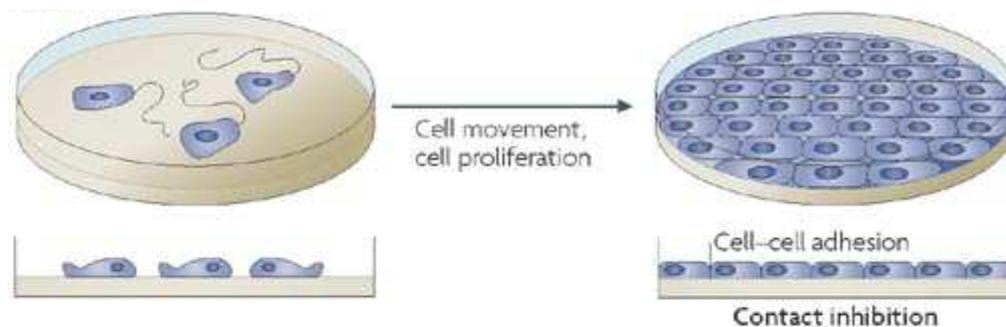
surnageant est aspiré et réparti dans 2 tubes de 50 ml en évitant d'aspirer les esquilles osseuses. 100 ml de PEAA sont à nouveau ajoutés aux résidus de fraisage et l'opération est renouvelée une fois. Les tubes de surnageant sont centrifugés pendant 10 minutes à 420 g à TA. 2 ml de PEAA sont ajoutés à chaque culot, ces derniers sont mélangés après homogénéisation. La suspension cellulaire est filtrée à 70  $\mu\text{m}$  et transférée dans un nouveau tube de 50 ml (filtrer 2 ml par 2 ml). La suspension cellulaire filtrée est complétée avec du PEAA à 40 ml final. Une numération cellulaire est réalisée à l'aide d'un automate type l'ADVIA® de façon à connaître le nombre total de cellules mononucléées (CMN) contenu dans la suspension cellulaire avant mise en culture.

## 2.2 Evaluation *in vitro* du substitut de SVF sur une culture de CSM

### 2.2.1 Etude de la prolifération des CSM

Pour valider la qualité du produit élaboré à partir de protéines plaquettaires et plasmatiques en tant que supplément de milieu de culture, les CSM de moelle osseuse ont servi de modèle cellulaire.

Des CSM en culture *in vitro* dans des conditions de prolifération vont se multiplier jusqu'à atteindre un nombre maximum de cellules en fonction de la surface de culture (confluence). Le recouvrement total de la surface générant une inhibition de contact (Figure 16)



**Figure 16 : Accroissement de la population et arrêt par inhibition de contact**  
(Takai et al., 2008)

La prolifération cellulaire correspond mathématiquement à une fonction sigmoïde. Au début de culture, la phase de latence correspond au temps où les cellules se conditionnent à entrer en prolifération. Vient ensuite la phase exponentielle où les cellules sont en cours de prolifération, étape où toutes les cellules capables de proliférer rentrent dans leur cycle cellulaire. Puis vient la phase de déclin au cours de laquelle les cellules sortent de la phase du

cycle cellulaire, provoquée généralement par l'encombrement cellulaire générant l'inhibition de contact.

Deux paramètres sont étudiés :

- le nombre de cellules obtenues à un temps  $t$  donné pendant théoriquement la phase exponentielle de prolifération, on parlera de « Jour fixe ou J Fixe ».
- Le nombre de cellules obtenues quand le taux de recouvrement est supérieur à 80%, on parlera dans ce cas de « Jour de confluence ou J Confluence ».

Les cellules sontensemencées en plaques de 6 puits en condition humide à 37°C en normoxie (20% d'O<sub>2</sub> à 5% de CO<sub>2</sub> dans un milieu type MEM $\alpha$  (milieu essentiel minimum) low glucose (Ref : 01-042-1A, ATGC, France). La prolifération des cellules est étudiée entre deux et trois passages successifs. Les cellules arrivées à confluence sont remises en suspension pour être réensemencées dans la même condition de milieu générant le passage suivant.

### **2.2.1.1 L'ensemencement en primo-culture**

Les cellules proviennent de la suspension cellulaire extrait des résidus de fraisage. La numération cellulaire donne le nombre de CMN à ensemercer. Pour l'étude de la confluence 10<sup>6</sup> CMN sontensemencées par puits (en duplicata ou triplicata) contenant 2 ml de milieu MEM $\alpha$  additionné de SVF ou de son substitut à tester. La même procédure est utilisée pour l'étude des « Jfixes ».

Les milieux de culture sont renouvelés au troisième jour après l'ensemencement, au 7<sup>ème</sup> jour puis tous les 7 jours suivants.

### **2.2.1.2 Arrêt des cultures et numération cellulaire**

Pour estimer la prolifération cellulaire, les cellules sont décollées du support de culture et dissociées par traitement enzymatique avant d'être comptées pour obtenir une estimation de la quantité de cellules produites. L'enzyme utilisée est la trypsine, une endoprotéase qui hydrolyse les liaisons peptidiques des protéines d'adhérence au niveau des acides aminés basique. L'enzyme est couplée à de l'EDTA, un chélateur qui réduit la concentration extracellulaire en calcium rendant les cadhérines inactives (interaction cellules-cellules).

Les cultures étudiées à « Jfixe » sont traitées au 10<sup>ème</sup> jour après ensemencement. Les cultures pour étudiées à « Jconfluence » sont traitées quand le tapis cellulaire recouvre plus de 80% du support de culture.

### ***2.2.1.2.1 Protocole de décollement par trypsine-EDTA***

Les cellules sont décollées à la trypsine-EDTA (GIBCO® Trypsine EDTA 0,5% 15400-054, Life technologies, France). Une fois le MEM $\alpha$  conditionné retiré, les cellules sont rincées avec 2 ml de PBS (PBS sans Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) par puits. 300  $\mu$ l de trypsine sont déposés sur les cellules et le tout est incubé cinq minutes à 37°C. Une fois ce délai passé, les cellules se retrouvent en suspension dans la solution de trypsine. Pour arrêter la réaction enzymatique, du MEM $\alpha$  conditionné est ajouté qsp 2 ml (les solutions de supplémentation contiennent naturellement des anti-trypsines nécessaires pour éviter une trop forte dégradation des protéines membranaires). La suspension de cellules est ensuite énumérée à l'aide d'une cellule de Malassez. La suspension cellulaire est mélangée à du bleu trypan (GIBCO® Bleu de trypan 15250, Life technologies, France) dans une plaque de 96 puits. Le mélange est déposé sur une cellule de Malassez. Les cellules sont comptabilisées sur l'ensemble de la cellule de Malassez permettant de définir la densité de cellules par unité de volume.

### **2.2.1.3 Réensemencement cellulaire et réalisation des passages successifs de culture**

Les cellules remises en suspension après traitement à la trypsine-EDTA, vont être remises en culture pour étudier leur capacité proliférative après chaque réensemencement, plus communément appelé « passage ». La remise en culture après la primoculture se nomme le passage 1, puis passage 2.

Les suspensions cellulaires de chaque duplicata ou triplicata sont mélangées pour obtenir une suspension cellulaire représentative de la condition de culture et de la souche cellulaire. Les suspensions sont centrifugées (temps : 5 minutes, 450g, température ambiante). Une fois culotté, le surnageant est remplacé par 1 millilitre de MEM $\alpha$ .

Après composition des plaques 6 puits par les différents milieux conditionnés, chaque puits correspondant à une condition de supplémentation estensemencé avec la suspension cellulaire correspondant à une concentration de 4000 CSM par puits. Ces puits correspondent à l'étude de la prolifération à confluence ou à Jfixe. Ces conditions sont réalisées en duplicata ou triplicata en fonction de la souche de CSM et de la supplémentation du milieu.

Les cellules cultivées pour l'étude de la prolifération à Jfixe sont décollées du support par action de la trypsine-EDTA au 5<sup>ème</sup> jour après ensemencement. L'arrêt des cultures à

confluence est établi après une appréciation à plus de 80% de la colonisation de la surface de culture et trypsinées comme précédemment décrit.

Les changements de milieu s'effectuent une fois par semaine à intervalle régulier.

L'opération est renouvelée pour la mise en culture d'un passage supplémentaire.

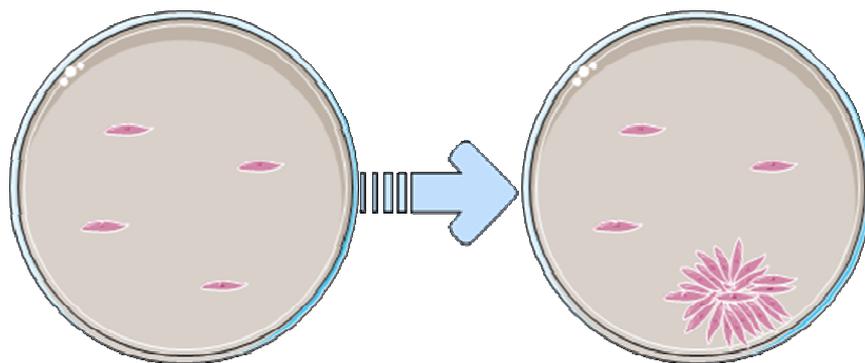
## 2.2.2 Etude de la clonogénicité des CSM

### 2.2.2.1 Le test des CFU-F

Les CSM sont une population de cellules hétérogènes, au caractère souche varié (allant de la primitivité à l'engagement dans une voie de différenciation). Au sein de cette population, se trouvent des cellules capables de générer une multitude de cellules filles à la forme fibroblastoïde par réplication (Friedenstein et al., 1974; Friedenstein et al., 1976). Ces réplications successives formant une colonie, colonie ayant pour origine une cellule unique, on parle ainsi d'une unité formant une colonie de cellules fibroblastiques ou CFU-F. Le nombre de ces colonies est corrélé à la primitivité de la population cellulaire d'origine.

La mise en évidence de ces CFU-F se fait par un ensemencement d'un support de culture à très faible densité pour isoler chaque cellule et être sûr que les colonies obtenues seront issues d'une cellule unique ou clone (Figure 17).

L'étude de la clonogénicité est faite en parallèle à l'étude de la prolifération avec les cellules provenant des mêmes suspensions cellulaires et les mêmes conditions de culture et de milieu.



**Figure 17 : Principe de l'étude des CFU-f**

On peut voir que les cellules sont isolées à  $t_0$ , au temps  $t$ , on constate qu'une colonie s'est développée où se trouvait au départ une des cellules ensemencées, on parle dans ce cas de CFU-F

### 2.2.2.2 Mise en place de l'étude de la clonogénicité

Les cellules sontensemencées à très faible concentration en plaques 6 puits avec 2ml de milieu conditionné par puits puis incubées pendant 10 jours à 37°C sous condition de normoxie (20% d'O<sub>2</sub>) et 5% de CO<sub>2</sub>. Les cultures des CFU-F se font en parallèle des études de la prolifération et les suspensions cellulaires dont elles proviennent sont celles utilisées pour l'ensemencement en primoculture, passage 1, passage 2. Les cultures des CFU-F sont établies en fonction de la souche cellulaire et de la supplémentation du milieu.

Pour les CFU-F correspondant à la primoculture, les CMN issues de la suspension récupérée des résidus de fraisage sontensemencées à 132000 cellules/puits. Les milieux de culture sont renouvelés au 3<sup>ème</sup> jour et 7<sup>ème</sup> jour de culture.

Pour les CFU-F correspondant aux passages suivants, les cellules sont issues des suspensions provenant du passage précédent. Les CSM sontensemencées à 100 cellules/puits. Le milieu de culture est fonction de leur condition de supplémentation d'origine. Les milieux sont renouvelés au 7<sup>ème</sup> jour de culture.

#### *Protocole d'arrêt, de fixation et de coloration des cultures de CFU-F*

Au 10<sup>ème</sup> (+/- 1) jour de culture, les cellules sont rincées deux fois au PBS, puis fixées pendant 10 minutes à l'éthanol 70° (VWR Prolabo, France) avant d'être séchées à l'air ambiant.

Une fois l'éthanol évaporé, les puits sont colorés avec une solution de Giemsa à 6% (Réactif RAL, France) pendant 15 minutes avant d'être rincés deux fois avec un mélange d'eau standard-eau osmosée, puis séchés à l'air ambiant.

Une fois les puits séchés, les colonies sont énumérées sous microscope optique.

### 2.2.3 Etude du phénotypage des cellules après passage

L'étape de prolifération *in vitro* est cruciale pour accroître le nombre de cellules nécessaires à une utilisation en thérapie cellulaire. Mais ces cellules doivent répondre à des critères de qualité. Il est nécessaire de contrôler que le passage *in vitro* n'a pas altéré les cellules, l'environnement cellulaire et les traitements subits pouvant influencer leurs caractéristiques. L'analyse quantitative et qualitative de ces cellules peut se faire par l'étude de leur phénotype membranaire en cytométrie de flux qui va permettre de déterminer la richesse en CSM de la population cellulaire obtenue (pureté).

### 2.2.3.1 Principe de l'étude du phénotype membranaire par la cytométrie de flux

Le phénotype membranaire des cellules est étudié après l'étape de culture *in vitro*. Les cellules remises en suspension après détachement enzymatique par trypsine vont subir un marquage immunochimique direct par des anticorps, spécifiques de certaines protéines membranaires, couplés à des fluorochromes qui seront détectés par cytométrie en flux.

La cytométrie en flux repose sur le passage en flux (liquide ou gazeux) de cellules marquées par des anticorps couplés à des fluorochromes à travers un laser. Ce laser (488 nm) excite ces molécules photosensibles qui deviennent à leur tour une source de lumière à la longueur d'onde spécifique (Figure 18). La lumière est interceptée par des capteurs photoélectriques ou photomultiplicateurs, qui renseignent sur la présence ou non de la protéine d'intérêt. Compte tenu de la diversité du nombre de fluorochromes il est possible de marquer plusieurs protéines sur une même cellule, les anticorps étant spécifiquement orientés sur une protéine d'intérêt.

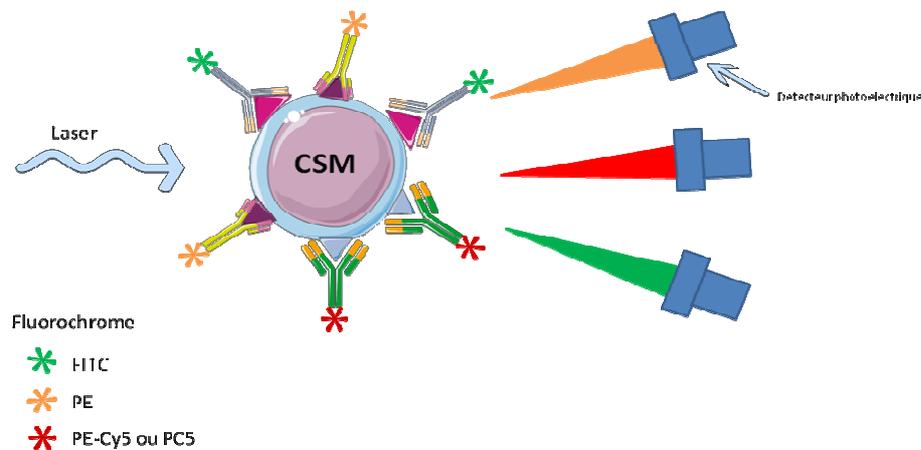


Figure 18 : Intérêt du marquage cytométrique à 3 couleurs

Les suspensions cellulaires sont centrifugées à 450g pendant 5 minutes (centrifugeuse à tube labofuge). Le culot de cellules est re-suspendu dans du tampon « cytométrie » (Tableau 7) à une concentration de  $10^5$  CSM/ $20 \mu\text{l}$  à  $+4^\circ\text{C}$  pendant 20 minutes (ne pas dépasser 24 heures). Le tampon « cytométrie » est composé d'anticorps humain non spécifiques qui vont se fixer non-spécifiquement à tous les sites antigéniques et ainsi éviter les marquages non spécifiques par les anticorps d'intérêt sur ces sites.

Sur plaque 96 puits, 2 ou 3 anticorps d'intérêts (Tableau 8) sont mélangés (5 µl par anticorps) pour réaliser un double ou un triple marquage. Dans un puits 2 à 3 anticorps peuvent être mélangés seulement si ils ne sont pas couplés au même fluorochrome (FITC, PE, PC5) et s'ils ne sont pas orientés vers la même protéine (ex : anti-CD90-FITC et anti-CD90-PC5). Des Immunoglobulines (IgG) non spécifiques servent à calibrer le cytomètre. L'ensemble des puits formant une série de marquages permet d'étudier de nombreux marqueurs d'intérêts.

Les cellules en tampon « cyto » sont mélangées (20 µl/puits) à chaque assortiment d'anticorps préalablement préparé. La réaction Ag-Ac se fait pendant 20 minutes à l'obscurité à +4°C. Une fois marquées, les cellules sont lavées deux fois avec 150 µl de PBS (centrifugation à 700g pendant 2 minutes sur Jouan GR 422), avant d'être reprises dans 150 µl de PBS formol 1%.

Les cellules marquées sont ensuite passées aux cytomètre de flux dans un délai de 7 jours.

Produits	Volume (VF= 200ml)	Concentration finale dans le milieu
PBS 1X (Biochrom AG)	160 ml	
Albumine 20% (vialebex, LFB)	20 ml	2%
IgG humaine polyvalente (50 mg/ml) (Tegelin, LFB)	20 ml	0.5%

Tableau 7°: Composition du tampon cytométrie

Anticorps	Espèce	Manufacture	Référence	Fluorochrome	Role
IgG1	souris	Beckman coulter	A07795	FITC	Non spécifique
IgG1	souris	Beckman coulter	A07796	PE	Non spécifique
IgG1	souris	Beckman coulter	A07798	PC5	Non spécifique
IgG anti-CD29	souris	Beckman coulter	IM0791U	FITC	Intégrine β1
IgG anti-CD44	souris	Caltag laboratories	MG2b04	PE	Molécule d'interaction cellulaire (interaction lymphocytaire, hématopoïese)
IgG anti-CD45	souris	Beckman coulter	A07782	FITC	Protein tyrosine phosphatase ;

IgG anti-CD73	souris	BD Biosciences	550257	PE	<u>5'-ribonucleotide phosphohydrolase</u>
IgG anti-CD105	souris	Caltag laboratories	MG104	PE	Endoglin modulator of cellular responses to TGF- $\beta$ 1
IgG anti-HLADR	souris	Beckman coulter	IM0463U	FITC	MHC de classe II
IgG anti-CD90	souris	Beckman coulter	IM3703	PC5	THYMocyte differentiation antigen 1
IgG anti-CD31	souris	Beckman coulter	IM1431U	FITC	Marqueur endothélial
IgG anti-CD34	souris	Beckman coulter	IM1870	FITC	Marqueur endothélial
IgG anti-CD90*	souris	Beckman coulter	IM1839U	FITC	THYMocyte differentiation antigen 1
IgG anti-CD117	souris	Beckman coulter	IM1360U	PE	Marqueur hématopoïétique
IgG anti-CD146*	souris	BD Biosciences	550315	PE	M-CAM
IgG anti-CD200*	souris	BD Biosciences	552475	PE	Molécule immunomodulatrice
IgG anti-CD133	souris	Miltenyi Biotec	130-080-801	PE	AC133, marqueur progéniteur hématopoïétique ou endothélial
IgG anti-CD144	souris	Beckman coulter	PN A07481	PE	VE-Cadherin spécifique des cellules endothéliales
IgM anti Stro1	souris	Santa cruz Biotechnology	Sc-47733	FITC	un marqueur stromal exprimé par les cellules pouvant supporter notamment l'hématopoïese (Simmons and Torok-Storb, 1991).

IgG anti- MSCA 1 (W8B2)	souris	Miltenyi Biotec	130-093-587	FITC	Mesenchymal stromal cell antigen-1
IgG anti- CD56	souris	Beckman coulter	IM1844	FITC	N-CAM
IgG anti- CD271*	souris	Miltenyi Biotec	130-091-885	PE	Marqueur de primitivité

**Tableau 8 : Liste des anticorps utilisés lors du marquage phénotypique**

### 3 Analyses protéomiques

#### 3.1 Détermination de la concentration protéique : méthode de Bradford

Pour déterminer la concentration en protéines d'un échantillon, la méthode par dosage colorimétrique développée par Marion M. Bradford (Bradford, 1976) est très sensible tout en étant simple à réaliser.

C'est une méthode basée sur l'adsorption du bleu de Coomassie G250. Ce colorant se lie de façon ionique sur les acides aminés basiques (arginine, histidine, lysine) et crée des interactions hydrophobes sur les acides aminés hydrophobes (glycine, alanine, etc...). La complexation du colorant sur les protéines entraîne un transfert de son pic d'adsorption qui passe du rouge au bleu, le degré de changement d'absorbance étant proportionnellement lié au nombre de formes liées du colorant, extrapolable avec la concentration massique en protéines.

#### *Matériels*

- Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad, France)
- Spectrophotometre Shimadzu UV 160 (Shimadzu, France)
- Centrifugeuse MiniSpin® (Eppendorf, France)
- Vialubex 200 mg/ml (LFB, France) (Albumine humaine)

## ***Protocoles***

### **Préparation de la gamme étalon**

Une solution d'albumine est préparée à 1 mg/ml dans de l'eau distillée pour créer une gamme étalon selon le Tableau 9.

Concentration BSA (mg/ml)	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,03125
------------------------------	---	-----	------	-------	--------	---------

**Tableau 9 : Gamme étalon pour le dosage de protéines**

### **Préparation des échantillons**

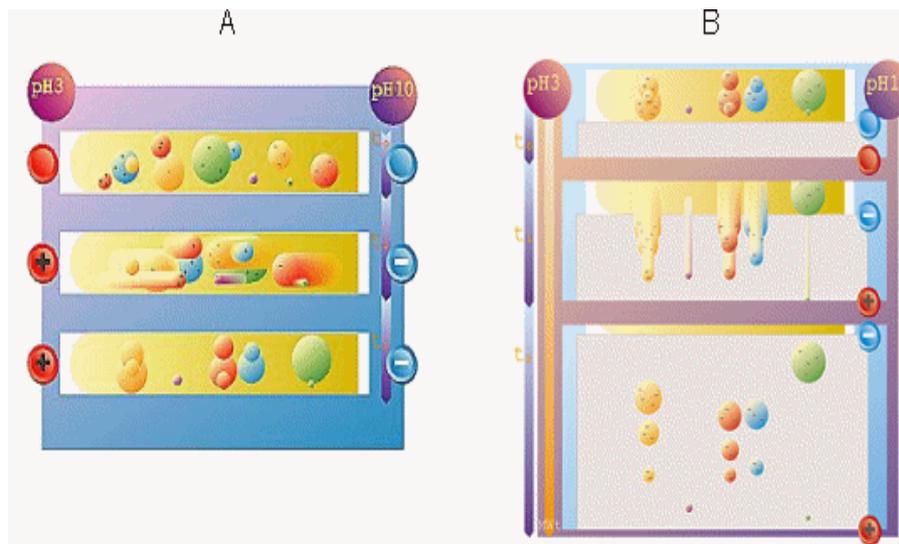
Les différentes solutions étudiées sont échantillonnées en microtube eppendorf et centrifugées sur MiniSpin® à 10000g pendant 10 minutes. Une gamme de dilution des différents échantillons allant de 1/50 à 1/200 est réalisée.

### **Dosage protéique par spectrométrie**

20µl de solution protéique (gamme albumine et gamme échantillon) est dilué dans un millilitre de Quick Start Bradford Protein Assay avec 20µl de solution de protéines. Le tout est laissé reposer 5 minutes à l'obscurité avant d'être lu à 595 nm au spectrophotomètre.

## **3.2 L'électrophorèse bidimensionnelle (2-DE)**

L'électrophorèse bidimensionnelle (2D) repose sur deux séparations successives des polypeptides dans un gel de polyacrylamide (Figure 19). Il s'agit d'une technique de séparation protéique mise au point par O'Farrell (O'Farrell, 1975).



**Figure 19 : Principe de l'électrophorèse bidimensionnelle**

A : séparation par isoélectrofocalisation

B : séparation en fonction de la masse moléculaire

La première dimension, ou isoélectrofocalisation (IEF) sépare les polypeptides sous l'effet d'un champ électrique en fonction de leur charge jusqu'à leur point isoélectrique (pI) dans un gel de polyacrylamide à l'intérieur duquel est établi un gradient de pH immobilisé (gradient d'Immobilines<sup>®</sup>). Le point isoélectrique étant atteint quand les charges électriques positives de la protéine s'équilibrent avec les négatives, le pH environnant ne permettant plus un échange de protons suffisant pour rompre cet équilibre, rendant la protéine insensible au champ électrique et donc incapable de se déplacer. La seconde dimension (SDS-PAGE), orthogonale à la première, sépare les polypeptides selon leur masse moléculaire relative (Mr). A cette étape les protéines sont chargées négativement pour permettre leur déplacement via un champ électrique, le maillage du gel d'acrylamide devenant de plus en plus dense au fur et à mesure de la migration. Ce maillage augmentant la difficulté à se mouvoir des protéines, est directement corrélé à leur masse moléculaire. Chaque polypeptide est séparé dans le gel en fonction de son pI et de sa Mr. Cette technique permet la séparation simultanée de plusieurs centaines de polypeptides d'un échantillon biologique complexe y compris leurs différents isoformes résultant de modifications post-traductionnelles.

**Matériels**

- ReadyStrip™ IPG Strips, 18 cm<sup>2</sup>, 0,5 mm d'épaisseur, pH 3-10 (Ref: 163-2023, Bio-Rad, France)
- ReadyStrip™ IPG Strips, 18 cm<sup>2</sup>, 0,5 mm d'épaisseur, pH 5-8 (Ref : 163-2036, Bio-Rad, France)
- Protean IEF Cell Bio-Rad 1 IPG phor GE (Bio-Rad, France)
- Cuve Protean plus Dodeca Cell Bio-Rad (Bio-Rad, France)
- Chambre multi-coulage de gel (Ref: 165-4160, Bio-Rad, France)
- Plaques de verre à charnière 1mm d'espace, 20 x 20,5 cm (Ref : 165-4170, Bio-Rad, France)
- Formeur de gradient (Ref : 165-4121, Bio-Rad, France)
- Kit sigma Prot-Sil 1 (coloration nitrate d'argent) (Sigma-Aldrich, France)
- Scanner GS 800 Bio-Rad piloté par le logiciel Quantity One (Bio-Rad, France)
- Precision Plus Protein™ Standards unstained (Bio-Rad, France) (marqueur de poids moléculaires)
- logiciel ImageMaster 2D Platinum 5.0 (GE Healthcare, France)
- Urée (Ref : U6504, Sigma-Aldrich, France)
- Thiourée ou PESTANAL® (Ref : 45328, Sigma-Aldrich, France)
- Glycerol (Ref : G8773, Sigma-Aldrich, France)
- CHAPS (Ref: C9426, Sigma-Aldrich, France)
- Triton™ X 100 (Ref: T8532, Sigma-Aldrich, France)
- Sulfobétaïnes 3-10 (Zwitterionic detergent, Ref: D4266, Sigma-Aldrich, France)
- Isopropanol (Ref: I9516, Sigma-Aldrich, France)
- Isobutanol (Ref: 58448, Sigma-Aldrich, France)
- DTT (1,4-Dithio-DL-thréitol, Ref: 43815, Sigma-Aldrich, France)
- Blue de bromophénol (Ref: B5525, Sigma-Aldrich, France)
- Ampholyte pH 3-10 (Ref: 10043, Sigma-Aldrich, France)
- Ampholyte pH 5-7 (Ref: 10048, Sigma-Aldrich, France)
- Huile minérale (Ref : 163-2129, Bio-Rad, France)
- Electrode Wicks (Ref : 165-4071, Bio-Rad, France)
- Plateau i12™ 18 cm (Ref: 165-4041, Bio-Rad, France)

- Rack de migration (18 cm focusinf Tray With Lid, Ref: 165-4040, Bio-Rad, France)
- Acrylamide/Bis-Acrylamide 30% solution ratio 37,5 :1 (Ref: A3699, Sigma-Aldrich, France)
- Tris-Base (Ref : 154563, Sigma-Aldrich, France)
- SDS (Sodium dodecyl sulfate solution, Ref : L4522, Sigma-Aldrich, France)
- Persulfate d'ammonium 10% (Ref: A3678, Sigma-Aldrich, France)
- Temed (Tétraméthyléthylènediamine, Ref: T9281, Sigma-Aldrich, France)
- Iodoacétamide (Ref: I1149, Sigma-Aldrich, France)
- Glycine (Ref: G8898, Sigma-Aldrich, France)
- Thiosulfate de sodium anhydre (Ref: 72049, Sigma-Aldrich, France)

### 3.2.1 Première dimension : isoélectrofocalisation (IEF)

Cette étape requiert une première dénaturation du matériel biologique, pour ce faire un mélange (solution IEF) de chaotropes (urée, thiourée), de détergents (CHAPS), de réducteur (DTT) et ampholyte est utilisé. L'urée et le thiourée permettent la solubilisation des protéines même à forte concentration (Rabilloud et al., 1997), le détergent switterioniques évite l'agrégation des protéines dû au domaine hydrophobe (Chevallet et al., 1998), alors que le DTT permet le maintien des groupements –SH réduits évitant ainsi l'oxydation des protéines ou la formation de ponts di-sulfure entre les protéines (Herbert et al., 1997). La solution IEF à été élaborée dans l'optique de conserver au maximum les protéines de l'échantillon dans leurs états naturels mais non complexé.

Le support pour l'IEF le plus courant est celui qui utilise le gradient de pH immobilisé (IPG : immobilized pH gradient). Le gradient de pH est obtenu par la copolymérisation d'acrylamide et de BIS-acrylamide et de monomères à squelette d'acrylamide fonctionnalisés (soit par des groupes d'acide faible ou de base faible). Ces dernières générant le gradient de pH, confèrent par la même occasion un fort pouvoir tampon.

## ***Protocoles***

### **Etape de réhydratation des gels**

L'inclusion des protéines solubilisées à la solution de réhydratation permet d'accroître la capacité de charge des gels (Rabilloud et al., 1994) (Sanchez et al., 1999).

Après avoir déterminé la concentration protéique des échantillon, 150 µg de protéines (traité de la même manière que pour le dosage protéique) sont solubilisés dans un solution d'IEF 3-10 (urée 7M, thiourée 2M, glycérol 5 % (v/v), CHAPS 0.33 % (v/v), triton X-100 0.35 % (v/v), sulfobétaïnes 3-10 0.35 % (p/v), isopropanol 10 % (v/v), isobutanol 12.5 % (v/v), DTT 100 mM, une pointe de Bleu de bromophénol et un mélange d'ampholytes 3-10). Le volume de l'ensemble ne doit pas dépasser 400 µl. L'ensemble est porté au contact d'une ReadyStrip™ pH 3-10 sur un plateau i12™, le gel en contact direct avec la solution). L'ensemble est recouvert d'huile minérale pour éviter la cristallisation de l'urée, puis est laissé au repos 9 heures à 19°C pour une bonne adsorption des protéines dans le gel.

Remarque :

Pour l'utilisation de strips gel d'IEF pH 5-8 (ReadyStrip™ IPG Strips pH 5-8), le protocole est identique mise à par les ampholytes qui sont différents dans la solution IEF (mélange ampholyte 5-8).

### **Etape de la migration**

Après avoir imbibées d'eau bi-distillée des mèches de papier (Electrodes wicks) et les avoir placées sur les électrodes du rack de migration. Les strips réhydratées sont placées dans le rack, gel en contact avec les électrodes, recouvertes des mèches, à chaque extrémité et orientées coté pH acide au niveau de la cathode. L'ensemble est recouvert d'huile minérale. Le rack est déposé dans le générateur IEF (Protean IEF Cell Bio-Rad 1 IPG phor GE).

La focalisation est alors démarrée et réalisée avec le programme adéquate à 20°C (Tableau 10).

Une fois la focalisation terminée, les strips sont congelées à -20°C dans une gaine de polyéthylène).

Étape	Voltage (volt)	Condition	Temps (h)	Volts Heure
1	50	R	9	450
2	200	R	1	200
3	1000	L	1	600
4	10 000	L	6	33 000
5	10 000	R	5 h 34	55 750

**Tableau 10 : Programme de migration des protéines dans des strips 3-10 pour un gel analytique**  
(R) montée rapide du voltage, (L) montée linéaire du voltage

Remarque :

Le même programme est utilisé pour la focalisation sur les strips de pH 5-8.

### 3.2.2 Deuxième dimension : SDS-PAGE

Cette étape se déroule comme une électrophorèse monodimensionnelle classique (Laemmli, 1970). Les protéines sont préalablement dénaturées et chargées négativement de manière homogène par le dodécylsulfate de sodium (SDS) (Swank and Munkres, 1971). Le SDS, un détergent anionique fort, interagit avec les protéines par sa partie hydrophobe, empêchant le repliement de ces dernières, tout en rendant l'ensemble chargé négativement. Sous l'effet d'un courant électrique, les protéines vont alors se déplacer à travers un gel issu de la copolymérisation d'acrylamide et BIS à la densité croissante, générant un tamis moléculaire. Ce tamis générera une séparation selon leur  $M_r$ , les protéines ne pouvant se mouvoir à la même vitesse. Cette migration est permise grâce à un tampon électrolytique (tampon de migration).

#### *Protocoles*

##### **Préparation des gels**

Une fois les plaques de verre à charnière placées dans la chambre de coulage, les gels sont coulés en mélangeant les deux solutions d'acrylamide (Tableau 11) grâce au formeur de gradient relié à une pompe péristaltique de façon à générer des gels SDS-PAGE en gradient d'acrylamide (8%-15,8%).

	<b>Solution à 8%</b>	<b>Solution à 18.5%</b>
Acrylamide/Bis (30%/0,8%)	14.23mL	34.50mL
Tampon Tris-Base 4X (1,5M,pH 8,8)	14.23mL	14mL
Eau bi-distillée	28.46mL	-
SDS 10% (p/v)	0.57mL	0.56mL
Glycérol	-	8.44mL
Persulfate d'ammonium à 10% (p/v)	312µL	214µL
Temed	32.6µL	28µL

**Tableau 11°: Composition du gel d'électrophorèse SDS-PAGE (valeur pour 1 gel)**

Une fois coulé, le haut des gels est recouvert d'isobutanol saturé en eau bi-distillé pour aplanir le surface. L'ensemble est laissé à polymériser 1h à 2h à température ambiante. L'isobutanol est remplacé par de l'eau bi-distillée une fois les gels pris en masse et ils sont conservés à +4°C sous atmosphère humide.

#### **Migration dans la seconde dimension**

Une fois décongelées à température ambiante, les strips IPG sont incubées dans une première solution d'équilibration (Tris 50 mM à pH 8.8, urée 6 M, glycérol 30 % (v/v), SDS 1% (p/v), DTT 65 mM) pendant 15 minutes. Elles sont ensuite incubées 15 minutes dans une deuxième solution d'équilibration (Tris 50 mM à pH 8.8, urée 6 M, glycérol 30 % (v/v), SDS 1% (p/v), Iodoacétamide 53 mM).

Cette étape d'équilibration va charger négativement les polypeptides avec le SDS, réduire les ponts disulfures et alkyler les groupements thiols.

les strips sont entaillées de l'ordre de 5 mm à chaque extrémitée (partie en contact avec les électrodes) et placées sur le sommet des gels au gradient d'acrylamide (coté 8%) toujours entre les plaques de verre, les strips devant être en contact direct avec les gels et centrées. Le marqueur de poids moléculaires de référence est placé à gauche des strips par l'intermédiaire d'un papier imprégné de 10 µl de ce dernier. Les strips et le marqueur sont recouverts de tampon de migration (Tris 25mM, glycine 192 mM, SDS 3.5 mM, thiosulfate 1.25 mM) à 1% d'agarose qui permettra une meilleur pénétration des protéines dans les gels au gradient d'acrylamide.

Les supports de verre sont placés dans la cuve de migration Dodeca Cell préalablement remplie du tampon de migration, coté strips vers la cathode. La migration peut alors commencer selon le programme adéquate (Tableau 12) le tout à +10°C.

Étape	Voltage (volt)	Temps (h)
1	40	1
2	100	18

**Tableau 12 : Programme de la seconde migration sur gel de gradient d'acrylamide de 20x20,5 et 1mm d'épaisseur**

Après migration, les gels sont récupérés et dissociés de leur support de verre, et les polypeptides sont révélés avec le kit ProteoSilver™.

### 3.2.3 Analyse d'images des gels 2D

Les gels ne sont pas exploitables directement, il est nécessaire de les numériser et de les analyser sur un logiciel d'exploitation d'image. Pour cela les gels sont numérisés avec le scanner GS-800 à une résolution de 600 dpi (dots per inch = points par pouce) avec le logiciel d'exploitation : Quantity One. L'analyse qualitative différentielle se fait sur le logiciel Image master 2D Platinum 5.0.

## 4 Préparation d'un nouveau substitut du SVF à partir de produits plaquettaires et plasmatiques

### 4.1 Traitement de Concentrés de Plaquettes d'Aphérèse

Le lysat plaquettaire (Lpmix) élaboré au sein du laboratoire (Cf Fiche technique) en vue de son utilisation comme substitut du SVF pour la culture des CSM est un produit « brut ». Les plaquettes prélevées par aphérèse sont congelées, cette congélation entraînant une cryolyse des cellules libérant les facteurs de croissances plaquettaires dans le milieu de culture.

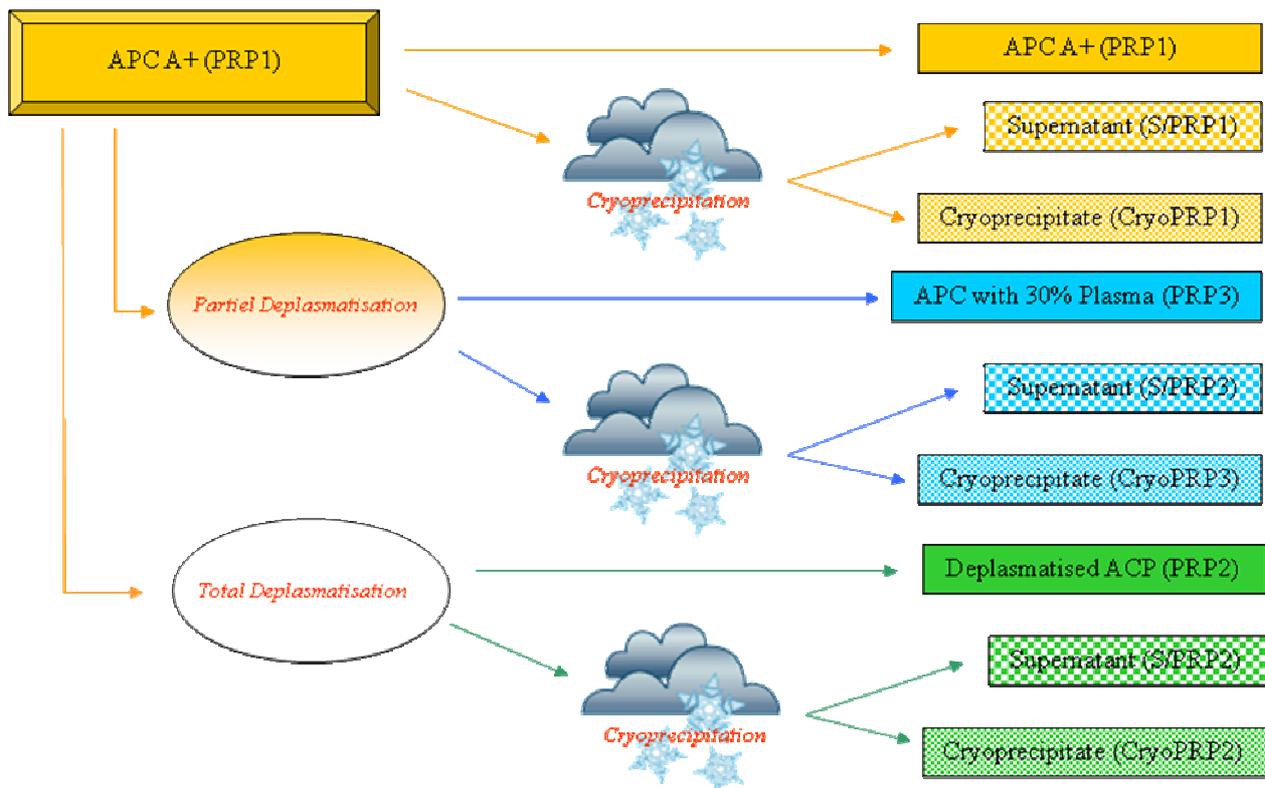
Les CPA prélevés jusqu'à présent pour générer le Lpmix ne sont pas déplétés en plasma avec ajout de solution de stockage de plaquettes, mais l'évolution des procédures de traitement va aboutir au fait que tous les concentrés de plaquettes seront stockés en solution de conservation. C'est pour cette raison que nous avons voulu étudier les conséquences de la déplétion en plasma sur les CPA pour soutenir la prolifération cellulaire.

Pour améliorer le lysat plaquettaire, nous avons voulu tester le processus de cryoprécipitation sur ce dernier, méthode de fractionnement encore jamais utilisée sur un concentré de plaquettes cryolysées. Le but de ce traitement est de permettre si possible la « sélection » des

protéines plaquettaires, si une partie de ces protéines sont capables de cryoprécipiter, et permettre ainsi l'optimisation de la qualité de notre Lp.

Pour cela nous avons traité un CPA sans solution de conservation par deux procédés soit de manière distincte soit combinée : un procédé de déplasmatisation (Chap 1§1.1.2.1) et un procédé de cryoprécipitation (Chap 1§1.1.2.2). Nous avons ainsi obtenu **9 produits** : **PRP1** natif, un surnageant de cryoprécipité (**S/PRP1**), un cryoprécipité (**CryoPRP1**), un PRP partiellement déplasmatisé contenant 30% de plasma (**PRP3**), un surnageant de PRP partiellement déplasmatisé et cryoprécipité (**S/PRP3**), un cryoprécipité de PRP partiellement déplasmatisé (**CryoPRP3**), un PRP totalement déplasmatisé (**PRP2**), un surnageant de PRP totalement déplasmatisé et cryoprécipité (**S/PRP2**) et un cryoprécipité de PRP totalement déplasmatisé (**CryoPRP2**) (Figure 20).

NB : Les cryoprécipités ont été récupérés dans 30 ml de solution SSP+ ;



**Figure 20 : Récapitulatif des solutions de supplémentation obtenues à partir d'un CPA**

Trois séries distinctes, la série 1 (orange) composée de produits non déplasmatisés. La série 2 (vert) composée de produits totalement déplasmatisés. La série 3 (bleu) composée de produits partiellement déplasmatisés.

#### 4.1.1 Evaluation des différents produits de substitution du SVF

Ainsi, les neuf produits obtenus après déplasmatisation +/-cryoprécipitation sont répartis en trois séries (série 1 à 3). Trois témoins ont également été élaborés (Tableau 13):

- Le plasma exempt de plaquettes (**Plasma**)
- Le lysat plaquettaire standard, provenant d'un pool de CPA de tout groupe (**Lpmix**)
- Le sérum de veaux fœtal (**SVF**) (HyClone, USA)

	Nomination	Milieu (2ml/puit)	Supplément protéique (Volume)	Héparine (2UI/ml de milieu)
Série 1	5% PRP1	MEM $\alpha$	PRP1 (100 $\mu$ l)	Oui
	5% S/PRP1	MEM $\alpha$	S/PRP1 (100 $\mu$ l)	Oui
	5% CryoPRP1	MEM $\alpha$	CryoPRP1 (100 $\mu$ l)	Oui
Série 2	5% PRP2	MEM $\alpha$	PRP2 (100 $\mu$ l)	Oui
	5% S/PRP2	MEM $\alpha$	S/PRP2 (100 $\mu$ l)	Oui
	5% CryoPRP2	MEM $\alpha$	CryoPRP2 (100 $\mu$ l)	Oui
Série 3	5% PRP3	MEM $\alpha$	PRP3 (100 $\mu$ l)	Oui
	5% S/PRP3	MEM $\alpha$	S/PRP3 (100 $\mu$ l)	Oui
	5% CryoPRP3	MEM $\alpha$	CryoPRP3 (100 $\mu$ l)	Oui
Témoin	5% Plasma	MEM $\alpha$	Plasma (100 $\mu$ l)	Oui
Témoin	5% Lpmix	MEM $\alpha$	Lpmix (100 $\mu$ l)	Oui
Temoin	10% SVF	MEM $\alpha$	SVF (200 $\mu$ l)	Non

Tableau 13 : Composition des milieux de cultures

***Matériels***

- SVF (Ref : 3016003, HyClone, thermo Scientific, USA)
- Héparine Choay (5000 UI/ml) (Ref : AMM-552436.3, Sanofi Synthelabo, France)
- Lpmix
- Plasma
- Les produits de supplémentation (PRP1, SPRP1, CryoPRP1 ; PRP2, SPRP2, CryoPRP2 ; PRP3, SPRP3, CryoPRP3)

***Protocole***

Les produits plaquettaires ainsi préparés sont testés comme substitut du SVF pour la culture des CSM. Ils sont additionnés directement au milieu de culture à la concentration de 5% (50 µl/ml de MEM $\alpha$ ). Les milieux de cultures sont préparés extemporanément comme indiqué dans le tableau 13. Les solutions issues des plaquettes, le plasma et le Lpmix sont décongelés extemporanément. L'héparine est utilisée pour éviter la complexification des protéines plaquettaires et/ou plasmatiques pouvant entraîner une gélification partielle du milieu de culture. Elle est ajoutée au milieu de culture à raison de 2U/mL sauf dans la condition sous SVF.

Les paramètres étudiés sont :

- La capacité proliférative des CSM
- La capacité clonale
- Le phénotype cellulaire à l'aide des anticorps suivants :
  - conjugué au FITC : CD29, CD45, HLADR
  - conjugué au PE : CD44, CD73, CD105
  - conjugué au PC5 : CD90
- Dosage protéique : Les différents produits issus des séries sont titrés par la méthode de Bradford pour estimer leur concentration en protéines.
- Analyse protéomique : mise en évidence des protéomes des différents lysats des trois séries par analyse sur électrophorèse bidimensionnelle. Les gels des différentes solutions plasmatiques sont comparés deux à deux, soit en fonction de leur homologie au sein de leur série (PRP1 vs PRP3), soit

par comparaison au sein de chaque série. Le plasma est comparé au PRP1, le produit avec lequel il s'apparente le plus.

## **4.2 Conception de la Solution d'Extraits Plaquettaires et Plasmatiques (SEPP)**

### **4.2.1 Evaluation de la concentration protéique des produits de substitution du SVF**

Les solutions de supplémentation de milieu comme le SVF ou le lysat plaquettaire sont utilisées à des quantités selon un ratio de volume. Ainsi la concentration en SVF correspond à un milieu de culture supplémenté à 10% de SVF, les milieux composés de produits plaquettaires sont enrichis à 5% de leur volume.

Ce procédé entraîne des variations dans la qualité de supplémentation d'un lot de produit de supplémentation à l'autre. Deux lots de Lpmix ou de SVF n'ont pas la même concentration protéique, cette différence se reflète directement sur l'efficacité du produit à stimuler la prolifération des CSM.

Pour ces raisons nous avons souhaité standardiser l'utilisation des produits en fonction de leur concentration en protéines (mg/l de milieu de culture).

Pour déterminer à quelle concentration les milieux de culture seront supplémentés, nous avons composé une gamme de supplémentation de Lpmix dépourvus de débris plaquettaires (Lpmix modifié) en utilisant un protocole analogue à celui de l'obtention d'une solution plasmatique (Chap 1§1.1.2.3). Cette gamme est composée de 6 conditions : MEM $\alpha$  à 3%, 5%, 7%, 9%, 12% et 15% de Lpmix modifié. Le témoin de référence est le même Lpmix sans traitement. Le milieu est héparinisé à la même concentration dans toutes les conditions à savoir 2 UI/ml.

Les paramètres étudiés sont :

- La capacité proliférative des CSM
- La capacité clonale
- Le phénotype cellulaire à l'aide des anticorps suivants :
  - conjugué au FITC : CD29, CD45, HLADR, CD34, CD31, CD90
  - conjugué au PE : CD44, CD73, CD105, CD200, CD117, CD144, CD133, CD271, CD146
- Le dosage protéique du Lpmix modifié

La dilution retenue sera celle qui donnera le résultat le plus proche de celui obtenu avec le Lpmix en termes de prolifération de CSM. Nos résultats ont permis de retenir une dilution entre 5% et 7% de Lpmix modifié ce qui correspond à une concentration moyenne en protéines de 3 mg/ml. C'est sur cette base que seront élaborés nos produits de substitution.

#### **4.2.2 Préparation d'un nouveau produit de substitution de SVF basé sur un ratio standardisé de protéines plasmatiques et plaquettaires**

Pour élaborer un substitut du SVF et du Lpmix « brut » et améliorer l'homogénéisation des lots, nous avons distingué la partie plaquettaire du lysat de la partie plasmatique. Ces deux composants sont mélangés dans des proportions définies. L'objet de cette étude est d'établir le bon ratio qui permet la supplémentation la plus efficace pour une utilisation à 3 mg/ml pour soutenir la prolifération de CSM.

Nous avons élaboré des solutions plasmatiques à partir de plasma (Chap 1§1.1.2.3) et des solutions d'extraits plaquettaires (SEP) obtenues à partir de CPA et de MCP (Chap 1§1.1.2.4) Une gamme de 6 ratios a été réalisée en mélangeant les solutions plasmatiques et les SEP obtenues à partir de CPA (SEPP1 à SEPP6) (Tableau 14), et une gamme de 2 ratios en mélangeant les solutions plasmatiques avec les SEP obtenues à partir de MCP (SEPP'3 et SEPP'4).

Désignation	Quantité de protéines de la solution plasmatique	Quantité de protéines de la solution plaquettaire
SEPP1	100%	0%
SEPP2	99%	1%
SEPP3 (SEPP'3)	97%	3%
SEPP4 (SEPP'4)	90%	10%
SEPP5	75%	25%
SEPP6	0%	100%

**Tableau 14 : Les différents ratios protéiques réalisés**

### 4.2.3 Evaluation d'un nouveau produit de substitution de SVF basé sur un ratio standardisé de protéines plasmatiques et plaquettaires

Chaque produit des gammes (SEPP et SEPP') a été utilisé à une concentration de 3 mg/ml comme substitut du SVF dans le milieu de culture composé de MEM $\alpha$ . Deux témoins ont été élaborés:

- Lpmix utilisé à 5% en MEM $\alpha$
- SVF utilisé à 10% en MEM $\alpha$

#### *Matériels*

- SVF (Ref : 3016003, HyClone, thermo Scientific, USA)
- Héparine Choay (5000 UI/ml) (Ref : AMM-552436.3, Sanofi Synthelabo, France)
- Lpmix
- Les produits de supplémentation SEPP1 à SEPP6 ; SEPP'3 et SEPP'4

#### *Protocole*

Les milieux de culture sont préparés extemporanément. Les solutions issues des plaquettes, le plasma et le Lpmix sont décongelés extemporanément. L'héparine est ajoutée au milieu de culture à raison de 2U/mL

Les paramètres étudiés sont :

- dosage protéique des SEPP et SEPP'
- la capacité proliférative des CSM
- la capacité clonale
- le phénotype cellulaire à l'aide des anticorps suivants :
  - conjugué au FITC : CD45, HLADR, CD90, Stro1
  - conjugué au PE : CD73, CD105, CD200, CD271, CD146

Les solutions SEPP4 et SEPP'4 ayant données les meilleurs résultats en termes de prolifération de CSM, ces produits ont été retenus comme nos produits de référence dont le ratio Plasma/plaquettes est de 90/10 soit 10% de protéines plaquettaires.

### **4.3 Sécurisation de la SEPP**

#### **4.3.1 Sécurisation de la partie plasmatique et sa cryoprécipitation**

Dans cette étude nous avons voulu également étudier la viro-inactivation sur la composante plasmatique de la SEPP et estimer son impact sur la capacité du SEPP à stimuler la prolifération des CSM. Deux traitements sont utilisés, le traitement par le bleu de méthylène et la pasteurisation. En parallèle, la cryoprécipitation de la composante plasmatique a également été étudiée dans le but de trouver un intérêt à cette procédure de fractionnement pour mettre en valeur le cryoprécipité. Dans notre étude le cryoprécipité a été re-suspendu dans 10 ml de solution de SSP+ pour faciliter sa manipulation. Le cryoprécipité plasmatique étant le facteur limitant, de nouvelles concentrations plasmatiques plus faibles ont été étudiées. La concentration plaquettaire reste fixée à 0,3mg/ml de protéines plaquettaires dans le milieu de culture ce qui correspond à la concentration plaquettaire de la solution de référence SEPP4 et SEPP'4 définie au chapitre précédent (chapitre 4§2.3).

Pour répondre à cela, 3 types de plasmas ont été mis à contribution : un pool de plasma pasteurisé (Chap 1§1.1.3.1), un plasma unitaire viro-atténué par traitement au bleu de méthylène (Chap 1§1.1.3.2) et un plasma unitaire non viro-atténué. Chaque plasma a été centrifugé deux fois pour éliminer les résidus globulaires et plaquettaires avant la congélation (Chap 1§1.1.1.1), puis a subi une cryoprécipitation selon le protocole Chap 1§1.1.2.2.

Chaque surnageant a été filtré (Chap 1§1.1.2.3) mais pas les cryoprécipités pour éviter la perte de volume. La solution d'extraits plaquettaires a été obtenue à partir de MCP (Chap1§1.1.2.4).

17 conditions ont été ainsi créées pour supplémenter le milieu de culture des CSM (Tableau 15). Ces conditions varient selon 3 facteurs:

- La viro-inactivation du plasma : pas de traitement, traitement au BM, pasteurisation
- La fraction protéique : cryoprécipité du plasma ou son surnageant
- La concentration protéique de la composante plasmatique : 2,7 mg, 1,35 mg et 0,3 mg (quantité estimée par millilitre de milieu de culture)

Traitement par viro-inactivation	Fraction plasmatique	Quantité de protéines plasmatiques présente dans un millilitre de MEM $\alpha$ (mg)	Quantité de protéines plaquettaires présente dans un millilitre de MEM $\alpha$ (mg)	nomenclature
non	Surnageant de cryoprécipité	2,7	0,3	SNcryoP norm 2,7
		1,35	0,3	SNcryoP norm 1,35
		0,3	0,3	SNcryoP norm 0,3
	cryoprécipité	2,7	0,3	CryoP norm 2,7
		1,35	0,3	CryoP norm 1,35
		0,3	0,3	CryoP norm 0,3
bleu de méthylène	Surnageant de cryoprécipité	2,7	0,3	SNcryoP BM 2,7
		1,35	0,3	SNcryoP BM 1,35
		0,3	0,3	SNcryoP BM 0,3
	cryoprécipité	2,7	0,3	CryoP BM 2,7
		1,35	0,3	CryoP BM 1,35
		0,3	0,3	CryoP BM 0,3
pasteurisation	Surnageant de cryoprécipité	2,7	0,3	SNcryoP past 2,7
		1,35	0,3	SNcryoP past 1,35
		0,3	0,3	SNcryoP past 0,3
	cryoprécipité	2,7	0,3	CryoP past 2,7
		0,3	0,3	CryoP past 0,3

**Tableau 15 : Les différentes solutions de supplémentation issues de la viro-inactivation du plasma et de sa cryoprécipitation**

Détail sur la nomenclature : Exemple de SNcryoP norm 2,7 ; « SNcryoP » correspond à la fraction plaquettaire, ici le surnageant du cryoprécipité, « CryoP » pour le cryoprécipité ; « Norm » correspond au type de viro-inactivation, ici « norm » sous entendant « normal » signifiant que le plasma n'est pas viro-inactivé. Les autres traitements sont nommés « BM » et « past » pour traitement photochimique au bleu de méthylène et pasteurisation respectivement ;

« 2,7 » correspond à la quantité de protéine plasmatique associé à SEP (0,3 mg) à savoir 2,7 mg/ml de milieu de culture. Les autres concentrations sont nommées « 1,35 » et « 0,3 ».

### 4.3.2 Evaluation de la sécurisation de la partie plasmatique et sa cryoprécipitation

Chaque produit a été utilisé comme supplément de facteur de croissance en MEM $\alpha$  pour la culture des CSM. Les produits de supplémentation composés d'une forte teneur en protéines plasmatiques (SNcryoP norm 2,7, CryoP norm 2,7, SNcryoP BM 2,7, CryoP BM 2,7, SNcryoP past 2,7, CryoP past 2,7) supplémentent le milieu à une concentration de 3 mg/ml. Les produits de supplémentation composés d'une teneur intermédiaire en protéines plasmatiques (SNcryoP norm 1,35, CryoP norm 1,35, SNcryoP BM 1,35, CryoP BM 1,35, SNcryoP past 1,35) supplémentent le milieu à une concentration de 1,65 mg/ml. Les produits de supplémentation composés d'une faible teneur en protéines plasmatiques (SNcryoP norm 0,3, CryoP norm 0,3, SNcryoP BM 0,3, CryoP BM 0,3, SNcryoP past 0,3, CryoP past 0,3) supplémentent le milieu à une concentration de 0,6 mg/ml. Cinq témoins ont également été élaborés, à savoir :

- Lpmix utilisé à 5% en MEM $\alpha$
- SVF utilisé à 10% en MEM $\alpha$
- SVF utilisé à 10% en MEM $\alpha$  + 2 UI d'héparine Choay par ml de MEM $\alpha$
- SEP à 0,3 mg/ml de MEM $\alpha$
- Albumine à 2,7 mg/ml de MEM $\alpha$  + SEP à 0,3 mg/ml de MEM $\alpha$

#### *Matériels*

- SVF (Ref : 3016003, HyClone, thermo Scientific, USA)
- Héparine Choay (5000 UI/ml) (Ref : AMM-552436.3, Sanofi Synthelabo, France)
- Vialebex 400mg/ml (LFB, France) (Albumine humaine)
- Lpmix
- Les produits de supplémentation SNcryoP norm 2,7-1,35-0,3 ; CryoP norm 2,7-1,35-0,3 ; SNcryoP BM 2,7-1,35-0,3 ; CryoP BM 2,7-1,35-0,3 ; SNcryoP past 2,7-1,35-0,3 ; CryoP past 2,7-0,3 & SEP

### ***Protocole***

Les milieux de cultures sont préparés extemporanément. Les solutions issues des plaquettes et le Lpmix sont décongelées extemporanément. L'héparine est ajoutée au milieu de culture à raison de 2U/mL.

Les paramètres étudiés sont:

- Le dosage protéique des SEPP et SEPP'
- La capacité proliférative des CSM
- La capacité clonale
- Le phénotype cellulaire à l'aide des anticorps suivants :
  - conjugué au FITC : CD45, HLADR, CD90, Stro1
  - conjugué au PE : CD73, CD105, CD200, CD271, CD146, CD31, CD56

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

## RESULTATS ET DISCUSSION

### 1 Tests cellulaires et caractérisation de différents suppléments de milieu de culture élaborés à partir d'un produit plaquettaire

#### 1.1 Tests cellulaires des différents suppléments de milieu de culture élaborés à partir de produits plaquettaires

La première étape de nos travaux a consisté en l'étude du comportement de CSM cultivées (prolifération, clonogénicité et phénotypage) en présence de différentes préparations élaborées à partir de concentré de plaquettes d'aphérèse. Ces préparations sont des PRP plus ou moins déplasmatisés, cryolysés puis cryoprécipités ou non. Les précipités et les surnageants ont été testés. Des expérimentations sont réalisées en parallèle avec des cultures témoins contenant soit plasma, du SVF ou du Lpmix. (Chap 5§4.1): Trois séries d'expériences ont été réalisées :

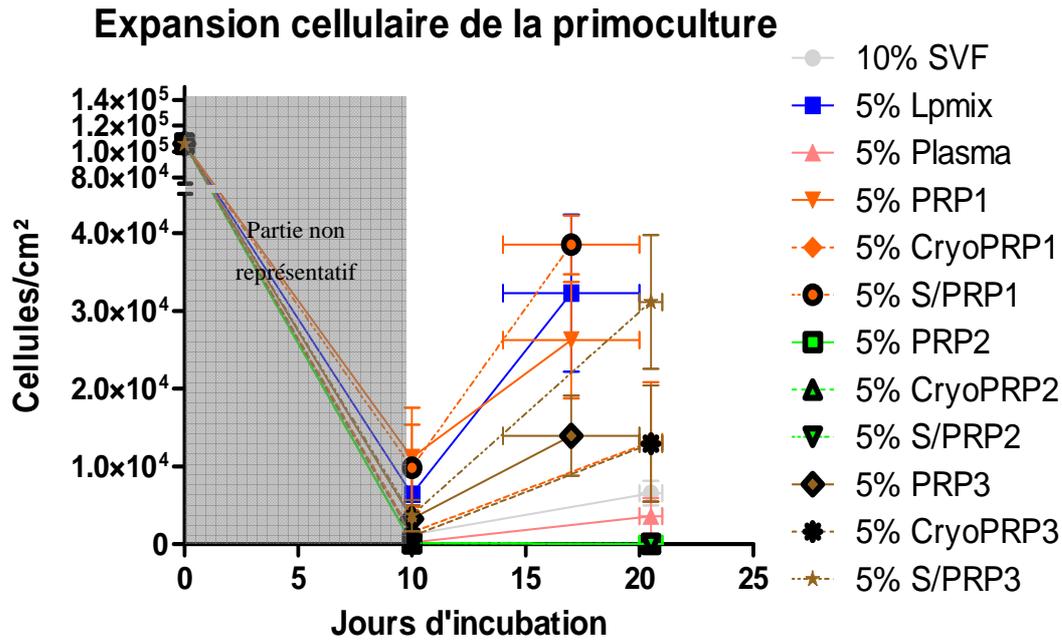
Une série 1 correspondant à un PRP non déplasmatisé (100% de plasma)

Une série 2 correspondant à un PRP déplasmatisé (0% de plasma)

Une série 3 correspondant à un PRP partiellement déplasmatisé (30% de plasma)

##### 1.1.1 Prolifération cellulaire

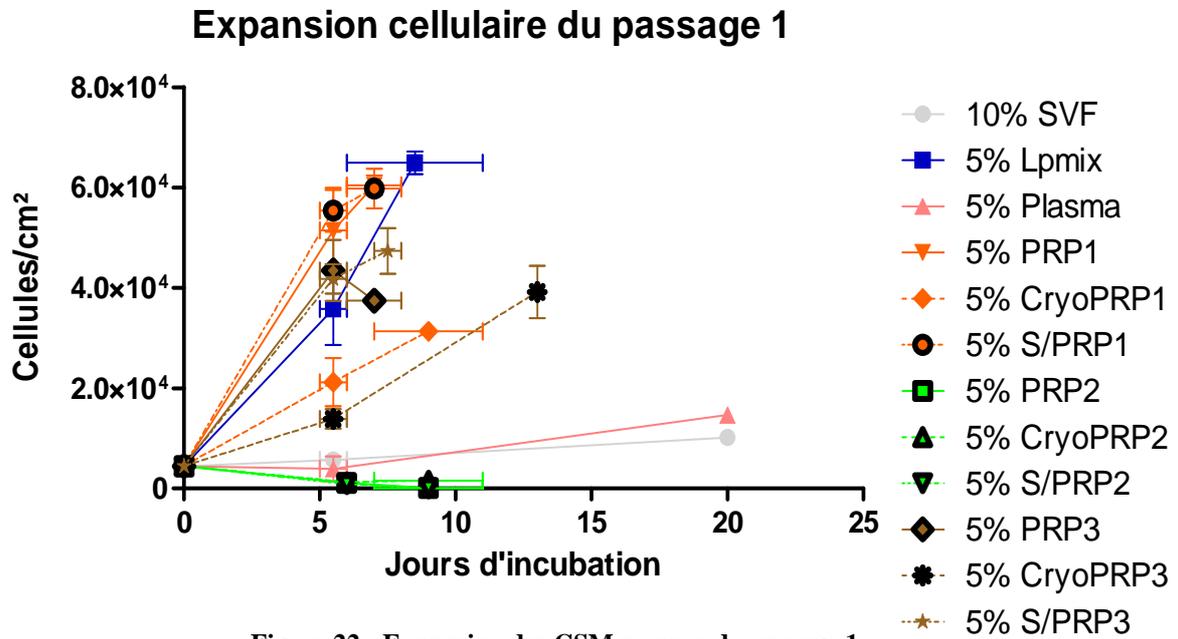
En primoculture, le nombre de CSM n'est pas connu lors de l'ensemencement puisque ce sont les CMN totales que nous mettons en culture. La partie gauche du graphique (Figure 21) correspondant aux dix premiers jours de culture n'est donc pas exploitable. En effet, le nombre de CSM représente une population sous représentée par rapport aux CMN totales ensemencées.



**Figure 21 : Expansion des CSM en primoculture dans les différentes conditions.** (n=2) ; chaque courbe est constitué de 3 points représentant de gauche à droite : la densité cellulaire à l'ensemencement – la densité cellulaire à Jfixe – la densité cellulaire à confluence.

Les conditions expérimentales donnant les meilleures expansions de CSM sont respectivement les séries 1 et 3. La série 2 ne permet pas de prolifération cellulaire (Figure 21). Les témoins SVF et plasma permettent une production cellulaire modérée. Le temps d'obtention de la confluence est corrélé à la meilleure prolifération cellulaire (temps de culture plus court pour un nombre plus important de cellules). C'est le S/PRP1 qui a permis d'obtenir les meilleurs résultats en primoculture. Concernant l'intérêt de la cryoprécipitation, le cryoprécipité semble avoir des propriétés inférieures en termes de prolifération cellulaire par rapport au surnageant correspondant, qui lui-même semble avoir un potentiel plus important pour supporter la production de CSM par rapport au produit d'origine (PRP). Aux passages suivants, cette tendance se confirme, puisque le S/PRP1 donne des valeurs de prolifération très proches de celles obtenues avec le Lpmix mais avec des délais plus courts (Figures 22 & 23, Tableaux 16 & 17). Les cellules ne prolifèrent pas dans les conditions de culture employant le supplément « série 2 » de PRP. Les cryoprécipités des deux séries 1 et 3 génèrent des productions de cellules inférieures en temps et en nombre par rapport autres produits de leur série respective. La série 1 semble être composée de produits de supplémentation permettant la production de CSM en un minimum de temps par rapport à la

série 3. Ces deux séries permettent une croissance cellulaire supérieure, dans l'ensemble, aux témoins, excepté le Lp mix qui est équivalent (Figures 22 & 23, Tableaux 16 & 17).



**Figure 22 : Expansion des CSM au cour du passage 1** (n=2) ; chaque courbe est constitué de 3 points représentant de gauche à droite : la densité cellulaire à l'ensemencement – la densité cellulaire à Jfixe – la densité cellulaire à confluence.

Conditions	SVF	Lpmix	Plasma	PRP1	CryoPRP1	S/PRP1	PRP2	CryoPRP2	S/PRP2	PRP3	CryoPRP3	S/PRP3
SVF												
Lpmix	*/***											
Plasma	ns/ns	*/***										
PRP1	***/**	ns/ns	***/**									
CryoPRP1	ns/*	ns/**	ns/ns	**/**								
S/PRP1	***/**	ns/ns	***/**	ns/ns	**/**							
PRP2	ns/ns	*/***	ns/ns	***/**	ns/**	***/**						
CryoPRP2	ns/ns	*/***	ns/ns	***/**	ns/**	***/**	ns/ns					
S/PRP2	ns/ns	*/***	ns/ns	***/**	ns/**	***/**	ns/ns	ns/ns				
PRP3	**/**	ns/**	***/**	ns/**	ns/ns	ns/**	**/**	**/**	**/**			
CryoPRP3	ns/**	ns/**	ns/**	**/**	ns/ns	***/**	ns/**	ns/**	ns/**	*/ns		
S/PRP3	**/**	ns/*	**/**	ns/ns	ns/*	ns/ns	**/**	**/**	**/**	Ns/ns	ns/ns	

**Tableau 16 : Statistique des différentes expansions cellulaire du passage 1 en fonction des conditions et du moment de l'arrêt (Jfixe et confluence)**

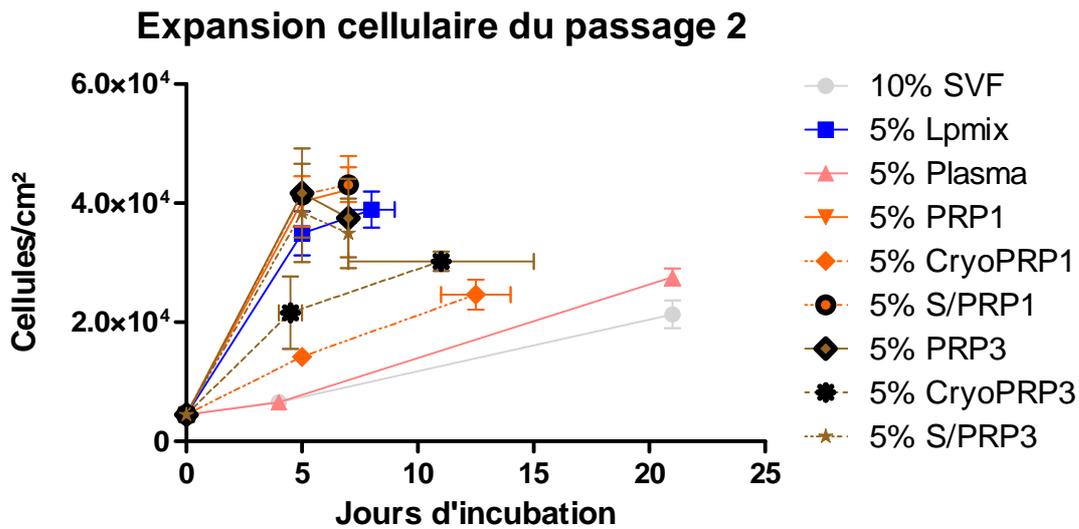
Les nombres de cellules au cm<sup>2</sup> obtenue aux Jfixe sont comparés entre eux par un test de Tukey après analyse via Anova, même comparaison au moment de la confluence.

Légende : Jfixe/confluence

\* : p < 0,05

\*\* : p < 0,01

\*\*\* : p < 0,001



**Figure 23 : Expansion des CSM au cour du passage 2**

(n=2) ; chaque courbe est constitué de 3 points représentant de gauche à droite : la densité cellulaire à l'ensemencement – la densité cellulaire à Jfixe – la densité cellulaire à confluence.

Conditions	SVF	Lpmix	Plasma	PRP1	CryoPRP1	S/PRP1	PRP2	CryoPRP2	S/PRP2	PRP3	CryoPRP3	S/PRP3
SVF												
Lpmix	ns/ns											
Plasma	ns/ns	ns/ns										
PRP1	*/ns	ns/ns	*/ns									
CryoPRP1	ns/ns	ns/ns	ns/ns	*/ns								
S/PRP1	*/ns	ns/ns	*/ns	ns/ns	*/ns							
PRP2												
CryoPRP2												
S/PRP2												
PRP3	*/ns	ns/ns	*/ns	ns/ns	*/ns	ns/ns						
CryoPRP3	ns/ns	ns/ns	ns/ns	ns/ns	ns/ns	ns/ns				ns/ns		
S/PRP3	*/ns	ns/ns	*/ns	ns/ns	ns/ns	ns/ns				ns/ns	ns/ns	

**Tableau 17 : Statistique des différentes expansions cellulaire du passage 2 en fonction des conditions et du moment de l'arrêt (Jfixe et confluence)**

Les nombres de cellules au cm<sup>2</sup> obtenue aux Jfixe sont comparés entre eux par un test de Tukey après analyse via Anova, même comparaison au moment de la confluence.

Légende : Jfixe/confluence

\* :  $p < 0,05$

\*\* :  $p < 0,01$

\*\*\* :  $p < 0,001$

### 1.1.2 Clonogénicité

L'étude clonogénique est réalisée en parallèle à l'étude de l'expansion aux passages 1 et 2. Pour l'une des souches étudiée (CSM 1), un faible taux de clonogénicité au passage 1 et peu de différence entre les différentes conditions sont observées, excepté pour les conditions de la série 2 qui présentent une absence totale de clone. Concernant le passage 2, le nombre de clones semble augmenter légèrement en condition PRP et surnageant notamment. Nous n'avons pas observé de différence entre les séries 1 et 3 (Tableau 18). Le SVF présente un grand nombre de CFU-F mais de tailles réduites (Résultats non montrés). Le Lp mix génère moins de clones par rapport aux autres conditions.

Pour la souche CSM 2, le nombre de clones est globalement plus important que celui obtenu pour la souche CSM 1 et en particulier dans les conditions PRP1, CryoPRP1, S/PRP1, PRP3, CryoPRP3 et S/PRP3 (Tableau 19).

<i>CSM 1</i>	<i>SVF</i>	<i>Lpmix</i>	<i>Plasma</i>	<i>PRP1</i>	<i>CryoPRP1</i>	<i>S/PRP1</i>	<i>PRP2</i>	<i>CryoPRP2</i>	<i>S/PRP2</i>	<i>PRP3</i>	<i>CryoPRP3</i>	<i>S/PRP3</i>
Passage 1	3	2	0	3	4	2	0	0	0	5	3	0
Passage 2	11	1	0	7	2	9	\	\	\	9	1	7

<i>CSM 2</i>	<i>SVF</i>	<i>Lpmix</i>	<i>Plasma</i>	<i>PRP1</i>	<i>CryoPRP1</i>	<i>S/PRP1</i>	<i>PRP2</i>	<i>CryoPRP2</i>	<i>S/PRP2</i>	<i>PRP3</i>	<i>CryoPRP3</i>	<i>S/PRP3</i>
Passage 1	15	15	0	12	10	17	\	\	\	16	7	18
Passage 2	\	14	\	14	11	11	\	\	\	14	9	16

**Tableau 18 & 19°: Tableaux récapitulatifs des CFU-F : nombre de clones pour cent cellulesensemencées.**

### 1.1.3 Phénotype cellulaire des CSM

Les cellules ont été phénotypées à l’issue des processus de culture soit en fin de passage 2. Le phénotype cellulaire reste dans l’ensemble identique quelle que soit la souche de CSM, et ce, indépendamment des conditions de culture. Quelles que soient les conditions et les souches de CSM, les cellules expriment les marqueurs membranaires CD29, CD44, CD73, CD105 et CD90 (pourcentage d’expression et MFI). Le caractère hématopoïétique est absent (les cellules sont CD45 et HLADR négatives) (Figure 24 & 25). Notons qu’avec les conditions **CryoPRP**, de façon inattendue, **une sous-population cellulaire exprime HLADR** quelle que soit la souche cellulaire (CSM 1&2) (Figures 26 & 27).

Pour que l’interprétation des résultats de cytométrie soit la plus claire possible, il faut préciser que l’intensité de la fluorescence des fluorochromes diffère les unes des autres. Le PC5 devient une source lumineuse très intense quand il est excité en comparaison du FITC qui émet une plus faible lumière. Ainsi, un ratio de 3000 obtenue avec le fluorochrome PC5 est tout aussi significatif qu’un ratio de 100 avec le fluorochrome PE et un ratio de 30 avec FITC.

**Phénotype des CSM après expansion *in vitro* : MFI de la population CSM 1**

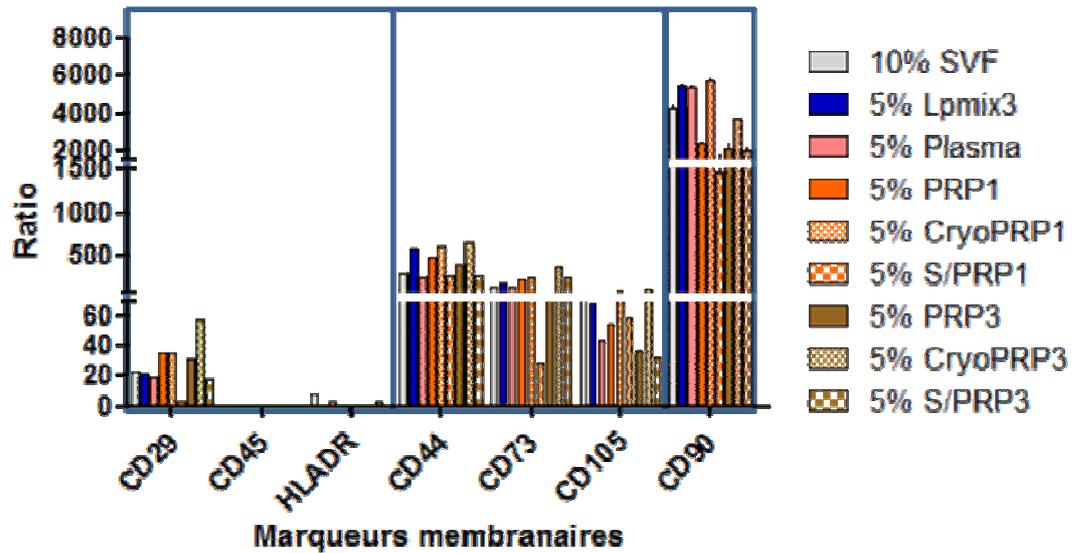


Figure 24 : Intensité moyenne de fluorescence des cytochromes associés à l'expression de protéines membranaires des CSM 1 après le second passage sous les différentes conditions de supplémentation

**Phénotype des CSM après expansion *in vitro* : MFI de la population CSM 2**

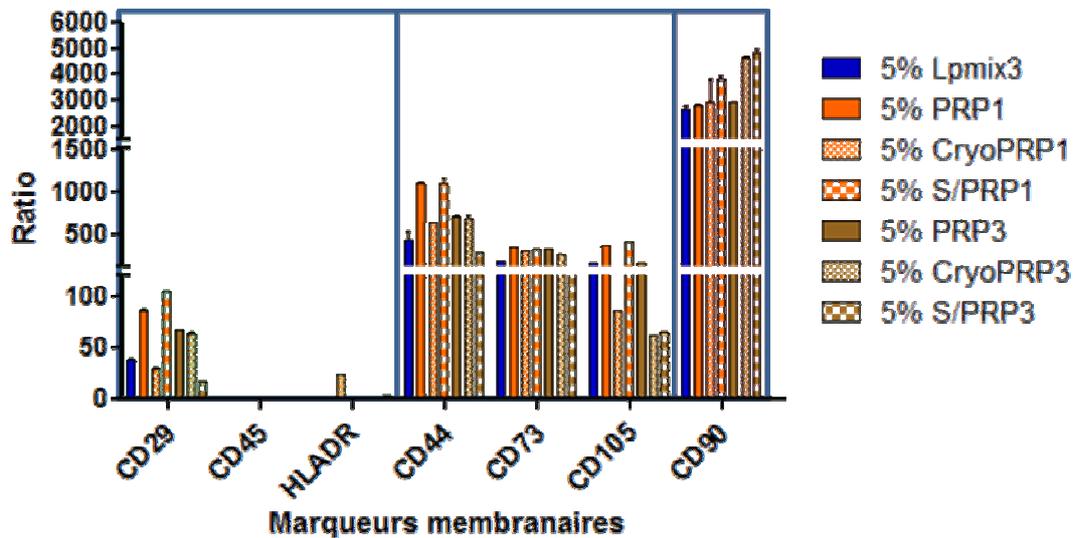


Figure 25 : Intensité moyenne de fluorescence des cytochromes associés à l'expression de protéines membranaires des CSM 2 après le second passage sous les différentes conditions de supplémentation

**Phénotype des CSM après expansion *in vitro* : Pourcentage de la population CSM 1 exprimant les marqueurs membranaires**

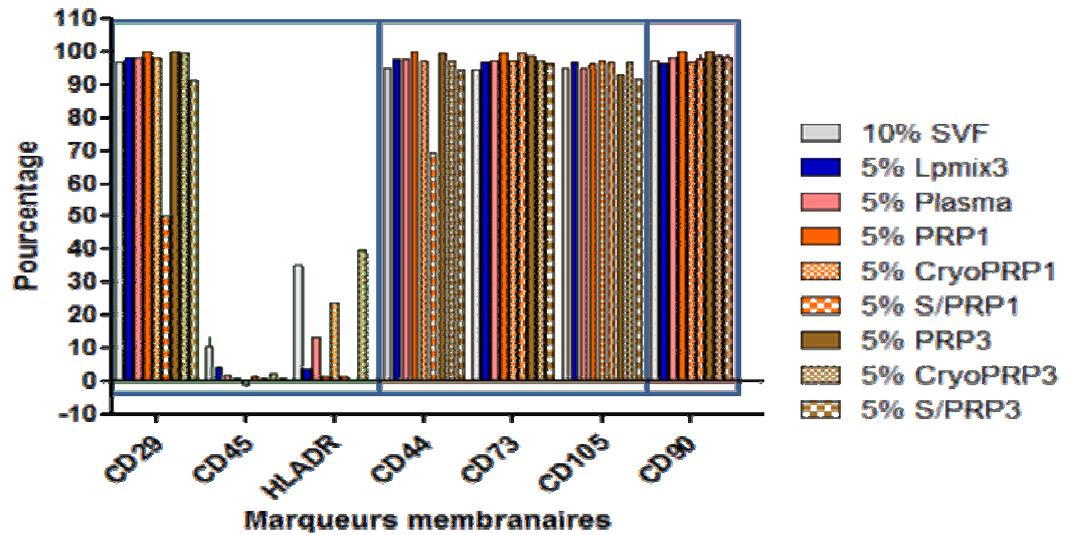


Figure 26 : Pourcentage de la population de CSM 1 exprimant les clusters de différenciation en fonction des conditions de culture

**Phénotype des CSM après expansion *in vitro* : Pourcentage de la population CSM2 exprimant les marqueurs membranaires**

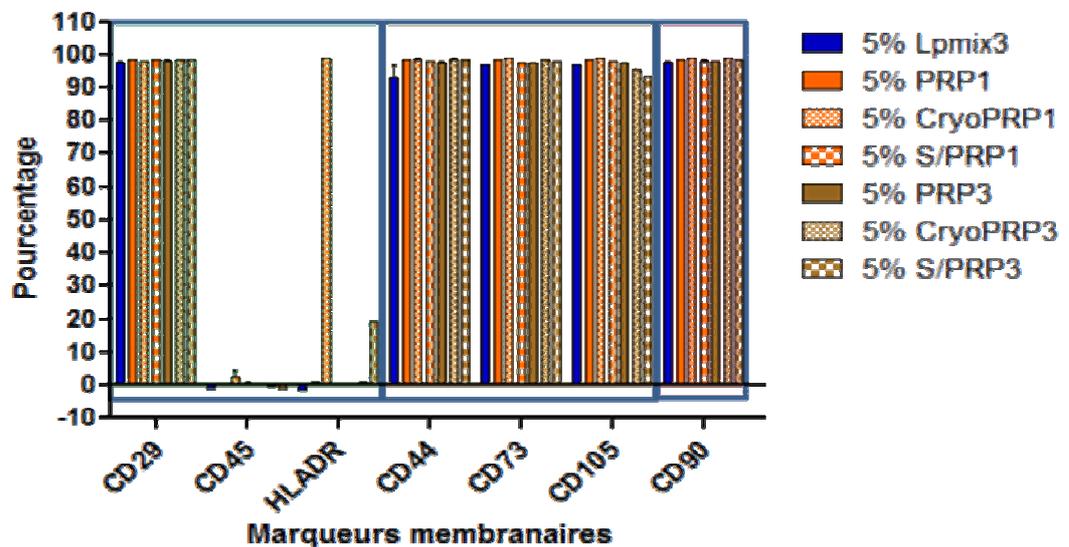


Figure 27 : Pourcentage de la population de CSM 2 exprimant les clusters de différenciation en fonction des conditions de culture

### 1.1.4 Discussion intermédiaire

Ces expériences, qui ont posées les premiers jalons de cette thèse, démontrent que des CSM cultivées en présence de certains suppléments de milieu de culture élaborés à partir d'un produit plaquettaire prolifèrent plus rapidement que des CSM cultivées avec des conditions classiques de culture en SVF et de façon équivalente par rapport au Lpmix de référence. Nous avons postulé que les traitements usuels des PSL utilisés dans les centres de transfusions, modifient la composition biochimique de ces produits, se répercutant sur la « qualité » pour la culture cellulaire du produit de départ.

Ainsi une diminution du taux de plasma dans un produit diminuerait les propriétés de supplémentation de milieu, de même que les produits issus de la cryoprécipitation ne seraient pas forcément de meilleure facture que le produit initial (cryoprécipité vs PRP).

**La conclusion principale de cette première série d'expériences est que la présence de plasma dans un concentré plaquettaire est essentielle** pour obtenir un supplément de milieu de culture favorisant la prolifération de CSM (série 1 > série 3 > série 2), mais que **le produit doit également contenir de protéines plaquettaires**, un milieu supplémenté uniquement avec du plasma ne permettant pas la prolifération cellulaire.

Nous avons émis l'hypothèse que les différences observées en culture cellulaire avec les différents suppléments de milieu de culture élaborés à partir d'un produit plaquettaire sont liées à leur composition en protéine.

Pour caractériser biochimiquement ces différents « PRP », une comparaison par analyse protéomique a été effectuée par étude d'électrophorèse sur gel 2D après une quantification protéique de tous les échantillons.

## 1.2 *Caractérisation de différents suppléments de milieu de culture élaborés à partir d'un produit plaquettaire*

### 1.2.1 **Dosages protéiques des différents suppléments de milieu de culture élaborés à partir d'un produit plaquettaire**

L'analyse de la quantité en protéines des différents types de lysats plaquettaires issus d'un PRP montre que leurs concentrations sont très différentes (Tableau 20).

Les produits de la série 1 sont très concentrés (PRP1 et S/PRP1) et sont très proche de la concentration du plasma. Les produits de la série 3 sont plus dilués (d'un facteur 1,6 environ) et ceux de la série 2 sont presque dépourvus de protéines.

<i>Produits</i>	<i>Concentration (mg/ml)</i>
Plasma	79,19
PRP1	74,19
CryoPRP1	26,43
S/PRP1	72,52
PRP2	1,17
CryoPRP2	0,665
S/PRP2	1,15
PRP3	43,58
CryoPRP3	15,03
S/PRP3	45,25

**Tableau 20 : Concentration protéique des différents suppléments plaquettaires**

### **1.2.2 Analyses protéomiques des différents suppléments de milieu de culture élaborés à partir d'un produit plaquettaire**

L'analyse des gels d'électrophorèses bidimensionnelles a permis de mettre en évidence deux grandes tendances en fonction des procédés d'obtention des différents suppléments de milieu de culture élaborés à partir d'un produit plaquettaire,

La série numéro 2 adopte un profil protéique différent de tous les autres produits (Tableau 21). La présence de plasma dans le produit entraîne irrémédiablement l'expression d'un profil plasmatique, gommant la présence de toute trace de protéines plaquettaires (Tableau 21 & Figure 28). Ces dernières sont seulement visibles dans les profils de la série 2, qui sont typiquement des profils plaquettaires. Le gradient de pH 5-8 permet de bien séparer les protéines plasmatiques, générant une meilleure résolution du profil plasmatique en comparaison avec le gradient de pH 3-10. Par contre ce gradient de pH 5-8 n'est pas adapté au profil plaquettaire. La majorité des protéines plaquettaires ayant un pI plutôt acide, sont regroupées sur le bord acide du gel, générant une mauvaise résolution des gels. Le gradient de pH 3-10 est plus adapté pour le profil plaquettaire. La dissemblance des deux profils est telle qu'il est impossible de trouver des similitudes entre les profils.

Condition	Gel 2D pH 3-10	Gel 2D pH 5-8
Plasma		
S/PRP1 (= série 1 & série 3)		
S/PRP2 (= série 2)		

Tableau 21 : Exemples de gels 2D obtenus en fonction des séries et du pH d'étude.

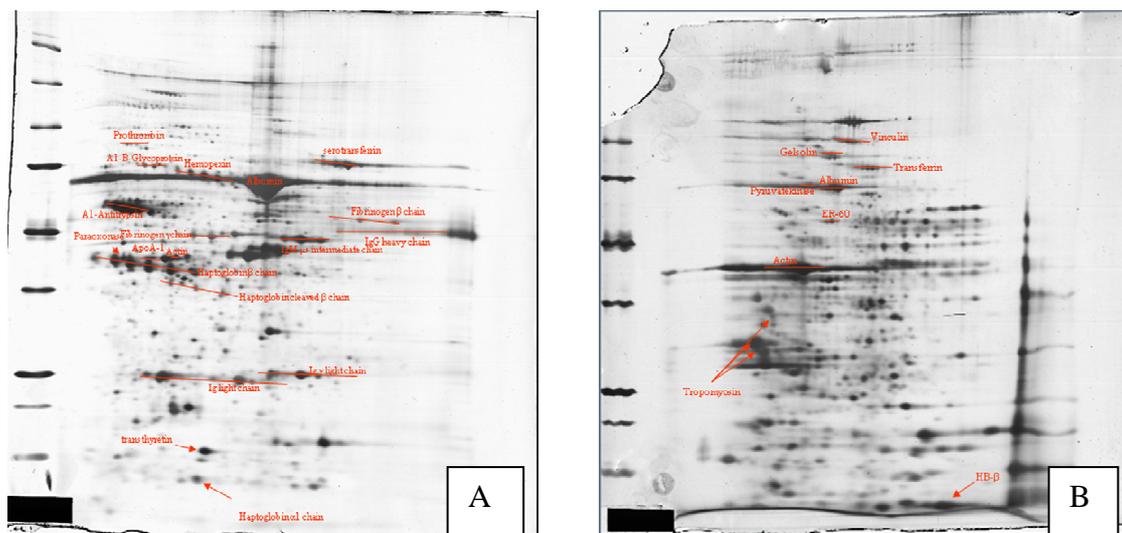


Figure 28 : Protéines identifiées sur les deux types de profil protéique. A: profil plasmatique du PRP3; B: profil plaquettaire du PRP2

### 1.2.3 Discussion et orientation

Les dosages protéiques effectués sur l'ensemble des produits ont permis de constater une gamme de concentrations de protéines très variable en fonction des différents suppléments de milieu. Une corrélation a pu être établie entre les produits plaquettaires les plus riches en protéines et une plus forte production de cellules (PRP1 et S/PRP1). Il existe donc des **effets de dose dépendance**. De plus, les protéines issues de la lyse des plaquettes sont indispensables pour générer une production de CSM. Le plasma, exempt de ces protéines, bien que concentré en protéines ne permet pas une production efficace de cellules.

Il faut noter que les produits contenant uniquement des protéines plaquettaires ont une très faible concentration en protéines en comparaison aux autres suppléments de milieu, ce qui sous-entend que la proportion en protéines plaquettaires dans un PRP cryolysé est négligeable. Ces observations sont confirmées par l'analyse protéomique des différents produits.

L'analyse protéomique par électrophorèse bidimensionnelle ne permet pas de détecter des protéines plaquettaires dans les produits contenant également du plasma. Les protéines plasmatiques, très majoritaires en termes de concentration protéique, masquent les protéines plaquettaires détectables seulement après déplétion du plasma.

Cependant, le rapprochement direct entre les résultats issus de l'analyse protéomique et la production cellulaire n'est pas envisageable, les produits d'intérêts étant légèrement différents. En effet, les produits, en vue de leur étude protéomique, ont subi une déplétion en débris plaquettaires (résidus de la lyse des plaquettes) et il n'a pas été démontré que ces débris n'influencent pas la prolifération des CSM.

D'un point de vue global, une déplasmatisation totale à un effet délétère sur le PRP utilisé à des concentrations conventionnelles et la cryoprécipitation ne permet pas, quant à elle, l'élaboration d'un produit de meilleure qualité que le produit d'origine en termes de prolifération cellulaire.

La poursuite de ce travail a consisté à :

Comparer chacun des produits à une **concentration protéique égale**, le ratio entre les concentrations en protéines plaquettaires/plasmatiques doit être le seul facteur influençant la productivité cellulaire. Pour cela nous avons créé des solutions composées de différents ratios, à savoir :

- des solutions composées par de faibles ratios pour mimer les solutions de la série 1, série non déplasmatisée (100% de plasma)
- des solutions composées par de forts ratios pour mimer les solutions de la série 2, série déplasmatisée totalement (0% de plasma)
- des solutions composées par des ratios intermédiaires pour mimer les solutions de la série 3, série déplasmatisée partiellement (30% de plasma)

Pour répondre à cette question, il nous fallait d'abord définir cette concentration. Pour cela, nous avons initié une nouvelle série d'expériences, en utilisant comme référent un Lpmix modifié, c'est-à-dire centrifugé et filtré, en utilisant comme témoin un Lpmix

## **2 Mise au point d'un produit de supplémentation de milieu de culture à partir de produits plaquettaires et plasmatiques**

### **2.1.1 Détermination de la concentration d'utilisation du produit**

La deuxième étape de nos travaux a donc consisté en l'étude du comportement de CSM cultivées (prolifération, clonogénicité et phénotypage) en présence de différents taux de Lpmix débarrassés des débris cellulaires (jusqu'alors les cultures sont réalisées en présence des débris cellulaires plaquettaires) afin de déterminer la concentration protéique de ce Lpmix modifié permettant d'obtenir une croissance des CSM analogue à celle des Lpmix bruts.

#### **2.1.1.1 Effet sur la prolifération des CSM**

Les expériences ont été réalisées sur deux souches de CSM. Les résultats obtenus permettent de mettre en évidence que la prolifération des CSM est bien dépendante de la concentration en protéines, et donc en facteurs de croissances dans le milieu (Figure 29 & 30), et ce, quelque

soit le passage. Toutes les conditions permettent d'obtenir avec la même cinétique la confluence, excepté la condition Lpmix modifié 3%, pour laquelle la croissance s'est infléchi entre 24 à 48 heures. Nous avons pu constater que les CSM cultivées avec du Lpmix standard (condition témoin) permet une production de cellules équivalente à celle obtenue avec les Lpmix modifiés 5 et 7%.

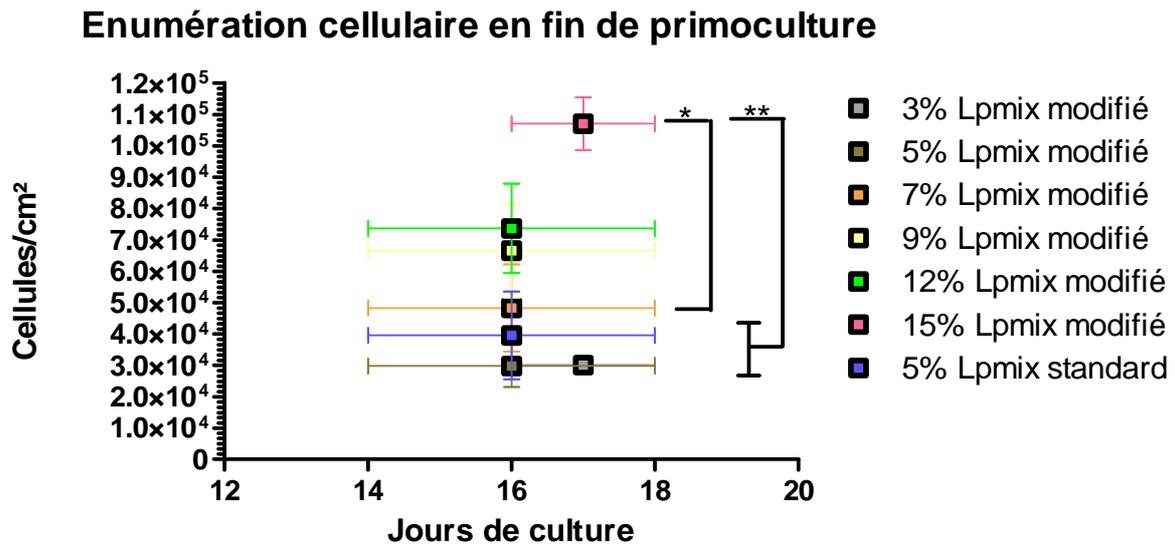


Figure 29 : Densité cellulaire des CSM après confluence en primoculture en fonction de différentes concentrations de Lpmix modifié (n=2) ; Test statistique : Anova puis Tukey ; \* = p<0,05 ; \*\* = p<0,01

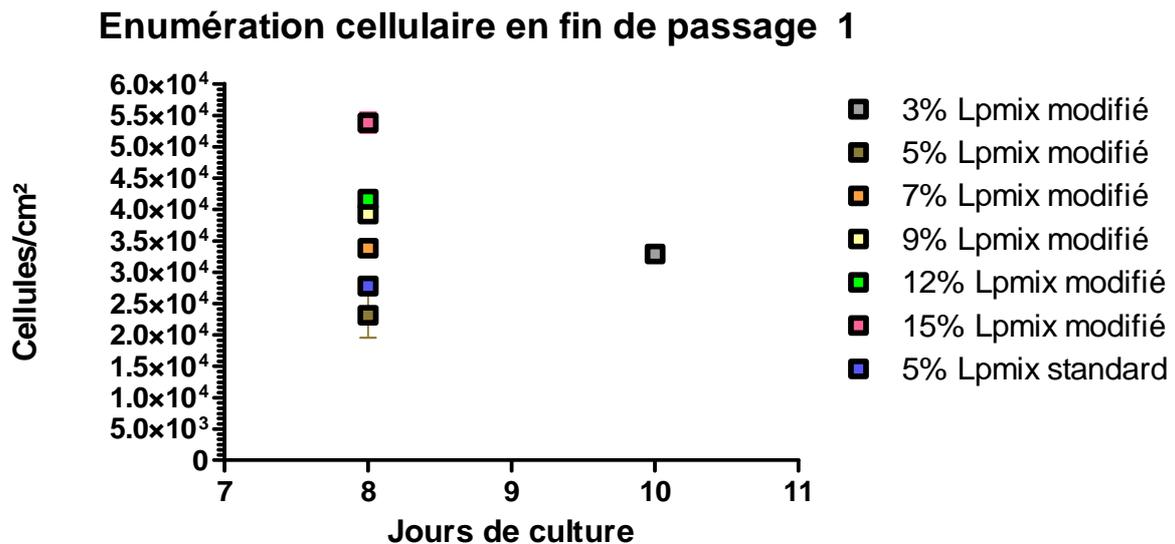


Figure 30°: Expansion de CSM au passage 1 en fonction de différentes concentrations de Lpmix modifié (n=1)

### 2.1.1.2 Effet sur la clonogénicité des CSM

L'étude clonogénique a été réalisée en parallèle à l'étude de l'expansion aux passages 1. Le nombre de clones cellulaires ne semble pas affecté par l'augmentation du ratio (volume/volume) de Lpmix modifié composant le milieu de culture (Tableau 22). La meilleure clonogénicité est observable sous la condition Lpmix « brut » au niveau de la population de la CSM 1, mais cette tendance n'apparaît pas avec la population de la CSM 2.

CFU-F	3% Lpmix modifié	5% Lpmix modifié	7% Lpmix modifié	9% Lpmix modifié	12% Lpmix modifié	15% Lpmix modifié	5% Lpmix standard
CSM 1	9	12	13	8	11	13	20
CSM 2	2	3	3	2	8	5	2

Tableau 22°: Pourcentage de CFU-F au passage 1 pour chaque souche cellulaire

### 2.1.1.3 Effet sur le phénotype des CSM

Quelques soient les conditions expérimentales, les cellules obtenues en fin de processus de culture n'ont pas dérivé phénotypiquement et conservent un phénotype caractéristique des CSM (CD29+, CD90+, CD44+, CD105+, CD73+, CD45-, HLADR-) (Figure 31 et 32). Les marqueurs hématopoïétiques ou endothéliaux sont absents (CD31, CD34, CD117, CD144, CD133).

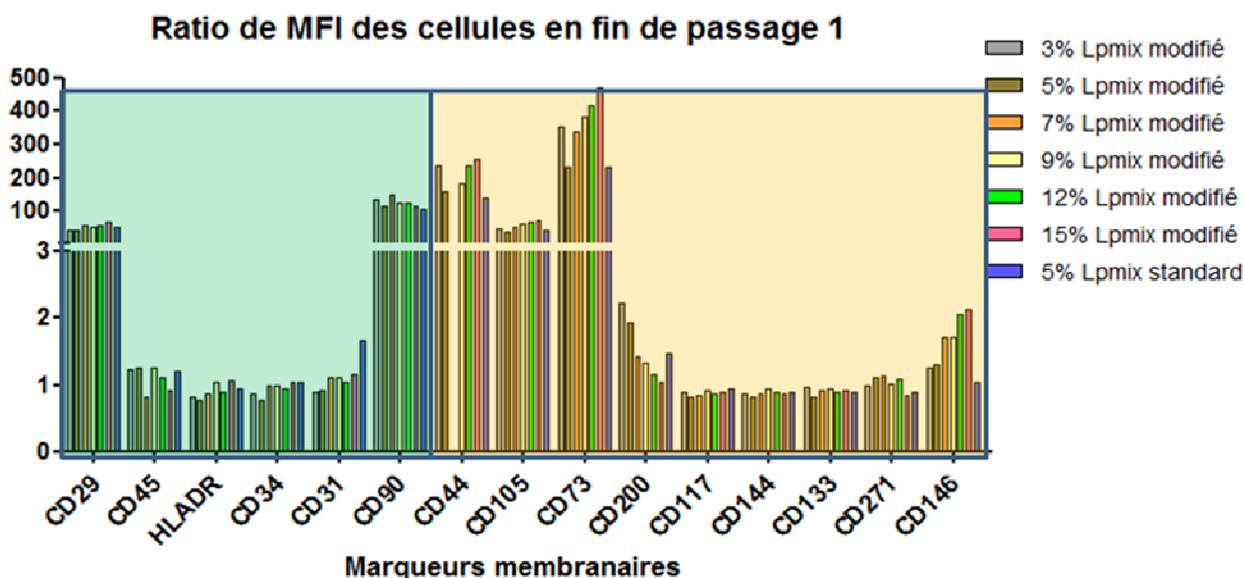


Figure 31°: Histogramme représentant le MFI des CSM après culture au passage 1 sur différents marqueurs membranaires en fonction des conditions de culture (n=1)

Il est intéressant de noter la présence d'une sous population de cellules exprimant le CD200. L'expression de ce marqueur est inversement proportionnelle à la concentration de Lpmix modifié utilisée dans les cultures.

Nous avons également mis en évidence une sous population exprimant le CD146. L'expression de ce marqueur semble proportionnelle à la concentration de Lpmix modifié dans le milieu de culture (Figure 32).

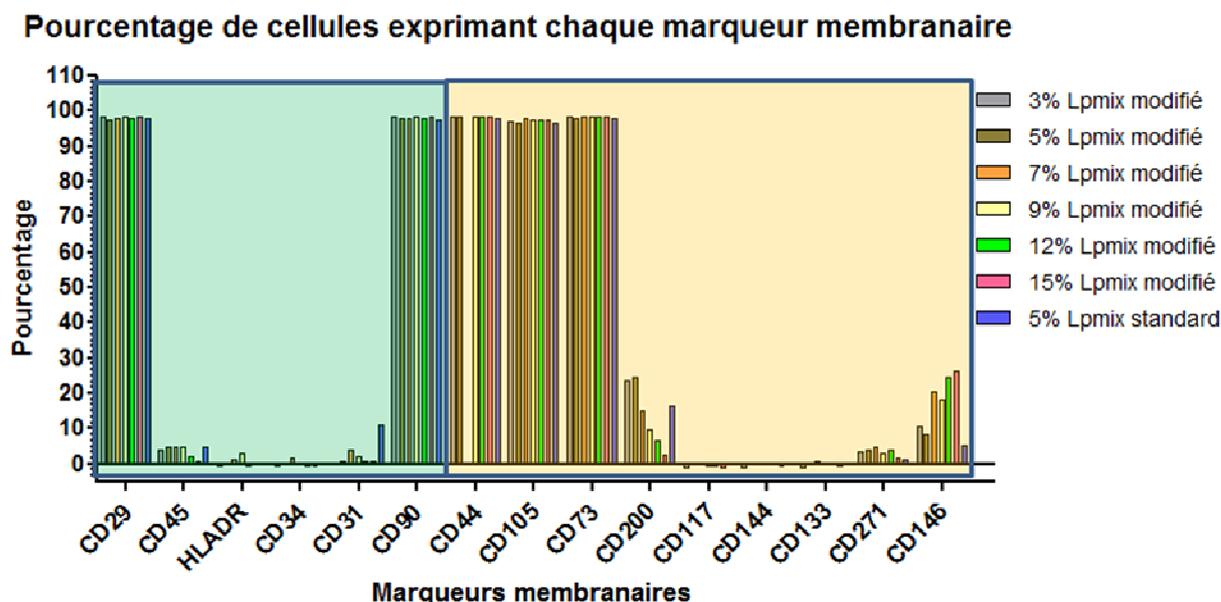


Figure 32 : Histogramme représentant le pourcentage de CSM exprimant différents marqueurs membranaires en fin d'expansion au passage 1 en fonction des conditions de culture (n=1)

### 2.1.1.4 Vers la conception d'une préparation d'extrait plaquettaire en équivalent de protéines

Les résultats de prolifération, clonogénicité et phénotypage ont permis de déterminer que l'équivalent en Lpmix 5% (v/v) correspond à un Lpmix modifié avec un ratio volume/volume compris entre 5 et 7%.

Nous avons dosé la concentration protéique du Lpmix modifié et établi que la concentration protéique moyenne était de 54,4mg/ml (Tableau 24). Les concentrations protéiques correspondant à un milieu supplémenté à 5% et 7% sont donc de 2,72 et 3,8 mg/ml, respectivement (Tableau 23). Ces résultats nous ont permis de définir la **concentration**

**protéique de référence** de l'ordre de **3 mg/ml** à utiliser en milieu de culture dans la suite de cette étude.

<i>Pourcentage de Lpmix modifié</i>	<i>Concentration protéique mg/ml</i>
100% (Lpmix modifié brut)	54,4
3%	1,63
5%	2,72
7%	3,8
9%	4,9
12%	6,5
15%	8,2

**Tableau 23°: Extrapolation des concentrations en protéines dans le milieu de culture en fonction du pourcentage de complémentation en Lpmix modifié**

### 2.1.1.5 Discussion et orientation

Cette partie du travail de thèse a permis d'établir la quantité de protéines théorique à mettre dans le milieu de culture, permettant de mimer les conditions classiques d'utilisation d'un Lpmix.

Nous avons mis en évidence que la présence de débris plaquettaires améliore légèrement la qualité de la supplémentation. Il faut donc envisager d'augmenter la concentration en protéines en solution pour aboutir à un effet similaire sur la croissance cellulaire (supérieur à 5% mais inférieur à 7%). Nous avons fixé une concentration de 3 mg de protéines de solution de supplémentation par millilitre de milieu. L'intérêt de procéder ainsi est d'obtenir un protocole plus standardisé. En effet, jusqu'alors, les produits de complémentation de milieu étaient utilisés selon un ratio de volume, ne prenant pas en compte le fait que leurs concentrations en protéines pouvaient varier d'un lot à un autre.

Concernant la présence de cellules exprimant le CD200 (anciennement OX 2), molécule impliquée dans l'immunomodulation (Gorczyński et al., 1998), le CD271 (NGFR : nerve growth factor receptor), marqueur essentiellement trouvé sur CSM du tissu primaire, à fort potentiel clonogénique (Bühning et al., 2007) ou encore le CD146, un MCAM exprimé par les cellules stromales directement impliqué dans la niche hématopoïétique (Sorrentino et al., 2008; Bühning et al., 2009), il semble que ces molécules soient exprimées différenciellement en fonction des conditions de culture. Les protéines apportées par les plaquettes pourraient avoir un rôle sur l'expression de certains marqueurs exprimés par certaines sous populations de cellules et soulève l'importance de la composition du milieu de culture pour la production

de CSM à visée d'immunomodulation. En effet on sait que le « priming » in vitro de ces cellules peut pré-conditionner leur efficacité thérapeutique.

**La suite de ce travail de thèse s'est orientée vers l'élaboration du supplément de culture cellulaire en se basant sur les quantités de protéines dans le milieu**, définies grâce aux expérimentations précédentes à **3mg/ml de milieu de culture**. Sachant qu'un Lpmix est composé de protéines plaquettaires et plasmatiques, donc de protéines ayant des origines et fonctions bien distinctes, **nous avons formulé des produits avec des ratios différents de protéines plaquettaires et plasmatiques** et les avons testés sur des cultures de CSM. **Nous avons appelé ces produits Solution d'extrait plaquettaire et plasmatique (SEPP)** et la suite du travail évalue l'effet de ces SEPP sur des cultures de CSM.

## 2.1.2 Mise au point d'un nouveau produit de supplémentation de milieu de culture à partir de PSL : La SEPP

### 2.1.2.1 Concentration protéique des solutions plasmatiques et plaquettaires

Le dosage des protéines des solutions d'extraits plasmatiques et plaquettaires (après cryolyse) par technique de Bradford a permis de déterminer leurs concentrations protéiques. Les solutions obtenues à partir du plasma sont 4 à 5 fois plus concentrées que celles produites à partir des concentrés de plaquettes, soit issus de CPA ou de MCP (Tableau 24). La différence de concentration entre les deux SEP (CPA et MCP) est due à une concentration plaquettaire différente entre les deux,  $5.10^{11}$  pour le CPA contre  $9.10^{11}$  pour le MCP, rendant le rendement d'extraction protéique supérieur avec une poche de concentration de  $5.10^{11}$  plaquettes.

Solutions	Concentration (mg/ml)
Solution plasmatique (n=2)	61.05 mg/ml ( $\pm$ 1.05)
SEP (CPA) (n=2)	14.2 mg/ml ( $\pm$ 0.8)
SEP (MCP) (n=1)	25.1mg/ml

Tableau 24°: Concentration protéiques des solutions qui constitueront les SEPP et SEPP'

### 2.1.2.2 Concentration des lots d'extraits plaquettaires

La détermination des concentrations protéiques de l'ensemble des solutions plasmatiques et plaquettaires permet d'élaborer plusieurs solutions protéiques aux concentrations finales connues (Tableau 25), permettant de définir les quantités de chaque solution d'extrait

plaquettaire à utiliser pour une concentration finale de 3mg de protéines/ml de milieu de culture.

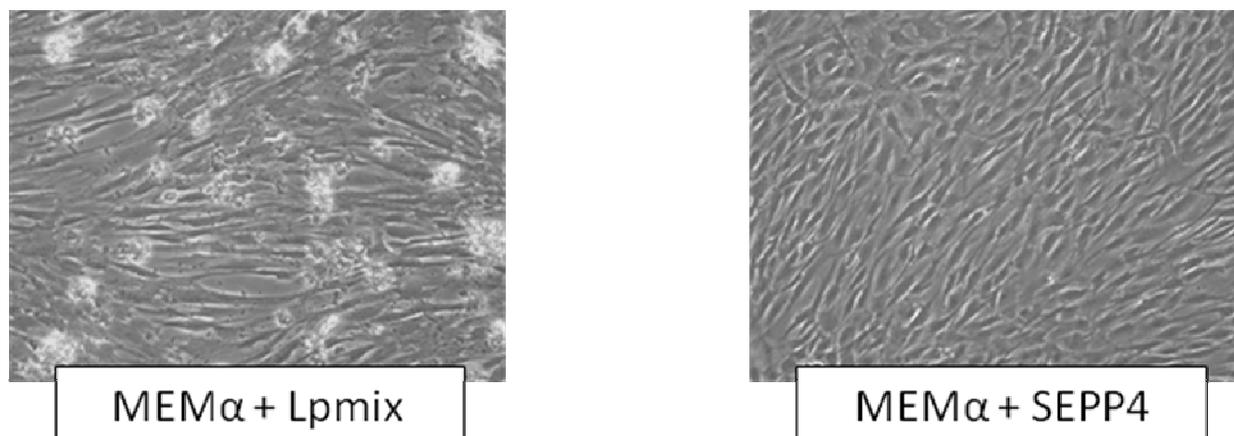
Lots d'extraits plaquettaires	Concentration protéiques totales
SEPP1 (100% P.pla)	61.05 mg/ml ( $\pm$ 1.05)
SEPP2 (1% P.plq-99% P.pla)	59.09 mg/ml ( $\pm$ 0.82)
SEPP3 (3% P.plq-97% P.pla)	55.42 mg/ml ( $\pm$ 0.56)
SEPP4 (10% P.plq-90% P.pla)	45.84 mg/ml ( $\pm$ 0.3)
SEPP5 (25% P.plq-75% P.pla)	33.41 mg/ml ( $\pm$ 0.88)
SEPP6 (100 % P.plq)	14.2 mg/ml ( $\pm$ 0.8)
SEPP'3 (3% P.plq-97% P.pla)	61.04 mg/ml
SEPP'4 (10% P.plq-90% P.pla)	54.24 mg/ml

**Tableau 25°: Concentration finale en protéines de chaque lot d'extrait de lysat plaquettaire**

SEPP : solution d'extrait plaquettaire provenant de CPA. SEPP' : solution d'extrait plaquettaire provenant de MCP. P.plq : protéines plaquettaires. P.pla : protéines plasmatiques.

### 2.1.2.3 Aspect qualitatif du milieu de culture

Contrairement au Lpmix qui présente des débris cellulaires pouvant altérer l'observation des cellules au microscope, la SEPP présente un meilleur aspect « qualitatif » avec une limpidité du milieu de culture. Le Lpmix présente des particules en suspension dans le milieu alors que les milieux enrichis en SEPP et SEPP' n'en ont pas, ce qui facilite l'observation microscopique des cellules en cultures (Figure 33).

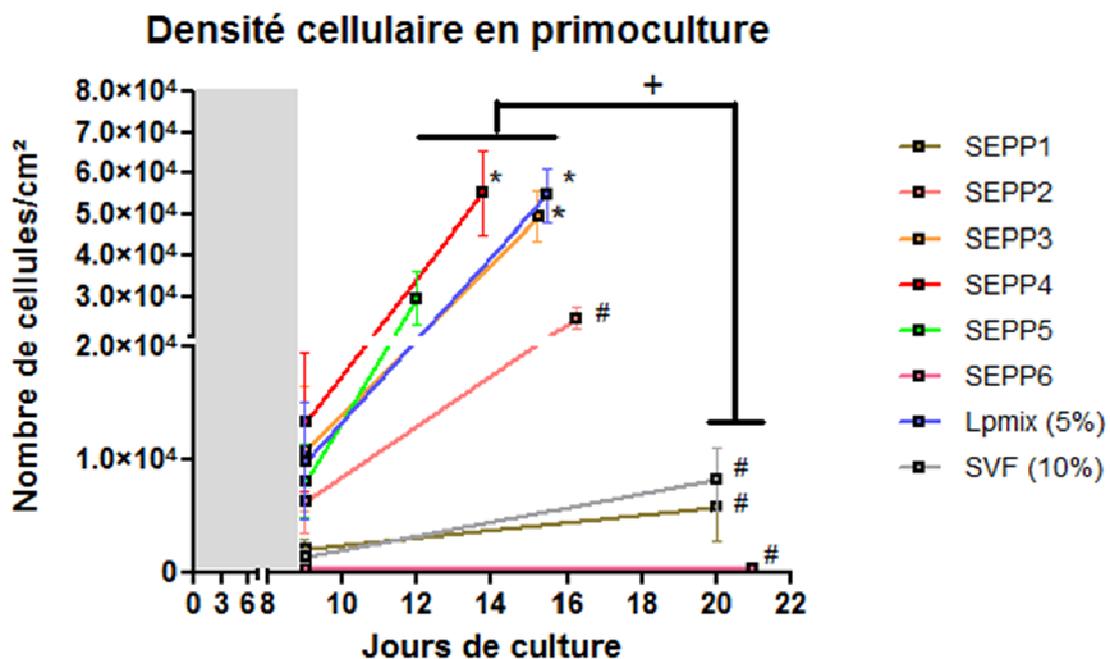


**Figure 33°: Observation de CSM cultivée en Lpmix versus SEPP (x 40).**

## 2.1.2.4 Prolifération des CSM en présence du concept de solution d'extraits plaquettaires et plasmatiques

### 2.1.2.4.1 Source plaquettaire : le CPA

Les CSM cultivées avec les lots de solution d'extraits plaquettaires et plasmatiques montrent que le taux de protéines plaquettaires dans le milieu de culture a des répercussions directes sur leurs capacités de prolifération. La gamme utilisée a permis d'obtenir des productions de cellules en quantité très variables en fonction du ratio protéines plaquettaires / plasmatiques présent dans le milieu (Figures 34 et 35).

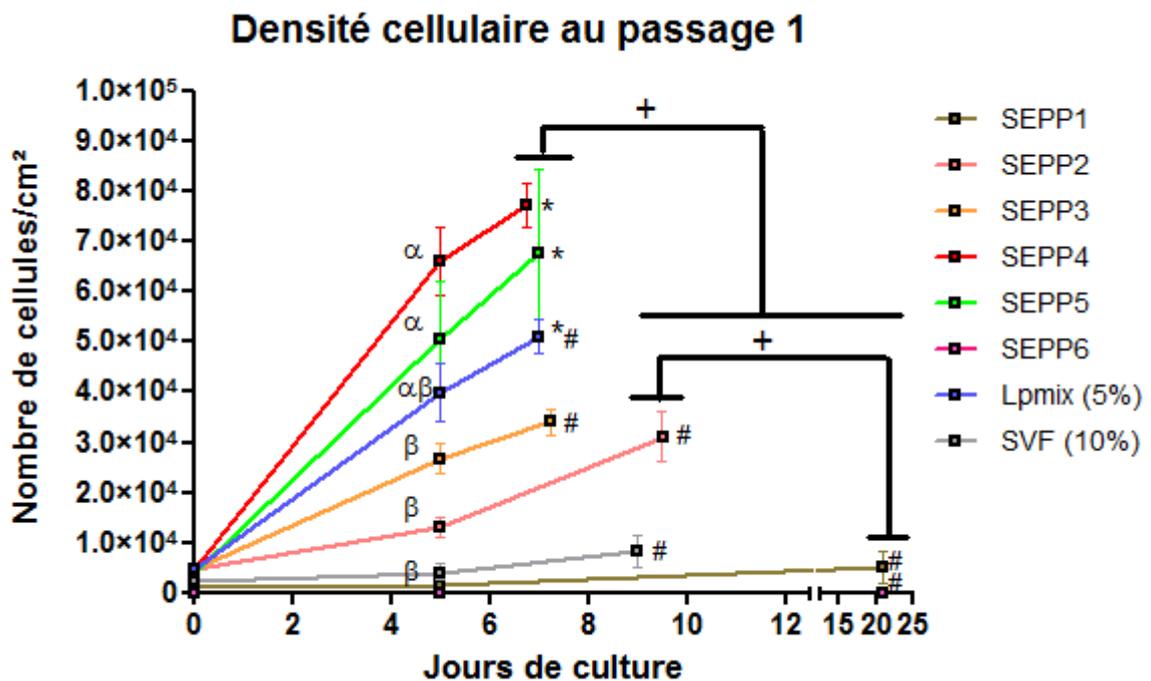


**Figure 34°: Prolifération en primoculture de CSM sous différentes conditions de SEPP** (n=4). Courbe composée de deux points, A gauche, la densité cellulaire à Jfixe, a droite la densité cellulaire à confluence. Le jours de culture représente le temps passé par les cellules à expandre. Tests statistiques Anova et Tukey : \* : p<0,05, statistiquement différent à la densité cellulaire sous condition SVF à confluence. # : p<0,05, statistiquement différent à la densité cellulaire sous condition SEPP4. + : p<0,05, temps d'expansion pour obtenir la confluence statistiquement différent.

Tous les échantillons d'extraits plaquettaires ne permettent pas d'obtenir une production de cellules puisque l'ajout de SEPP6 (100% protéines plaquettaires) ne permet pas l'enrichissement cellulaire en primo-culture voir même la survie des cellules. Avec le SEPP1 (100% protéines plasmatiques), les cellules ont peu proliférées que ce soit en primo-culture ou au passage 1. La capacité proliférative des cellules en présence de SEPP1 est équivalente à

celle rencontrée en présence de SVF, qui est largement inférieure à celle du Lpmix pour les deux passages. Il en est de même pour l'échantillon SEPP2 en primo-culture, mais au passage 1 la prolifération des cellules sous cette condition n'est pas significativement différente de celle obtenue sous la condition Lpmix, même si elle tend à être moins prononcée (significativité non montrée).

L'échantillon SEPP3 entraîne une croissance cellulaire équivalente au Lpmix que se soit en primo-culture qu'au passage 1 et cette prolifération est supérieure au SVF. La condition SEPP4 (10% de protéines plaquettaires) génère une meilleure prolifération des CSM que le Lpmix et le SVF. En primo-culture, les proliférations cellulaires avec le Lpmix et le SEPP4 sont équivalentes mais avec une tendance à une diminution du temps de culture, en comparaison au SVF, cette prolifération est plus importante avec un temps d'incubation nettement inférieur). Par contre au passage 1 cette prolifération est simplement supérieure aux deux conditions témoins.



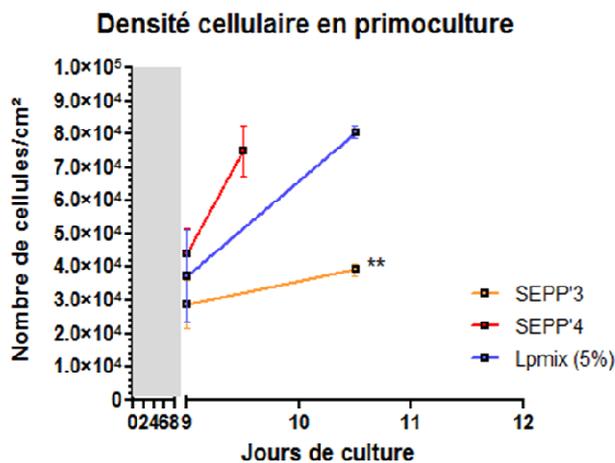
**Figure 35°: Densité cellulaire durant le passage 1 sous différentes conditions de SEPP**

(n=4). Courbe composée de la densité à l'ensemencement, au Jfixe et à confluence. Les jours de culture représente le nombre de jours passé par les cellules pour s'expandre. Tests statistiques Anova et Tukey : Comparaison à Jfixe :  $\alpha$  :  $p < 0,05$ , statistiquement différent à la densité cellulaire sous condition SVF à Jfixe.  $\beta$  : statistiquement différent à la densité cellulaire sous condition SEPP4 à Jfixe. Comparaison à confluence : \* :  $p < 0,05$ , statistiquement différent à la densité cellulaire sous condition SVF à confluence. # :  $p < 0,05$ , statistiquement différent à la densité cellulaire sous condition SEPP4. + :  $p < 0,05$ , temps d'expansion pour obtenir la confluence statistiquement différent.

Concernant la condition SEPP5, durant la primo-culture, la production cellulaire n'a pas montré de différence significative que ce soit avec le Lpmix ou avec le SVF. Par contre le temps de culture pour l'obtention de la confluence est nettement inférieur à celui du SVF. Cependant au passage 1, la capacité proliférative des cellules sous SEPP5 est supérieure à celles des deux conditions témoins et équivalente à celle de la condition SEPP4.

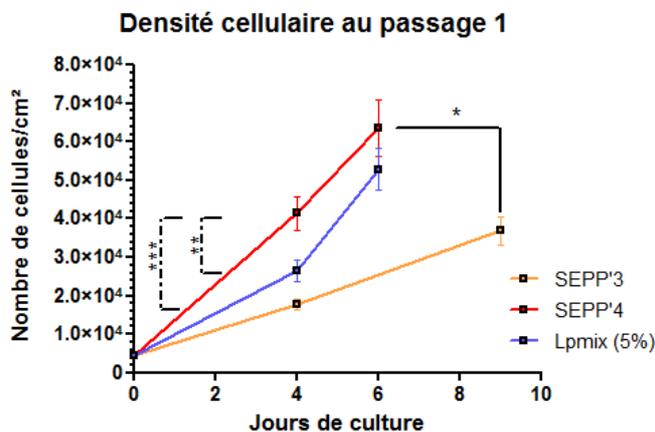
#### 2.1.2.4.2 Source plaquettaire : le MCP

La condition SEPP'4, est la condition qui permet la meilleure prolifération cellulaire quelle que soit le passage (Figure 36 à 38). En primoculture, elle permet d'obtenir la confluence plus rapidement pour une population cellulaire équivalente au Lpmix mais supérieur au SEPP'3. Au passage 1 et 2 cette population de cellules obtenue à confluence est plus importante que celle du Lpmix et du SEPP'3. Par contre la condition à 3% de protéines plaquettares n'est tout simplement pas assez enrichie pour être aussi efficace que le témoin Lpmix.

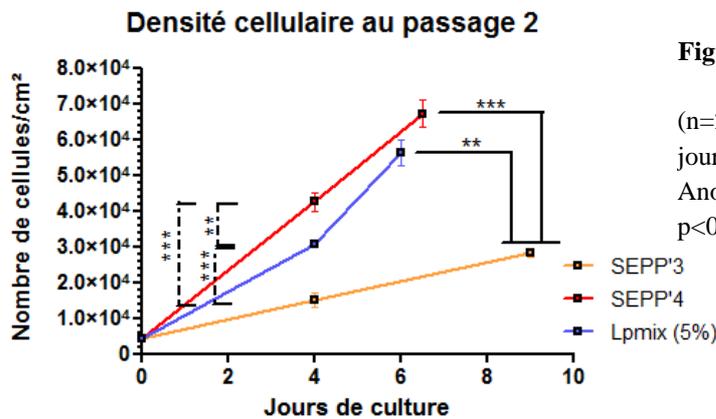


**Figure 36°: Densité cellulaire durant la primoculture sous différentes conditions de SEPP'**

(n=2). Jours de culture correspond au nombre de jours en cours d'expansion. Tests statistique Anova et Tukey sur la densité cellulaire : \* = p<0,05.



**Figure 37°: Densité cellulaire durant le passage 1 sous différentes conditions de SEPP'**  
(n=2). Jours de culture correspond au nombre de jours en cours d'expansion. Tests statistique Anova et Tukey sur la densité cellulaire : \* = p<0,05 ; \*\* = p<0,01 ; \*\*\* = p<0,001.



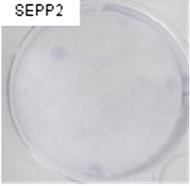
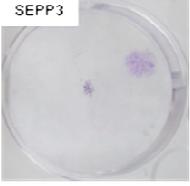
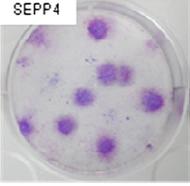
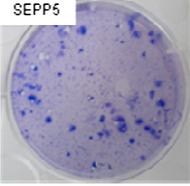
**Figure 38°: Densité cellulaire durant le passage 2 sous différentes conditions de SEPP'** (n=2). Jours de culture correspond au nombre de jours en cours d'expansion. Tests statistiques Anova et Tukey sur la densité cellulaire : \* = p<0,05 ; \*\* = p<0,01 ; \*\*\* = p<0,001.

### 2.1.2.5 Etude de la clonogénicité des CSM en présence du nouveau concept de solution d'apport de croissance

#### 2.1.2.5.1 Taux de clonogénicité en fonction des extraits de lysat plaquettaire provenant de CPA

Le taux de clonogénicité d'une souche cellulaire détermine le pourcentage de cellules gardant le caractère souche/progéniteur et donc, prolifératif au sein d'une population donnée. Cette étude a été menée en étudiant le nombre de CFU-F formé. Deux études distinctes ont été réalisées : étude du nombre total de CFU-F et étude du nombre de CFU-F de taille supérieure à 4 mm de diamètre (Tableau 26).

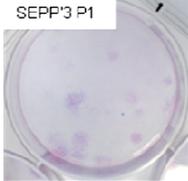
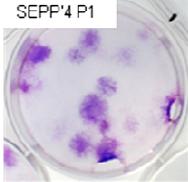
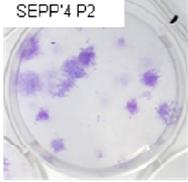
Seule la condition SEPP4 a pu générer un taux de clonogénicité significativement supérieur aux autres conditions que se soit en termes de nombre de clones totaux qu'en nombre de clones de taille > 4mm (17% et environ 8% respectivement).

Condition	Pourcentage de CFU-F	Pourcentage de CFU-F > 4mm	Photo de puits d'étude de CFU-F
SEPP1	0 <sup>a</sup>	0	
SEPP2	3 ± 1.5 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.375	
SEPP3	6.5 ± 4.5 <sup>a</sup>	1.5 ± 1.25	
SEPP4	17.75 ± 0.875 <sup>b</sup>	8.25 ± 1.875*	
SEPP5	NC	NC	
SEPP6	0	0	
Lp témoin	9 ± 4.5 <sup>ab</sup>	1.25 ± 1.25	
SVF	1 ± 0.75 <sup>a</sup>	0	

**Tableau 26 : Etude de la clonogénicité des CSM dans les différentes conditions de SEPP au le premier passage**

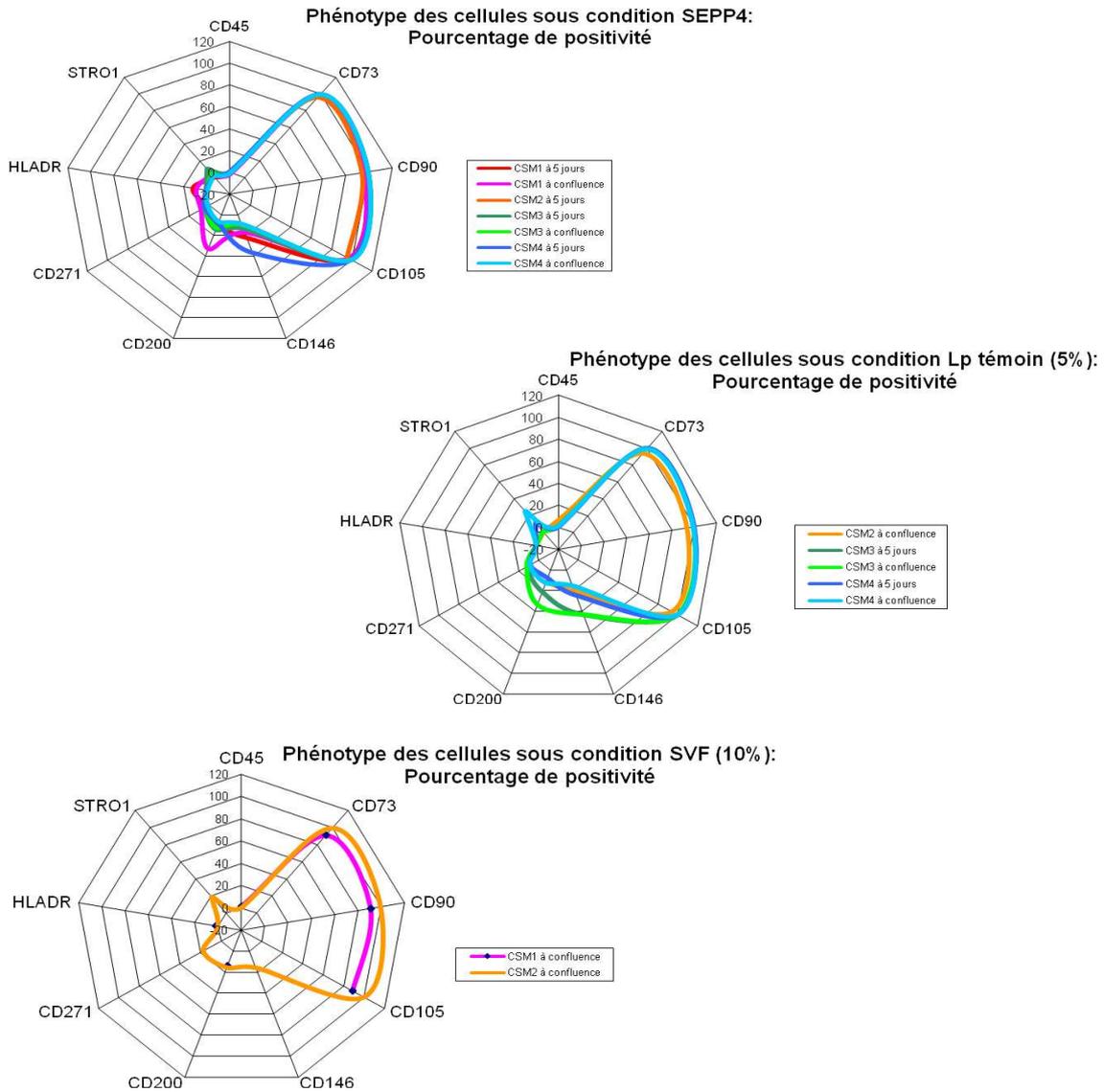
Photo représentant des exemples de puits de culture en négatif. Valeur moyenne ± SEM ; (SEPP1 :n=1 ; SEPP2, 3, 4 et témoin :n=4 ; SVF :n=2). Tests statistiques Anova et Tukey pour un P<0.05 sur pourcentage de CFU-F en fonction des conditions et sur pourcentage de CFU-F > 4mm en fonction des conditions. Nba statistiquement différents de Nbb.

**2.1.2.5.2 Taux de clonogénicité en fonction des extraits de lysat plaquettaire provenant de MCP**

Condition	Pourcentage de CFU-F	Pourcentage de CFU-F > 4mm	Photo de puits d'étude de CFU-F
SEPP'3 passage 1	10 ± 5	0.5 ± 0.5	
SEPP'4 passage 1	18.5 ± 0.5	6 ± 2	
Lp témoin passage 1	17.5 ± 1.5	3.5 ± 0.5	
SEPP'3 passage 2	5.5 ± 0.5	0.5 ± 0.5	
SEPP'4 passage 2	15.5 ± 0.5	7 ± 2	
Lp témoin passage 2	14.5 ± 1.5	1 ± 0	

**Tableau 27 : Etude de la clonogénicité des CSM dans les différentes conditions sur 2 passages successif**  
 Photo représentant des exemples de puits de culture en négatif. (n=2). Valeur moyenne ± SEM. Test statistique : Anova et Tukey p>0.05,(pas de significativité) sur le pourcentage de CFU-F en fonction des conditions et du passage. p>0.05 (pas de significativité) sur le pourcentage de CFU-F > 4mm en fonction des conditions et du passage.

Dans cette étude les pourcentages de clonogénicité obtenu en condition SEPP'4 et Lpmix sont les plus importants et équivalents entre eux. Cependant le pourcentage de clones supérieurs à 4 mm de diamètre est supérieur pour la condition SEPP'4, mais le faible nombre d'échantillons ne permet pas de prouver statistiquement cette différence (Tableau 27).



**Figure 39°: Graphiques en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant les différents marqueurs membranaires durant le passage 1 sous conditions SEPP et témoins**

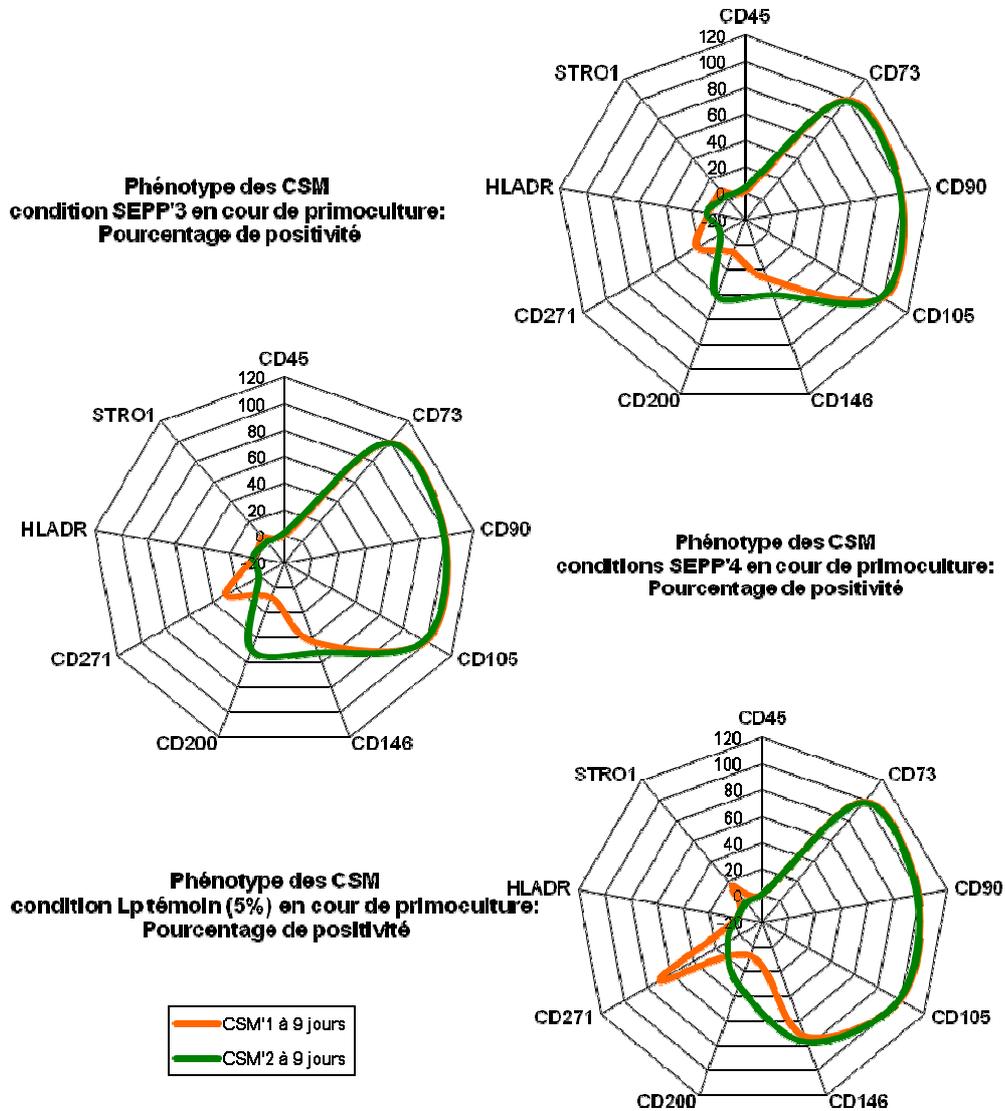
### **2.1.2.6 Etude phénotypique des cellules**

#### ***2.1.2.6.1 Phénotype de type CSM après conditionnement par les SEPP***

Le phénotype cellulaire est étudié au cours du passage 1. Pour plus de commodité, seules les cellules cultivées en SEPP4 sont étudiées et comparées aux témoins. Les cellules, quelle que soit la condition de culture, gardent le phénotype de cellules stromales mésenchymateuses (CD73+, CD90+, CD 105+, CD45-, HLADR-. (Figure 39). Quelques variations sont observées avec des marqueurs déjà observés au cours de cette étude comme étant sujets à des variations d'expressions tels que CD146, CD200. Mais ces variations semblent dépendre davantage de la souche cellulaire que de la condition de culture.

#### ***2.1.2.6.2 Phénotype cellulaire après conditionnement en SEPP'***

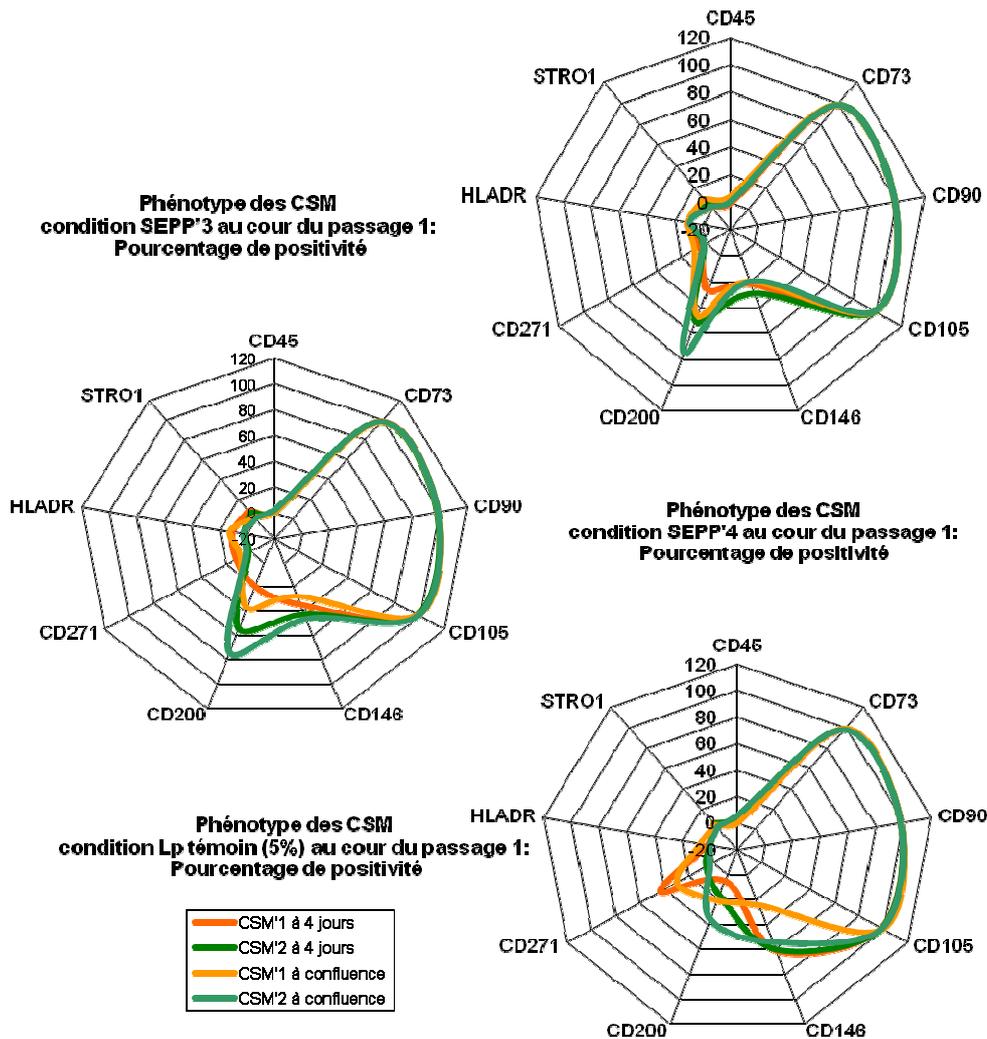
Pour l'étude des SEPP', le phénotype a pu être étudié dès la primoculture, au Jfixe et à la confluence des passages 1 et 2 (Figures 40 à 42). Quelque soit le moment de la phase de culture *in vitro*, le phénotype CSM CD73+, CD90+, CD 105+, CD45-, HLADR- est conservé. Les expressions des autres marqueurs membranaires varient en fonction des conditions et de la souche de cellulaire.



**Figure 40°: Graphiques en radar représentant le phénotype des cellules cultivées en primoculture sous différentes conditions de SEPP'**  
 Pourcentage de cellules exprimant les divers clusters de différenciation.

Une sous population importante de cellules CD146+ est apparue en Lpmix, sous population qui diminue légèrement en présence de SEPP'4, alors qu'avec SEPP'3, elle correspond à un faible pourcentage. Une sous population CD271+ relativement importante dans une des souches de cellules est mise en évidence en condition témoin mais tend à disparaître au fur et

à mesure des passages. A noter également des cellules CD200+ mises en évidence dans certaines souches cellulaires en présence de SEPP', population persistant au fur et à mesure des passages. Seul Stro 1 n'est pas exprimé quelle que soit la condition et la souche cellulaire étudiée.



**Figure 41°: Graphiques en radar représentant le phénotype des cellules cultivées au passage 1 sous différentes conditions de SEPP'**

Pourcentage de cellules exprimant les divers clusters de différenciation au moment du Jfixe et à confluence.

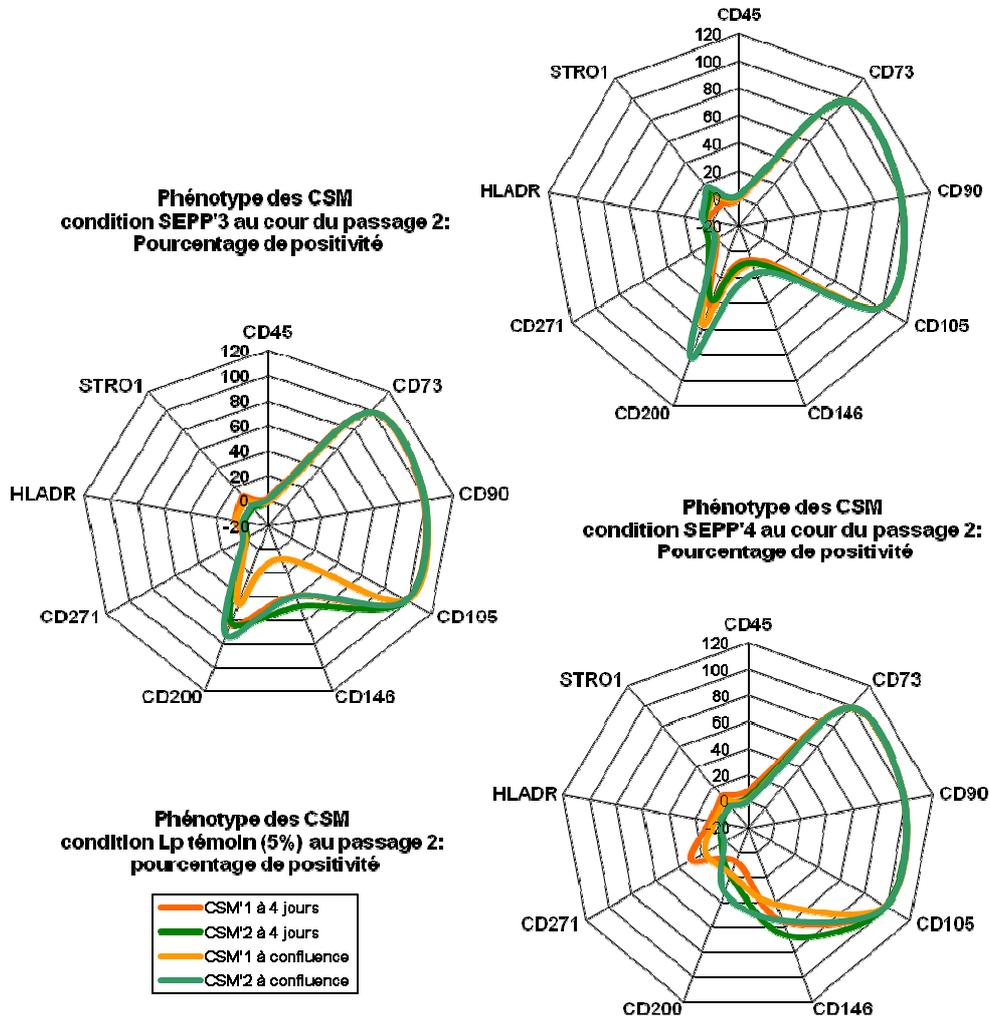


Figure 42°: Graphiques en radar représentant le phénotype des cellules cultivées au passage 2 sous différentes conditions SEPP'

Pourcentage de cellules exprimant les divers clusters de différenciation au moment du Jfixe et à confluence.

### 2.1.2.7 Discussion sur ce nouveau concept et orientation

Cette étude a permis de répondre aux questions posées sur l'effet de la déplasmatisation. La différence à soutenir une culture de CSM, entre un produit amoindri ou non en plasma utilisé sous ces conditions, était due à un effet dose, mais une certaine teneur en protéines plasmatiques associée aux protéines plaquettaires reste indispensable (SEPP6 contenant 100%

de protéines plaquettaires ne permet pas aux cellules de proliférer). Il existe cependant un ratio de protéines plaquettaires et plasmatiques optimal pour soutenir une forte expansion cellulaire. Il s'est avéré que le ratio 10% (SEPP4), pour une utilisation à 3 mg/ml était le plus efficace et le plus homogène pour une production de cellules. Le ratio 25% trop hétérogène en termes de production, et trop demandeur en protéines plaquettaires est donc peu intéressant. Avec ces concentrations, on limite la dilution du milieu de culture tout en augmentant la qualité du milieu supplémenté nous rapprochant ainsi de la teneur en protéines par millilitre de milieu souhaitée.

La déplasmatisation d'un MCP diminue l'efficacité de celui-ci à supporter les cultures dans des conditions conventionnelles de dosage à cause de la faible teneur en protéines plasmatiques. Contrairement aux CPA, les MCP subissent obligatoirement cette déplasmatisation, ils ne sont donc pas à utiliser car peu efficaces en comparaison avec leurs homologues d'aphérèse. Cette procédure pour développer un ratio unique en utilisant un produit de plaquettes totalement dépourvu de plasma et fortement concentré, rend les MCP utilisables et tout aussi efficaces que les CPA. Ce résultat est important car l'approvisionnement en MCP semble plus aisé d'après le rapport d'activité de 2011 de l'EFS (le nombre de dons est de l'ordre de 3190000 dont seulement 601000 sont réalisés par aphérèse, le quart étant des aphérèses plaquettaires). Un SEPP à 10% de protéines plaquettaires provenant de MCP s'est révélé suffisamment efficace pour supplémenter un milieu de culture destiné à la production de CSM. Le MCP devient donc un produit potentiellement exploitable en termes de capacité à produire la SEPP. Le concept d'une SEPP (10%) à base de MCP utilisé à 3 mg/ml de milieu de culture est donc le candidat de choix.

Pour que la SEPP puisse répondre aux attentes de l'ANSM pour une utilisation thérapeutique chez l'Homme, il est important de la sécuriser par un procédé d'inactivation virale. Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à la viro-inactivation de la fraction plasmatique.

### **2.2 Sécurisation des produits de supplémentation**

L'objectif principal de cette étape est la sécurisation de la SEPP pour minimiser les risques potentiels de transmission de pathogènes. La transmission pouvant survenir lors de l'administration des CSM chez le receveur après amplification *in vitro* sous SEPP contaminée. Pour sécuriser la solution, deux orientations ont été étudiées, la viro-inactivation

directe de la SEPP après fabrication ou la viro-inactivation au préalable de chaque composé. Dans un premier temps nous avons étudié l'impact de la sécurisation de seulement un des deux composants sur la capacité de la SEPP à stimuler la prolifération des CSM. L'objectif a été d'étudier l'impact de la viro-inactivation de la partie plasmatique de la SEPP pour estimer si ce traitement peut être intégré dans la procédure de fabrication de la SEPP. En parallèle nous avons étudié l'utilisation d'un sous-produit du plasma obtenu par cryoprécipitation pour améliorer la qualité de l'apport plasmatique et ainsi améliorer la qualité de la supplémentation par la SEPP.

### **2.2.1 Evaluation de la sécurisation et de la cryoprécipitation de la partie plasmatique**

Deux traitements de viro-inactivation ont été étudiés, la pasteurisation et le traitement photochimique par bleu de méthylène, deux procédés physico-chimiques différents, mais efficaces dans l'atténuation virale.

Pour valoriser le cryoprécipité du plasma, composé obtenue en quantité limitée très restreinte en comparaison à son surnageant correspondant, nous avons étudié différentes concentrations de la composante plasmatique sur la conception de la SEPP. Les concentrations protéiques de référence sont celles de la SEPP (10%), ainsi l'apport en protéines plaquettaires utilisées dans cette étude reste de 0,3 mg/ml de milieu de culture.

17 conditions ont été étudiées, conditions qui vont varier selon :

- leur traitement de viro-inactivation (sans traitement, traitement au bleu de méthylène ou pasteurisation) ;
- leur composante plasmatique (cryoprécipité ou surnageant de la cryoprécipitation) ;
- leur quantité de protéines plasmatiques proposant des concentrations finales de ces protéines de 2,7 mg/ml de MEM $\alpha$ , 1,35 mg/ml de MEM $\alpha$  ou 0,3 mg/ml de MEM $\alpha$ .

#### **2.2.1.1 Volume des différentes solutions plasmatiques et leurs concentrations**

Les volumes des différentes solutions plasmatiques récupérées sont très variables, notamment concernant le cryoprécipité et son surnageant associé. Les différences sont de l'ordre d'un facteur 16,75 (Tableau 28). Les volumes des cryoprécipités correspondent aux quantités récupérées après resuspension dans les 10 mL de SSP+. Les concentrations protéiques des

cryoprécipités sont également plus faibles de l'ordre d'un facteur 1,9. Les composantes plasmatiques pasteurisées présentent les plus faibles concentrations protéiques, toutes composantes plasmatiques confondues. La SEP est obtenue à partir de 4 MCP aux concentrations plaquettaires équivalentes.

<i>Source protéique</i>	<i>Volume (mL)</i>	<i>Concentration protéique (mg/mL)</i>
Solution d'Extrait Plaquettaire (SEP)	47	13,5
Surnageant de cryoprécipité de plasma non viroatténué (SNcryoP norm)	250	66,5
Cryoprécipité de plasma non viroatténué (CryoP norm)	17,5	37,7
Surnageant de cryoprécipité de plasma viro-atténué au bleu de méthylène (SNcryoP BM)	250	72
Cryoprécipité de plasma viro-atténué au bleu de méthylène (CryoP BM)	15	38,5
Surnageant de cryoprécipité de plasma pasteurisé (SNcryoP past)	290	53,8
Cryoprécipité de plasma pasteurisé (CryoP past)	15	25,8

**Tableau 28 : Volumes et concentrations des différents composants des SEPP**

### **2.2.1.2 Prolifération des CSM en présence de SEPP aux multiples composantes plasmatiques**

Que ce soit en primoculture ou durant le passage 1 (Figure 43 et 44) (Tableau 29 et 30), les conditions permettant les proliférations de CSM les plus productives correspondent essentiellement aux solutions les plus enrichies en protéines plasmatiques (correspondant à 2,7 mg de protéines plasmatiques dans un millilitre de milieu de culture) suivies par les conditions aux concentrations plasmatiques intermédiaires (1,35 mg). Les conditions appauvries en contenu plasmatique (0,3 mg) engendrent une faible quantité de cellules associée à un temps d'incubation plus important, voire pas de prolifération pour la condition sans composante plasmatique. La condition sous albumine, bien que très concentrée (2,7 mg) ne permet cependant pas l'accroissement de la population cellulaire. Les témoins SVF

génèrent une prolifération cellulaire du même ordre de grandeur que les conditions appauvries en plasma (0,3 mg), l'héparine n'ayant aucun effet sur la qualité de la supplémentation.

Concernant l'effet du sous-produit plasmatique, aucune différence n'est démontrée. Qu'elles soient composées du cryoprécipité ou du surnageant du cryoprécipité, les solutions de supplémentation permettent un taux d'accroissement de la population des CSM élevé, du moment que la quantité de protéines plasmatiques soit importante, à l'exception du cryoprécipité pasteurisé.

Enfin, la viro-inactivation, quel que soit le procédé, n'altère pas la composante plasmatique. A l'exception de la pasteurisation qui semble avoir altéré les propriétés du cryoprécipité. En effet malgré la forte concentration en protéines plasmatiques du « CryoP past 2,7 », les CSM cultivées sous cette condition ont une croissance inférieure aux autres conditions de même concentration (population cellulaire inférieure pour un temps d'incubation équivalent ou inversement).

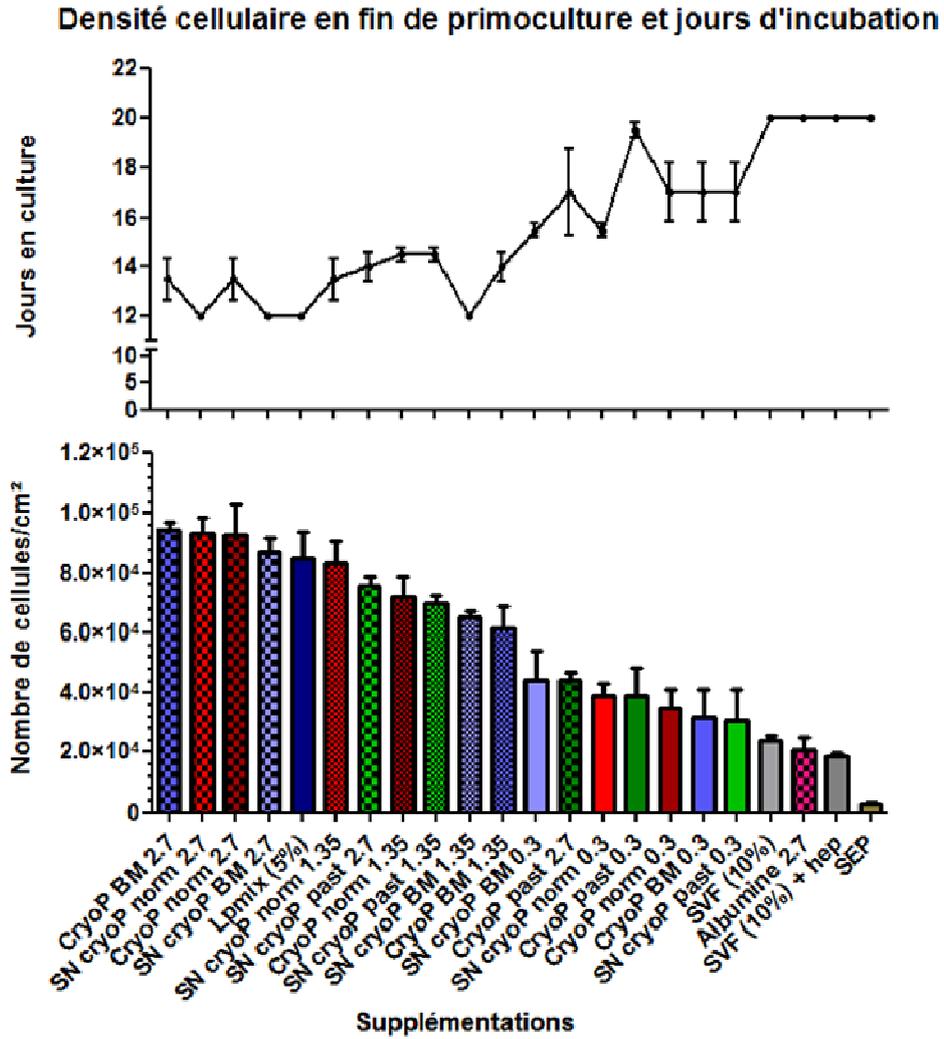


Figure 43 : Densité cellulaire à confluence en primoculture et temps d'incubation pour l'obtention de la confluence

CONDITIONS	SEP	SN cryoP norm 0,3	SN cryoP norm 1,35	SN cryoP norm 2,7	SN cryoP BM 0,3	SN cryoP BM 1,35	SN cryoP BM 2,7	SN cryoP past 0,3	SN cryoP past 1,35	SN cryoP past 2,7	CryoP norm 0,3	CryoP norm 1,35	CryoP norm 2,7	CryoP BM 0,3	CryoP BM 1,35	CryoP BM 2,7	CryoP past 0,3	CryoP past 2,7	Albumine 2,7	Lpmix (5%)	SVF (10%)	SVF (10%) + hep
SEP		**	***	***	**	***	***	ns	***	***	ns	***	***	ns	***	***	ns	ns	ns	***	ns	ns
SN cryoP norm 0,3	**		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	**	ns	**	**
SN cryoP norm 1,35	***	***		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	***	ns	***	***
SN cryoP norm 2,7	***	***	ns		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	***	ns	***	***
SN cryoP BM 0,3	***	ns	**	***		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	**	ns	**	**
SN cryoP BM 1,35	***	ns	ns	ns	ns		ns	***	ns	ns	***	ns	ns	***	ns	ns	***	***	***	ns	***	***
SN cryoP BM 2,7	***	***	ns	ns	***	ns		***	ns	ns	***	ns	ns	***	ns	ns	***	***	***	ns	***	***
SN cryoP past 0,3	ns	ns	***	***	ns	*	***		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns
SN cryoP past 1,35	***	*	ns	ns	ns	ns	ns	**		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	***	ns	***	***
SN cryoP past 2,7	***	**	ns	ns	*	ns	ns	***	ns		ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	***	ns	***	***
CryoP norm 0,3	*	ns	***	***	ns	ns	***	ns	*	**		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns
CryoP norm 1,35	***	*	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns	**		ns	ns	ns	ns	***	ns	***	ns	***	***
CryoP norm 2,7	***	***	ns	ns	***	ns	ns	***	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	***	ns	***	***
CryoP BM 0,3	ns	ns	***	***	ns	*	***	ns	**	***	ns	***	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	***	ns	ns
CryoP BM 1,35	***	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns		ns	***	ns	***	ns	***	***
CryoP BM 2,7	***	***	ns	ns	***	ns	ns	***	ns	ns	***	ns	ns	***	*		***	ns	***	ns	***	***
CryoP past 0,3	**	ns	***	***	ns	ns	***	ns	*	**	ns	*	***	ns	ns	***		ns	ns	***	ns	ns
CryoP past 2,7	**	ns	**	***	ns	ns	***	ns	ns	*	ns	ns	***	ns	ns	***	ns		ns	***	ns	ns
Albumine 2,7	ns	ns	***	***	ns	***	***	ns	***	***	ns	***	***	ns	**	***	ns	ns		***	ns	ns
Lpmix (5%)	***	***	ns	ns	**	ns	ns	***	ns	ns	***	ns	ns	***	ns	ns	***	**	***		***	***
SVF (10%)	ns	ns	***	***	ns	**	***	ns	***	***	ns	***	***	ns	**	***	ns	ns	ns	***		ns
SVF (10%) + hep	ns	ns	***	***	ns	***	***	ns	***	***	ns	***	***	ns	***	***	ns	ns	ns	***	ns	

**Tableau 29 : Comparaison statistique des différentes expansions cellulaire à confluence en fonction des conditions et de leurs temps d'incubation en primoculture**

Un test de Tukey après analyse Anova,.

Légende : les comparaisons statistiques des expansions cellulaire sont représentés dans la partie basse du tableau (fond blanc) ; les comparaisons statistiques des temps d'incubation sont représenté dans la partie haute du tableau (Fond violet)

- \* : p < 0,05
- \*\* : p < 0,01
- \*\*\* : p < 0,001

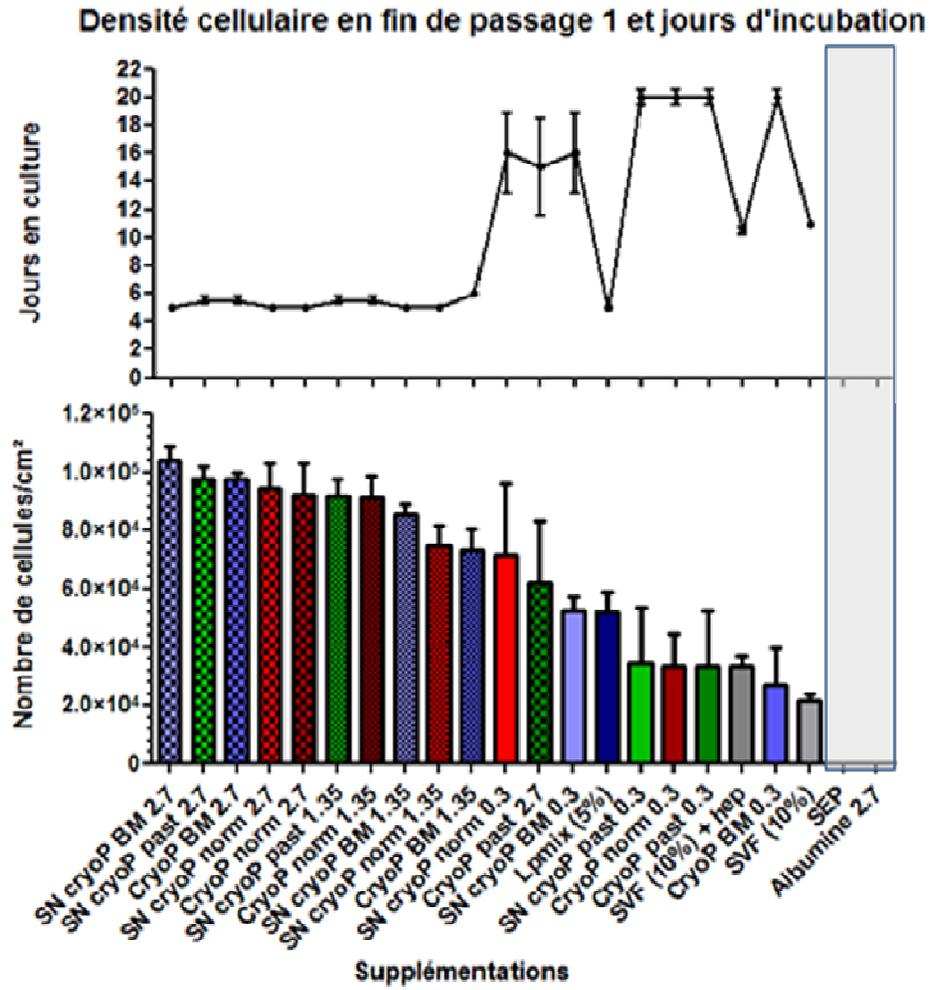


Figure 44 : Densité cellulaire à confluence au cour du passage 1 et temps d'incubation pour l'obtention de la confluence

CONDITIONS	SEP	SN cryoP norm 0,3	SN cryoP norm 1,35	SN cryoP norm 2,7	SN cryoP BM 0,3	SN cryoP BM 1,35	SN cryoP BM 2,7	SN cryoP past 0,3	SN cryoP past 1,35	SN cryoP past 2,7	CryoP norm 0,3	CryoP norm 1,35	CryoP norm 2,7	CryoP BM 0,3	CryoP BM 1,35	CryoP BM 2,7	Albumine 2,7	Lpmix (5%)	SVF (10%)	SVF (10%) + hep	
SEP																					
SN cryoP norm 0,3			***	***	ns	***	***	ns	***	***	ns	***	***	ns	***	***	ns	ns	***	ns	ns
SN cryoP norm 1,35	ns			ns	***	ns	ns	***	ns	ns	***	ns	ns	***	ns	ns	***	***	ns	ns	ns
SN cryoP norm 2,7	ns	ns			***	ns	ns	***	ns	ns	***	ns	ns	***	ns	ns	***	***	ns	ns	ns
SN cryoP BM 0,3	ns	ns	ns			***	***	ns	***	***	ns	***	***	ns	***	***	ns	ns	***	ns	ns
SN cryoP BM 1,35	ns	ns	ns	ns			ns	***	ns	ns	***	ns	ns	***	ns	ns	***	***	ns	ns	ns
SN cryoP BM 2,7	ns	ns	ns	ns	ns			***	ns	ns	***	ns	ns	***	ns	ns	***	***	ns	ns	ns
SN cryoP past 0,3	ns	ns	*	ns	ns	**		***	***	***	ns	***	***	ns	***	***	ns	ns	***	***	***
SN cryoP past 1,35	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*		ns	***	ns	ns	ns	***	ns	ns	***	***	ns	ns	ns
SN cryoP past 2,7	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns		***	ns	ns	ns	***	ns	ns	***	***	ns	ns	ns
CryoP norm 0,3	ns	ns	*	ns	ns	**	ns	*	*		***	***	ns	***	***	***	ns	ns	***	***	***
CryoP norm 1,35	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*		ns	***	ns	ns	***	***	ns	ns	ns	ns
CryoP norm 2,7	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	*	ns	***	ns	ns	***	***	ns	ns	ns
CryoP BM 0,3	ns	ns	**	ns	*	***	ns	*	**	ns	*	*		***	***	ns	ns	***	***	***	***
CryoP BM 1,35	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CryoP BM 2,7	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	**	ns	ns	***	***	ns	ns	ns
CryoP past 0,3	ns	ns	*	ns	ns	**	ns	*	*	ns	*	*	ns	ns	ns	*		ns	***	***	***
CryoP past 2,7	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns			***	ns	ns
Albumine 2,7																					
Lpmix (5%)	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
SVF (10%)	ns	ns	**	ns	*	***	ns	**	**	ns	**	**	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
SVF (10%) + hep	ns	ns	*	ns	ns	**	ns	*	*	ns	*	*	ns	ns	*	ns	ns	ns	ns	ns	ns

**Tableau 30 : Comparaison statistique des différentes expansions cellulaire à confluence en fonction des conditions et de leurs temps d'incubation au cour du passage 1.**

Un test de Tukey après analyse Anova.,

Légende : les comparaisons statistiques des expansions cellulaire sont représentés dans la partie basse du tableau (fond blanc) ; les comparaisons statistiques des temps d'incubation sont représenté dans la partie haute du tableau (Fond violet)

- \* :  $p < 0,05$
- \*\* :  $p < 0,01$
- \*\*\* :  $p < 0,001$

### 2.2.1.3 Etude de la clonogénicité

L'étude clonogénique est réalisée en parallèle à l'étude de l'expansion aux passages 1. Le taux de clonogénicité dans chaque condition est corrélé dans l'ensemble à la capacité proliférative des conditions (Tableau 31).

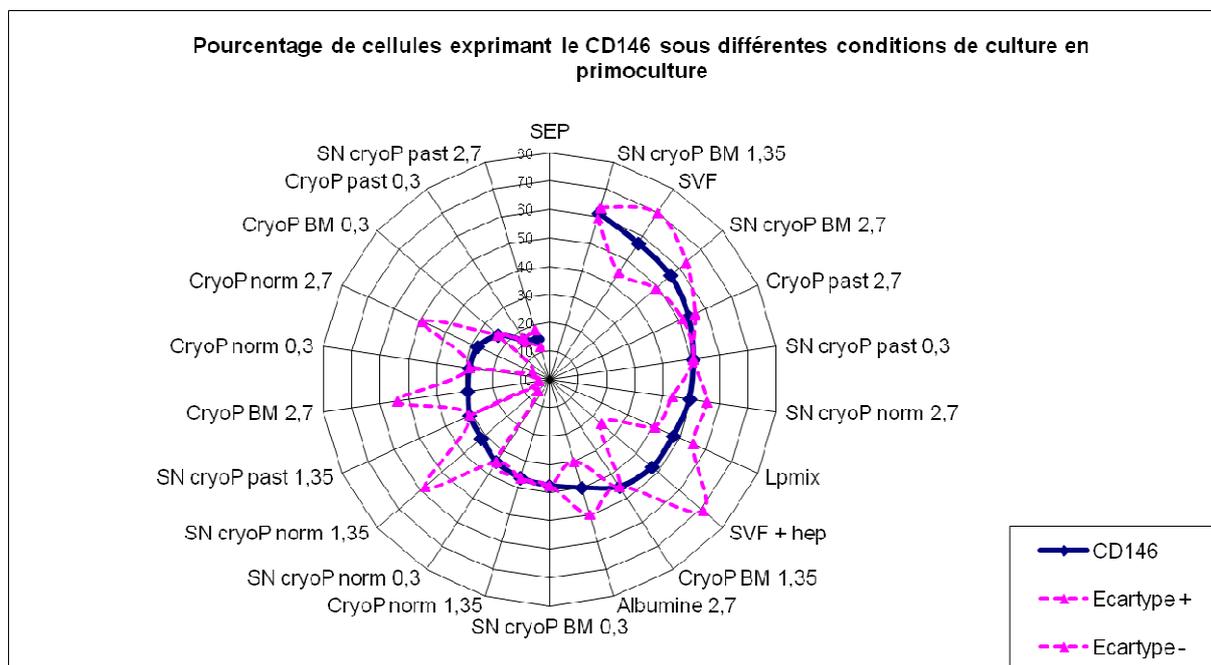
<i>Conditions</i>	<i>Pourcentage</i>
SN cryoP norm 0,3	4±3
SN cryoP norm 1,35	16±1
SN cryoP norm 2,7	19.5±1.5
SN cryoP BM 0,3	3.5±3.5
SN cryoP BM 1,35	16±3
SN cryoP BM 2,7	17.5±1.5
SN cryoP past 0,3	0
SN cryoP past 1,35	8.5±8.5
SN cryoP past 2,7	19.5±2.5
CryoP norm 0,3	0.5±0.5
CryoP norm 1,35	16±1
CryoP norm 2,7	19±2
CryoP BM 0,3	0
CryoP BM 1,35	7±6
CryoP BM 2,7	5±5
CryoP past 0,3	0
CryoP past 2,7	6±6
Lpmix (5%)	14±1
SVF (10%)	7.5±2.5
SVF (10%) + hep	1.5±1.5

**Tableau 31 : Pourcentage de CFU-F de la population cellulaire au cours du passage 1 en fonctions des conditions de supplémentation**

Les pourcentages de clones dans les conditions SNcryoP 2,7 (norm, BM et past) et CryoP norm 2,7 sont élevés de l'ordre de 18% (le pourcentage le plus haut étant celui de SNcryoP norm 2,7 avec 19,5±1,5%), conditions dont les proliférations étaient importantes. Les pourcentages de clones dans les conditions SNcryoP 0,3 et CryoP 0,3 (norm, BM, past) sont faibles avec une moyenne de 1,33 toutes conditions confondues, conditions dont les proliférations étaient faibles. Même remarque pour la condition CryoP past 2,7. Mais les conditions CryoP BM 1,35 et CryoP BM 2,7 ont un taux de clonogénicité bas (respectivement 7±6 et 5±5), non représentatif de la prolifération des CSM en culture.

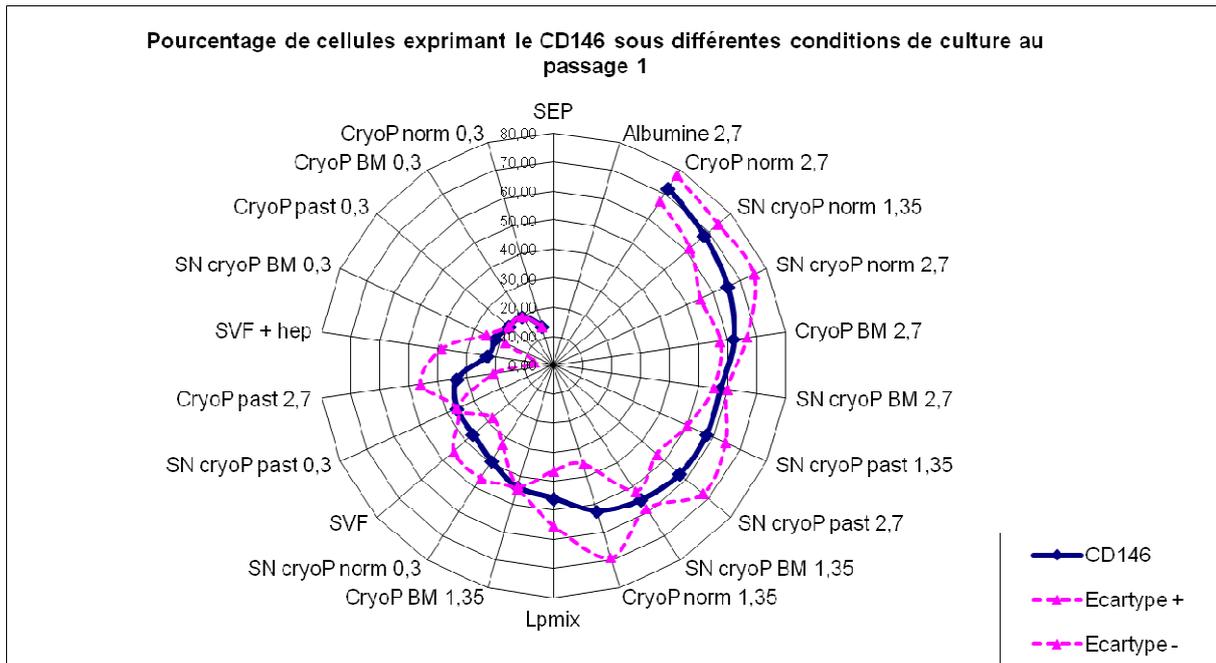
### 2.2.1.4 Etude phénotypique

L'étude phénotypique des CSM est réalisée sur les cellules obtenues à confluence en primoculture et au passage 1. Dans les différentes conditions testées les cellules répondent aux conditions définissant les CSM selon l'ISCT : plus de 90% sont CD73+, CD90+, CD105+, moins de 5% expriment un marqueur de type hématopoïétique (CD45), ou endothélial (CD31). Les cellules n'expriment pas le CMH de classe II (HLADR). Les milieux testés n'entraînent donc pas l'amplification de types cellulaires potentiellement contaminant comme les monocytes ou les cellules endothéliales.



**Figure 45 : Graphique en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant le CD146 à la fin de la primoculture selon les conditions de culture**  
n = 2.

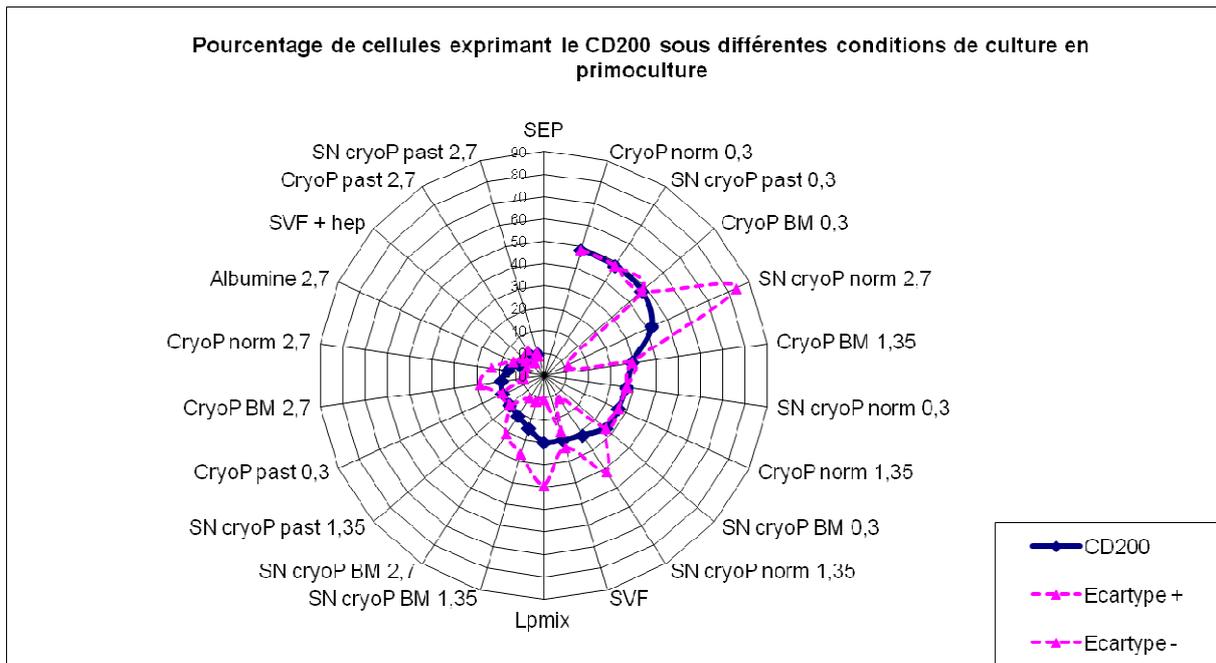
Certaines sous populations se distinguent par l'expression de certains marqueurs membranaires. L'expression de MCAM (CD146), une protéine également présente sur les cellules endothéliales, décroît comme attendu, au fil des passages et passe d'entre 50 et 60 % des cellules en fin de primoculture en Lpmix ou SVF, à respectivement 45 et 15% au passage 1 (Figures 45 et 46). S'il ne semble pas évident d'établir un effet dose ou une hiérarchie entre les différentes conditions en primoculture, il est intéressant de constater qu'à la fin du passage 1, il existe un effet dose croissant, les concentrations 1,35 et 2,7 permettant en moyenne d'obtenir une proportion de CD146+ supérieure à celle du Lpmix. Il ne semble pas y avoir d'effet très net des autres conditions (Figures 45 et 46).



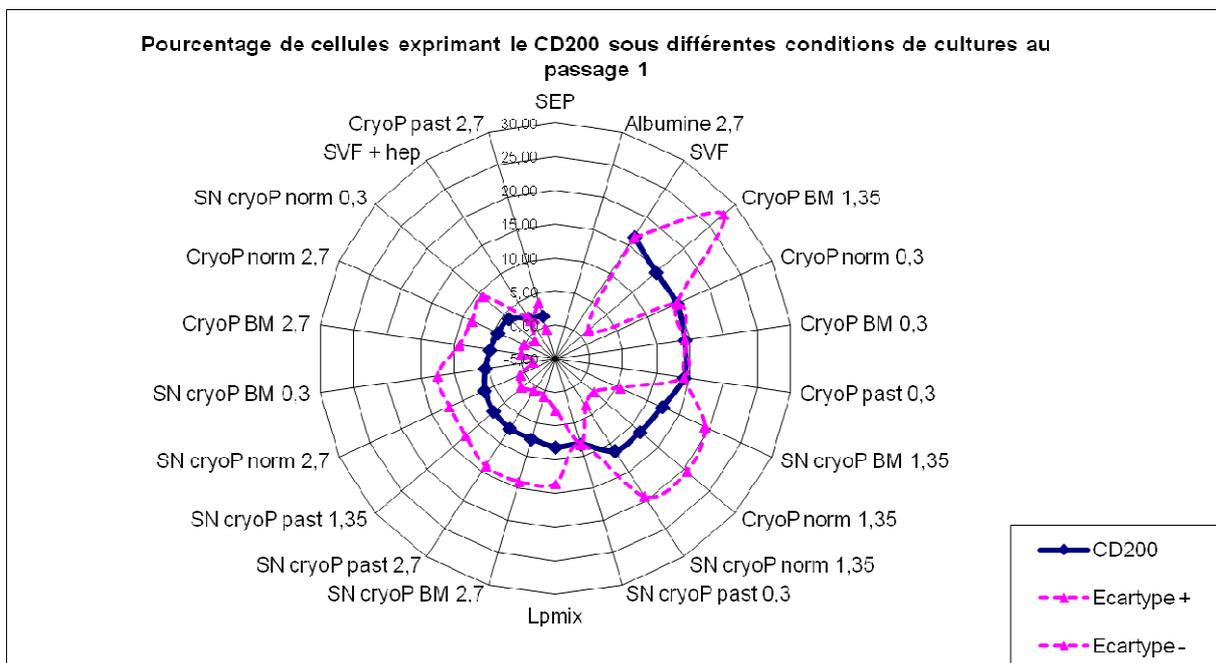
**Figure 46 : Graphique en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant le CD146 à la fin du passage 1 selon les conditions de culture n = 2.**

La proportion de cellules CD200+, une protéine associée à l’inhibition de cellules myéloïdes, décroît elle aussi entre les 2 passages, de 20% pour Lpmix et SVF en primoculture, à 7 et 15% respectivement au passage 1 (Figures 47 et 48).

Il ne semble par contre pas exister d’effet dose ou de hiérarchie entre catégories que ce soit en primoculture ou au passage 1.



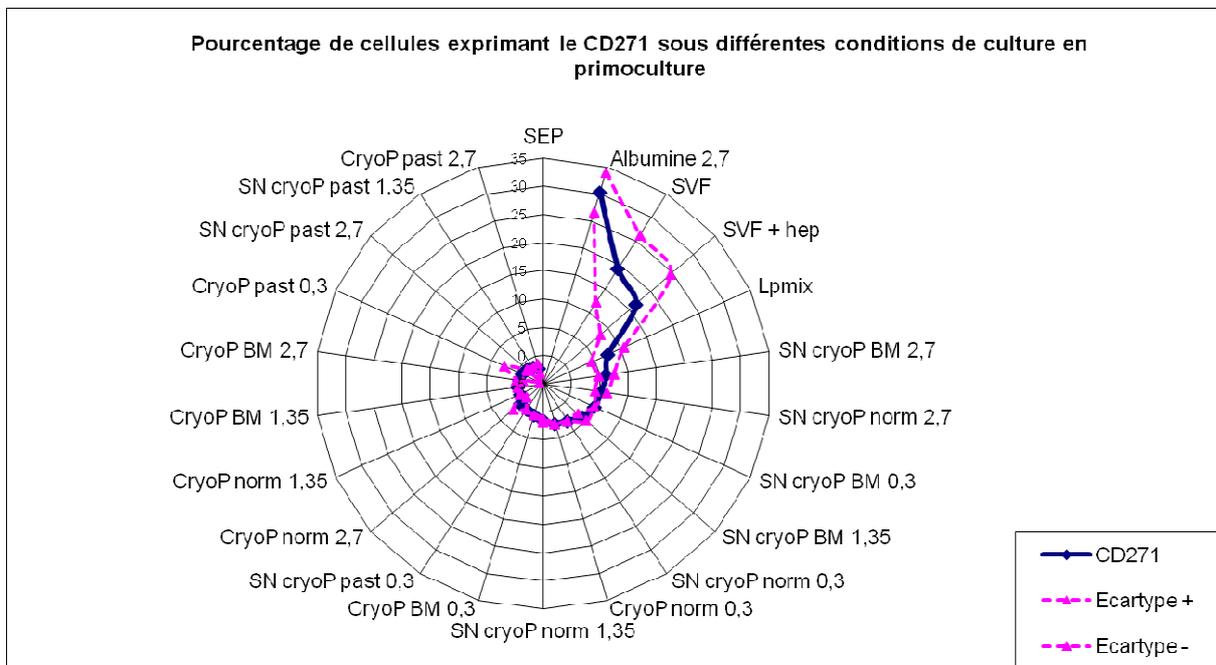
**Figure 47 : Graphique en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant le CD200 à la fin de la primoculture selon les conditions de culture**  
n = 2.



**Figure 48 : Graphique en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant le CD200 à la fin du passage 1 selon les conditions de culture**  
n = 2.

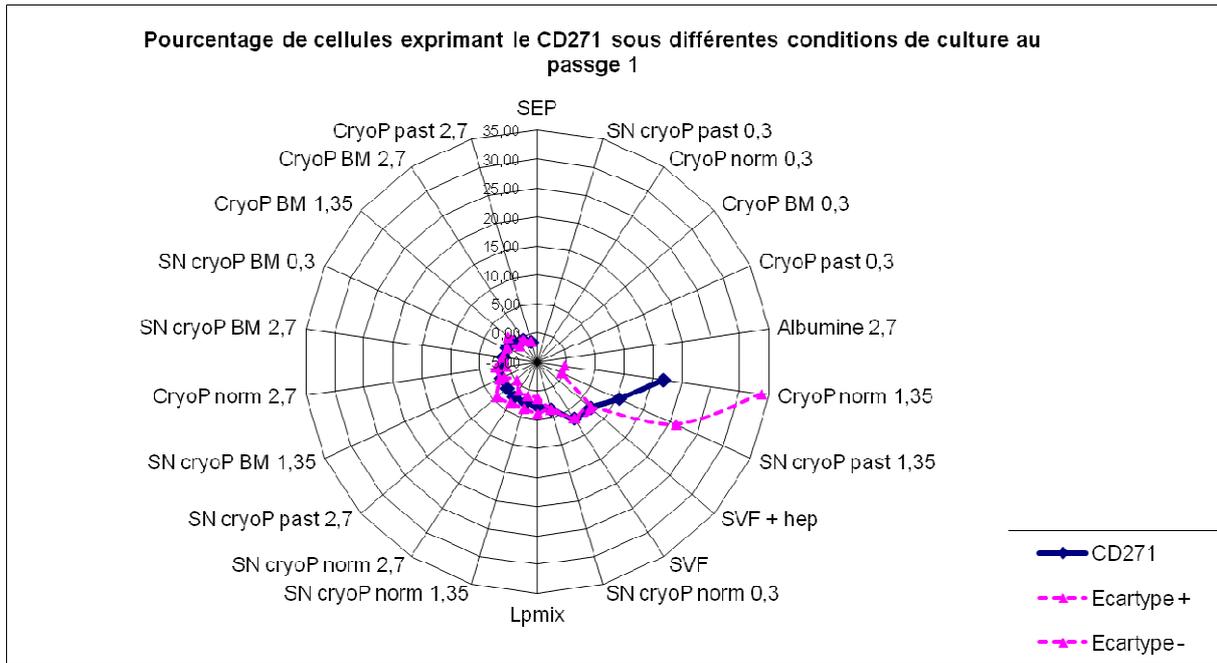
Le récepteur de faible affinité au NGF (CD271), marqueur de primitivité exprimé par une très faible sous population à la fin de la primoculture (environ 5%), est plus faiblement exprimé au cours du passage 1 (Figures 49 et 50). Dans les conditions en présence d'albumine et SVF, les cellules prolifèrent très peu, ce qui peut expliquer la forte proportion de CD271+.

Les SNcryoP semblent meilleurs que les cryoP pour maintenir cette sous-population en primoculture. Globalement le mode d'inactivation au bleu de méthylène semble révéler d'avantage de cellules positives au CD271 qu'un traitement à la pasteurisation ou sans traitement du plasma (Figure 49) ce qui pourrait suggérer que le bleu de méthylène soit plus toxique pour les cellules les moins primitives. Mais cette tendance ne se retrouve pas au passage 1, et globalement les différentes conditions n'entraînent pas d'amélioration sur ce paramètre par rapport au Lpmix ou au SVF (Figure 50).



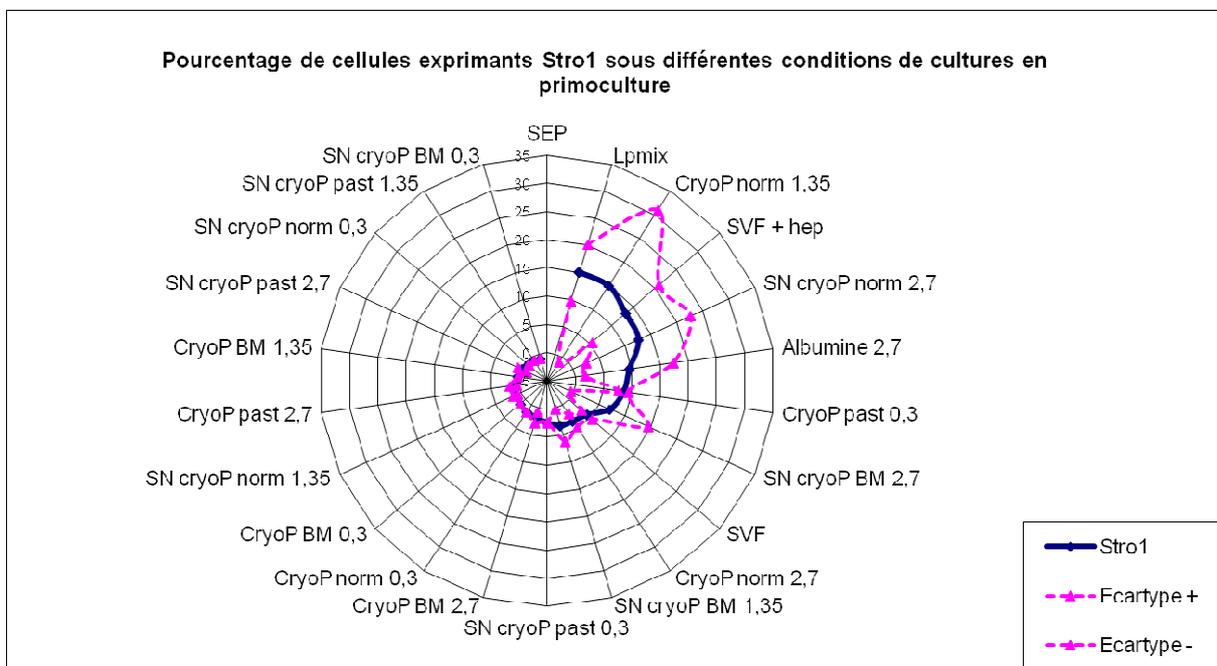
**Figure 49 : Graphique en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant le CD271 à la fin de la primoculture selon les conditions de culture**

n = 2.

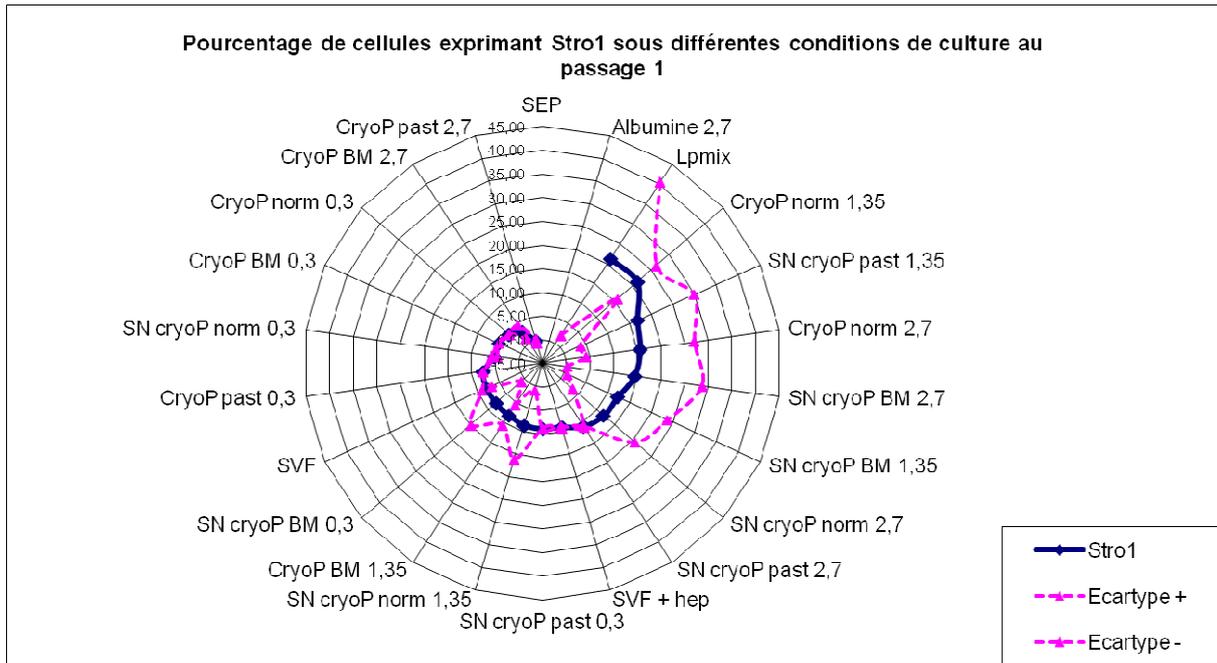


**Figure 50 : Graphique en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant le CD271 à la fin du passage 1 selon les conditions de culture n = 2.**

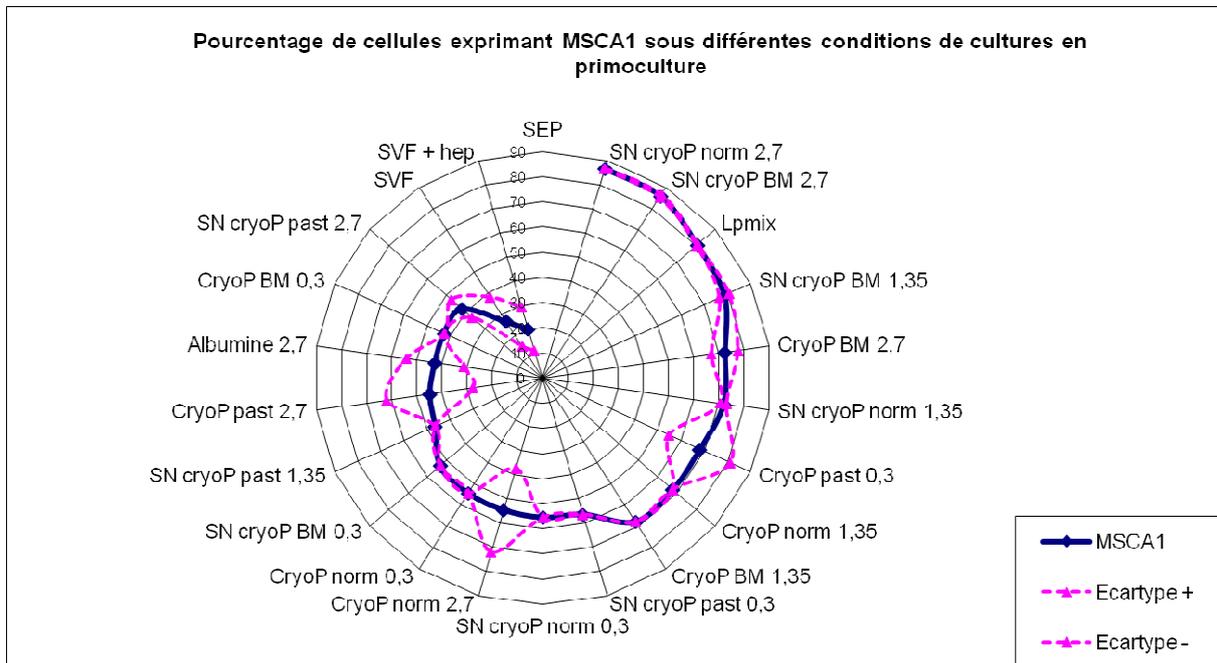
Stro-1 par contre varie peu globalement entre les 2 passages, le Lpmix étant la condition qui permet la plus forte expression. Si un effet-dose existe au passage 1, il n'est toutefois pas évident la non plus de catégoriser les différentes conditions (Figures 51 et 52).



**Figure 51 : Graphique en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant Stro1 à la fin de la primoculture selon les conditions de culture n = 2.**

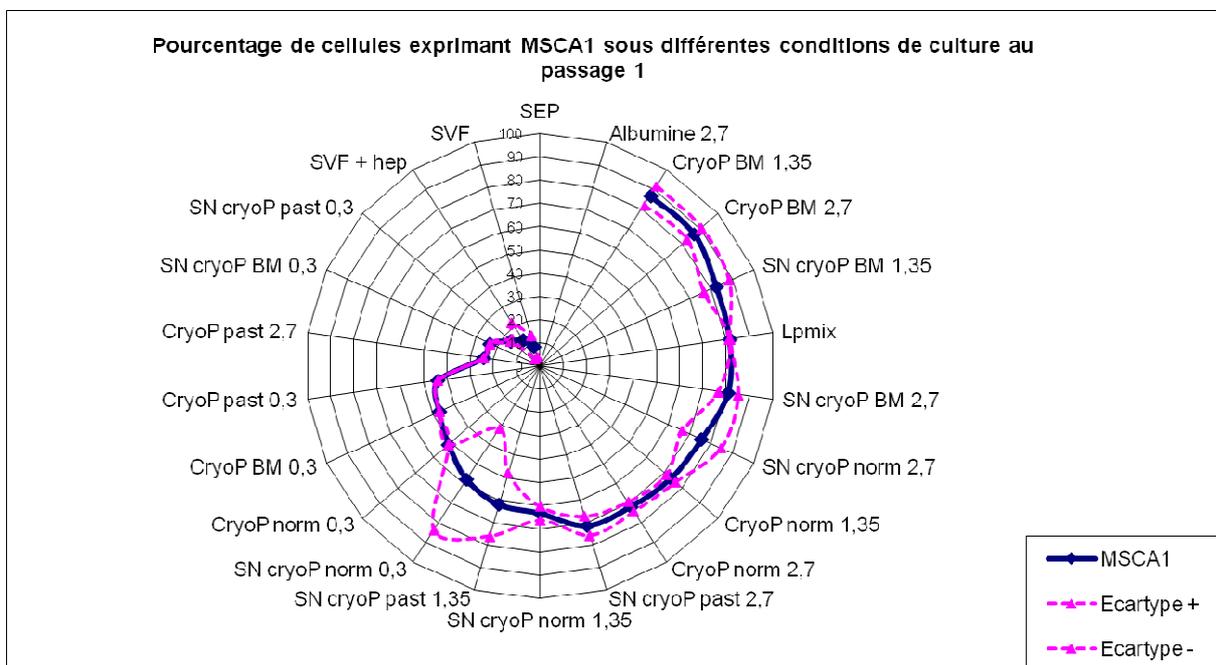


**Figure 52 : Graphique en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant Stro1 à la fin du passage 1 selon les conditions de culture**  
n = 2.



**Figure 53 : Graphique en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant MSCA1 à la fin de la primoculture selon les conditions de culture**  
n = 2.

MSCA1, la phosphatase alcaline non spécifique d'un tissu, permet de discriminer une population à plus fort potentiel clonogénique. Ses variations d'expression entre les différentes conditions sont plus importantes que les autres marqueurs fonctionnels étudiés, allant de 20-30% de positivité pour le SVF, à plus de 80% dans les conditions traitées au bleu de méthylène sans baisse notable entre les 2 passages (Figures 53 et 54). Parmi les conditions approchant ou dépassant le Lpmix, on retrouve les conditions les plus concentrées en protéines plasmatiques (1,35 et 2,7), les conditions traitées par du bleu de méthylène et le SN cryoP norm 2,7.



**Figure 54 : Graphique en radar représentant le pourcentage de cellules exprimant MSCA1 à la fin du passage 1 selon les conditions de culture n = 2.**

Globalement, aucune condition ne se démarque clairement des méthodes de culture standard sur ces marqueurs qui ne discriminent pas tous les mêmes sous populations. Il semble toutefois que les milieux aux concentrations protéiques les plus élevées, la viro-inactivation du plasma au bleu de méthylène ou l'absence de traitement par rapport à la pasteurisation aient des effets sur l'expression de certains marqueurs sans que l'on puisse en tirer des conclusions particulières.

### 2.2.1.5 Conclusion et discussion

Nous avons pu constater qu'un procédé de viro-inactivation peut être compatible avec le processus de fabrication de la SEPP. Cependant tous les traitements ne sont pas utilisables, la pasteurisation entraînant un effet délétère sur les protéines du plasma, notamment sur les protéines composant le cryoprécipité. Cette observation confirme bien la dénaturation des protéines plasmatiques par la pasteurisation (MacLeod et al., 1984), et démontre par ailleurs que les protéines plasmatiques ont un rôle et une activité biologique essentiels dans la qualité de notre substitut de SVF pour la culture des CSM. A composition égale, le traitement par pasteurisation du plasma diminue la qualité de la SEPP en comparaison au traitement par le bleu de méthylène. Le traitement photochimique en revanche ne semble pas affecter la propriété de notre substitut et permet d'obtenir un produit partiellement sécurisé. Hélas ce procédé d'inactivation a été considéré comme inadapté dans le traitement du plasma par l'ANSM, et son utilisation a pris fin en mars 2012.

Concernant la composition de la partie plasmatique, une haute teneur en protéines plasmatiques est un élément déterminant dans la composition de la SEPP, ainsi le taux de protéines plasmatiques à 90% (soit 10% de protéines plaquettaires) pour une utilisation à 3 mg/ml reste le meilleur ratio pour l'obtention d'une SEPP permettant une production optimale de CSM. Concernant la fraction dont proviennent ces protéines plasmatiques, aucune différence n'a pu être observée entre le cryoprécipité et le surnageant, les protéines du cryoprécipité ne semblant donc pas être des acteurs importants pour l'efficacité de notre produit. Le surnageant reste plus intéressant que le cryoprécipité en termes de volume obtenu à partir d'un don de plasma, volume compatible avec des procédés de viro-inactivation tels que le traitement photochimique par amotosalen. Le surnageant paraît également intéressant pour remplacer le plasma, car il est amoindrie en fibrinogène, protéine impliquée dans le processus de formation de fibrine pouvant potentiellement apparaître dans le milieu de culture.

Aucun effet majeur sur le phénotype mésenchymateux des cellules n'a pu être mis en évidence en fonction des conditions de culture. On a pu cependant constater qu'une importante sous-population exprimant MSCA1 apparaît quand les cellules sont cultivées dans les milieux composés de protéines plaquettaires et plasmatiques humaines.

## **CONCLUSION GENERALE**

## CONCLUSION GENERALE

L'objectif principal de ce travail de thèse est la mise au point d'une solution de supplémentation de milieu de culture. Ce supplément de milieu a été élaboré dans le but de favoriser la croissance des CSM.

Pour réaliser ce projet, les travaux ont été réalisés en 3 étapes :

- La première étape fut d'étudier l'impact des modifications apportées à un PRP issu d'un CPA avant de subir une cryolyse et servir de supplément de milieu de culture. L'une de ces modifications est la déplasmatisation (totale ou partielle), où le volume de plasma, composant de base le PRP, est remplacé par une solution de conservation des plaquettes. Les résultats ont permis de déduire que la composante plasmatique est essentielle pour la prolifération cellulaire. La deuxième modification, la cryoprécipitation, n'apportait que peu d'intérêt : le surnageant, plus efficace pour supplémenter le milieu de culture que le cryoprécipité, était d'une efficacité analogue au plasma avant cryoprécipitation.
- La deuxième partie fut de mettre au point un produit formulé selon les teneurs en protéines plaquettaires et plasmatiques. L'intérêt étant d'augmenter son efficacité de supplémentation, de minimiser les volumes d'utilisation, uniformiser les lots. Ainsi fut élaborée une solution à partir d'un mélange d'extrait plaquettaire riche en protéines issus de la lyse des plaquettes sanguines et de plasma, à des proportions de 1/10 de protéines plaquettaires. Le protocole de mise au point de ces SEPP a été réalisé à la fois avec des CPA mais également des MCP.
- La troisième étude nous permis d'élaborer une stratégie de sécurisation de la SEPP pour éviter tout problème de transmission de pathogènes. La partie plasmatique fut traitée (bleu de méthylène et pasteurisation) et pour apprécier l'impact de la viro-inactivation sur le pouvoir de supplémentation de la SEPP, la pasteurisation s'étant avérée peu concluante alors que le bleu de méthylène fit l'objet d'un arrêté pour la cessation de son utilisation. En parallèle fut modifiée la partie plasmatique en la cryoprécipitant. Chaque produit de la cryoprécipitation fut utilisé en temps que

partie plasmatique. Pour compenser la faible quantité initiale de cryoprécipité, le taux de protéines plasmatiques composant le SEPP fit l'objet d'une variation dans le but de diminuer sa concentration au sein de la SEPP et donner au cryoprécipité un intérêt. Mais le fort pourcentage de la partie plasmatique dans la composition de la SEPP garantissait un meilleur pouvoir de supplémentation de la solution. C'est au final le surnageant du cryoprécipité qui a retenu notre intérêt, permettant par la même occasion de diminuer le taux de fibrinogène, facteur pouvant entraîner la gélification du milieu de culture.

## 1 Un composé riche en facteurs de croissance

La SEPP se révèle être idéale pour remplacer l'utilisation du SVF en culture *ex vivo* de CSM humaines. La forte présence de facteurs de croissance présents au sein des plaquettes (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, b-FGF, IGF-1, TGF- $\beta$ 1, VEGF) (Fekete et al., 2012; Su et al., 2009), facteurs impliqués dans le processus de cicatrisation tissulaire (Sánchez et al., 2003), est une des raisons principales sur la forte prolifération des CSM sous conditions *in vitro* et leur maintien dans un état primitif et indifférencié. L'équipe de Doucet a montré que les cellules stromales mésenchymateuses en présence de lysat plaquettaire, enrichi en ces facteurs, expriment les récepteurs de ces protéines sur leurs surfaces membranaires (PDGF-AR, PDGF-BR, TGF $\beta$ R2, IGF-R, VEGF-R) (Doucet et al., 2005), preuve d'une interaction directe entre les facteurs de croissance et les cellules.

Le fort taux en facteurs de croissance associé à leurs actions en synergie entraîne un comportement des cellules spécifique. En effet les cellules passent d'une forme fibroblastique au soma évasé sous conditions SVF à une forme très effilée. Le taux de clonogénicité reste identique en termes de nombre de CFU-F, mais les clones prolifèrent d'avantage, observation déjà démontrée dans les études de Bianco (Bianco et al., 2001) et observée sous les conditions en SEPP. N'oublions pas que des chimiokines libérées par les plaquettes telles que CCL5/RANTES et CXCL1/2/3, des interleukines telles que G-CSF, GM-CSF, IL-1 $\alpha$ , IL-7, IL-8 ou encore IFN- $\gamma$  interagissent également avec les CSM (Fekete et al., 2012). Certaines études ont montré que les CSM exprimaient les récepteurs aux CCL5/RANTES, ayant pour effet une augmentation de la migration des cellules (Ponte et al., 2007; Kroeze et al., 2009). Cependant il s'est avéré que ces facteurs ne suffisent pas pour permettre la prolifération des CSM mais restent essentiels. En effet la quantité de protéines issues de la fraction plasmatique

a montré son importance. Leur présence c'est avérée indispensable, à des concentrations supérieures aux protéines plaquettaires ; une SEPP à 10% de protéines plaquettaires se montrant être la proportion la plus aboutie pour obtenir une prolifération de CSM efficace. Mais les protéines impliquées restent à déterminer : Ont-elles une action directe sur les cellules ? Permettent-elles d'accroître l'accessibilité des facteurs plaquettaires aux cellules ? Il est envisageable que la composante plasmatique joue un rôle également dans l'apport en acides aminés (exception concernant le plasma pasteurisé, celui-ci étant dialysé) nécessaires à l'intégrité de la cellule et nécessaire à son développement.

## **2 Une solution de supplémentation pertinente pour la production de CSM à usage thérapeutique**

La SEPP évite le croisement interspèce, les conditions de culture s'approchent d'avantage des conditions thérapeutiques établies par les normes sanitaires (AFSSAPS, 2009) (EUROPEAN COMMISSION, 2011). En effet, les cellules cultivées en SVF peuvent internaliser des protéines du sérum, molécules au fort pouvoir antigénique. Une fois implantées, une réponse immunitaire peut survenir chez le receveur orientée contre les CSM et entraîner leur rejet (Spees et al., 2004; Sundin et al., 2007). Le SVF est par ailleurs un vecteur potentiel d'agents infectieux (zoonose), tels que les encéphalopathies spongiformes transmissibles (EST) dont fait partie la maladie de Creutzfeldt-Jakob et transmissible à l'Homme (Asher, 1999; Brown et al., 2001). Récemment un lot entier de sérum s'est révélé contaminé par un pestivirus bovin (Xia et al., 2011).

L'un des points forts de la SEPP est qu'il est possible d'utiliser des composants viro-atténués permettant de limiter la transmission de pathogènes. De plus les PSL sont obligatoirement qualifiés pour s'assurer qu'aucun produit ne présente un risque de transmissions virales ou d'autres pathogènes listés. Tout produit présentant les marqueurs de ces agents est obligatoirement écarté de la chaîne de transfusion et détruit. Les concentrés de plaquettes et les plasmas thérapeutiques ont un risque minimal de contamination de tout pathogènes viraux du type VIH, VHB, VHC, VHA, parvovirus B19 et autres parasites du type *treponema pallidum*. Grâce à la QBD et aux avancées technologiques de détection telles que l'amplification des acides nucléiques des éléments viraux, les risques de transmission sont devenus très faibles, estimé 1:360000 pour le VHB, 1:4,3 millions pour le VIH ou encore 1:10,88 millions pour le VHC (Hourfar et al., 2008).

Certains traitements de viro-inactivation peuvent entrer dans le processus de fabrication de la SEPP, ainsi un contrôle qualité sur chaque don de plaquettes et de plasma, associé à un traitement photochimique comme l'amotosalen permettant de traiter aussi bien les plaquettes que le plasma (kit Intercept® pour plaquettes , permettant de s'affranchir de la fenêtre sérologique du donneur ou de la présence de pathogènes non contrôlé à ce jour, fait que la SEPP est un produit de sécurité optimale. D'autres traitements de viro-inactivation pouvant être joint à la fabrication d'un lysat plaquettaire sont à l'étude comme par exemple le traitement par solvant/détergeant (Burnouf et al., 2010; Su et al., 2009). Ce procédé est dû à l'action du TnBP et du triton X-45 sur des concentrés de plaquettes d'aphérese engendrant un lysat plaquettaire, puisque ces deux produits sont délétères pour les thrombocytes. Cependant le procédé de récupération du solvant/détergent déplete le lysat de certains facteurs de croissance, à savoir le PDGF et le VEGF.

### **3 Une homogénéité des lots de SEPP**

Les concentrations des différentes protéines, particulièrement celles d'intérêt, demandent à être définies dans la SEPP. Mais la préparation de la solution a été pensée pour atténuer les variations inter-dons. La quantité de plaquettes et le volume d'extraction sont fixés pour obtenir une solution de protéines plaquettaires à la concentration pré-déterminée. Solution mélangée à une quantité de protéines plasmatiques, elle aussi pré-déterminée. Quelque soit les lots qui pourront être produits, nous pourrions garantir une qualité plus ou moins homogènes grâce au ratio fixé entre protéines plaquettaires et plasmatiques. Cette méthode nous a permis d'élargir notre éventail de matière première. Les CPA étaient jusqu'à maintenant les seuls produits exploitables, les MCP s'avérant moins efficaces particulièrement à cause de la présence de la solution de stockage qui compose les MCP comme nous avons pu le constater. Maintenant, selon notre procédé de fabrication des SEPP, ils ont un intérêt particulier d'autant qu'ils sont plus accessibles en termes d'approvisionnement.

### **4 Perspectives**

Cette étude a permis d'élaborer un complément de milieu de culture destiné à être utilisé en culture de CSM pour l'usage clinique de part sa sécurisation. Une sécurisation de tout les composants de la SEPP, plaquettes et plasma, par leurs kit Intercept® (Cerus) respectifs

permettrait d'aboutir à un produit sécurisé. Cette sécurisation permettrait d'utiliser la SEPP dès sa conception, sans attendre les délais de mise en quarantaine qui était le moyen de sécurisation du lysat plaquettaire (Fekete et al., 2012) utilisé jusqu'à ce jour. Il sera nécessaire de confirmer la viabilité des CSM après culture par une étude de leurs phénotypes membranaires, leur faculté à se différencier (Caplan, 2007), ou leurs capacités immunomodulatrices (Flemming et al., 2011; Djouad et al., 2003), et si bien sûr elles sont efficaces une fois administrées dans des modèles animaux de lésions tissulaires.

La procédure de fabrication de la SEPP doit être optimisée pour minimiser les pertes lors de l'acquisition de l'extrait plaquettaire ou encore améliorer l'étape de filtration de la solution. Bien entendu l'aspect commercial et l'aspect clinique sont deux destinées bien distinctes, mais les deux sont envisageables avec ce concept de SEPP. D'un côté on peut utiliser les concentrés de plaquettes périmés, même si leur nombre reste faible. Pour une utilisation clinique, le produit peut être fait à la demande, et après validation du produit par l'ANSM en tant que Produit Thérapeutique Annexe (PTA), une sollicitation de dérogation sera faite pour écarter les produits nécessaires à l'obtention de la SEPP de la chaîne de transfusion voire pour faire un produit totalement autologue.

## **ANNEXES**

# **BREVET**

**BREVET en cours de dépôt**

**Intitulé**

**Mise au point d'un nouveau substitut de sérum enrichi en protéines  
plaquettaires et plasmatiques pour la culture de cellules eucaryotes**

## **ARTICLE 1**



## Development of proteomic tools to study protein adsorption on a biomaterial, titanium grafted with poly(sodium styrene sulfonate)

S. Oughlis<sup>a,1</sup>, S. Lessim<sup>a,1</sup>, S. Changotade<sup>a</sup>, F. Bollotte<sup>a,b,c</sup>, F. Poirier<sup>a</sup>, G. Helary<sup>a</sup>, J.J. Lataillade<sup>b</sup>, V. Migonney<sup>a</sup>, D. Lutomski<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Université Paris 13-UMR CNRS 7244 – CSPBAT – LBPS – UFR SMBH, Bobigny, France

<sup>b</sup> Unité de Thérapie Cellulaire, Centre de Transfusion Sanguine des Armées "Jean Julliard", Clamart, Cedex, France

<sup>c</sup> EFS Nord de France, 33 avenue Charles Saint Venant, Lille, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 June 2011

Accepted 3 October 2011

Available online 11 October 2011

#### Key words:

Liquid chromatography

Biomaterial

Titanium

Proteomic

Platelets rich plasma

### ABSTRACT

It is known that protein adsorption is the initial interaction between implanted biomaterials and biological environment. Generally, a complex protein layer will be formed on material surfaces within a few minutes and the composition of this layer at the interface determines the biological response to the implanted material, and therefore the long-term compatibility of the biomaterial. Despite different techniques exist to observe protein adsorption on biomaterials, none of them led to the identification of adsorbed proteins. In this paper, we report a chromatographic technique coupled to proteomics to analyse and identify proteins from complex biological samples adsorbed on biomaterial surfaces. This approach is based on (1) elaboration of the chromatographic support containing the biomaterial (2) a chromatography step involving adsorption of proteins on the biomaterial (3) the high-resolution separation of eluted proteins by 2-DE gel and (4) the identification of proteins by mass spectrometry. Experiments were performed with proteins from platelets rich plasma (PRP) adsorbed on a biomaterial which consist in titanium bioactivated with PolyNaSS. Our results show that chromatographic approach combined to 2-DE gels and mass spectrometry provides a powerful tool for the analysis and identification of proteins adsorbed on various surfaces.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Titanium (Ti) and its alloys are commonly used in dental implants and artificial hip joints, because of their biocompatibility and biomechanical properties [1–3]. However, several years after implantation, a local host response to titanium can be occurred, leading to the fibrous isolation of the implant from the healthy bone tissue, and progressively, the loss of osseointegration [4]. Therefore, to improve bone cell attachment and proliferation, and finally osseointegration of Ti implants, numerous surface modification of titanium has been developed including chemical treatments, topographic modifications and electrochemical methods [5,6]. Recent studies in tissue engineering biomaterial development have focused on coating peptides or proteins onto biomaterials. The primary intention of these methods is to ensure the transmission of signals from extracellular environments into cells, and improve bone cell attachment, proliferation and differentiation at the Ti surface [7]. Currently, extracellular matrix (ECM)

molecules or the minimum adhesion motif on ECM molecules represented by RGD (arginine–glycine–aspartic acid) are coated on the material surface [8]. To immobilize biomolecules onto titanium surfaces, physical adsorption and covalent attachment are commonly used [9]. However, these approaches are not successful for long-term implantation because of the weak interactions involved during adsorption process, or the reduction of the bioactivity of biomolecules by the covalent immobilization method [10]. Therefore, elaboration of organic–inorganic composites or elaboration of modified Ti surfaces able to improve adsorption of proteins and protein ligands, generate a great deal of interest in the current biomaterials research.

In our laboratory, we have shown that covalent grafting of polymers such as poly(sodium styrene sulfonate) (polyNaSS) can significantly modulate the cell attachment and the cellular activity of osteoblasts compared to un-modified Ti surfaces [11–14]. These results suggest that negative ionic groups along the macromolecular chains create new active sites which can interact with extracellular proteins, such as fibronectin, implicated in cell adhesion and cell response. If polyNaSS/titanium has a higher level of protein adsorption than untreated titanium surface, pretreatment of polyNaSS/titanium with an appropriated mixture of proteins (cell-matrix proteins, cytokines and growth factors) before

\* Corresponding author. Tel.: +33 1 48 38 77 54; fax: +33 1 48 38 77 53.

E-mail address: [lutomski@smbh.univ-paris13.fr](mailto:lutomski@smbh.univ-paris13.fr) (D. Lutomski).

<sup>1</sup> Contributed equally to this work.

surgical placement of biomaterials could be a powerful strategy to improve the bioreactivity of Ti implants. Development of this strategy imply (a) to demonstrate the efficiency of the polyNaSS surface to protein adsorption, (b) to pre-treat the polyNaSS/Ti surface with various protein samples and testing them on cell response, and (c) to identify proteins adsorbed on the more responsive pre-treated polyNaSS/Ti surface. To analyse proteins adsorbed on biomaterial, different techniques such as radiolabeling [15], ellipsometry [16,17], surface plasmon resonance (SPR) sensor [18–20], enzyme immunoassaying [21], gold-colloid-labelled immunoassay combined with micro-bicinchoninic acid protein assay [22] have been used. However none of them led to the identification of adsorbed proteins. Consequently, analytical methods useful for our strategy have to be first developed and validated.

In this paper, we report a chromatography strategy coupled to proteomics to first, evaluate the protein adsorption level of biomaterials, and second, to analyse and identify proteins adsorbed on biomaterial surfaces. This method is based on the elaboration of the chromatographic support containing the biomaterial, the affinity chromatography step involving adsorption on the solid phase of proteins from the biological sample, the high-resolution separation by 2-D gel of eluted proteins, and the identification of eluted proteins by mass spectrometry. Platelets rich plasma (PRP) was used in this study because this biological product is clinically proven to enhance bone healing. Results obtained from PRP adsorbed on modified polyNaSS/Ti material show that our chromatographic approach combined to 2-D gels and mass spectrometry provides a powerful tool for the analysis and identification of proteins adsorbed on various biomaterial surfaces. This strategy could contribute to the elaboration of new biomaterials based on protein layers deposition.

## 2. Experiments

### 2.1. Materials and reagents

Except when otherwise indicated, chemicals and other reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Titanium granules were from Alfa Aesar® (purity: 99.9%; –15 mesh). Sodium styrene sulfonate NaSS, hydrogen peroxide (30 wt.%) were purchased from Fluka. Sodium styrene sulfonate was purified by recrystallization in a mixture of water/ethanol 10/90 vol.%. Carrier ampholyte mixture 5–8 was from Amersham-Bioscience (Uppsala, Sweden). Immobiline dry strips 5–8 were from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Iodoacetamide, sulfobetaines 3–10, CHAPS, thiourea, Triton X100, bovine trypsin were from Sigma (St. Louis, MO, USA). Anti-proteases were from Roche (Basel, Switzerland). DTT was from Biovalley (Marne-la-Vallée, France).

### 2.2. Samples

PRP were obtained from 10 different platelet apheresis collections performed at the “Centre de Transfusion Sanguine des Armées” (Clamart, France). All apheresis products were biologically qualified according to French legislation. The platelet number of each product was automatically measured (ADVIA 120, Bayer Pharma, Puteaux, France) and only samples containing about  $1 \times 10^9$  platelets/mL were selected and frozen at  $-80^\circ\text{C}$  to obtain a PRP containing platelet released growth factors. PRP products were then thawed, harvested and pooled to be used. Only one PRP pooled sample was used for all experiments.

### 2.3. Grafting of bioactive polymers (polyNaSS) on titanium granules

The method previously described [11,12,23] was used with minor modifications. Briefly, titanium granules were ultrasonically

cleaned in hexane, acetone and water, for 20 min each. After drying under vacuum for a few hours, they were kept under argon.

Oxidation of titanium granules was carried out initially by immersion in a solution of sulfuric acid ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) for 1 min stirring and then adding hydrogen peroxide (30% v/v). Oxidized titanium granules were washed 3 times 30 min in distilled water, immersed in a solution of sodium styrene sulfonate NaSS (15% w/v), and then heated to  $70^\circ\text{C}$  with stirring for 15 h. After polymerization, grafted titanium granule samples were cleaned 6 times 10 min in distilled water and dried under vacuum. Not grafted titanium granules used in this study were submitted to the same oxidation step.

### 2.4. Quantification of grafting

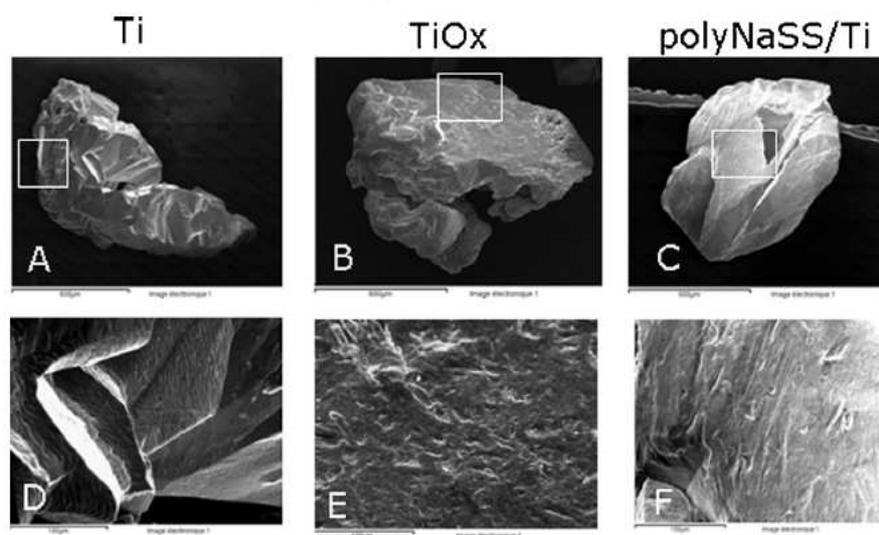
Complexation of quaternary ammonium groups of toluidine blue with sulfonate groups allows the amount of NaSS grafted to titanium samples to be determined. According to Sano et al. [24], the toluidine blue is capable of making a complex through its  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$  with the sample's carboxylate. This concept was transposed to the sodium styrene sulfonate by preparing a network of polyNaSS which was immersed in a solution of toluidine blue. After rinsing, each sulfonate group was complexed with the  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$  of the marker. Grafted samples were immersed in an aqueous solution of toluidine blue ( $5 \times 10^{-4}$  M) for 6 h at  $30^\circ\text{C}$ . Then samples were rinsed with an aqueous solution of NaOH ( $5 \times 10^{-3}$  M) in order to remove uncomplexed dye. A standard series was done with seven different concentrations between  $4 \times 10^{-6}$  and  $5 \times 10^{-5}$  M, which allows us to determine the concentration of decomplexed toluidine blue thanks to the molar extinction coefficient. Decomplexation of toluidine blue occurs by immersing titanium samples in an aqueous solution of acetic acid (50 vol.%) for 24 h. Concentration of decomplexed toluidine blue is measured by visible spectroscopy at 633 nm using a Perkin-Elmer spectrometer lambda 25.

### 2.5. Scanning electron microscopy (SEM)

Biomaterials surfaces were investigated with support of the environmental scanning electron microscope (ESEM, Hitachi S 3000N, Japan) in secondary electron (SE) mode. The microscope was operated at 12–25 kV under a  $10\text{E}4\text{--}10\text{E}5$  Torr vacuum. The working distance (WD) between the microscope sensor and the samples ranged between 8.7 and 11.2 mm. The observations were performed at  $400\times$  magnifications.

### 2.6. Affinity chromatography

Affinity chromatography was performed using an Akta Purifier system (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Two mL of the titanium granules (133 g) grafted or not with polyNaSS were packed into Tricorn columns (Tricorn 5/50 GE Healthcare), and equilibrated with Phosphate Buffer Saline (PBS pH 7.4). Platelet Rich Plasma (PRP) sample was diluted with PBS to obtain a final protein concentration of 5 mg/mL before to be passed through the column (1 mL). The flow rate was set at 0.3 mL/min and the UV absorbance of the mobile phase was monitored at 280 nm. The column was then washed with PBS for an additional until baseline return. The adsorbed proteins were eluted with PBS containing 3 M NaCl and the corresponding fraction was recovered. Multiple affinity chromatographies were performed with the same PRP sample to purify enough proteins for 2D-gel electrophoresis experiments. The collected fractions were pooled, dialyzed against TBS 30 mM, then concentrated using Centricon (SE 10 kDa). The protein concentration was determined with the commercial Bradford reagent (Bio-Rad) and BSA as the protein standard [25].



**Fig. 1.** Scanning Electronic Microscopy (SEM) images. (A) pure titanium granules: Ti, (B) oxidized titanium granules: TiOx, (C) grafted titanium granules: polyNaSS/Ti, (D, E and F) enlargements of SEM images corresponding to Ti, polyNaSS/Ti and TiOx respectively.

### 2.7. Two-dimensional gel electrophoresis

All the manipulations were performed under a laminar flow hood, wearing gloves and mask, to prevent sample contamination. Isoelectric focusing (IEF) was done using the IEFCell (Bio-Rad) and linear 18 cm IPG strips pH 5–8. Protein extracts (150 µg) were solubilised in a dry strip rehydration buffer for IPG strips (7 M urea, 2 M thiourea, 0.33% (w/v) CHAPS, 0.35% (v/v) Triton X100, 0.35% (w/v) SB 3–10, 10% (v/v) isopropanol, 12.5% (v/v) isobutanol, 0.6% (v/v) of a mixture of ampholytes 5–8, 100 mM DTT, a trace of bromophenol blue), to obtain a final volume of 350 µL. The entire sample was applied in-gel for the welling of dry IPG strips for 9 h at 19 °C. Then, damp electrode pads were positioned under the rehydrated strip over the electrode at the anodic and cathodic ends. An in-gel incorporation step at low voltage (50 V for 8 h) was introduced. Focusing was carried out for a total of 80,000 V h. Prior to second dimension separation, the IPG strip were equilibrated for 15 min under gentle shaking in 50 mM Tris–HCl, pH 8.8, containing 6 M urea, 1% (w/v) SDS, 65 mM DTT, 30% (v/v) glycerol. Strips were then re-equilibrated for 20 min in the same buffer containing 53 mM iodoacetamide instead of DTT. SDS–PAGE separation was performed using a Protean Dodeca Cell (BioRad) electrophoresis apparatus, using homemade vertical SDS gradient slab gels (8–18.5%T; 200 mm × 200 mm × 1 mm). Electrophoresis was conducted at 40 V for 1 h, and then was continued at 100 V for 18 h. Polypeptides were in-gel fixed in 40% v/v ethanol, 5% v/v acetic acid for 1 h, and stained with silver nitrate (ProteoSilver™ Plus, Sigma). Stained gels were digitized using a GS-700 densitometer (Bio-Rad, Hercules, USA). The acquired images were analysed with the Image Master 2D Platinum image analysis software (Amersham Biosciences).

### 2.8. Image analysis

Qualitative image analysis was performed using Image Master 2D Platinum (Amersham Biosciences). Differential analysis was performed between the 2-DE gels corresponding to the PRP

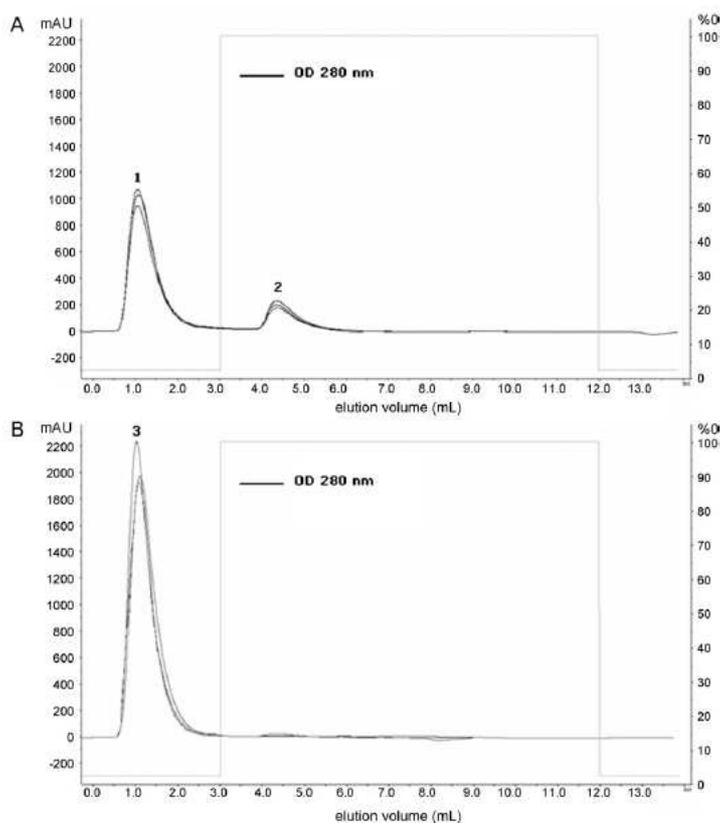
proteins purified by polyNaSS/Ti chromatography. Two classes of gels were defined, namely class A for the eluted fraction and class B for the flowthroughed fraction. Pairs of spots were automatically created by matching 2-DE gels. Two categories of spots were considered (a) spots present only in the eluted fraction and (b) spots present only in the flowthroughed fraction.

### 2.9. Mass spectrometry analyses

Spots to be identified were excised from 2-DE gels and digested in-gel with trypsin using the automated Proteomeer SPII (Bruker Daltonik) and Ettan Digester (Amersham Biosciences) robots, following the protocols of the manufacturers. NanoLC–MS/MS analysis of the tryptic peptides was performed using an Agilent 1100 Series capillary LC system (Agilent Technologies) coupled to an Agilent 1100 Series LC/MSD Ion Trap (Agilent Technologies) equipped with the nanospray Chip Cube ion source (Agilent Technologies). The peptide mass profiles obtained by nanoLC–MS/MS were analysed using DataAnalysis software (Agilent Technologies) and were submitted to the SWISS-Prot database (<http://www.expasy.proteome.org>) using MASCOT software (Matrix Science). The search parameters used were as follows: carbamidomethylation for cysteine residues; oxidation for methionine residues; tolerance on mass measurements of 100 ppm in MS mode and 0.5 Da in MS/MS mode; 1 enzymatic missed cleavage maximum was allowed; and trypsin was used as a digestion compound. The species of origin was restricted to the human. To validate the identifications, three peptides with high-quality MS/MS spectra (MASCOT ion score >25) were required.

### 3. Results/discussion

To evaluate chromatography coupled to 2-DE approach to analyse and identify proteins adsorbed on biomaterials, the strategy was first applied to a Platelet Rich Plasma (PRP) sample adsorbed on the polyNaSS titanium surface. Platelet-rich plasma is a blood-derived fraction that contains a high concentration of platelets and



**Fig. 2.** Affinity chromatography profiles. Separation of PRP proteins on NaSS/Ti column (A) or TiOx column (B) equilibrated with PBS pH 7.4 at a flow rate of 0.3 mL/min. PRP proteins (5 mg) were loaded to the column, and adsorbed proteins were eluted with PBS containing 3 M NaCl. UV absorbance was measured at 280 nm. Peaks are assigned as followed: 1, 3, flowthrough, and 2, eluate. Multiple chromatographies were performed. Protein fractions 1 and 2 were collected.

growth factors able to modulate cell adhesion, cell migration, and differentiation [26,27].

First, two chromatographic supports containing polyNaSS titanium or pure titanium were constructed to evaluate protein adsorption level of the polyNaSS titanium surface. After chromatography, PRP proteins were eluted from the columns and analysed by 2-DE gel. Spots of interest were then excised from the 2-DE gel and polypeptides were in-gel digested by trypsin. Corresponding proteins were finally identified by nanoLC-MS/MS. NanoLC-MS/MS was chosen instead of the MALDI MS because it is a very powerful instrument to identify the different proteins that a 2-DE gel spot may contain.

### 3.1. Elaboration of chromatographic supports

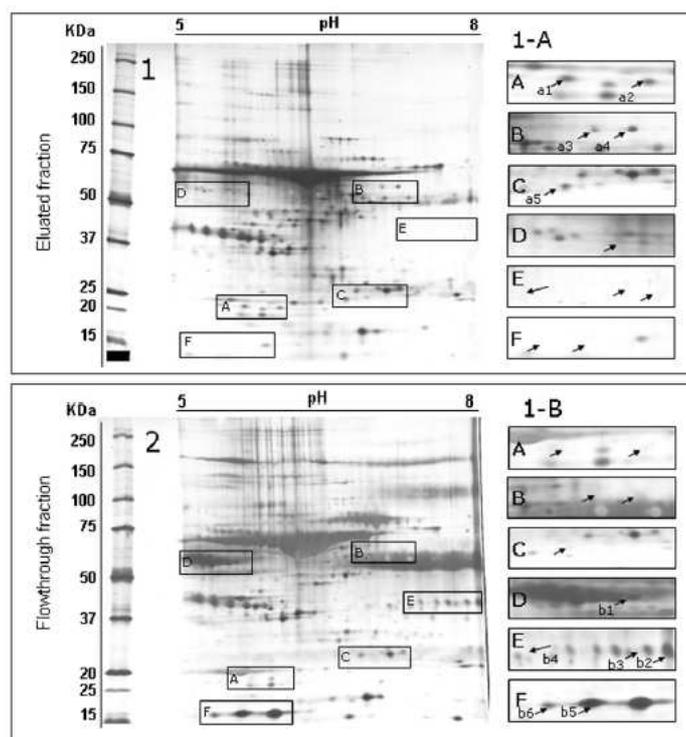
To increase the surface of contact between the titanium and PRP proteins, the approach consists in using granules instead of plane surface generally used in biomaterial studies. For this reason, chromatography based on columns packed with titanium granules is the method of choice for the protein adsorption. The contact area between titanium granules (15 mesh) and the PRP sample was

calculated according to the column volume (2 mL) and manufacturer's data. It corresponds to 100 cm<sup>2</sup> (50 cm<sup>2</sup> per cm<sup>3</sup> of titanium).

Sulfonate groups were covalently attached to the titanium granule surface by radical polymerization of sodium styrene sulfonate initiated by radicals issued from titanium peroxide as described in Section 2. Amounts of grafted polymers were measured by colorimetric method, and were considered as the yield of grafting reaction. This procedure allows 79.1 ( $\pm 8.1$ )  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  of grafted polymer to be obtained. Crude titanium samples and titanium oxidized samples were used as control. No coloration was observed with control samples, confirming that coloration is only due to the decomplexation of the dye from monomer units of the bioactive polymer (data not shown).

PolyNaSS titanium granules were compared to unmodified and oxidized Ti surfaces by scanning electron microscopy (SEM). The analysis of SEM images shows that Ti granules have similar size, whatever the type of granule observed (Fig. 1A–C) indicating that chemical reactions occurring during the oxidation step and the grafting procedure do not break titanium granules.

Previous works have demonstrated that oxidation step increase roughness of titanium during the grafting procedure [28]. Because



**Fig. 3.** 2-DE profiles of PRP proteins adsorbed on polyNaSS/Ti chromatography. Proteins were separated on a linear pH 5–8 IPG strip, followed by a 8–18.5% SDS-polyacrylamide gel, as stated in Section 2.7. Proteins were stained with silver nitrate. (1-A) 2-DE map of the eluted fraction. (1-B) 2-DE map of the flowthrough fraction. A–F windows correspond to interesting areas with polypeptides interacting or not with the bioactivated biomaterial. Spots are indicated by labelled arrows for 1bis (polypeptides present only in gel 1, and 2bis) for polypeptides present only in gel 2. The spots were excised and analysed by nanoLC–MS/MS. Protein names are listed in Table 1.

it is known that roughness of Ti surfaces tends to increase protein adsorption [29], evaluation of the protein adsorption level of the polyNaSS/Ti compared to untreated surfaces could be seriously affected if non-oxidized Ti is used as control. Therefore, control titanium granules used in this study were submitted to the same oxidation step.

### 3.2. Protein adsorption on the polyNaSS/Ti surface

The protein adsorption level of the polyNaSS/titanium surface was evaluated by chromatography using two columns packed respectively with polyNaSS/titanium granules and TiOx granules. One millilitre of PRP sample (5 mg/mL) was loaded to the columns as described in Section 2. Chromatogram profiles obtained by affinity purification are shown Fig. 2.

With the polyNaSS/Ti phase (Fig. 2A), two peaks, 1 and 2, were observed corresponding to the flowthrough and the eluate, respectively. According to the total peak area (peak 1+2), proteins adsorbed to the polyNaSS/Ti surface (peak 2) corresponds to 24% of the total PRP sample loaded to the column. With the TiOx phase (Fig. 2B), only one peak (peak 3) corresponding to the flowthrough was observed, and no UV signal was detected for the eluted fraction suggesting a very low adsorption of PRP proteins on the TiOx surface. Chromatographic results demonstrate that

polyNaSS/Ti surface has a higher level of protein adsorption than ungrafted titanium.

### 3.3. 2-DE gel analysis

The strategy applied in this study makes use of proteomic technologies to reveal and identify proteins adsorbed on the polyNaSS/Ti surface. In this way, protein fractions (flowthrough and eluate) from four distinct polyNaSS/Ti chromatographies were collected and subjected to 2-DE experiments. Because the chromatographic process dilutes the proteins samples, direct proteomic analysis by 2-DE was not possible. To reach a concentration suitable for 2-DE, protein fractions (6 mL per fraction) were dialyzed and concentrated.

Qualitative image analysis was performed on a set of two gels for the eluted fraction (EF gels) and two gels for the flowthrough fraction (FF gels). Fig. 3 shows a representative 2-DE image obtained for each protein fraction. A mean of 221 spots  $\pm$  26 and 283  $\pm$  20 were detected on EF gels and FF gels, respectively. A large amount of spots is present in both EF and FF fractions indicating that a majority of PRP proteins show an affinity for the polyNaSS/Ti surface. Two other categories of spots were considered (a) spots present only in the eluted fraction and (b) spots present only in the flowthrough fraction. Proteomic study evidenced that polyNaSS/Ti surface

**Table 1**  
Spots obtained by 2D-electrophoresis were subjected to tryptic digestion and identified by nanoLC-MS/MS analysis. A–F zones correspond to areas on 2D electrophoresis maps.

Sample type	Zone	Spot label	Protein identification	Theoretical Mr/pI	SwissProt accession #	Species	Mascot score	Matched peptide by MS/MS	Sequence coverage (%)	ppm (MS)	
Eluate gel	A	a1	Indeterminate								
		a2	Indeterminate								
Flowthrough gel	B	a3	Complement factor B	86847/6.67	Q9BX92	Human	67	3	3	28	
		a4	Complement factor B	86847/6.67	Q9BX92	Human	100	9	9	38	
	C	a5	Serum Albumin	71317/5.96	Q9P157	Human	82	6	7	46	
		D	b1	Alpha-1-antitrypsin	46878/5.37	Q86U18	Human	126	10	21	49
	b2			Serum albumin	71317/5.92	Q9P157	Human	107	11	16	52
				Serum paraoxonase/arylesterase 1	39877/5.08	P27169	Human	52	6	18	54
	b3			Actin cytoplasmic 1	42052/5.29	Q96HG5	Human	164	9	30	54
				Actin cytoplasmic 2	42108/5.31	P63261	Human	164	9	30	54
			Beta-actin-like protein 2	42318/5.39	Q562R1	Human	64	5	15	57	
			Serum albumin	71317/5.92	Q9P157	Human	34	5	6	52	
			Apolipoprotein A-IV	45371/5.28	P06727	Human	33	4	9	27	
	b4			Actin cytoplasmic 1	42052/5.29	Q96HG5	Human	211	19	37	56
				Actin cytoplasmic 2	42108/5.31	P63261	Human	211	19	37	56
				Putative beta-actin-like protein 3	42331/5.91	Q98YX7	Human	93	4	12	41
			Beta-actin-like protein 2	42318/5.39	Q562R1	Human	70	10	16	45	
		Apolipoprotein A-IV	45371/5.28	P06727	Human	29	3	7	36		
		Ig gamma-2 chain c region	36505/7.66	P01859	Human	38	3	10	42		
E	b5	Indeterminate									
	b6	Indeterminate									
	b7	Indeterminate									
	b8		Ig gamma-1 chain c region	36596/8.46	P01857	Human	50	3	8	73	
			Ig gamma-3 chain c region	42287/8.23	P01860	Human	50	3	8	73	
	b9		Ig gamma-1 chain c region	36596/8.46	P01857	Human	54	3	8	62	
			Ig gamma-3 chain c region	42287/8.23	P01860	Human	35	3	4	64	
	b10		Ig gamma-1 chain c region	36596/8.46	P01857	Human	54	3	8	62	
			Ig gamma-3 chain c region	42287/8.23	P01860	Human	89	8	12	51	
	b11		Ig gamma-1 chain c region	36596/8.46	P01857	Human	99	8	16	58	
		Ig gamma-3 chain c region	42287/8.23	P01860	Human	89	8	12	51		
F	b12	Transthyretin	15991/5.52	P02766	Human	111	6	48	31		
	b13	Transthyretin	15991/5.52	P02766	Human	123	4	18	58		

modulated the adsorption of 19 polypeptides (Table 1). Among them, 5 polypeptides appeared to be completely adsorbed on the polyNaSS/Ti surface (spots a1–a5), while 14 showed an absence of affinity for the same support (spots b1–b14). Spots of interest indicated in Fig. 3 by arrows were subjected to tryptic digestion and nanoLC-MS/MS analysis. In this way 29 spots were unambiguously identified (Table 1). The presence of variants appeared on the gel as multiple spots can be related to post translational modifications, truncations or to differences in genomic sequence. Interestingly, the adsorption of proteins on the polyNaSS/Ti biomaterial is independent of their molar concentration: 10 spots corresponding to high abundance plasma proteins (15–130  $\mu\text{mol/L}$ ) such as Ig G, alpha-1 antitrypsin and transthyretin show an absence of affinity for the polyNaSS/Ti surface, while 2 spots corresponding to complement factor B (2–5  $\mu\text{mol/L}$ ) appeared to be completely adsorbed on the same support [30]. These results demonstrate that our

polyNaSS/Ti surface modulates selectively the adsorption of proteins.

#### 4. Conclusion

In this work, we report a novel strategy based on chromatography technique, 2-DE gel separation and mass spectrometry for identification of proteins adsorbed on biomaterials. To evaluate the feasibility of our approach, proteins from platelets rich plasma (PRP) and columns packed with the polyNaSS/Ti biomaterial was used as a model. Results demonstrated that (1) proteins adsorbed on biomaterials can be easily purified; (2) the polyNaSS/Ti surface has a higher level of protein adsorption than un-grafted titanium, and (3) the polyNaSS/Ti surface modulate selectively the adsorption of proteins in regard to 2-DE image analysis and mass spectrometry identifications. These results clearly show that our approach

provides a powerful tool for the analysis and identification of proteins adsorbed on various biomaterials (metallic alloys and ceramic). In our laboratory, this work will provide a basis for further investigations aiming at the development of a polyNaSS/Ti surface pre-treated with an appropriated mixture of proteins to improve the bioreactivity of the implant.

#### Acknowledgments

Sophiane Oughlts is a recipient from Ministère de la Recherche. Soucounda Lessim is a recipient from DIM Stem pole. Frederic Bolotte is recipient from ANRT.

This work was supported by grants from the Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie (MENRT) and CNRS.

The skilled technical assistance of Sandy Baldet is acknowledged.

#### References

- [1] J.E. Lemons, L.C. Lucas, *J. Arthroplasty* 1 (2) (1986) 143–147.
- [2] H. Nakajima, T. Okabe, *Dent. Mater. J.* 15 (2) (1996) 77–90.
- [3] D.C. Smith, *Int. J. Prosthodont.* 6 (2) (1993) 106–117.
- [4] A.N. Cranin, M. Baroïdan, J. DeGrado, *J. Oral Implantol.* 23 (1–2) (1997) 21–24.
- [5] D. De Leonardis, A.K. Garg, G.E. Pecora, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* 14 (3) (1999) 384–391.
- [6] B. Yang, M. Uchida, H.M. Kim, X. Zhang, T. Kokubo, *Biomaterials* 25 (6) (2004) 1003–1010.
- [7] L. Bacakova, E. Filova, F. Rypacek, V. Svorcik, V. Stary, *Physiol. Res.* 53 (Suppl. 1) (2004) S35–S45.
- [8] H.C. Kroese-Deutman, J. van den Dolder, P.H. Spauwen, J.A. Jansen, *Tissue Eng* 11 (11–12) (2005) 1867–1875.
- [9] X. Liu, X. Zhao, R.K. Fu, J.P. Ho, C. Ding, P.K. Chu, *Biomaterials* 26 (31) (2005) 6143–6150.
- [10] R. Müller, J. Abke, E. Schnell, D. Scharnweber, R. Kujat, C. Englert, et al., *Biomaterials* 27 (22) (2006) 4059–4068.
- [11] G. Helary, F. Noirclere, J. Mayingi, V. Migonney, *Acta Biomater.* 5 (1) (2009) 124–133.
- [12] G. Hélarly, L. Poussard, H. Zreiqat, V. Migonney, *Biomed. Mater. Eng.* 18 (4–5) (2008) 237–239.
- [13] G. Pavon-Djavid, L.J. Gamble, M. Ciobanu, V. Gueguen, D.G. Castner, V. Migonney, *Biomacromolecules* 8 (11) (2007) 3317–3325.
- [14] J. Mayingi, G. Helary, B. Bacroix, V. Migonney, *Conference Proceedings of IEEE Engineering Medical and Biological Society*, 2007, 2007, pp. 5119–5122.
- [15] C.J. Nonckreman, P.G. Rouxhet, C.C. Dupont-Gillain, *J. Biomed. Mater. Res. A* 81 (4) (2007) 791–802.
- [16] M. Pokinski, H. Arwin, *Opt. Lett.* 32 (10) (2007) 1308–1310.
- [17] F. Hook, B. Kasemo, T. Nylander, C. Fant, K. Sott, H. Elwing, *Anal. Chem.* 73 (24) (2001) 5796–5804.
- [18] S. Choi, Y. Yang, J. Chae, *Biosens. Bioelectron.* 24 (4) (2008) 899–905.
- [19] S. Kalasin, M.M. Santore, *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 73 (2) (2009) 229–236.
- [20] K. Yoshimoto, M. Nozawa, S. Matsumoto, T. Echigo, S. Nemoto, T. Hatta, et al., *Langmuir* 25 (20) (2009) 12243–12249.
- [21] A. Higuchi, K. Sugiyama, B.O. Yoon, M. Sakurai, M. Hara, M. Sumita, et al., *Biomaterials* 24 (19) (2003) 3235–3245.
- [22] H. Kawakami, M. Kanno, S. Nagaoka, S. Kubota, *J. Biomed. Mater. Res. A* 67 (4) (2003) 1393–1400.
- [23] J. Zhou, M. Ciobanu, G. Pavon-Djavid, V. Gueguen, V. Migonney, *Conference Proceedings of IEEE Engineering Medical and Biological Society*, 2007, 2007, pp. 5115–5118.
- [24] S. Sano, K. Kato, Y. Ikada, *Biomaterials* 14 (11) (1993) 817–822.
- [25] M.M. Bradford, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [26] M. Caceres, R. Hidalgo, A. Sanz, J. Martinez, P. Riera, P.C. Smith, *J. Periodontol.* 79 (4) (2008) 714–720.
- [27] C. Doucet, I. Ernou, Y. Zhang, J.R. Liense, L. Begot, X. Holy, et al., *J. Cell. Physiol.* 205 (2) (2005) 228–236.
- [28] A. Michiardi, G. Hélarly, P.C. Nguyen, L.J. Gamble, F. Anagnostou, D.G. Castner, et al., *Acta Biomater.* 6 (2) (2010) 667–675.
- [29] M.E. Nagassa, A.E. Daw, W.G. Rowe, A. Carley, D.W. Thomas, R. Moseley, *Clin. Oral Implants Res.* 19 (12) (2008) 1317–1326.
- [30] G.L. Hortin, D. Sviridov, N.L. Anderson, *Clin. Chem.* 54 (10) (2008) 1608–1616.

## **ARTICLE 2**



## The osteogenic differentiation improvement of human mesenchymal stem cells on titanium grafted with polyNaSS bioactive polymer

S. Oughlis,<sup>1</sup> S. Lessim,<sup>1</sup> S. Changotade,<sup>1</sup> F. Poirier,<sup>1</sup> F. Bollotte,<sup>1,2,3</sup> J. Peltzer,<sup>1,2</sup>  
H. Felgueiras,<sup>1</sup> V. Migonney,<sup>1</sup> J. J. Lataillade,<sup>2</sup> D. Lutomski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, UMR CNRS 7244, CSPBAT-LBPS, UFR SMBH, Bobigny, France

<sup>2</sup>Unité de Thérapie Cellulaire, Center de Transfusion Sanguine des Armées "Jean Julliard," Clamart Cedex, France

<sup>3</sup>EFS Nord de France, 95, rue Jemmapes, Lille, France

Received 24 February 2012; revised 25 May 2012; accepted 21 June 2012

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.a.34336

**Abstract:** Osseointegration of metallic implants used in orthopedic surgery requires that osteoprogenitor cells attach and adhere to the surface, then proliferate, differentiate into osteoblasts, and finally produce mineralized matrix. Because the ability of progenitor cells to attach to a scaffold surface during early stages is important in the development of new tissue structures, we developed in our laboratory, a strategy involving grafting of implants with a polymer of sodium styrene sulfonate (polyNaSS) used as a scaffold which enables human mesenchymal stem cells (hMSCs) interactions. In the present study, we investigated the cellular response of hMSCs to polyNaSS surfaces of titanium (Ti). In particular, cell proliferation, cell viability, cell differentiation, and cell spreading were eval-

uated. Results showed that cell proliferation and cell viability did not differ with any statistical significance between modified and unmodified Ti surfaces. Interestingly, culture of MSCs on polyNaSS surfaces resulted in a significant increase of cell spreading and cell differentiation compared with the other tested surfaces. These results suggest that titanium surface grafted with polyNaSS is a suitable scaffold for bone tissue engineering. © 2012 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part A*: 00A:000–000, 2012.

**Key Words:** human mesenchymal stem cells, titanium biomaterial, cell differentiation, cell proliferation

**How to cite this article:** Oughlis S, Lessim S, Changotade S, Poirier F, Bollotte F, Peltzer J, Felgueiras H, Migonney V, Lataillade JJ, Lutomski D. 2012. The osteogenic differentiation improvement of human mesenchymal stem cells on titanium grafted with polyNaSS bioactive polymer. *J Biomed Mater Res Part A* 2012;00A:000–000.

### INTRODUCTION

Human mesenchymal stem cells (hMSCs) are multipotent stem cells and represent a particularly attractive source for tissue engineering. Present in blood, bone marrow, and other tissues at low levels, they are nevertheless readily isolated and expanded. Under the control of specific cues (e.g., cytokines, growth factors, or micro-environment), hMSCs can differentiate into several mature cell types, such as adipocytes,<sup>1</sup> chondrocytes,<sup>2</sup> osteoblasts,<sup>3</sup> and myoblasts.<sup>4</sup> Known to be the first cell to colonize the biomaterial surface after implantation and associated with their osteogenic differentiation capacity, MSCs have been utilized in numerous studies as a source of osteogenic cells for bone repair.<sup>5–7</sup>

Titanium and some of its alloys are widely used in dental and orthopedic surgery because of favorable mechanical and biocompatible properties. Numerous attempts have been made to improve bone prosthesis contact because biological fixation is considered to be a prerequisite for implant-supported prostheses and their long-term success. To promote the osseointegration of implants, various surface treatments have been proposed. The objective of these surface treatments is to

prolong the life span of an implant, or shorten the recovery time of a patient to reduce the need for revision surgery. Many studies have been devoted to increasing the osseointegration by modifying surface properties (surface roughness,<sup>8</sup> surface charges,<sup>9</sup> hydroxylapatite coatings,<sup>10</sup> and surface immobilization of biochemical molecules [e.g., bone morphogenetic proteins, adhesion sequences like "arginine-glycine-aspartic acid" (RGD), collagen,<sup>11–16</sup>). The main difficulty is to ensure the stability of biomolecules binding to the surface of the implant and its accessibility to active sites or receptors of cells.

Early approaches to surface modification focused on adsorbing bioactive molecules at the implantation site of the prosthesis (fibronectine, RGD sequence).<sup>17–19</sup> The main disadvantages of these techniques were the need for a large quantities of products as well as the inability to control the orientation of active sites for a physiological response more quickly and accurately to the bone implant interface. The covalent attachment of biomolecules to the titanium surface resolves these problems but requires the use of different chemical reactions that could affect biomolecules or biocompatibility of the material.

**Correspondence to:** D. Lutomski; e-mail: lutomski@smbh.univ-paris13.fr

Contract grant sponsors: Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie (MENRT); ANR Actisurf; CNRS

In a previous study, we showed that polymers bearing appropriate chemical functions can modulate the cell attachment, the spread onto these bioactive polymers as well as the cell activity.<sup>20-22</sup> The distribution of these ionic groups along the macromolecular chains leads to affinity properties toward proteins implicated in cell response.

Preliminary results were obtained with cell lines (MG63) and MC3T3<sup>22</sup> but the behavior of cell hMSC on polyNaSS surfaces has not been investigated. Because of the fact that hMSC are promising cells for bone replacement and can differentiate toward osteoblasts depending on their environment, we studied the behavior of those cells with a biomaterial scaffold corresponding with polyNaSS titanium. The aim of this study was to analyze the effects of Ti surfaces on adhesion, proliferation, viability and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in contact with polyNaSS titanium (Ti) compared to crude and oxidized titanium used as control.

With respect to cell spreading analysis, alkaline phosphate activity measurements and calcium/phosphate titration, polyNaSS/Ti surface improve cell-adhesion and osteoblastic differentiation of hMSCs. Moreover, no negative effects were measured on cell proliferation and cell viability of hMSCs.

Considering these results, preculture of hMSCs on polyNaSS/Ti before surgical placement of implants, could be a powerful strategy to improve Ti cell attachment and proliferation, and finally osseointegration.

## MATERIALS AND METHODS

### Materials

Titanium (Ti) foil from Alfa Aesar (purity: 99.7%; 0.5 mm in thickness) was cut into squares of 1 cm<sup>2</sup> in size. Sodium styrene sulfonate (NaSS), hydrogen peroxide (30 wt %) were purchased from Fluka. Sodium styrene sulfonate was purified by recrystallization in a mixture of ethanol 90%.

### Grafting of polyNaSS on titanium

PolyNaSS was grafted on titanium according to Helary et al., 2009, with modification.<sup>22</sup> Titanium plates were ultrasonically cleaned in the following solvents: hexane, acetone and water, for 15-min each. Titanium plates were ultrasonically cleaned in the following solvents: hexane, acetone and water, for 15 min each. After drying under vacuum for a few hours, Ti<sub>grafted</sub> and Ti<sub>oxidized</sub> plates were kept under argon. Oxidation was performed by immersion in sulfuric acid for 1min before addition of an identical volume of hydrogen peroxide solution. Then Ti plates were rinsed extensively with water. After drying, only Ti<sub>oxidized</sub> plates were immersed in an aqueous solution containing NaSS monomer units at a concentration of 0.7M. The solution was heated at a temperature of 70°C for 15 h. Ti plates were rinsed three times under gentle shaking with water to remove nonreacted monomers.

### Grafting control

Complexation of quaternary ammonium groups of toluidine blue with sulfonate groups allows the amount of NaSS grafted to titanium plates to be determined. According to Ikada et al.,<sup>23</sup> toluidine blue staining makes a complex

through its N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> with the sample's carboxylate. This concept was transposed to the sodium styrene sulfonate by preparing a network of polyNaSS immersed in a solution of toluidine blue. Grafted Ti plates were immersed in toluidine blue solution (5 × 10<sup>-4</sup>M) for 6 h at 30°C and rinsed with an aqueous solution of NaOH (5 × 10<sup>-3</sup>M) to remove uncomplexed dye. A standard series was done with seven different concentrations between 4 × 10<sup>-6</sup> and 5 × 10<sup>-5</sup> M, to determine the concentration of decomplexed toluidine blue thanks to the molar extinction coefficient. Decomplexation of toluidine blue occurs by immersing titanium plates in an aqueous solution of acetic acid (50%) for 24 h. Concentration of decomplexed toluidine blue is measured by visible spectroscopy at 633 nm using a Perkin-Elmer spectrometer lambda 25.

Fourier-transformed infrared (FTIR) spectra, recorded in an attenuated total reflection (ATR), were obtained using a Thermo Nicolet Avatar 370 Spectrometer. Spectra were obtained with a 4 cm<sup>-1</sup> resolution using a 45° Ge crystal. Ti plates were pressed against the crystal using a smart Omni sampler. Data presented are averaged from 128 spectra.

### Cell culture on titanium

Prior to cell culture, all Ti plates were washed with 1.5M NaCl, 0.15M NaCl, pure water and phosphate-buffered saline (PBS), three times each, and sterilized by ultraviolet (UV) irradiation under a germicide 30 W UV lamp applied for 15 min on each titanium face, which is not enough to degrade the polymeric coating.

Human mesenchymal stem cells (hMSCs) used in the present study were obtained by plastic adhesion from bone marrow samples collected from hematologically normal patients undergoing routine total hip replacement surgery. All samples were obtained, after informed consent, from donors of the "Department of Orthopedic surgery, Hôpital d'Instruction des Armées Percy" (Clamart, France). The cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) containing 10% fetal bovine serum (FCS, PAN-Biotech GmbH) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco) at 37°C in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub>. The media were exchanged every 3 days. Only early passage cells were used for these experiments. A total of 10<sup>5</sup> cells mL<sup>-1</sup> (spreading analysis) or 2 × 10<sup>5</sup> cells mL<sup>-1</sup> (viability, proliferation, and differentiation analysis) was added to titanium plates (Ti<sub>ungrafted</sub>, Ti<sub>grafted</sub>, or Ti<sub>oxidized</sub>) and placed on the bottom of a 24-well plate (Costar). Three plates per group were used and the experiments were reproduced at least three. Cells were cultured at 37°C under a humidified atmosphere in a 5% CO<sub>2</sub> incubator for different periods of time, according to the study underway.

For mineralization experiments, at 7 days of culture, the medium was exchanged by FCS medium supplemented with 0.1 μM dexamethasone, 0.05 mM L-ascorbic acid-2-phosphate, and 10 mM β-glycerophosphate (osteogenic media).

### Cell proliferation and cell viability

After 1, 4, 7, 10, 14, 21, and 28 days on titanium plates, supernatant cell culture medium was collected. The adherent

cells from Ti supports were enzymatically detached in one stage using 1 mM EDTA, 1.3 mg mL<sup>-1</sup> collagenase, and 0.25% trypsin solution (Gibco, Invitrogen). The total number of cells per sample, and the percentage of viable and nonviable cells were determined following Trypan blue staining using a handheld automated cell counter (Scepter™, Millipore). Supernatant cell culture medium was centrifuged at 500 g and non-adherent cells were counted using a Malassez counting chamber. The data was averaged with the standard error to the mean.

#### Cell spreading

After 2 h of culture in Ti plates, the cell culture medium was removed and the cells were rinsed three times with PBS, and fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma) for 45 min at 4°C. Fixed cells were rinsed two times with PBS/BSA 0.04% (Sigma) and were first permeabilized with 0.5% Triton X-100 (Sigma) in PBS at 4°C for 15 min. To reduce non-specific background, cells were incubated with PBS/BSA 3% (Sigma) for 30 min at room temperature and rinsed three times with PBS/BSA 0.04%. Cells were then incubated for 4 h in the dark with rhodamine-phalloidin-547H FluorProbes (Interchim) at a dilution of 1:40 in PBS. Finally, cells were washed twice with PBS and deionized water.

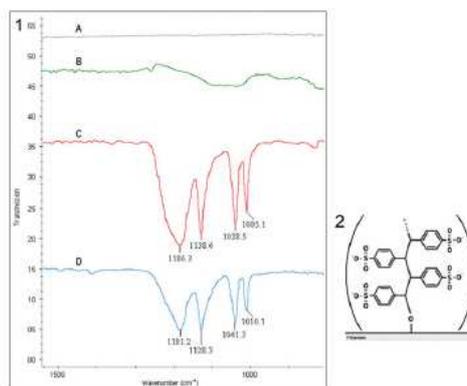
After staining, fluorescent images observed under a fluorescence microscope (Axioplan, Zeiss, Germany) were taken with a digital camera (Olympus Camedia C-5050). The cell areas were calculated with Scion imager software (Scion Corporation, USA) according to manufacturer guidelines. Moreover, based on the measurement of area and perimeter of each cell on the titanium surface, cell shape measurements are expressed as the form factor (FF),  $4\pi(\text{area})/(\text{perimeter})^2$ , which gives a value of 1 for a perfectly circular perimeter and decreasingly smaller positive values for less circular perimeters.<sup>24</sup>

#### Alkaline phosphatase activity quantification

ALP activity was evaluated (repeatedly after 7, 14, 21, and 28 days of culture) in accordance with the transformation of *p*-nitrophenylphosphate into *p*-nitrophenol at 37°C and pH 10.2. The enzyme was isolated from the cell membrane by reaction with cold Triton X-100 for 1 h under shaking. Then, 50 µL of the supernatant were added to 50 µL of *p*-nitrophenylphosphate substrate in 2-amino-2-methyl-1-propanol buffer (20 mM, pH 10.2). After incubation at 37°C, the *p*-nitrophenol produced was measured by absorbance measurements at 405 nm. Enzymatic activity (nmol of *p*-nitrophenol produced per min), was standardized to the mass of protein (mg). Protein content was measured using a commercially available colorimetric assay (DC protein Assays, Biorad). Thus, enzymatic activity is expressed in nmol of *p*-nitrophenol produced per min per mg of protein.

#### Calcium and phosphate levels measurement

After 7, 14, 21, and 28 days of culture of hMSC in Ti plates, culture media were removed and 400 µL of trichloroacetic acid (15% w/v) were added on plates to dissolve calcium-phosphate crystals.



**FIGURE 1.** Control of the grafting. FTIR/ATR spectra of (1-A) ungrafted titanium, (1-B) oxidized titanium, (1-C) polyNaSS grafted titanium, (1-D) monomer of NaSS. PolyNaSS is characterized by a peak at 1039 cm<sup>-1</sup> of sulfonic group and a peak at 1009 cm<sup>-1</sup> from aromatic ring. Molecular structure of grafted polyNaSS (2). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

After 60 min of continuous gentle shaking, 10 µL of the supernatant was added to 1 mL of arsenazo-III (Sigma) containing calcium reagent to measure the concentration calcium. The absorbance of the resulting samples was measured at 650 nm and compared to a linear standard curve of CaCl<sub>2</sub> from 50 to 1000 µg mL<sup>-1</sup> in trichloroacetic acid (15% w/v).

After 48 h under gentle shaking, 100 µL of solution sample was added to 800 µL of AAM solution (acetone-acid-molybdate) containing phosphate reagent supplemented with 80 µL of citric acid (1M) on order to measure phosphate concentration. The absorbance of the resulting samples was measured at 355 nm and compared to a linear standard curve of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> from 10 to 200 µg mL<sup>-1</sup> in trichloroacetic acid (15% w/v).

#### Statistical analysis

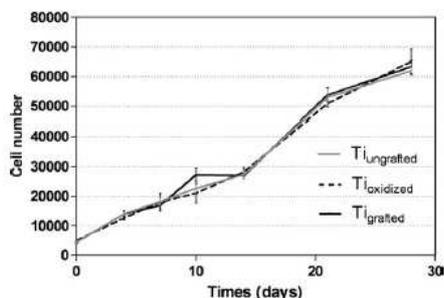
For cell viability, cell proliferation, and osteoblastic differentiation assays, three titanium plates for each type of surface modification (ungrafted, oxidized and grafted) are used and two assays are performed by plates. In addition, each experiment was repeated three times independently. Thus, for each assays, the number of titanium samples for each type of surface (n) is 9.

The data was averaged with the standard error to the mean. Statistical analysis was performed using ANOVA, followed by the *post hoc* test of Bonferroni (GraphPad Prism 5.00 software) and considered significant for  $p < 0.05$ .

## RESULTS AND DISCUSSION

### Elaboration of Ti supports

Sulfonate groups were covalently attached to the titanium surface by radical polymerization of sodium styrene



**FIGURE 2.** Cell proliferation. Results of the proliferation assay of hMSCs in contact to different titanium plates (ungrafted, oxidized, and grafted) after 0, 4, 7, 10, 14, 21, and 28 days of culture.

sulfonate initiated by radicals issued from titanium peroxide as described in materials and methods. FTIR/ATR spectra of grafted titanium Ti<sub>grafted</sub> surfaces show the presence of two bands characteristic of the sulfonate groups at 1009 and 1039  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. 1). To characterize grafted titanium surfaces, the spectrum FTIR/ATR was completed by measuring the amount of graft polymers by the colorimetric method as described in Materials and Methods. The average density of grafting was measured at  $52 \pm 8.3 \mu\text{g cm}^{-2}$  for grafted titanium surfaces.

Crude titanium plates and titanium oxidized plates were used as control. No coloration was observed with those control samples, confirming that coloration is only due to the decomplexation of the dye from monomer units of the bioactive polymer (data not shown). The improvement of grafting compared to previous works<sup>22</sup> could be explained by a better accessibility of the polymerization reaction on titanium surfaces using a lower number of Ti plates in the closed sample vial.

#### Cell proliferation and cell viability

The number of cells was determined on the ungrafted, oxidized, and grafted titanium from 0 to 28 days of culture (Fig. 2). Around two hundred nonadherent cells were counted in each supernatant culture media indicating that a large majority of hMSCs adhere on the Ti surfaces (data not shown). After 28 days of culture, the number of hMSCs increased around 12-fold compared to day 0. No statistical difference in cell proliferation between Ti surfaces was observed during the trial, indicating that modified Ti surfaces have no effect on the cell proliferation of hMSCs.

The cell viability was determined by Trypan blue staining for 7, 14, and 28 days of culture (Fig. 3). During the entire trial, >90% of cell viability was measured whatever the surface used. These results indicate that modified Ti surfaces not affect the cell viability of hMSCs.

#### Cell spreading

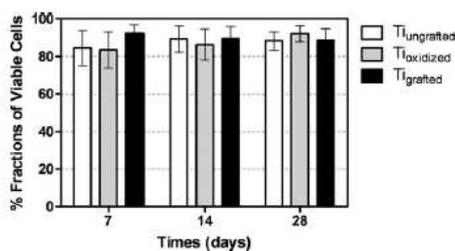
Cell spreading analyses were performed by fluorescent microscopy using phalloidin-rhodamine as a marker of the

filamentous actin structures for a general observation of the cytoskeletal. Human mesenchymal stem cells were cultivated on grafted Ti, oxidized Ti and ungrafted Ti surfaces during 2 h and submitted to a phalloidin-rhodamine staining [Fig. 4(A)].

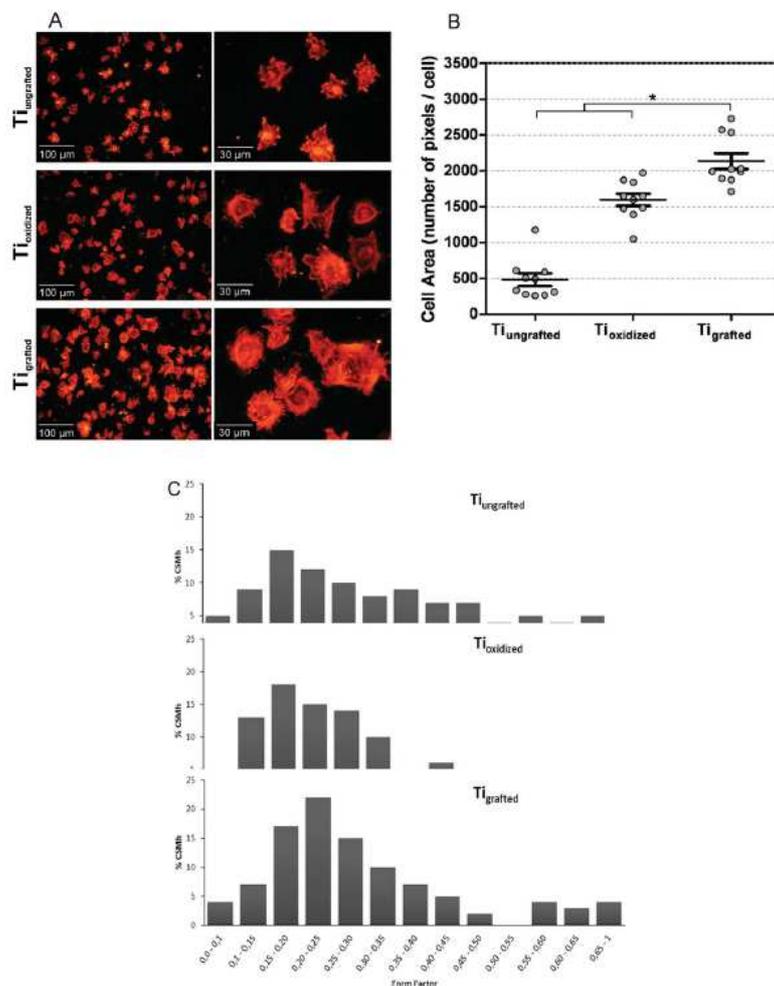
After 2 h of culture, fluorescence images show a significant change of the hMSCs spreading between Ti surfaces. The polyNaSS Ti surface seems to improve significantly hMSCs spreading in comparison with the others. To complete the visual analysis, a dimensional investigation based on the hMSCs size was also conducted. Each cell present in the captured fluorescence images was analyzed individually using Scion imager software. A group of 10 cells were defined on the grafted Ti, the oxidized Ti and the ungrafted Ti fluorescence image. The shape of the cells was delineated and the area analyzed resulting in a graphic representation reporting the average area of the cells after 2 h of contact with the biomaterial surface [Fig. 4(B)]. Results shown that after 2 h of culture, hMSCs started to expand above the polyNaSS surface exhibiting a distinctly larger cell spreading area ( $2133 \pm 286$  pixels/cell) than on oxidized ( $1595 \pm 198$  pixels/cell) and ungrafted ( $481 \pm 192$  pixels/cell) Ti surfaces. We notice that cell spreading area increased around three-fold on oxidized titanium compared to untreated surface suggesting that topographic modifications occurring during the oxidation step<sup>25</sup> improve cell spreading. Interestingly, cell spreading area on grafted titanium surface increase of >30% compared to the oxidized one. These results demonstrate the efficiency of the polyNaSS to improve hMSCs spreading and consequently, cell-adhesion.

Results clearly demonstrate an effect of the titanium surface modification on the form factor of hMSCs population. Indeed, when comparing the cellular distribution of the form factor between different titanium surfaces, a distribution shift of the FF values >0.4, from 0.15 to 0.25 was observed with Ti-polyNaSS surfaces. This result indicates that polyNaSS/Ti surface induces mostly less rounded cell shape compared with other titanium surfaces.

Difference in cell spreading for polyNaSS grafted titanium, may be attributed to its surface properties including topographic and chemical modifications. The major topographic modifications of the PolyNaSS/Ti plate occur during the oxidation step resulting in the improvement of the



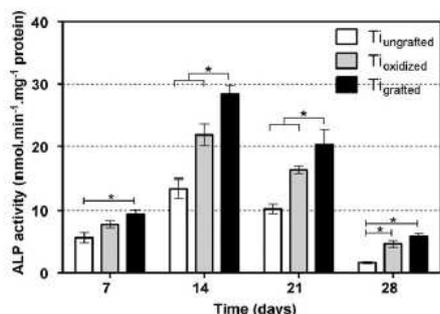
**FIGURE 3.** Cell viability. Cell viability of hMSCs cultured on titanium surfaces (ungrafted, oxidized and grafted) for 7, 14, and 28 days. Error bars represent means  $\pm$  SEM. (\*Statistically significant,  $p < 0.05$ ).



**FIGURE 4.** Cell spreading. Representative fluorescence images (A) of hMSCs adhered to different titanium plates (ungrafted, oxidized, and grafted) after 2 h of culture. Staining of actin fibers to phalloidin was visualized by fluorescence microscopy. Cell spreading analysis (B) of hMSC areas staining after 2 h of culture. Results expressed average cell area in number of pixels/cell determined by image-calculation software. Error bars represent means + SEM. (\*Statistically significant,  $p < 0.05$ ). Form factor distribution (C) of hMSCs adhered to different titanium plates (ungrafted, oxidized and grafted) after 2 h of culture. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

surface roughness.<sup>25</sup> Because the roughness of biomaterials surface was reported to improve the cell affinity,<sup>26,27</sup> topological modifications observed after the oxidation step could contribute to increase cell spreading of hMSCs. Results in the present work are consistent with that, but also demonstrate that Ti grafted with polyNaSS significantly improve cell-adhesion. It is known that grafting of polyNaSS increase the hydrophilic character of the titanium by the presence of anionic charges along the macromolecular chains. Moreover,

it is well documented that hydrophilic/hydrophobic balance of a given surface is a major parameter affecting cellular spreading at the cell-materials interface with a positive effects of hydrophilic surfaces on cell-adhesion.<sup>28,29</sup> More recently, we have shown that polyNaSS/Ti supports modulates selectively the adsorption of proteins.<sup>30</sup> This suggests that hydrophilic properties of the polyNaSS could improve cell-adhesion of hMSCs via interactions with extracellular proteins such as fibronectin implicated in this process.



**FIGURE 5.** Alkaline phosphatase activity quantification. Alkaline phosphatase activity of hMSCs adhered to different titanium plates (ungrafted, oxidized, and grafted) after 7, 14, 21, and 28 days of culture. Results are expressed in  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{protein}$ . Error bars represent means  $\pm$  SEM. (\*Statistically significant,  $p < 0.05$ ).

#### Cell differentiation

Effect of Ti surfaces on osteoblastic differentiation was first studied by measuring alkaline phosphatase [ALP] activity of hMSCs. Figure 5 shows ALP activity after 7, 14, 21, and 28 days of culture. For all substrates, the best ALP activity response was obtained at 14 days, and then decreased with time. Interestingly, whatever the day of culture, the level of ALP activity was higher on grafted Ti than on oxidized and ungrafted Ti ( $p < 0.05$ ). Mineralization, the second phase of bone differentiation, was also studied by measuring phosphate and calcium ions liberated from mineral crystals (Fig. 6). During the ALP activity, phosphate ions interact with the calcium present in the medium and induce the formation of the inorganic phase of bone. The mineralization phase corresponds to the ECM maturation, which is the last stage of the bone formation. To induce this stage of development two components were added to the culture medium, ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate (osteogenic medium). No calcium and phosphate ions were measured between 0 and 21 days of culture (data not shown). However, a strong improvement of both calcium and phosphate ions levels was measured at the 28th day of culture. No dystrophic cal-

cification was observed with acellular controls (data not shown). The graphic representations (Fig. 6) show the phosphate and calcium concentrations after 28 days of culture in osteogenic medium [Fig. 6(A,B)]. Interestingly, concentration of calcium and phosphate ions increase for the Ti surface grafted with polyNaSS compared to ungrafted Ti. Moreover, the level of calcium and phosphate concentrations was higher on grafted Ti than on the oxidized surface.

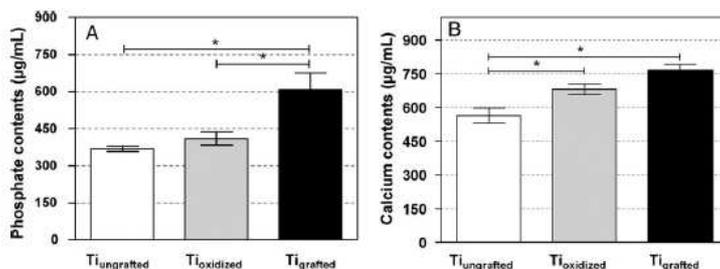
These results show that polyNaSS grafted on Ti surface led to an increase of both ALP activity and mineralization and consequently, improve the osteoblastic differentiation of hMSCs.

Take together these results demonstrate the ability of polyNaSS grafting to enhance osteoblastic differentiation of hMSCs improving both ALP activity and *in vitro* mineralization. The present data are in agreement with previous reports on immortalized osteoblastic cell lines cultured on polyNaSS/Ti surface such as MG63 and MC3T3-E1.<sup>22,31</sup> According to the literature, there has been significant research to establish the correct biological stimuli required to obtain osteoblasts from hMSCs by the use of supplemented media.<sup>32-34</sup> More recently, studies have focused on 2D substrate-induced hMSC osteogenesis and substrate-induced bioactivity.<sup>34-40</sup> However, the current lack of knowledge about substrate characteristics such as surface chemistry and topography control over hMSC differentiation has largely restricted hMSC osteogenic differentiation to biological intervention in the form of growth factors and cytokines. Although mechanisms inducing osteoblastic differentiation of hMSCs on the polyNaSS/Ti are not understood yet, direct interaction between cell membrane proteins and the polyNaSS resulting in cell signaling pathways activation, could be also a pertinent way to explain cell differentiation observed on polyNaSS/Ti surface.

#### CONCLUSION

Because human MSCs play a crucial role in the process of bone regeneration and bony fixation of biomaterials, possibilities in clinical applications of hMSCs to differentiate into osteoblasts seem more promising than cell lines.

In this work, cell viability, cell spreading, cell proliferation, and cell differentiation of hMSCs were compared on crude, oxidized, and polyNaSS grafted titanium to evaluate



**FIGURE 6.** Calcium and phosphate levels measurement. Quantification of cell mineralization on different surfaces (ungrafted, oxidized, grafted) after 28 days of proliferation. Phosphate contents (A) and calcium contents (B) of cells matrix. Error bars represent means  $\pm$  SEM. (\*Statistically significant,  $p < 0.05$ ).

advantages of NaSS/Titanium surfaces in the current biomaterials research. Results demonstrated that titanium grafted with polyNaSS modulate the behavior of the hMSCs in two different ways improving cell-adhesion and osteoblastic differentiation. Interestingly, polyNaSS/Ti surface have no negative effects on proliferation and viability of hMSCs.

In regard to these results, we could hypothesized that titanium implants covered with polyNaSS can improve *in situ* osseointegration activated by osteoblastic differentiations without the use of exogenous mesenchymal stem cells. Moreover, preculture of hMSCs on polyNaSS/Ti before surgical placement of implants, could be a powerful strategy to improve Ti cell attachment and differentiation, and consequently osseointegration.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Sophiane Oughlis is a recipient from Ministère de la Recherche. Soucounda Lessim is a recipient from DIM Stem pole. Frederic Bollotte is recipient from ANRT.

#### REFERENCES

- Morganstein DL, Wu P, Mane MR, Fisk NM, White R, Parker MG. Human fetal mesenchymal stem cells differentiate into brown and white adipocytes: A role for ERRalpha in human UCP1 expression. *Cell Res* 2010;20:434–444.
- Zannettino AC, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, Gronthos S. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol* 2008;214:413–421.
- Marinucci L, Balloni S, Becchetti E, Bistoni G, Calvi EM, Lumare E, Ederli F, Locci P. Effects of hydroxyapatite and bioactive on osteogenic induction of hMSC. *Ann Biomed Eng* 2010;38:640–648.
- Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006;126:677–689.
- Caplan AL. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 1991;9:641–650.
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976;4:267–274.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–147.
- Le Guehennec L, Soueidan A, Layrolle P, Amourig Y. Surface treatments of titanium dental implants for rapid osseointegration. *Dent Mater* 2007;23:844–854.
- Jinno T, Kirk SK, Morita S, Goldberg VM. Effects of calcium ion implantation on osseointegration of surface-blasted titanium alloy femoral implants in a canine total hip arthroplasty model. *J Arthroplasty* 2004;19:102–109.
- Chen JS, Juang HY, Hon MH. Calcium phosphate coating on titanium substrate by a modified electrocrystallization process. *J Mater Sci Mater Med* 1998;9:297–300.
- Jennissen HPZT, Chatz Nikolaidou M, Steppuhn J. Biocoating of implants with mediator molecules: Surface enhancement of metals by treatment with chromosulfuric acid. *Mat-wiss u Werkstofftech* 1999;30:838–845.
- Otto M, Franzen A, Hansen T, Kirkpatrick CJ. Modification of human platelet adhesion on biomaterial surfaces by protein pre-adsorption under static and flow conditions. *J Mater Sci Mater Med* 2004;15:35–42.
- Roessler S, Born R, Scharnweber D, Worch H, Sewing A, Dard M. Biomimetic coatings functionalized with adhesion peptides for dental implants. *J Mater Sci Mater Med* 2001;12:871–877.
- Ferris DM, Moodie GD, Dimond PM, Gioranni CW, Ehrlich MG, Valentini RF. RGD-coated titanium implants stimulate increased bone formation in vivo. *Biomaterials* 1999;20:2323–2331.
- Morra M, Cassinelli C, Cascardo G, Bollati D, Baena RR. Gene expression of markers of osteogenic differentiation of human mesenchymal cells on collagen I-modified microrough titanium surfaces. *J Biomed Mater Res A* 2011;96:449–455.
- Muller R, Abke J, Schnell E, Scharnweber D, Kujat R, Englert C, Taheri D, Nerlich M, Angele P. Influence of surface pretreatment of titanium- and cobalt-based biomaterials on covalent immobilization of fibrillar collagen. *Biomaterials* 2006;27:4059–4068.
- Rapuano BE, MacDonald DE. Surface oxide net charge of a titanium alloy: Modulation of fibronectin-activated attachment and spreading of osteogenic cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011;82:95–103.
- Petrie TA, Reyes CD, Burns KL, Garcia AJ. Simple application of fibronectin-mimetic coating enhances osseointegration of titanium implants. *J Cell Mol Med* 2009;13:2602–2612.
- Bell BF, Schuler M, Tosatti S, Textor M, Schwartz Z, Boyan BD. Osteoblast response to titanium surfaces functionalized with extracellular matrix peptide biomimetics. *Clin Oral Implants Res* 2011;22:865–872.
- El Khadafi F, Helary G, Pavon-Djavid G, Migonney V. Modulating fibroblast cell proliferation with functionalized poly(methyl methacrylate) based copolymers: Chemical composition and monomer distribution effect. *Biomacromolecules* 2002;3:51–56.
- Anagnostou F, Debet A, Pavon-Djavid G, Goudaby Z, Helary G, Migonney V. Osteoblast functions on functionalized PMMA-based polymers exhibiting *Staphylococcus aureus* adhesion inhibition. *Biomaterials* 2006;27:3912–3919.
- Helary G, Noirciere F, Mayingji J, Migonney V. A new approach to graft bioactive polymer on titanium implants: Improvement of MG 63 cell differentiation onto this coating. *Acta Biomater* 2009;5:124–133.
- Al-Hamdan K, Al-Moaber SH, Junker R, Jansen JA. Effect of implant surface properties on peri-implant bone healing: A histological and histomorphometric study in dogs. *Clin Oral Implants Res* 2011;22:399–406.
- Miller CC, Godeau G, Labreton-DeCoster C, Desmouliere A, Pellat B, Dubertret L, Coulomb B. Validation of a morphometric method for evaluating fibroblast numbers in normal and pathologic tissues. *Exp Dermatol* 2003;12:403–411.
- Michiardi A, Helary G, Nguyen PC, Gamble LJ, Anagnostou F, Castner DG, Migonney V. Bioactive polymer grafting onto titanium alloy surfaces. *Acta Biomater* 2010;6:667–675.
- Dimitrievska S, Bureau MN, Antoniou J, Mwale F, Petit A, Lima RS, Marple BR. Titania-hydroxyapatite nanocomposite coatings support human mesenchymal stem cells osteogenic differentiation. *J Biomed Mater Res A* 2011;98:576–588.
- Kushwaha M, Pan X, Holloway JA, Denry IL. Differentiation of human mesenchymal stem cells on niobium-doped fluorapatite glass-ceramics. *Dent Mater* 2011;28:252–260.
- Feng B, Weng J, Yang BC, Qu SX, Zhang XD. Characterization of surface oxide films on titanium and adhesion of osteoblast. *Biomaterials* 2003;24:4663–4670.
- Zhao G, Schwartz Z, Wieland M, Rupp F, Geis-Gerstorfer J, Cochran DL, Boyan BD. High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *J Biomed Mater Res A* 2005;74:49–58.
- Oughlis S, Lessim S, Changotade S, Bollotte F, Poirier F, Helary G, Lataillade JJ, Migonney V, Lutomski D. Development of proteomic tools to study protein adsorption on a biomaterial, titanium grafted with poly(sodium styrene sulfonate). *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011;879:3681–3687.
- Angwarawong T, Dubas ST, Arksornnukit M, Pavasant P. Differentiation of MC3T3-E1 on poly(4-styrenesulfonic acid-co-maleic acid)sodium salt-coated films. *Dent Mater J* 2011;30:158–169.
- Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature* 2001;414:118–121.
- Chen F, Lam WM, Lin CJ, Qiu GX, Wu ZH, Luk KD, Lu WW. Biocompatibility of electrophoretic deposition of nanostructured hydroxyapatite coating on roughen titanium surface: In vitro evaluation using mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007;82:183–191.
- Dalby MJ, McCloy D, Robertson M, Wilkinson CD, Oreffo RO. Osteoprogenitor response to defined topographies with nanoscale depths. *Biomaterials* 2006;27:1306–1315.

35. Curran JM, Chen R, Hunt JA. The guidance of human mesenchymal stem cell differentiation in vitro by controlled modifications to the cell substrate. *Biomaterials* 2006;27:4783–4793.
36. Curran JM, Chen R, Hunt JA. Material induced mesenchymal stem cell differentiation. *Biomaterials* 2010;31:1463–1464.
37. Dalby MJ, Gadegaard N, Tare R, Andar A, Riehle MO, Herzyk P, Wilkinson CD, Oreffo RO. The control of human mesenchymal cell differentiation using nanoscale symmetry and disorder. *Nat Mater* 2007;6:997–1003.
38. Lee JY, Choo JE, Choi YS, Park JB, Min DS, Lee SJ, Rhyu HK, Jo IH, Chung CP, Park YJ. Assembly of collagen-binding peptide with collagen as a bioactive scaffold for osteogenesis in vitro and in vivo. *Biomaterials* 2007;28:4257–4267.
39. Richardson SM, Curran JM, Chen R, Vaughan-Thomas A, Hunt JA, Freemont AJ, Hoyland JA. The differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into chondrocyte-like cells on poly-L-lactic acid (PLLA) scaffolds. *Biomaterials* 2006;27:4069–4078.
40. Xin X, Hussain M, Mao JJ. Continuing differentiation of human mesenchymal stem cells and induced chondrogenic and osteogenic lineages in electrospun PLGA nanofiber scaffold. *Biomaterials* 2007;28:316–325.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abe, H., Yamada-Ohnishi, Y., Hirayama, J., Owada, T., Ikeda, H., and Ikebuchi, K. (2000). Elimination of both cell-free and cell-associated HIV infectivity in plasma by a filtration/methylene blue photoinactivation system. *Transfusion* 40, 1081–1087.

Abedin, M., Tintut, Y., and Demer, L.L. (2004). Mesenchymal stem cells and the artery wall. *Circ. Res.* 95, 671–676.

AFSSAPS (2009). AFSSAPS (2009). Commission nationale de biovigilance - Compte rendu de la réunion du 28 mai 2009.

Allain, J.P., Bianco, C., Blajchman, M.A., Brecher, M.E., Busch, M., Leiby, D., Lin, L., and Stramer, S. (2005). Protecting the blood supply from emerging pathogens: the role of pathogen inactivation. *Transfus Med Rev* 19, 110–126.

Almeida-Porada, G., Porada, C.D., Tran, N., and Zanjani, E.D. (2000). Cotransplantation of human stromal cell progenitors into preimmune fetal sheep results in early appearance of human donor cells in circulation and boosts cell levels in bone marrow at later time points after transplantation. *Blood* 95, 3620–3627.

Alsalameh, S., Amin, R., Gemba, T., and Lotz, M. (2004). Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis Rheum.* 50, 1522–1532.

Alter, H.J. (2008). Pathogen Reduction: A Precautionary Principle Paradigm. *Transfusion Medicine Reviews* 22, 97–102.

Alter, H.J., Holland, P.V., Purcell, R.H., Lander, J.J., Feinstone, S.M., Morrow, A.G., and Schmidt, P.J. (1972). Posttransfusion Hepatitis After Exclusion of Commercial and Hepatitis-B Antigen-Positive Donors. *Ann Intern Med* 77, 691–699.

Alter, H.J., Purcell, R.H., Holland, P.V., Alling, D.W., and Koziol, D.E. (1981). Donor transaminase and recipient hepatitis. Impact on blood transfusion services. *JAMA* 246, 630–634.

Alter, H.J., Purcell, R.H., Shih, J.W., Melpolder, J.C., Houghton, M., Choo, Q.L., and Kuo, G. (1989). Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 321, 1494–1500.

Andrew, J.G., Hoyland, J.A., Freemont, A.J., and Marsh, D.R. (1995). Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures. *Bone* 16, 455–460.

Andrews, R. K., J. A. Lopez, et al. (1997). Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation. *Int J Biochem Cell Biol* 29(1): 91-105.

ANSM (2010). Rapport hémovigilance 2010.

Arnhold, S., Absenger, Y., Klein, H., Addicks, K., and Schraermeyer, U. (2007). Transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells rescue photoreceptor cells in the dystrophic retina of the rhodopsin knockout mouse. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 245, 414–422.

Ascencio, M., Collinet, P., Cosson, M., Vinatier, D., and Mordon, S. (2007). Intérêt et place de la thérapie photodynamique en gynécologie. *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 35, 1155–1165.

Asher, D.M. (1999). Bovine sera used in the manufacture of biologicals: current concerns and policies of the U.S. Food and Drug Administration regarding the transmissible spongiform encephalopathies. *Dev. Biol. Stand.* 99, 41–44.

Aubin, J.E. (1998). Bone stem cells. *J. Cell. Biochem. Suppl.* 30-31, 73–82.

Auletta, J.J., Bartholomew, A.M., Maziarz, R.T., Deans, R.J., Miller, R.H., Lazarus, H.M., and Cohen, J.A. (2012). The potential of mesenchymal stromal cells as a novel cellular therapy for multiple sclerosis. *Immunotherapy* 4, 529–547.

Avgoustiniatos, E.S., Scott, W.E., Suszynski, T.M., Schuurman, H.-J., Nelson, R.A., Rozak, P.R., Mueller, K.R., Balamurugan, A.N., Ansite, J.D., Fraga, D.W., et al. (2012).

Supplements in Human Islet Culture: Human Serum Albumin is Inferior to Fetal Bovine Serum. *Cell Transplant.*

Azuma, H., Hirayama, J., Akino, M., Miura, R., Kiyama, Y., Imai, K., Kasai, M., Koizumi, K., Kakinoki, Y., Makiguchi, Y., et al. (2009). Reduction in adverse reactions to platelets by the removal of plasma supernatant and resuspension in a new additive solution (M-sol). *Transfusion* 49, 214–218.

Barbara, J. (2004a). Why ‘Safer than Ever’ May Not Be Quite Safe Enough. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 31, 2–10.

Barbara, J.A.J. (2004b). The rationale for pathogen-inactivation treatment of blood components. *Int. J. Hematol.* 80, 311–316.

Bartmann, C., Rohde, E., Schallmoser, K., Pürstner, P., Lanzer, G., Linkesch, W., and Strunk, D. (2007). Two steps to functional mesenchymal stromal cells for clinical application. *Transfusion* 47, 1426–1435.

Battiwalla, M., and Hematti, P. (2009). Mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Cytotherapy* 11, 503–515.

Benjamin, R.J. (2005). Bacterial detection in platelet components and the rationale for pathogen inactivation: a blood center perspective. *J Clin Apher* 20, 117–122.

Bernardo, M.E., Avanzini, M.A., Perotti, C., Cometa, A.M., Moretta, A., Lenta, E., Del Fante, C., Novara, F., De Silvestri, A., Amendola, G., et al. (2007). Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J. Cell. Physiol.* 211, 121–130.

Beutler, E., and West, C. (1979). The storage of hard-packed red blood cells in citrate-phosphate-dextrose (CPD) and CPD-adenine (CPDA-1). *Blood* 54, 280–284.

Bhanot, S., and Alex, J.C. (2002). Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg* 18, 27–33.

Bhatia, R., and Hare, J.M. (2005). Mesenchymal stem cells: future source for reparative medicine. *Congest Heart Fail* 11, 87–91; quiz 92–93.

- Bianco, C. (2008). Dengue and Chikungunya viruses in blood donations: risks to the blood supply? *Transfusion* 48, 1279–1281.
- Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., and Robey, P.G. (2001). Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19, 180–192.
- Bielecki, T.M., Gazdzik, T.S., Arendt, J., Szczepanski, T., Król, W., and Wielkoszynski, T. (2007). Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. *J Bone Joint Surg Br* 89, 417–420.
- Blajchman, M.A., Goldman, M., Webert, K.E., Vamvakas, E.C., Hannon, J., and Delage, G. (2004). Proceedings of a consensus conference: the screening of blood donors for variant CJD. *Transfus Med Rev* 18, 73–92.
- Blakytyn, R., Ludlow, A., Martin, G.E.M., Ireland, G., Lund, L.R., Ferguson, M.W.J., and Brunner, G. (2004). Latent TGF-beta1 activation by platelets. *J. Cell. Physiol.* 199, 67–76.
- Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., and Ringdén, O. (2003). HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.* 31, 890–896.
- Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Götherström, C., Hassan, M., Uzunel, M., and Ringdén, O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363, 1439–1441.
- Blejer, J.L., Saguier, M.C., Dinapoli, R.A., and Salamone, H.J. (1999). [Prevalence of *Trypanosoma cruzi* antibodies in blood donors]. *Medicina (B Aires)* 59, 129–132.
- Blümel, J., Schmidt, I., Willkommen, H., and Löwer, J. (2002). Inactivation of parvovirus B19 during pasteurization of human serum albumin. *Transfusion* 42, 1011–1018.
- Bonab, M.M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S.H., Ghavamzadeh, A., and Nikbin, B. (2006). Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biol.* 7, 14.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.

- Brown, P., Will, R.G., Bradley, R., Asher, D.M., and Detwiler, L. (2001). Bovine spongiform encephalopathy and variant Creutzfeldt-Jakob disease: background, evolution, and current concerns. *Emerging Infect. Dis.* 7, 6–16.
- Bühring, H.-J., Battula, V.L., Treml, S., Schewe, B., Kanz, L., and Vogel, W. (2007). Novel markers for the prospective isolation of human MSC. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1106, 262–271.
- Bühring, H.-J., Treml, S., Cerabona, F., De Zwart, P., Kanz, L., and Sobiesiak, M. (2009). Phenotypic characterization of distinct human bone marrow-derived MSC subsets. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1176, 124–134.
- Burnouf, T. (2007). Modern Plasma Fractionation. *Transfusion Medicine Reviews* 21, 101–117.
- Burnouf, T., and Radosevich, M. (2000). Reducing the risk of infection from plasma products: specific preventative strategies. *Blood Rev.* 14, 94–110.
- Burnouf, P.-A., Juan, P.-K., Su, C.-Y., Kuo, Y.-P., Chou, M.-L., Su, C.-H., Tseng, Y.-H., Lin, C.-T., and Burnouf, T. (2010). A novel virally inactivated human platelet lysate preparation rich in TGF-beta, EGF and IGF, and depleted of PDGF and VEGF. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 56, 151–160.
- Burnouf, T., Martinache, L., and Goudemand, M. (1987). [Virus inactivation in plasma fractions for therapeutic use]. *Nouv Rev Fr Hematol* 29, 93–96.
- Burnouf, T., Chou, M.-L., Cheng, L.-H., Li, Z.-R., Wu, Y.-W., El-Ekiaby, M., and Tsai, K.-H. (2013). Dengue virus inactivation by minipool TnBP/Triton X-45 treatment of plasma and cryoprecipitate. *Vox Sang.* 104, 1–6.
- Burnouf-Radosevich, M., Burnouf, T., and Huart, J.J. (1993). [Industrial pasteurization of plasma and criteria of quality]. *Rev. Fr. Transfus. Hemobiol.* 36, 93–102.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9, 641–650.
- Caplan, A.I. (2007). Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J. Cell. Physiol.* 213, 341–347.

- Caplan, A.I., and Bruder, S.P. (2001). Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med* 7, 259–264.
- Caplan, A.I., and Dennis, J.E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J. Cell. Biochem.* 98, 1076–1084.
- Carlo-Stella, C., Mangoni, L., and Rizzoli, V. (1993). Biology and clinical applications of long-term bone marrow cultures. *Int J Artif Organs* 16 Suppl 5, 76–79.
- Caruelle, J.-P., Cassier, P., and Houdry, J. (2000). *La régénération* (Belin).
- Chandra, T., Gupta, A., Kumar, A., and Afreen, S. (2011). Morphological and functional changes in random donor platelets stored for seven days in platelet additive solution. *International Journal of Blood Transfusion and Immunohematology* 1, 20.
- Chase, L.G., Lakshmipathy, U., Solchaga, L.A., Rao, M.S., and Vemuri, M.C. (2010). A novel serum-free medium for the expansion of human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 1, 8.
- Cheng, L., Qasba, P., Vanguri, P., and Thiede, M.A. (2000). Human mesenchymal stem cells support megakaryocyte and pro-platelet formation from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *J. Cell. Physiol.* 184, 58–69.
- Chevallet, M., Santoni, V., Poinas, A., Rouquié, D., Fuchs, A., Kieffer, S., Rossignol, M., Lunardi, J., Garin, J., and Rabilloud, T. (1998). New zwitterionic detergents improve the analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 19, 1901–1909.
- Cho, M.I., Lin, W.L., and Genco, R.J. (1995). Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regenerative therapy. *J. Periodontol.* 66, 522–530.
- Choukroun, J., Diss, A., Simonpieri, A., Girard, M.-O., Schoeffler, C., Dohan, S.L., Dohan, A.J.J., Mouhyi, J., and Dohan, D.M. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 101, e56–60.
- Ciccocioppo, R., Bernardo, M.E., Sgarella, A., Maccario, R., Avanzini, M.A., Ubezio, C., Minelli, A., Alvisi, C., Vanoli, A., Calliada, F., et al. (2011). Autologous bone marrow-

derived mesenchymal stromal cells in the treatment of fistulising Crohn's disease. *Gut* 60, 788–798.

Cobo, F., Talavera, P., and Concha, A. (2006). Diagnostic approaches for viruses and prions in stem cell banks. *Virology* 347, 1–10.

Cochran, D.L., and Wozney, J.M. (1999). Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol.* 2000 19, 40–58.

Cohn, E.J., Oncley, J.L., Strong, L.E., Hughes, W.L., and Armstrong, S.H. (1944). Chemical, clinical, and immunological studies on the products of human plasma fractionation. I. The characterization of the protein fractions of human plasma. *J. Clin. Invest.* 23, 417–432.

Colter, D.C., Sekiya, I., and Prockop, D.J. (2001). Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 7841–7845.

Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) (2012). Guideline on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products.

Coulombel, L. (2003). [Adult stem cells: seing is not being]. *Med Sci (Paris)* 19, 683–694.

Crawford, D.H., Rickinson, A.B., Finerty, S., and Epstein, M.A. (1978). Epstein-Barr (EB) Virus Genome-containing, EB Nuclear Antigen-negative B-lymphocyte Populations in Blood in Acute Infectious Mononucleosis. *J Gen Virol* 38, 449–460.

Cromack, D.T., Porras-Reyes, B., and Mustoe, T.A. (1990). Current concepts in wound healing: growth factor and macrophage interaction. *J Trauma* 30, S129–133.

Czyrski, J.A., Narczewska, B., and Inglot, A.D. (1984). New procedure for purification of human platelet-derived growth factor. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 32, 589–598.

Debili, N. and W. Vainchenker (2008). [From giant to micro: a platelet story]. *Med Sci (Paris)* 24(5): 467-469.

D'Ippolito, G., Schiller, P.C., Ricordi, C., Roos, B.A., and Howard, G.A. (1999). Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J. Bone Miner. Res.* 14, 1115–1122.

- D'Ippolito, G., Diabira, S., Howard, G.A., Menei, P., Roos, B.A., and Schiller, P.C. (2004). Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J. Cell. Sci.* *117*, 2971–2981.
- Daif, E.T. (2012). Effect of autologous platelet-rich plasma on bone regeneration in mandibular fractures. *Dent Traumatol.*
- Dardare, N., and Platz, M.S. (2002). Binding affinities of commonly employed sensitizers of viral inactivation. *Photochem. Photobiol.* *75*, 561–564.
- Dausset, J. (1958). [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol.* *20*, 156–166.
- Deans, R.J., and Moseley, A.B. (2000). Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp. Hematol.* *28*, 875–884.
- Dekel, B., Zangi, L., Shezen, E., Reich-Zeliger, S., Eventov-Friedman, S., Katchman, H., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Rechavi, G., Margalit, R., et al. (2006). Isolation and characterization of nontubular sca-1+lin- multipotent stem/progenitor cells from adult mouse kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* *17*, 3300–3314.
- Dicker, A., Le Blanc, K., Aström, G., Van Harmelen, V., Götherström, C., Blomqvist, L., Arner, P., and Rydén, M. (2005). Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue. *Exp. Cell Res.* *308*, 283–290.
- Diduch, D.R., Jordan, L.C., Mierisch, C.M., and Balian, G. (2000). Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects. *Arthroscopy* *16*, 571–577.
- Dietz, A.B., Padley, D.J., and Gastineau, D.A. (2007). Infrastructure development for human cell therapy translation. *Clin. Pharmacol. Ther.* *82*, 320–324.
- Djouad, F., Ponce, P., Bony, C., Tropel, P., Apparailly, F., Sany, J., Noël, D., and Jorgensen, C. (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* *102*, 3837–3844.
- Docheva, D., Popov, C., Mutschler, W., and Schieker, M. (2007). Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. *J. Cell. Mol. Med.* *11*, 21–38.

- Doerr, H.W., Cinatl, J., Stürmer, M., and Rabenau, H.F. (2003). Prions and orthopedic surgery. *Infection* 31, 163–171.
- Dohan Ehrenfest, D.M., Rasmusson, L., and Albrektsson, T. (2009). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 27, 158–167.
- Doucet, C., Ernou, I., Zhang, Y., Llense, J.-R., Begot, L., Holy, X., and Lataillade, J.-J. (2005). Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: a safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J. Cell. Physiol.* 205, 228–236.
- Eastment, C.T., and Sirbasku, D.A. (1978). Platelet derived growth factor(s) for a hormone-responsive rat mammary tumor cell line. *J. Cell. Physiol.* 97, 17–27.
- Ebisawa, K., Kato, R., Okada, M., Kamei, Y., Mazlyzam, A.L., Narita, Y., Kagami, H., and Ueda, M. (2008). Cell therapy for facial anti-aging. *Med. J. Malaysia* 63 *Suppl A*, 41.
- Emery, V.C., Cope, A.V., Bowen, E.F., Gor, D., and Griffiths, P.D. (1999). The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo. *J. Exp. Med.* 190, 177–182.
- EUROPEAN COMMISSION (2011). Note for guidance on minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products (EMA/410/01 rev.3).
- Farjami, E., Clima, L., Gothelf, K.V., and Ferapontova, E.E. (2010). DNA interactions with a Methylene Blue redox indicator depend on the DNA length and are sequence specific. *Analyst* 135, 1443–1448.
- Fava, R.A., Olsen, N.J., Postlethwaite, A.E., Broadley, K.N., Davidson, J.M., Nanney, L.B., Lucas, C., and Townes, A.S. (1991). Transforming growth factor beta 1 (TGF-beta 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF-beta-driven synovial inflammation and hyperplasia. *J. Exp. Med.* 173, 1121–1132.
- Fekete, N., Gadelorge, M., Fürst, D., Maurer, C., Dausend, J., Fleury-Cappellesso, S., Mailänder, V., Lotfi, R., Ignatius, A., Sensebé, L., et al. (2012). Platelet lysate from whole blood-derived pooled platelet concentrates and apheresis-derived platelet concentrates for the

isolation and expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells: production process, content and identification of active components. *Cytotherapy* 14, 540–554.

Flemming, A., Schallmoser, K., Strunk, D., Stolk, M., Volk, H.-D., and Seifert, M. (2011). Immunomodulative efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured in human platelet lysate. *J. Clin. Immunol.* 31, 1143–1156.

Fréchette, J.-P., Martineau, I., and Gagnon, G. (2005). Platelet-rich plasmas: growth factor content and roles in wound healing. *J. Dent. Res.* 84, 434–439.

Friedenstein, A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I., and Frolova, G.P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6, 230–247.

Friedenstein, A.J., Deriglasova, U.F., Kulagina, N.N., Panasuk, A.F., Rudakowa, S.F., Luriá, E.A., and Ruadkow, I.A. (1974). Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol.* 2, 83–92.

Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., and Kulagina, N.N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* 4, 267–274.

Fujii, H., Kitazawa, R., Maeda, S., Mizuno, K., and Kitazawa, S. (1999). Expression of platelet-derived growth factor proteins and their receptor alpha and beta mRNAs during fracture healing in the normal mouse. *Histochem. Cell Biol.* 112, 131–138.

Fukumoto, T., Sperling, J.W., Sanyal, A., Fitzsimmons, J.S., Reinholz, G.G., Conover, C.A., and O'Driscoll, S.W. (2003). Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthr. Cartil.* 11, 55–64.

Garwood, M., Cardigan, R.A., Drummond, O., Hornsey, V.S., Turner, C.P., Young, D., Williamson, L.M., and Prowse, C.V. (2003). The effect of methylene blue photoinactivation and methylene blue removal on the quality of fresh-frozen plasma. *Transfusion* 43, 1238–1247.

Gellis, S.S., and Neefe, J.R. (1948). Chemical, clinical, and immunological studies on the products of human plasma fractionation; inactivation of the virus of homologous serum

hepatitis in solutions of normal human serum albumin by means of heat. *J. Clin. Invest.* 27, 239–244.

Gibble, J.W., and Ness, P.M. (1990). Fibrin glue: the perfect operative sealant? *Transfusion* 30, 741–747.

Gironés, N., Bueno, J.L., Carrión, J., Fresno, M., and Castro, E. (2006). The efficacy of photochemical treatment with methylene blue and light for the reduction of *Trypanosoma cruzi* in infected plasma. *Vox Sang.* 91, 285–291.

Goodrich, R.P. (2000). The use of riboflavin for the inactivation of pathogens in blood products. *Vox Sang.* 78 *Suppl* 2, 211–215.

Gorczyński, R.M., Chen, Z., Fu, X.M., and Zeng, H. (1998). Increased expression of the novel molecule OX-2 is involved in prolongation of murine renal allograft survival. *Transplantation* 65, 1106–1114.

Grass, J.A., Hei, D.J., Metchette, K., Cimino, G.D., Wieseahn, G.P., Corash, L., and Lin, L. (1998). Inactivation of leukocytes in platelet concentrates by photochemical treatment with psoralen plus UVA. *Blood* 91, 2180–2188.

Grass, J.A., Wafa, T., Reames, A., Wages, D., Corash, L., Ferrara, J.L., and Lin, L. (1999). Prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease by photochemical treatment. *Blood* 93, 3140–3147.

Grellier, P., Benach, J., Labaied, M., Charneau, S., Gil, H., Monsalve, G., Alfonso, R., Sawyer, L., Lin, L., Steiert, M., et al. (2008). Photochemical inactivation with amotosalen and long-wavelength ultraviolet light of *Plasmodium* and *Babesia* in platelet and plasma components. *Transfusion* 48, 1676–1684.

Gröner, A. (2008). Pathogen safety of plasma-derived products - Haemate P/Humate-P. *Haemophilia* 14 *Suppl* 5, 54–71.

Guinet, F., Carniel, E., and Leclercq, A. (2011). Transfusion-transmitted *Yersinia enterocolitica* sepsis. *Clin. Infect. Dis.* 53, 583–591.

- Guo, Z., Tang, P., Liu, X., Yang, J., Li, X., Chen, X., and Mao, N. (2000). Mesenchymal Stem Cells Derived from Human Bone Marrow Support Hematopoiesis in Vitro. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 8, 93–96.
- Hambleton, J., Wages, D., Radu-Radulescu, L., Adams, M., MacKenzie, M., Shafer, S., Lee, M., Smyers, J., Wiesehahn, G., and Corash, L. (2002). Pharmacokinetic study of FFP photochemically treated with amotosalen (S-59) and UV light compared to FFP in healthy volunteers anticoagulated with warfarin. *Transfusion* 42, 1302–1307.
- Hardwick, C.C., Herivel, T.R., Hernandez, S.C., Ruane, P.H., and Goodrich, R.P. (2004). Separation, identification and quantification of riboflavin and its photoproducts in blood products using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection: a method to support pathogen reduction technology. *Photochem. Photobiol.* 80, 609–615.
- Hartwig, J. H. (2006). The platelet: form and function. *Semin Hematol* 43(1 Suppl 1): S94–100.
- Hechler, B., Ohlmann, P., Chafey, P., Ravanat, C., Eckly, A., Maurer, E., Mangin, P., Isola, H., Cazenave, J.-P., and Gachet, C. (2012). Preserved functional and biochemical characteristics of platelet components prepared with amotosalen and ultraviolet A for pathogen inactivation. *Transfusion*.
- Heimburger, N., and Karges, H.E. (1989). Strategies to produce virus-safe blood derivatives. *Curr Stud Hematol Blood Transfus* 23–33.
- Herbert, B.R., Molloy, M.P., Yan, J.X., Gooley, A.A., Bryson, W.G., and Williams, K.L. (1997). Characterisation of wool intermediate filament proteins separated by micropreparative two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 18, 568–572.
- Herve, P., Lamy, B., Peters, A., Toubin, M., and Bidet, A.C. (1980). Preservation of human erythrocytes in the liquid state: biological results with a new medium. *Vox Sang.* 39, 195–204.
- Hilfenhaus, J., Geiger, H., Lemp, J., and Hung, C.L. (1987). A strategy for testing established human plasma protein manufacturing procedures for their ability to inactivate or eliminate human immunodeficiency virus. *J Biol Stand* 15, 251–263.

- Hillyer, C.D., Josephson, C.D., Blajchman, M.A., Vostal, J.G., Epstein, J.S., and Goodman, J.L. (2003). Bacterial contamination of blood components: risks, strategies, and regulation: joint ASH and AABB educational session in transfusion medicine. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 575–589.
- Högman, C.F., and Meryman, H.T. (1999). Storage parameters affecting red blood cell survival and function after transfusion. *Transfus Med Rev* 13, 275–296.
- Högman, C.F., Hedlund, K., Akerblom, O., and Venge, P. (1978a). Red blood cell preservation in protein-poor media. I. Leukocyte enzymes as a cause of hemolysis. *Transfusion* 18, 233–241.
- Högman, C.F., Hedlund, K., and Zetterström, H. (1978b). Clinical usefulness of red cells preserved in protein-poor mediums. *N. Engl. J. Med.* 299, 1377–1382.
- Högman, C.F., Akerblom, O., Hedlund, K., Rosén, I., and Wiklund, L. (1983). Red cell suspensions in SAGM medium. Further experience of in vivo survival of red cells, clinical usefulness and plasma-saving effects. *Vox Sang.* 45, 217–223.
- Holme, S., Heaton, W.A., and Courtright, M. (1987). Improved in vivo and in vitro viability of platelet concentrates stored for seven days in a platelet additive solution. *Br. J. Haematol.* 66, 233–238.
- Holness, L., Knippen, M.A., Simmons, L., and Lachenbruch, P.A. (2004). Fatalities caused by TRALI. *Transfus Med Rev* 18, 184–188.
- Honn, K.V., Singley, J.A., and Chavin, W. (1975). Fetal bovine serum: a multivariate standard. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 149, 344–347.
- Horowitz, B., Wiebe, M.E., Lippin, A., and Stryker, M.H. (1985a). Inactivation of viruses in labile blood derivatives. I. Disruption of lipid-enveloped viruses by tri(n-butyl)phosphate detergent combinations. *Transfusion* 25, 516–522.
- Horowitz, B., Wiebe, M.E., Lippin, A., Vandersande, J., and Stryker, M.H. (1985b). Inactivation of viruses in labile blood derivatives. II. Physical methods. *Transfusion* 25, 523–527.

- Horowitz, B., Bonomo, R., Prince, A.M., Chin, S.N., Brotman, B., and Shulman, R.W. (1992). Solvent/detergent-treated plasma: a virus-inactivated substitute for fresh frozen plasma. *Blood* 79, 826–831.
- Horwitz, E.M., Gordon, P.L., Koo, W.K.K., Marx, J.C., Neel, M.D., McNall, R.Y., Muul, L., and Hofmann, T. (2002). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *PNAS* 99, 8932–8937.
- Horwitz, E.M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Deans, R.J., Krause, D.S., and Keating, A. (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393–395.
- Hourfar, M.K., Jork, C., Schottstedt, V., Weber-Schehl, M., Brixner, V., Busch, M.P., Geusendam, G., Gubbe, K., Mahnhardt, C., Mayr-Wohlfart, U., et al. (2008). Experience of German Red Cross blood donor services with nucleic acid testing: results of screening more than 30 million blood donations for human immunodeficiency virus-1, hepatitis C virus, and hepatitis B virus. *Transfusion* 48, 1558–1566.
- Intini, G. (2009). The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. *Biomaterials* 30, 4956–4966.
- Irsch, J., and Lin, L. (2011). Pathogen Inactivation of Platelet and Plasma Blood Components for Transfusion Using the INTERCEPT Blood System™. *Transfus Med Hemother* 38, 19–31.
- Jia, X.Y., Briese, T., Jordan, I., Rambaut, A., Chi, H.C., Mackenzie, J.S., Hall, R.A., Scherret, J., and Lipkin, W.I. (1999). Genetic analysis of West Nile New York 1999 encephalitis virus. *Lancet* 354, 1971–1972.
- Jiang, Y., Vaessen, B., Lenvik, T., Blackstad, M., Reyes, M., and Verfaillie, C.M. (2002). Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp. Hematol.* 30, 896–904.
- Jochems, C.E.A., Van der Valk, J.B.F., Stafleu, F.R., and Baumans, V. (2002). The use of fetal bovine serum: ethical or scientific problem? *Altern Lab Anim* 30, 219–227.

- Jones, B.J., and McTaggart, S.J. (2008). Immunosuppression by mesenchymal stromal cells: from culture to clinic. *Exp. Hematol.* *36*, 733–741.
- Jones, E.A., Kinsey, S.E., English, A., Jones, R.A., Straszynski, L., Meredith, D.M., Markham, A.F., Jack, A., Emery, P., and McGonagle, D. (2002). Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum.* *46*, 3349–3360.
- Jones, E.A., English, A., Henshaw, K., Kinsey, S.E., Markham, A.F., Emery, P., and McGonagle, D. (2004). Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum.* *50*, 817–827.
- Jorgensen, C., Deschaseaux, F., Planat-Benard, V., and Gabison, E. (2011). [Mesenchymal stem cells: A therapeutic update]. *Med Sci (Paris)* *27*, 275–284.
- Joshi, N.V., Raftis, J.B., Lucking, A.J., Hunter, A.H., Millar, M., Fitzpatrick, M., Feuerstein, G.Z., and Newby, D.E. (2012). Lyophilised reconstituted human platelets increase thrombus formation in a clinical ex vivo model of deep arterial injury. *Thromb. Haemost.* *108*, 176–182.
- Kassem, M. (2004). Mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential clinical applications. *Cloning Stem Cells* *6*, 369–374.
- Kassem, M., and Abdallah, B.M. (2008). Human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: biological characteristics and potential role in therapy of degenerative diseases. *Cell Tissue Res.* *331*, 157–163.
- Kim, D.H., Yoo, K.H., Choi, K.S., Choi, J., Choi, S.-Y., Yang, S.-E., Yang, Y.-S., Im, H.J., Kim, K.H., Jung, H.L., et al. (2005). Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Cytokine* *31*, 119–126.
- Kistler, P., and Nitschmann, H. (1962). Large scale production of human plasma fractions. Eight years experience with the alcohol fractionation procedure of Nitschmann, Kistler and Lergier. *Vox Sang.* *7*, 414–424.
- Klemola, E., and Kääriäinen, L. (1965). Cytomegalovirus as a possible cause of a disease resembling infectious mononucleosis. *Br Med J* *2*, 1099–1102.

- Klinger, M. H. and W. Jelkmann (2002). Role of blood platelets in infection and inflammation. *J Interferon Cytokine Res* 22(9): 913-922.
- Koç, O.N., and Lazarus, H.M. (2001). Mesenchymal stem cells: heading into the clinic. *Bone Marrow Transplant.* 27, 235–239.
- Kon, E., Mandelbaum, B., Buda, R., Filardo, G., Delcogliano, M., Timoncini, A., Fornasari, P.M., Giannini, S., and Marcacci, M. (2011). Platelet-rich plasma intra-articular injection versus hyaluronic acid viscosupplementation as treatments for cartilage pathology: from early degeneration to osteoarthritis. *Arthroscopy* 27, 1490–1501.
- Koziol, D.E., Holland, P.V., Alling, D.W., Melpolder, J.G., Solomon, R.E., Purcell, R.H., Hudson, L.M., Shoup, F.J., Krakauer, H., and Alter, H.J. Antibody to hepatitis B core antigens as a paradoxical marker for non-A, non-B hepatitis agents in donated blood. *Annals of internal medicine* 104, 488–495.
- Kroeze, K.L., Jurgens, W.J., Doulabi, B.Z., Van Milligen, F.J., Scheper, R.J., and Gibbs, S. (2009). Chemokine-mediated migration of skin-derived stem cells: predominant role for CCL5/RANTES. *J. Invest. Dermatol.* 129, 1569–1581.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lambrecht, B., Mohr, H., Knüver-Hopf, J., and Schmitt, H. (1991). Photoinactivation of viruses in human fresh plasma by phenothiazine dyes in combination with visible light. *Vox Sang.* 60, 207–213.
- Lane, T.A. (1994). Leukocyte reduction of cellular blood components. Effectiveness, benefits, quality control, and costs. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 118, 392–404.
- Langer, R., and Vacanti, J.P. (1993). Tissue engineering. *Science* 260, 920–926.
- Lataillade, J.J., Doucet, C., Bey, E., Carsin, H., Huet, C., Clairand, I., Bottollier-Depois, J.F., Chapel, A., Ernou, I., Gourven, M., et al. (2007). New approach to radiation burn treatment by dosimetry-guided surgery combined with autologous mesenchymal stem cell therapy. *Regen Med* 2, 785–794.

- Lataillade, J.-J., Bey, E., Thepenier, C., Prat, M., Leclerc, T., and Bargues, L. (2010). [Skin engineering for burns treatment]. *Bull. Acad. Natl. Med.* *194*, 1339–1351.
- Lazarus, H.M., Koc, O.N., Devine, S.M., Curtin, P., Maziarz, R.T., Holland, H.K., Shpall, E.J., McCarthy, P., Atkinson, K., Cooper, B.W., et al. (2005). Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol. Blood Marrow Transplant.* *11*, 389–398.
- Lefrère, J.J., Cantaloube, J.F., Defer, C., Mercier, B., Loiseau, P., Vignon, D., Pawlotsky, J.M., Biagini, P., Lerable, J., Rouger, P., et al. (1999). Screening for HBV, HCV and HIV genomes in blood donations: shortcomings of pooling revealed by a multicentre study simulating real-time testing. *J. Virol. Methods* *80*, 33–44.
- Lieberman, J.R., Daluiski, A., and Einhorn, T.A. (2002). The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* *84-A*, 1032–1044.
- Lin, L., Cook, D.N., Wieseahn, G.P., Alfonso, R., Behrman, B., Cimino, G.D., Corten, L., Damonte, P.B., Dikeman, R., Dupuis, K., et al. (1997). Photochemical inactivation of viruses and bacteria in platelet concentrates by use of a novel psoralen and long-wavelength ultraviolet light. *Transfusion* *37*, 423–435.
- Lin, L., Dikeman, R., Molini, B., Lukehart, S.A., Lane, R., Dupuis, K., Metzel, P., and Corash, L. (2004). Photochemical treatment of platelet concentrates with amotosalen and long-wavelength ultraviolet light inactivates a broad spectrum of pathogenic bacteria. *Transfusion* *44*, 1496–1504.
- Lin, L., Hanson, C.V., Alter, H.J., Jauvin, V., Bernard, K.A., Murthy, K.K., Metzel, P., and Corash, L. (2005). Inactivation of viruses in platelet concentrates by photochemical treatment with amotosalen and long-wavelength ultraviolet light. *Transfusion* *45*, 580–590.
- Liu, Y., Kalén, A., Risto, O., and Wahlström, O. (2002). Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair Regen* *10*, 336–340.
- Liumbruno, G.M., Calteri, D., Petropulacos, K., Mattivi, A., Po, C., Macini, P., Tomasini, I., Zucchelli, P., Silvestri, A.R., Sambri, V., et al. (2008). The Chikungunya epidemic in Italy and its repercussion on the blood system. *Blood Transfus* *6*, 199–210.

- Ljungman, P., and Plotkin, S. (1995). Proceedings from the 5th International Cytomegalovirus Conference. Stockholm, Sweden, May 21-24, 1995. *Scand J Infect Dis Suppl* 99, 1–120.
- Luginbuehl, V., Meinel, L., Merkle, H.P., and Gander, B. (2004). Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm* 58, 197–208.
- Luria, E.A., Owen, M.E., Friedenstein, A.J., Morris, J.F., and Kuznetsow, S.A. (1987). Bone formation in organ cultures of bone marrow. *Cell Tissue Res.* 248, 449–454.
- Luttenberger, T., Schmid-Kotsas, A., Menke, A., Siech, M., Beger, H., Adler, G., Grünert, A., and Bachem, M.G. (2000). Platelet-derived growth factors stimulate proliferation and extracellular matrix synthesis of pancreatic stellate cells: implications in pathogenesis of pancreas fibrosis. *Lab. Invest.* 80, 47–55.
- MacLeod, A.J., Welch, A.G., Dickson, I.H., Cuthbertson, B., and Foster, P.R. (1984). Stabilisation of proteins to heat. *Res Disclosures* 380.
- Maitra, B., Szekely, E., Gjini, K., Laughlin, M.J., Dennis, J., Haynesworth, S.E., and Koç, O.N. (2004). Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant.* 33, 597–604.
- Majumdar, M.K., Thiede, M.A., Mosca, J.D., Moorman, M., and Gerson, S.L. (1998). Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J. Cell. Physiol.* 176, 57–66.
- Mangi, A.A., Noiseux, N., Kong, D., He, H., Rezvani, M., Ingwall, J.S., and Dzau, V.J. (2003). Mesenchymal stem cells modified with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat. Med.* 9, 1195–1201.
- Marden, L.J., Fan, R.S., Pierce, G.F., Reddi, A.H., and Hollinger, J.O. (1993). Platelet-derived growth factor inhibits bone regeneration induced by osteogenin, a bone morphogenetic protein, in rat craniotomy defects. *J. Clin. Invest.* 92, 2897–2905.
- Martinaud, C., Civadier, C., Ausset, S., Verret, C., Deshayes, A.-V., and Sailliol, A. (2012). In vitro hemostatic properties of French lyophilized plasma. *Anesthesiology* 117, 339–346.

Marx, R.E., Carlson, E.R., Eichstaedt, R.M., Schimmele, S.R., Strauss, J.E., and Georgeff, K.R. (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 85, 638–646.

Masse, M. (1993). [Assessment of filtration performance]. *Rev. Fr. Transfus. Hemobiol.* 36, 243–252.

Matras, H. (1985). Fibrin sealant in maxillofacial surgery. Development and indications. A review of the past 12 years. *Facial Plast Surg* 2, 297–313.

McCutcheon, S., Alejo Blanco, A.R., Houston, E.F., De Wolf, C., Tan, B.C., Smith, A., Groschup, M.H., Hunter, N., Hornsey, V.S., MacGregor, I.R., et al. (2011). All clinically-relevant blood components transmit prion disease following a single blood transfusion: a sheep model of vCJD. *PLoS ONE* 6, e23169.

Van der Meer, P.F. (2007a). Platelet additive solutions: a future perspective. *Transfus Clin Biol* 14, 522–525.

Van der Meer, P.F. (2007b). Platelet additive solutions: A future perspective. *Transfusion Clinique Et Biologique* 14, 522–525.

Minguell, J.J., Erices, A., and Conget, P. (2001). Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.* (Maywood) 226, 507–520.

Ministère des Affaires Sociales, de la Santé et de la Ville (1994). Arrêté du 5 avril 1994 portant homologation du règlement de l'Agence française du sang relatif aux caractéristiques de certains produits sanguins labiles et modifiant l'arrêté du 15 novembre 1993 portant homologation du règlement de l'Agence française du sang relatif aux caractéristiques de certains produits sanguins labiles et pris en application de l'article L. 666-8 du code de la santé publique (*Journal Officiel* 1994).

Ministère des Affaires Sociales, de la Santé et de la Ville (1998). Arrêté du 30 mars 1998 portant homologation du règlement de l'Agence française du sang relatif à la liste des produits sanguins labiles et pris en application de l'article L. 666-8 du code de la santé publique et modifiant l'arrêté du 5 avril 1994 modifié portant homologation du règlement de l'Agence française du sang relatif aux caractéristiques de certains produits sanguins labiles - *Journal Officiel* - 5 avril 1998 - Id 38294153 - vLex. *Journal Officiel* 5331–5333.

- Mito, T., Suzuki, T., Kobayashi, T., Zheng, X., Hayashi, Y., Shiraishi, A., and Ohashi, Y. (2012). Effect of photodynamic therapy with methylene blue on acanthamoeba in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 6305–6313.
- Mohammed, H., Linnen, J.M., Muñoz-Jordán, J.L., Tomashek, K., Foster, G., Broulik, A.S., Petersen, L., and Stramer, S.L. (2008). Dengue virus in blood donations, Puerto Rico, 2005. *Transfusion* 48, 1348–1354.
- Mohr, H., Bachmann, B., Klein-Struckmeier, A., and Lambrecht, B. (1997). Virus inactivation of blood products by phenothiazine dyes and light. *Photochem. Photobiol.* 65, 441–445.
- Mohr, H., Knüver-Hopf, J., Gravemann, U., Redecker-Klein, A., and Müller, T.H. (2004). West Nile virus in plasma is highly sensitive to methylene blue-light treatment. *Transfusion* 44, 886–890.
- Müller-Breitkreutz, K., and Mohr, H. (1998). Hepatitis C and human immunodeficiency virus RNA degradation by methylene blue/light treatment of human plasma. *J. Med. Virol.* 56, 239–245.
- Nájera, R., Herrera, M.I., and De Andrés, R. (1987). Human immunodeficiency virus and related retroviruses. *West. J. Med.* 147, 702–708.
- Nakahara, H., Bruder, S.P., Haynesworth, S.E., Holecek, J.J., Baber, M.A., Goldberg, V.M., and Caplan, A.I. (1990). Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone* 11, 181–188.
- Nakao, M., Nakao, T., Yoshikawa, H., Wada, T., Takaku, H., and Nakao, K. (1962). A new preservative medium containing adenine and inosine. *Bibl Haematol* 13, 455–461.
- Nevins, M., Giannobile, W.V., McGuire, M.K., Kao, R.T., Mellonig, J.T., Hinrichs, J.E., McAllister, B.S., Murphy, K.S., McClain, P.K., Nevins, M.L., et al. (2005). Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain: results of a large multicenter randomized controlled trial. *J. Periodontol.* 76, 2205–2215.
- Ni, H., and Freedman, J. (2003). Platelets in hemostasis and thrombosis: role of integrins and their ligands. *Transfus. Apher. Sci.* 28, 257–264.

- Nauta, A. J. and W. E. Fibbe (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110(10), 3499-3506.
- Nowak, T., Niedrig, M., Bernhardt, D., and Hilfenhaus, J. (1993). Inactivation of HIV, HBV, HCV related viruses and other viruses in human plasma derivatives by pasteurisation. *Dev. Biol. Stand.* 81, 169–176.
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007–4021.
- Ohnishi, S., Ohgushi, H., Kitamura, S., and Nagaya, N. (2007). Mesenchymal stem cells for the treatment of heart failure. *Int. J. Hematol.* 86, 17–21.
- Oksanen, K., Ebeling, F., Kekomäki, R., Elonen, E., Sahlstedt, L., Volin, L., and Myllylä, G. (1994). Adverse reactions to platelet transfusions are reduced by use of platelet concentrates derived from buffy coat. *Vox Sang.* 67, 356–361.
- Oreffo, R.O.C. (2004). Growth factors for skeletal reconstruction and fracture repair. *Curr Opin Investig Drugs* 5, 419–423.
- Osselaer, J.-C., Debry, C., Goffaux, M., Pineau, J., Calomme, G., Dubuc, E., Chatelain, B., Vandendaele, M.-C., Hsu, J., Rheinschmidt, M., et al. (2008). Coagulation function in fresh-frozen plasma prepared with two photochemical treatment methods: methylene blue and amotosalen. *Transfusion* 48, 108–117.
- Owada, T., Yamada, Y., Abe, H., Hirayama, J., Ikeda, H., Sekiguchi, S., and Ikebuchi, K. (2000). Elucidation of the HIV-1 virucidal mechanism of methylene blue photosensitization and the effect on primary isolates. *J. Med. Virol.* 62, 421–425.
- Owen, M., and Friedenstein, A.J. (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found. Symp.* 136, 42–60.
- Owen, M.E., Cavé, J., and Joyner, C.J. (1987). Clonal analysis in vitro of osteogenic differentiation of marrow CFU-F. *J. Cell. Sci.* 87 ( Pt 5), 731–738.
- Paganin, F., Borgherini, G., Staikowsky, F., Arvin-Berod, C., and Poubeau, P. (2006). [Chikungunya on Reunion Island: chronicle of an epidemic foretold]. *Presse Med* 35, 641–646.

- Park, Y.J., Lee, Y.M., Lee, J.Y., Seol, Y.J., Chung, C.P., and Lee, S.J. (2000). Controlled release of platelet-derived growth factor-BB from chondroitin sulfate-chitosan sponge for guided bone regeneration. *J Control Release* 67, 385–394.
- Pennington, J., Taylor, G.P., Sutherland, J., Davis, R.E., Seghatchian, J., Allain, J.-P., and Williamson, L.M. (2002). Persistence of HTLV-I in blood components after leukocyte depletion. *Blood* 100, 677–681.
- Peterman, T.A., Lui, K.J., Lawrence, D.N., and Allen, J.R. (1987). Estimating the risks of transfusion-associated acquired immune deficiency syndrome and human immunodeficiency virus infection. *Transfusion* 27, 371–374.
- Phinney, D.G., Kopen, G., Righter, W., Webster, S., Tremain, N., and Prockop, D.J. (1999). Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J. Cell. Biochem.* 75, 424–436.
- Piët, M.P., Chin, S., Prince, A.M., Brotman, B., Cundell, A.M., and Horowitz, B. (1990). The use of tri(n-butyl)phosphate detergent mixtures to inactivate hepatitis viruses and human immunodeficiency virus in plasma and plasma's subsequent fractionation. *Transfusion* 30, 591–598.
- Pietersz, R.N., Reesink, H.W., De Korte, D., Dekker, W.J., Van den Ende, A., and Loos, J.A. (1989). Storage of leukocyte-poor red cell concentrates: filtration in a closed system using a sterile connection device. *Vox Sang.* 57, 29–36.
- Pillonel, J., and Laperche, S. (2005). Trends in risk of transfusion-transmitted viral infections (HIV, HCV, HBV) in France between 1992 and 2003 and impact of nucleic acid testing (NAT). *Euro Surveill.* 10, 5–8.
- Pittenger, M.F., and Martin, B.J. (2004). Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. *Circ. Res.* 95, 9–20.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143–147.

- Ponte, A.L., Marais, E., Gallay, N., Langonné, A., Delorme, B., Hérault, O., Charbord, P., and Domenech, J. (2007). The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25, 1737–1745.
- Popovsky, M.A., Abel, M.D., and Moore, S.B. (1983). Transfusion-related acute lung injury associated with passive transfer of antileukocyte antibodies. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128, 185–189.
- Pountos, I., and Giannoudis, P.V. (2005). Biology of mesenchymal stem cells. *Injury* 36 *Suppl 3*, S8–S12.
- Quarto, R., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., Kutepov, S.M., Mukhachev, V., Lavroukov, A., Kon, E., and Marcacci, M. (2001). Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N. Engl. J. Med.* 344, 385–386.
- Quirici, N., Soligo, D., Bossolasco, P., Servida, F., Lumini, C., and Deliliers, G.L. (2002). Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp. Hematol.* 30, 783–791.
- Rabilloud, T., Valette, C., and Lawrence, J.J. (1994). Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension. *Electrophoresis* 15, 1552–1558.
- Rabilloud, T., Adessi, C., Giraudel, A., and Lunardi, J. (1997). Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18, 307–316.
- Rawal, B., Yen, T.S., Vyas, G.N., and Busch, M. (1991). Leukocyte filtration removes infectious particulate debris but not free virus derived from experimentally lysed HIV-infected cells. *Vox Sang.* 60, 214–218.
- Redler, L.H., Thompson, S.A., Hsu, S.H., Ahmad, C.S., and Levine, W.N. (2011). Platelet-rich plasma therapy: a systematic literature review and evidence for clinical use. *Phys Sportsmed* 39, 42–51.

- Reikvam, H., Marschner, S., Apelseth, T.O., Goodrich, R., and Hervig, T. (2010). The Mirasol® Pathogen Reduction Technology system and quality of platelets stored in platelet additive solution. *Blood Transfus* 8, 186–192.
- Rennie, I., Rawlinson, P.S.M., and Clark, P. (2001). Universal leukodepletion of blood and febrile transfusion reactions. *Transfusion Medicine* 11, 115–115.
- Reyes, M., Dudek, A., Jahagirdar, B., Koodie, L., Marker, P.H., and Verfaillie, C.M. (2002). Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J. Clin. Invest.* 109, 337–346.
- Riedner, C., Heim, M.U., Mempel, W., and Wilmanns, W. (1990). Possibility to improve preservation of whole blood by leukocyte-depletion before storage. *Vox Sang.* 59, 78–82.
- Ringwald, J., Zimmermann, R., and Eckstein, R. (2006). The New Generation of Platelet Additive Solution for Storage at 22°C: Development and Current Experience. *Transfusion Medicine Reviews* 20, 158–164.
- Van Rood, J.J., and Van Leeuwen, A. (1963). Leukocyte grouping. A method and its application. *J. Clin. Invest.* 42, 1382–1390.
- Roth, W.K., Weber, M., and Seifried, E. (1999). Feasibility and efficacy of routine PCR screening of blood donations for hepatitis C virus, hepatitis B virus, and HIV-1 in a blood-bank setting. *Lancet* 353, 359–363.
- Ruane, P.H., Edrich, R., Gampp, D., Keil, S.D., Leonard, R.L., and Goodrich, R.P. (2004). Photochemical inactivation of selected viruses and bacteria in platelet concentrates using riboflavin and light. *Transfusion* 44, 877–885.
- Ruskin, J.D., Hardwick, R., Buser, D., Dahlin, C., and Schenk, R.K. (2000). Alveolar ridge repair in a canine model using rhTGF-beta 1 with barrier membranes. *Clin Oral Implants Res* 11, 107–115.
- Salingcarnboriboon, R., Yoshitake, H., Tsuji, K., Obinata, M., Amagasa, T., Nifuji, A., and Noda, M. (2003). Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Exp. Cell Res.* 287, 289–300.

- Sanchez, J.C., Hochstrasser, D., and Rabilloud, T. (1999). In-gel sample rehydration of immobilized pH gradient. *Methods Mol. Biol.* *112*, 221–225.
- Sánchez, M., Azofra, J., Anitua, E., Andía, I., Padilla, S., Santisteban, J., and Mujika, I. (2003). Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Med Sci Sports Exerc* *35*, 1648–1652.
- Sánchez, M., Anitua, E., Azofra, J., Andía, I., Padilla, S., and Mujika, I. (2007). Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med* *35*, 245–251.
- Sánchez, M., Anitua, E., Azofra, J., Aguirre, J.J., and Andia, I. (2008). Intra-articular injection of an autologous preparation rich in growth factors for the treatment of knee OA: a retrospective cohort study. *Clin. Exp. Rheumatol.* *26*, 910–913.
- Sánchez, M., Anitua, E., Orive, G., Mujika, I., and Andia, I. (2009). Platelet-rich therapies in the treatment of orthopaedic sport injuries. *Sports Med* *39*, 345–354.
- Sawyer, L., Hanson, D., Castro, G., Luckett, W., Dubensky, T.W., Jr, and Stassinopoulos, A. (2007). Inactivation of parvovirus B19 in human platelet concentrates by treatment with amotosalen and ultraviolet A illumination. *Transfusion* *47*, 1062–1070.
- Schoenfeld, H., Pruss, A., Keller, M., Schuster, M., Meinck, K., Neuner, B., and Von Heymann, C. (2010). Lyophilised plasma: evaluation of clotting factor activity over 6 days after reconstitution for transfusion. *J. Clin. Pathol.* *63*, 726–730.
- Schwartz, R.E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, T., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W.-S., and Verfaillie, C.M. (2002). Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.* *109*, 1291–1302.
- Von Seefried, A., and MacMoline, H.G. (1976). The use of foetal, calf and adult bovine sera for the growth of serially subcultivated diploid cells. *Dev. Biol. Stand.* *37*, 83–89.
- Selvaggi, T.A., Walker, R.E., and Fleisher, T.A. (1997). Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood* *89*, 776–779.

- Sensebé, L., and Bourin, P. (2011). [Mesenchymal stem cells - The challenge of a good therapeutic product]. *Med Sci (Paris)* 27, 297–302.
- Sensebé, L., Tarte, K., Galipeau, J., Krampera, M., Martin, I., Phinney, D.G., and Shi, Y. (2012). Limited acquisition of chromosomal aberrations in human adult mesenchymal stromal cells. *Cell Stem Cell* 10, 9–10; author reply 10–11.
- Silva, W.A., Jr, Covas, D.T., Panepucci, R.A., Proto-Siqueira, R., Siufi, J.L.C., Zanette, D.L., Santos, A.R.D., and Zago, M.A. (2003). The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 21, 661–669.
- Simmons, P.J., and Torok-Storb, B. (1991). Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78, 55–62.
- Simon, E.R. (1962). Red cell preservation: further studies with adenine. *Blood* 20, 485–491.
- Solheim, B.G. (2008). Pathogen reduction of blood components. *Transfus. Apher. Sci.* 39, 75–82.
- Sorrentino, A., Ferracin, M., Castelli, G., Biffoni, M., Tomaselli, G., Baiocchi, M., Fatica, A., Negrini, M., Peschle, C., and Valtieri, M. (2008). Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. *Exp. Hematol.* 36, 1035–1046.
- Spees, J.L., Gregory, C.A., Singh, H., Tucker, H.A., Peister, A., Lynch, P.J., Hsu, S.-C., Smith, J., and Prockop, D.J. (2004). Internalized antigens must be removed to prepare hypoinmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Mol. Ther.* 9, 747–756.
- Spencer, E.M., Tokunaga, A., and Hunt, T.K. (1993). Insulin-like growth factor binding protein-3 is present in the alpha-granules of platelets. *Endocrinology* 132, 996–1001.
- Stainsby, D., Jones, H., Asher, D., Atterbury, C., Boncinelli, A., Brant, L., Chapman, C.E., Davison, K., Gerrard, R., Gray, A., et al. (2006). Serious hazards of transfusion: a decade of hemovigilance in the UK. *Transfus Med Rev* 20, 273–282.
- Su, C.-Y., Kuo, Y.P., Lin, Y.C., Huang, C.-T., Tseng, Y.H., and Burnouf, T. (2009). A virally inactivated functional growth factor preparation from human platelet concentrates. *Vox Sang.* 97, 119–128.

Sundin, M., Ringdén, O., Sundberg, B., Nava, S., Götherström, C., and Le Blanc, K. (2007). No alloantibodies against mesenchymal stromal cells, but presence of anti-fetal calf serum antibodies, after transplantation in allogeneic hematopoietic stem cell recipients. *Haematologica* 92, 1208–1215.

Swank, R.T., and Munkres, K.D. (1971). Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal. Biochem.* 39, 462–477.

Takaoka, T., and Katsuta, H. (1975). An improved synthetic medium suitable for tissue culture of various mammalian cells. *Jpn. J. Exp. Med.* 45, 11–17.

Tardivo, J.P., Del Giglio, A., De Oliveira, C.S., Gabrielli, D.S., Junqueira, H.C., Tada, D.B., Severino, D., De Fátima Turchiello, R., and Baptista, M.S. (2005). Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2, 175–191.

Tateishi-Yuyama, E., Matsubara, H., Murohara, T., Ikeda, U., Shintani, S., Masaki, H., Amano, K., Kishimoto, Y., Yoshimoto, K., Akashi, H., et al. (2002). Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 360, 427–435.

Taylor-Wiedeman, J., Sissons, J.G., Borysiewicz, L.K., and Sinclair, J.H. (1991). Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.* 72 ( Pt 9), 2059–2064.

Taylor-Wiedeman, J., Hayhurst, G.P., Sissons, J.G., and Sinclair, J.H. (1993). Polymorphonuclear cells are not sites of persistence of human cytomegalovirus in healthy individuals. *J. Gen. Virol.* 74 ( Pt 2), 265–268.

Tekkatte, C., Vidyasekar, P., Kapadia, N.K., and Verma, R.S. (2012). Enhancement of adipogenic and osteogenic differentiation of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells by supplementation with umbilical cord blood serum. *Cell Tissue Res.* 347, 383–395.

Theusinger, O.M., Baulig, W., Seifert, B., Emmert, M.Y., Spahn, D.R., and Asmis, L.M. (2011). Relative concentrations of haemostatic factors and cytokines in solvent/detergent-treated and fresh-frozen plasma. *Br J Anaesth* 106, 505–511.

Tolar, J., Bonfim, C., Grewal, S., and Orchard, P. (2006). Engraftment and survival following hematopoietic stem cell transplantation for osteopetrosis using a reduced intensity conditioning regimen. *Bone Marrow Transplant.* 38, 783–787.

Troxler, M., K. Dickinson, et al. (2007). Platelet function and antiplatelet therapy. *Br J Surg* 94(6), 674-682.

Tse, H.-F., Yiu, K.-H., and Lau, C.-P. (2007). Bone marrow stem cell therapy for myocardial angiogenesis. *Curr Vasc Pharmacol* 5, 103–112.

Tuschong, L., Soenen, S.L., Blaese, R.M., Candotti, F., and Muul, L.M. (2002). Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy. *Hum. Gene Ther.* 13, 1605–1610.

Uccelli, A., Milanese, M., Principato, M.C., Morando, S., Bonifacino, T., Vergani, L., Giunti, D., Voci, A., Carminati, E., Giribaldi, F., et al. (2012). Intravenous mesenchymal stem cells improve survival and motor function in experimental amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Med.* 18, 794–804.

Ulloa-Montoya, F., Kidder, B.L., Pauwelyn, K.A., Chase, L.G., Luttun, A., Crabbe, A., Geraerts, M., Sharov, A.A., Piao, Y., Ko, M.S.H., et al. (2007). Comparative transcriptome analysis of embryonic and adult stem cells with extended and limited differentiation capacity. *Genome Biol.* 8, R163.

Verfaillie, C.M. (2005). Multipotent adult progenitor cells: an update. *Novartis Found. Symp.* 265, 55–61; discussion 61–65, 92–97.

Verfaillie, C.M., Schwartz, R., Reyes, M., and Jiang, Y. (2003). Unexpected potential of adult stem cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 996, 231–234.

Vinatier, C., Bordenave, L., Guicheux, J., and Amédée, J. (2011). [Stem cells for osteoarticular and vascular tissue engineering]. *Med Sci (Paris)* 27, 289–296.

Van Voorhis, W.C., Barrett, L.K., Eastman, R.T., Alfonso, R., and Dupuis, K. (2003). Trypanosoma cruzi inactivation in human platelet concentrates and plasma by a psoralen (amotosalen HCl) and long-wavelength UV. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 475–479.

- De Vos, R.J., Van Veldhoven, P.L.J., Moen, M.H., Weir, A., Tol, J.L., and Maffulli, N. (2010). Autologous growth factor injections in chronic tendinopathy: a systematic review. *Br. Med. Bull.* 95, 63–77.
- Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., Saffrich, R., Benes, V., Blake, J., Pfister, S., Eckstein, V., et al. (2008). Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS ONE* 3, e2213.
- Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S.J., Young, R.G., Mansour, J.M., Caplan, A.I., and Goldberg, V.M. (1994). Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 76, 579–592.
- Wakitani, S., Saito, T., and Caplan, A.I. (1995). Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 18, 1417–1426.
- Warnke, P.H., Wiltfang, J., Springer, I., Acil, Y., Bolte, H., Kosmahl, M., Russo, P.A.J., Sherry, E., Lützen, U., Wolfart, S., et al. (2006). Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. *Biomaterials* 27, 3163–3167.
- Watt-Smith, S. (2005). Dental and craniofacial applications of platelet-rich plasma. *British Dental Journal* 199, 799–799.
- Weibrich, G., Hansen, T., Kleis, W., Buch, R., and Hitzler, W.E. (2004). Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 34, 665–671.
- Werner, S., and Grose, R. (2003). Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol. Rev.* 83, 835–870.
- Whitman, D.H., Berry, R.L., and Green, D.M. (1997). Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 55, 1294–1299.
- De Wildt-Eggen, J., and Gulliksson, H. (2003). In vivo and in vitro comparison of platelets stored in either synthetic media or plasma. *Vox Sang.* 84, 256–264.
- De Wildt-Eggen, J., Nauta, S., Schrijver, J.G., Van Marwijk Kooy, M., Bins, M., and Van Prooijen, H.C. (2000). Reactions and platelet increments after transfusion of platelet

concentrates in plasma or an additive solution: a prospective, randomized study. *Transfusion* 40, 398–403.

Wilhelm, J.A., Matter, L., and Schopfer, K. (1986). The risk of transmitting cytomegalovirus to patients receiving blood transfusions. *J. Infect. Dis.* 154, 169–171.

Williamson, L.M., Cardigan, R., and Prowse, C.V. (2003). Methylene blue-treated fresh-frozen plasma: what is its contribution to blood safety? *Transfusion* 43, 1322–1329.

Wollert, K.C., Meyer, G.P., Lotz, J., Ringes-Lichtenberg, S., Lippolt, P., Breidenbach, C., Fichtner, S., Korte, T., Hornig, B., Messinger, D., et al. (2004). Intracoronary autologous bone-marrow cell transfer after myocardial infarction: the BOOST randomised controlled clinical trial. *Lancet* 364, 141–148.

Wollowitz, S. (2001). Fundamentals of the psoralen-based Helinx technology for inactivation of infectious pathogens and leukocytes in platelets and plasma. *Semin. Hematol.* 38, 4–11.

Wollowitz, S. (2004). Targeting DNA and RNA in Pathogens: Mode of Action of Amotosalen HCl. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 31, 11–16.

Xia, H., Vijayaraghavan, B., Belák, S., and Liu, L. (2011). Detection and identification of the atypical bovine pestiviruses in commercial foetal bovine serum batches. *PLoS ONE* 6, e28553.

Yañez, R., Lamana, M.L., García-Castro, J., Colmenero, I., Ramírez, M., and Bueren, J.A. (2006). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem Cells* 24, 2582–2591.

Young, H.E., Steele, T.A., Bray, R.A., Hudson, J., Floyd, J.A., Hawkins, K., Thomas, K., Austin, T., Edwards, C., Cuzzourt, J., et al. (2001). Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors. *Anat. Rec.* 264, 51–62.

Zafranskaya, M.M., Nizheharodova, D.B., Yurkevich, M.Y., Lamouskaya, N.V., Motuzova, Y.M., Bagatka, S.S., Ivanchik, H.I., and Fedulov, A.S. (2012). In vitro assessment of

mesenchymal stem cells immunosuppressive potential in multiple sclerosis patients. *Immunol. Lett.*

Zhang, X.S., Linkhart, T.A., Chen, S.-T., Peng, H., Wergedal, J.E., Gutierrez, G.G., Sheng, M.H.-C., Lau, K.-H.W., and Baylink, D.J. (2004). Local ex vivo gene therapy with bone marrow stromal cells expressing human BMP4 promotes endosteal bone formation in mice. *J Gene Med* 6, 4–15.

Zhou, H., Guo, M., Bian, C., Sun, Z., Yang, Z., Zeng, Y., Ai, H., and Zhao, R.C. (2010). Efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of sclerodermatous chronic graft-versus-host disease: clinical report. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 16, 403–412.

(2010). A randomized controlled clinical trial evaluating the performance and safety of platelets treated with MIRASOL pathogen reduction technology. *Transfusion* 50, 2362–2375.

## FICHE TECHNIQUE

### *Préparation du mix de lysats plaquettaires (Lpmix)*

#### *Matériels*

- X poches de CPA (deleucocyté)
- Tube Falcon 50 ml (TPP (Techno Plastic Products), Suisse)

#### *Protocole*

- Aliquotage des CPA en tube
- Congélation à -35°C
- Décongélation à 37°C des tubes de divers CPA
  - Obtention de lysat plaquettaire (Lp)
- Mélange des Lp des différents CPA
  - Obtention d'un Lpmix
- Aliquotage
- Congélation à -35°C

# **Préparation d'extraits plaquettaires de grade clinique en vue d'une utilisation en bio-ingénierie cellulaire et tissulaire**

## **Résumé**

La culture de cellules est une étape fondamentale de la thérapie cellulaire et de l'ingénierie tissulaire. Les récents progrès réalisés dans ce domaine ont permis de faire passer la cellule souche d'un simple outil de recherche à l'un des fondements de la médecine régénératrice. Des progrès considérables ont été réalisés dans les procédés de culture de grade clinique mais malgré ces avancées, certains types cellulaires sont encore difficiles à produire. Ainsi, la culture de cellules stromales mésenchymateuses à des fins thérapeutiques nécessite encore de faire sauter certains verrous en particulier sécuritaires.

Pour la thérapie cellulaire et tissulaire, l'élaboration de nouveaux moyens de supplémentation en facteurs de croissance est essentielle pour amplifier les cellules et pour répondre aux normes drastiques en termes de sécurité sanitaire qui demandent d'éviter d'utiliser des produits d'origine animale.

Cette thèse a pour objectif le développement d'un nouveau produit standardisé de supplémentation de culture à partir de concentrés de plaquettes et de plasma pour améliorer la prolifération de cellules stromales mésenchymateuses. Elle a permis d'obtenir à partir de plaquettes sanguines humaines, contenant de nombreux facteurs de croissance et de plasma, une formulation de produit selon un ratio plaquettes/plasma précis favorisant l'amplification des cellules souches mésenchymateuses humaines. Ce produit dénommé Solution d'Extraits Plaquettaires et Plasmatiques (SEPP) a de plus été élaboré selon des critères de sécurité répondant aux normes sanitaires en vigueur pour le développement des Produits de Thérapie cellulaire et les Médicaments de Thérapie Innovante.

Mots-clés : Thérapie cellulaire, cellule stromale mésenchymateuse, facteurs de croissance, milieu de culture, plaquette, plasma.

## **Preparation of clinical grade platelet extracts for use in cellular and tissue engineering**

### **Summary**

The cell culture is a crucial step of cell therapy and of tissue engineering. The recent progress accomplished in this domain allowed making stem cells a central tool for regenerative medicine. These last decades, considerable progress were accomplished in the techniques of clinical grade culture but in spite of these advances, some cell types are still difficult to produce in GMP-compliant conditions. So, the Mesenchymal Stromal Cell culture for clinical use still requires blowing up some security bolts especially concerning the safety of the cell product.

For cell and tissue therapy, the elaboration of new products enriched in factors of growth is essential to amplify cells in sufficient number, and to answer the more and more drastic norms in terms of health security which recommend particularly avoiding the use of products from animal origin.

The aim of this thesis was to develop of a new standardized culture medium adjuvant obtained from concentrated solutions of platelets and plasma to increase the proliferation rate of Mesenchymal Stromal Cells. An innovative formulation of product according to a precise ratio of Platelets/plasma composition. This product named PPES (Platelet and Plasmatic Extract Solution) has been developed taking in account safety issues required by Cell Therapy Products (CTP) and Advanced Therapeutic Medical Products (ATMP) production rules.

Key words: Cell therapy, mesenchymal stromal cell, growth factor, culture medium, platelet, plasma