

# EXPANSION DES CSM ISSUES DE MOELLE OSSEUSE EN BIOREACTEUR CELLREADY 3L: CHOIX DES MICROPORTEURS



CHOUK Sonia, MICHEL Sébastien, EGELHOFER Harald, PERSOONS Virginie, MOISAN Anaïck

Unité de Thérapie et d'Ingénierie Cellulaire - EFS Rhône-Alpes Site de Saint-Ismier, 464 route de Lancey, 38330 St Ismier



## INTRODUCTION

Les Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM) de **moelle osseuse** peuvent être isolées et cultivées *ex vivo* pour une utilisation en médecine régénérative. Ce sont des cellules adhérentes au plastique qui doivent être cultivées sur des supports adaptés. Aujourd'hui, nous utilisons des contenants de type Cellstack (Corning) qui ne permettent qu'une expansion limitée de ces cellules. Afin de palier à ces limites de production et envisager une production clinique de CSM à grande échelle nous souhaitons valider leur expansion en bioréacteur à usage unique (MOBIUS Cellready 3L, Merck Millipore). Pour cela, des microporteurs en suspension dans le milieu de culture doivent être utilisés afin de permettre l'adhérence des CSM.

Nous avons testé différents microporteurs disponibles sur le marché pour déterminer le meilleur support adapté à une croissance optimale des CSM.

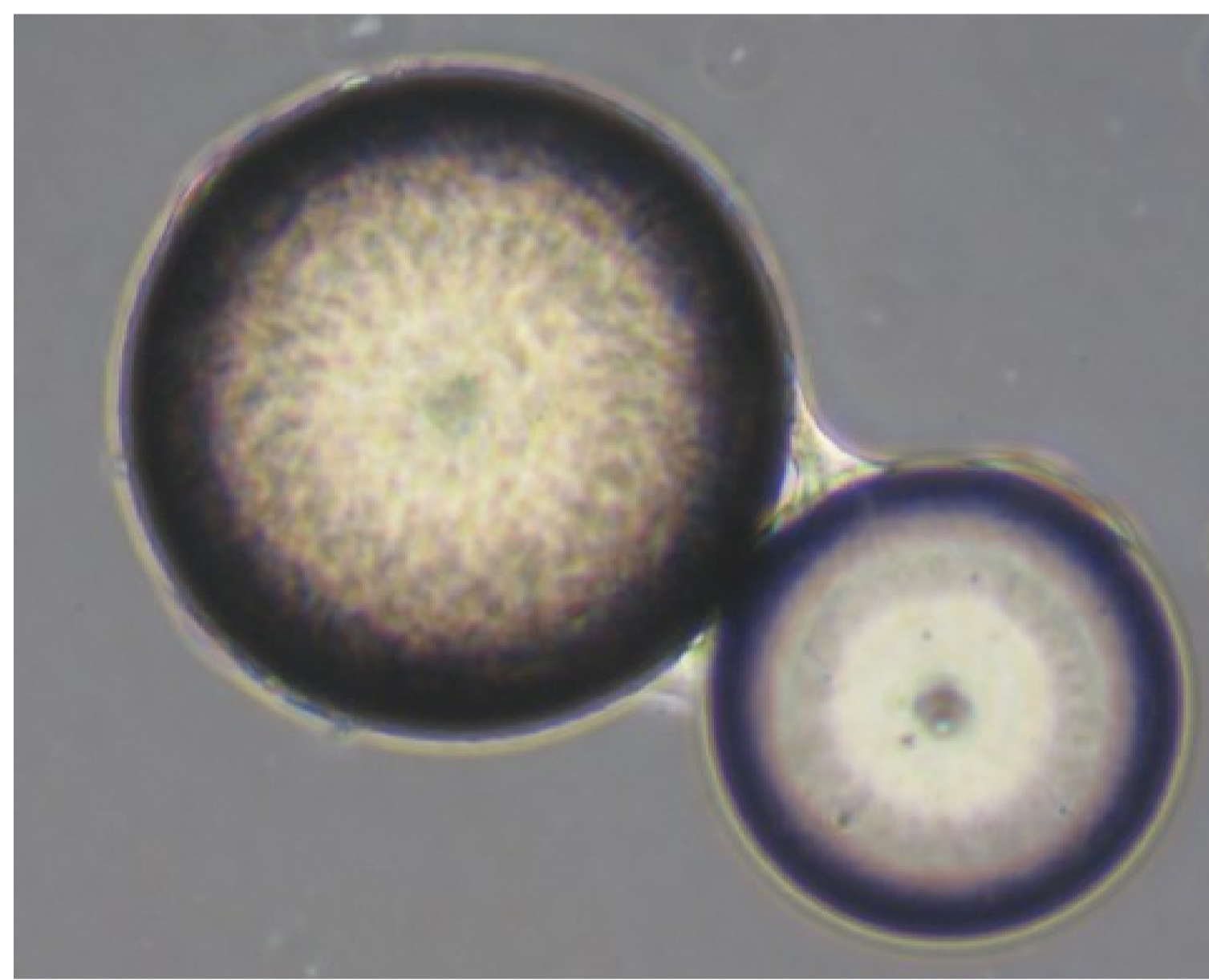
## OBJECTIFS

Choisir le meilleur microporteur et déterminer les conditions optimales de culture de CSM sur microporteurs :

- Densité optimale d'ensemencement des CSM
- Durée de trypsination optimale

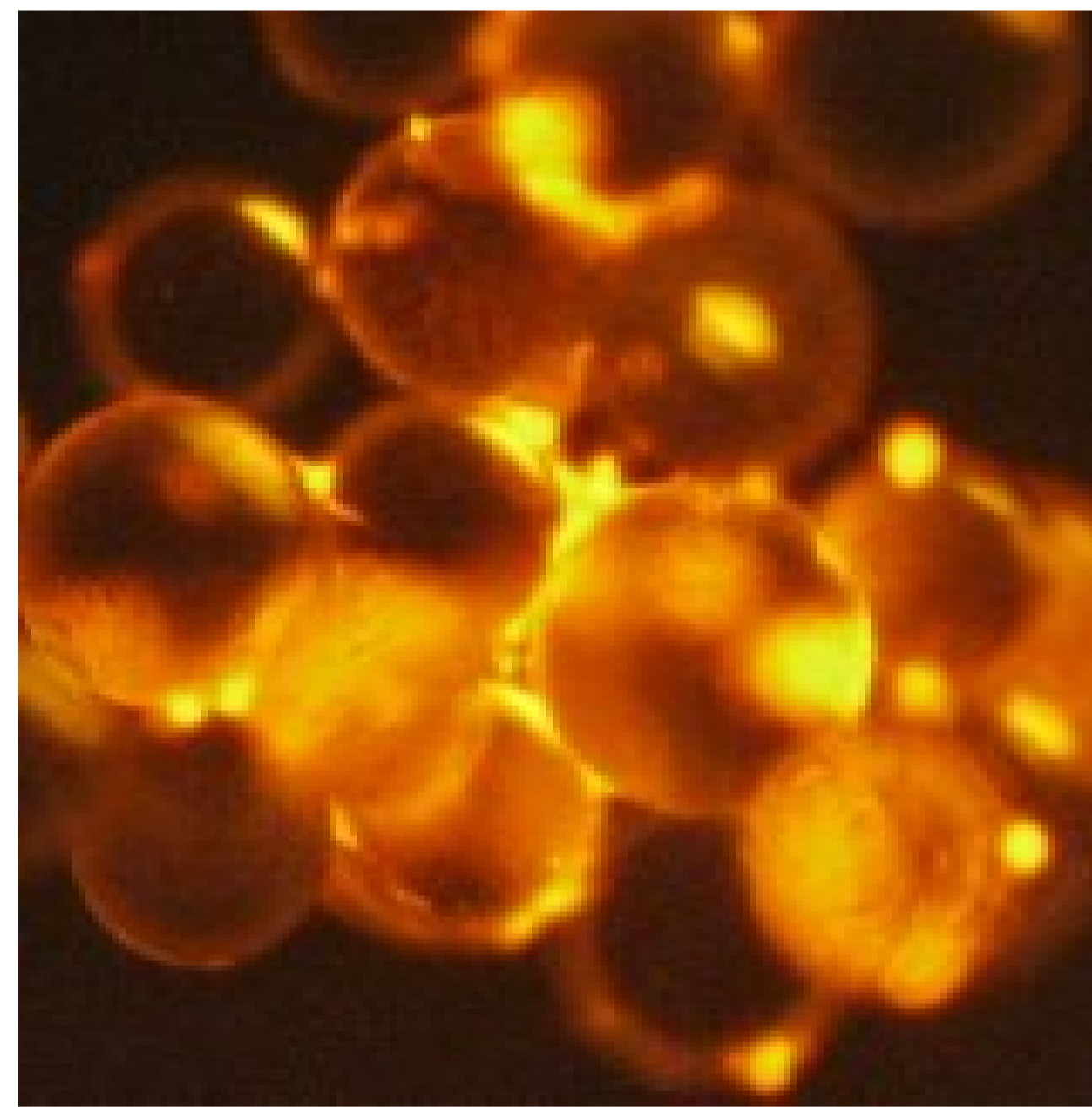
## RESULTATS

1) Les CSM adhèrent aux microporteurs testés

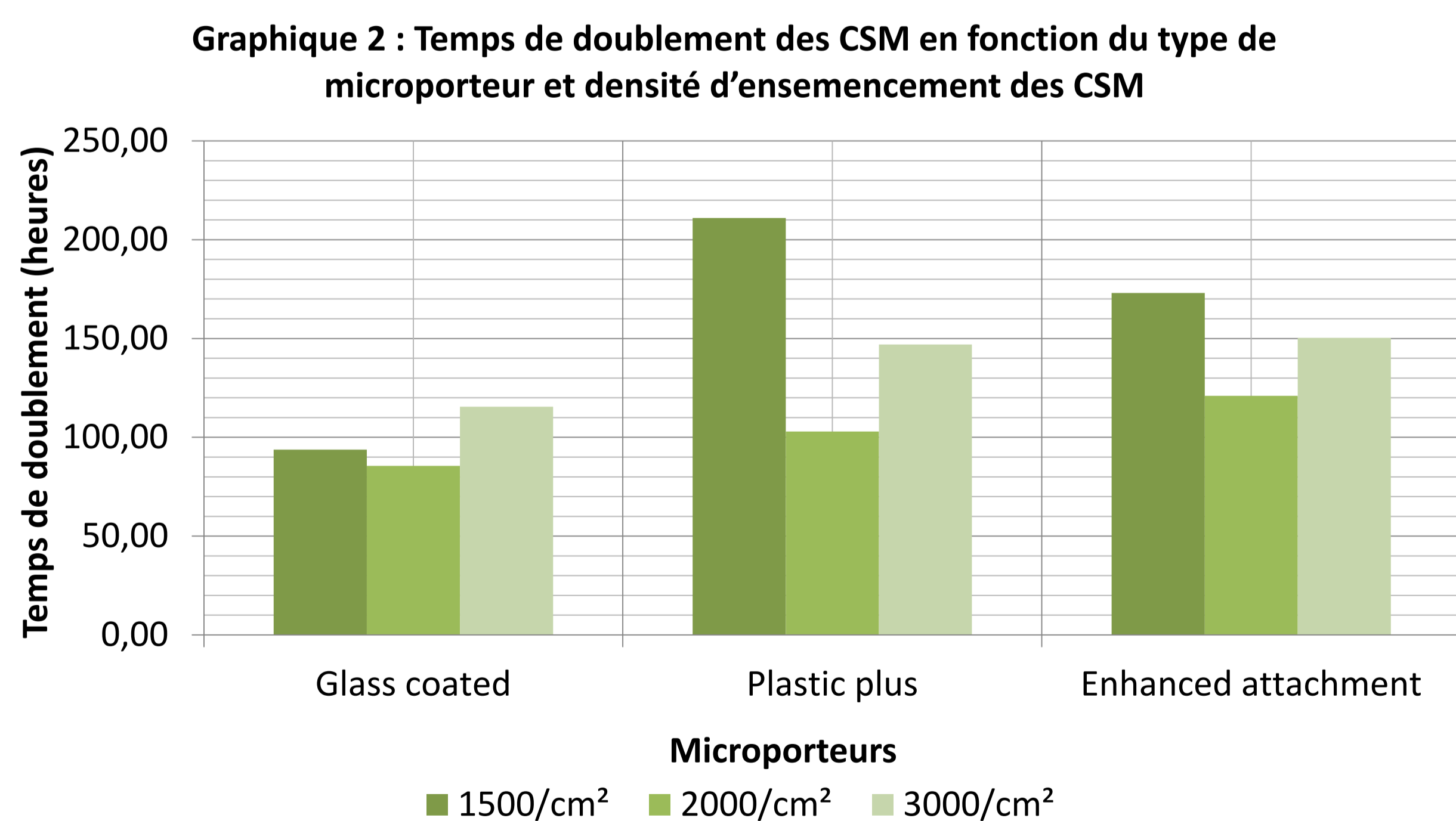


Microporteur Glass Coated (J3 de culture) x20 sans coloration

2) Formation d'amas de microporteurs



Microporteur Glass Coated (J10 de culture) x10 coloration au pkh26 (red fluorescent cell linker mini kit)



Parmi les microporteurs testés, Plastic Plus, Glass Coated et Enhanced Attachment ont donné les meilleurs résultats d'expansion (graphique 1). Le meilleur temps de doublement a été obtenu avec une densité d'ensemencement de 2000 cellules/cm<sup>2</sup> (graphique 2), qui correspond au double de la densité habituellement utilisée avec la méthode d'expansion sur plastique. La durée de trypsination (tableau ci-dessous) a été testée sur le microporteur ayant donné les meilleurs résultats d'expansion (Glass-coated). Le nombre de cellules récoltées a été plus important avec une trypsination de 10 minutes.

Microporteur	Densité ensemencement	Nb cellules ensemencées	Temps trypsination	Numération Malassez après trypsination
GLASS COATED	2000/cm <sup>2</sup>	108 000	7 min	140 000
		108 000	10 min	144 400
		108 000	15 min	87 000

Tableau 1 : Test de la durée de trypsination sur 1 type de microporteur avec ensemencement de 2000 CSM/cm<sup>2</sup>

## MATERIELS

**Cellules :** CSM issues de moelle osseuse (passage P2)

**Microporteurs:**

Microporteur	Fournisseur	Matériau	Revêtement	Diamètre moyen (micron)	Surface (g/cm <sup>2</sup> )	Conditionnement
Plastic	Solohill	Polystyrène	Plastic	125-212	360	Non stérile (autoclavable)
Plastic plus	Solohill		Cationic			
Pronectin F	Solohill		Recombinant RGD-contained protein coated			
Glass coated	Solohill		Glass coated			
Synthemax II	Corning		Proprietary peptide acrylate chemistry			
Enhanced attachment	Corning		Microwave treating			

**Milieu et support de culture :**

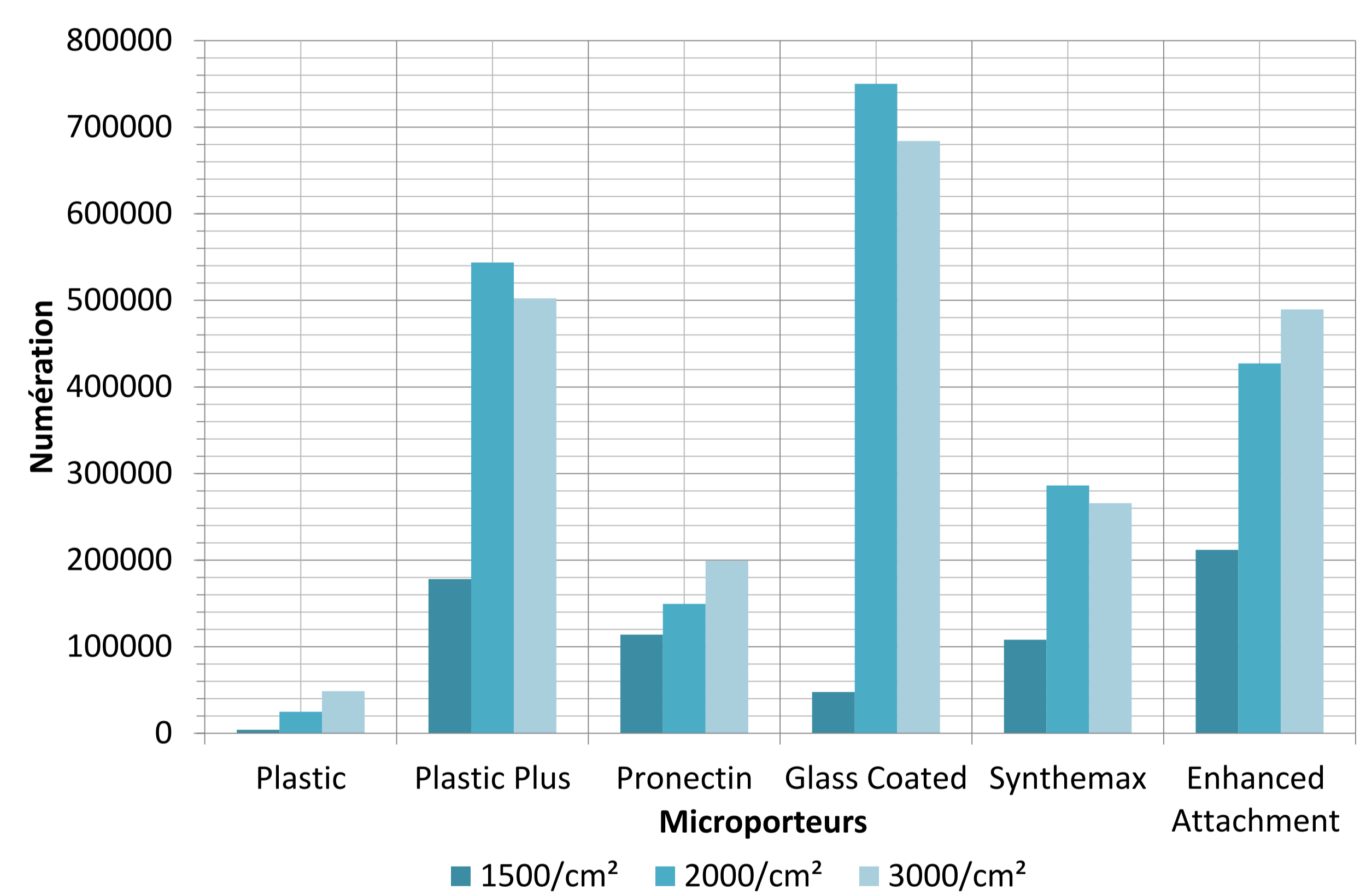
- MEMa + 10% SVF + 1% glutamine + 1% pénicilline/streptomycine + BFGF
- Boîtes de petri corning ultralow attachment 100 mm x 20mm (surface 54cm<sup>2</sup>)

## METHODES

Les CSM sont mises en culture statique dans des boîtes de Petri avec chaque microporteur à tester et à 3 densités d'ensemencement : 1500, 2000, 3000 cellules/cm<sup>2</sup> (concentration des microporteurs à 15g/L). Après 10 jours à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> les CSM sont trypsines puis filtrées sur un filtre 100 µm pour enlever les microporteurs.

Une numération des CSM associées aux microporteurs avant trypsination est réalisée pour chaque condition, à l'aide d'un Nucleocounter (NC-200, Via-1 Cassette, Chemometec). Avec le microporteur qui a donné les meilleurs résultats, 3 durées de trypsination (7, 10 et 15min) ont été testées.

Graphique 1 : Numération des CSM à J10 de culture en fonction du type de microporteur et de la densité d'ensemencement des CSM



## CONCLUSION

- Meilleure production de CSM obtenue avec les microporteurs: Plastic Plus, Glass Coated et Enhanced Attachment (graph. 1)
- Meilleur temps de doublement des CSM obtenu avec une densité d'ensemencement des CSM de 2000/cm<sup>2</sup> (graph. 2)
- Meilleur temps de trypsination observé à 10 min (tab.1)

Les microporteurs Glass-Coated ont donné les meilleurs résultats d'expansion en culture statique. Cependant, en vue d'une application clinique et d'une production en condition MTI-PP/MTI, nous avons décidé d'utiliser les microporteurs Enhanced Attachment. En effet, le temps de doublement obtenu avec ces microporteurs après 10 jours de culture est acceptable, ils sont stériles et conditionnés en poche, ce qui n'est pas le cas des Glass-Coated. Pour nos 3 runs de validation en bioréacteur Cellready, nous utilisons donc les microporteurs Corning Enhanced Attachment à une densité d'ensemencement de 2000 cellules/cm<sup>2</sup> et une durée de trypsination de 10 minutes.