Vecteurs synthétiques et approche mécano-biologique permettant d'optimiser l'utilisation des cellules souches en médecine régénérative

Assia Rmaidi

▶ **To cite this version:**

Assia Rmaidi. Vecteurs synthétiques et approche mécano-biologique permettant d'optimiser l'utilisation des cellules souches en médecine régénérative. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2019. Français. NNT : 2019ANGE0014 . tel-02918189

HAL Id: tel-02918189
https://theses.hal.science/tel-02918189

Submitted on 20 Aug 2020

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

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

UNIVERSITE BIOLOGIE BRETAGNE SANTE LOIRE

université angers

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605
Biologie Santé
Spécialité : *Sciences pharmaceutiques*

Par
Assia RMAIDI

Vecteurs synthétiques et approche mécano-biologique permettant d'optimiser l'utilisation des cellules souches en médecine régénérative

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 01/07/2019
Unité de recherche : INSERM CRCINA U1232 Cancer and Immunology Research Centre Nantes-Angers
Thèse N° : 140445

Rapporteurs avant soutenance :

Dr. Jean LE BIDEAU
Professeur des université, Université de Nantes, France
Dr. Anne SAPIN-MINET
Maitre de conférences HDR, Université de Lorraine, France

Composition du Jury :

Rapporteurs :
Dr. Jean LE BIDEAU
Professeur des universités, Université de Nantes, France
Dr. Anne SAPIN-MINET
Maitre de conférences HDR, Université de Lorraine, France
Examinateur :
Xavier GARRIC
Professeur des universités, Université de Montpellier 1, France
Directeur de thèse :
Dr. Claudia MONTERO-MENEI
CMU, Université d'Angers, France
Co-directeur de thèse :
Dr. Frank BOURY
Professeur des universités, Université d'Angers, France
Co-encadrant de thèse :
Dr. Nicolas DELORME
Professeur des universités, Le Mans Université, France

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :

- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).

- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.

- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :
http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.

RÉSUMÉ

Une approche de la médecine régénérative du système nerveux consiste à développer des substituts biologiques avec une fonction réparatrice en utilisant des cellules souches et des biomatériaux qui peuvent être recouverts des molécules de la matrice extracellulaire. Nous avons ainsi développé des microcarriers pharmacologiquements actifs, MPA. Ce sont des microsphères (MS) polymériques à base de PLGA, biodégradables et biocompatibles, recouvertes des molécules d'adhérence qui fournissent un support en 3-dimensions aux cellules. Les microcarriers ainsi associés aux cellules souches permettent, après implantation, d'augmenter la survie et de maintenir l'état de différenciation des cellules qu'ils portent, renforçant leurs effets de réparation tissulaire. Ces MPA peuvent également libérer des facteurs de croissance encapsulés et afin d'améliorer le relargage de protéines encapsulées une nouvelle combinaison de polymère : PLGA-Poloxamer188 (P188) -PLGA a été développé dans notre laboratoire. Il a aussi été montré que les MPA de PLGA-P188-PLGA fonctionnalisées avec de la fibronectine et poly-D-lysine induisaient une meilleure prolifération de cellules souches mésenchymateuses que les MPA de PLGA. Ces cellules sont très largement utilisées en médecine régénérative car elles sont faciles à prélever, se trouvant dans la moelle osseuse, et capables de se différencier vers le lignage chondrogénique, ostéogénique et dans certaines conditions, neuronale. Nous travaillons avec une sous population de ces cellules appelées cellules MIAMI (marrow isolated adult multilineage inducible) qui s'engagent vers une différenciation en cellule neuronale après un traitement avec 2 facteurs de croissance (EGF/ bFGF) et sur un support matriciel de laminine. Dernièrement, il a été mis en évidence que les propriétés physico-chimiques des supports polymériques régissent également le comportement des cellules souches (adhésion, survie et différenciation). L'objectif de cette étude est d'étudier l'effet des propriétés physico-chimiques et mécaniques des surfaces i) des MS sur l'adsorption de laminine et poly-D-lysine et ii) des MPA sur l'adhérence et la différenciation neuronale des cellules MIAMI. Nous avons montré que la présence du bloc hydrophile « poloxamère 188 » dans la composition du polymère PLGA-P188-PLGA diminue l'adsorption de molécules d'adhérence en formant une couche sur ces surfaces. Sur les MPA de PLGA, les molécules d'adhérence s'adsorbent bien quelle que soit la charge globale des molécules. Ces deux MPA ont une charge globale positive et permettent l'attachement de cellules à leur surface. Cependant, l'adhérence à court terme de cellules est plus forte sur les MPA de PLGA comparé aux MPA de PLGA-P188-PLGA mais à la longue les cellules finissent par adhérer aux deux supports. Le PLGA-P188-PLGA présente une forte énergie libre de surface et ces MPA présentent une surface moins rigide que les MPA de PLGA. Nos résultats suggèrent que ces caractéristiques de surface permettent aux cellules d'adhérer malgré la faible quantité de laminine sur ces supports. A long terme les cellules présentent le même comportement quel que soit le type du support. Elles se différencient en cellule de type neuronal exprimant des marqueurs de neurone mature comme le neurofilament et nous trouvons le même nombre de cellules adhérées à leur surface. En outre, nous avons montré que les cellules sont capables de sécréter de la même manière des molécules de la matrice extracellulaire sur les deux types de MPA expliquant probablement la similitude de comportement à long terme.

Mots-clés : Médecine régénérative, Cellule souche mésenchymateuse, Microcarriers pharmacologiment actif, polymère, propriétés physico-chimiques, adhérence cellulaire, différenciation cellulaire.

université angers

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00

ABSTRACT

An approach to regenerative nervous system medicine is to develop biological substitutes with restorative function using stem cells and biomaterials that can be coated with extracellular matrix molecules. We have developed pharmacologically active microcarriers, PAMs. These are PLGA-based, biodegradable and biocompatible polymeric microspheres (MS) coated with adhesion molecules that provide 3-dimensional support for cells. The microcarriers thus associated with the stem cells make it possible, after implantation, to increase the survival and maintain the state of differentiation of the cells they carry, reinforcing their tissue repair effects. These PAMs can also release encapsulated growth factors and to enhance the release of encapsulated proteins a new polymer combination: PLGA-Poloxamer188 (P188) -PLGA has been developed in our laboratory. It has also been shown that PLGA-P188-PLGA PAMs functionalized with fibronectin and poly-D-lysine induce better proliferation of mesenchymal stem cells than PLGA PAMs. These cells are very widely used in regenerative medicine because they are easy to collect, found in the bone marrow, and able to differentiate towards the chondrogenic lineage, osteogenic and under certain conditions, neuronal. We are working with a subpopulation of these cells called MIAMI cells (marrow isolated adult multilineage inducible) that engage in neuronal cell differentiation after treatment with 2 growth factors (EGF / bFGF) and on a laminin matrix support. Recently, it has been demonstrated that the physicochemical properties of polymeric supports also regulate the behavior of stem cells (adhesion, survival and differentiation). The objective of this study is to study the effect of physicochemical and mechanical properties of surfaces i) MS on laminin and poly-D-lysine adsorption and ii) PAMs on adhesion and neuronal differentiation of MIAMI cells. We have shown that the presence of the hydrophilic "poloxamer 188" block in the PLGA-P188-PLGA polymer composition decreases the adsorption of adhesion molecules by forming a layer on these surfaces. On PLGA PAMs, the adhesion molecules adsorb well regardless of the overall charge of the molecules. These two PAMs have a positive overall charge and allow the attachment of cells to their surface. However, in short-term cell adhesion is stronger on PLGA PAMs compared to PLGA-P188-PLGA PAMs, but in the long-term the cells eventually adhere to both supports. PLGA-P188-PLGA has a high free surface energy and these PAMs have a less rigid surface than PLGA PAMs. Our results suggest that these surface characteristics allow cells to adhere despite the low amount of laminin on these supports. In the long-term the cells exhibit the same behavior whatever the type of PAMs. They differentiate into neuronal cells expressing mature neuron markers such as the neurofilament-M and we find the same number of cells adhered to their surface. Furthermore, we have shown that cells are able to secrete extracellular matrix molecules in the same way on both types of PAMs, probably explaining the similarity of the behavior in long-term.

Keywords: Regenerative medicine, mesenchymal stem cell, pharmacologically active microcarriers, polymer, physicochemical properties, cell adhesion, cell differentiation.

université angers

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) .....
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le jj / mm / aaaa

Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint à tous les rapports, dossiers, mémoires.

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une collaboration scientifique entre le Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers (CRCINA), l'équipe 17 : Design et application de traitements locaux innovants dans le glioblastome (GLIAD) Angers et l'Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM)- Le Mans université. Ce travail de thèse a été réalisé grâce au projet MECASTEM qui été financé par la Région Pays de La Loire.

REMERCIEMENT

Faire une thèse de doctorat, signifie être prêt de commencer une aventure spéciale dans le parcours professionnel et personnel. Fierté, autonomie, stress, fatigue…sont tous des sentiments à ressentir par chaque doctorant. Toute au long de la période de la thèse, le doctorant réussit à améliorer ses connaissances et des compétences scientifiques.

Avant même d'entamer ce travail je rêvais déjà de rédiger ces quelques lignes. 3 ans et demi ont passé. J'ai les mains moites, je tremble et mon cœur bat la chamade. L'émotion probablement. Il me sera très difficile de remercier tout le monde car c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit de thèse ont été effectués au Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers (CRCINA), dont le directeur est Mr **Marc GREGOIRE**, plus spécifiquement dans l'équipe 17 : Design et application de traitements locaux innovants dans le glioblastome (GLIAD) Angers, France, dont le chef d'équipe est Mr **Emmanuel Garcion** et à l'Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM) du Mans université, France, dont le directeur est Mr **Laurent FONTAINE**. Je leur présente mes premiers et sincères remerciements de m'avoir accueilli dans leurs laboratoires. Je leur saurais gré de la confiance qu'ils m'ont apportée et de l'opportunité qu'ils m'ont donnée pour développer ces travaux de recherche en mettant à ma disposition tous les équipements et outils nécessaires dans le but de mener à bien ce projet de thèse.

Je souhaiterais tout d'abord exprimer ma gratitude particulière à ma directrice de thèse, la professeure **Claudia MONTERO-MENEI** de l'Université d'Angers, France. J'ai énormément apprécié de travailler avec vous et j'ai acquis avec vous une immense connaissance en biologie et surtout en domaine des cellules souches pendant toute la période de ma thèse, surtout que ce domaine a été nouveau pour moi. Je tiens à vous remercier de suivre mon travail en détaille et de me permettre de progresser petit à petit en tant que chercheuse. Merci pour votre patience avec moi, au cours de mon travail sur la partie biologique et à chaque fois quand je faisais des erreurs, vous m'encouragez

toujours pour que je corrige mes fautes, « je sais bien que tu sais » et « tu es capable » c'étaient des phrases que j'ai trop entendu par vous, ce qui m'a vraiment prodigué. Je suis vraiment reconnaissante pour ce genre d'encouragement et de soutien qui m'a aidé à apprendre beaucoup de choses. Je suis ravi d'avoir travaillé en sa compagnie car outre son appui scientifique, elle a toujours été là pour me soutenir et me conseiller au cours de l'élaboration de cette thèse. Enfin, je vous remercie pour les grandes compétences et les connaissances que vous m'avez transmises et qui m'a fait partager ses brillantes intuitions. Votre contribution à ma réussite aujourd'hui est hautement reconnue.

Je voudrais exprimer ma sincère gratitude à mon co-directeur de thèse, le professeur **Frank BOURY**, de l'Université d'Angers, France. Je vous remercie pour votre implication et votre participation à mon projet de recherche, votre patience à expliquer certains raisonnements théoriques en domaine des polymères, ainsi que pour vos conseils. J'avais l'honneur d'être sous votre encadrement je cède alors un grand remerciement à vous car vous m'avez fait confiance et que vous étiez sûr que je suis apte de bien développer ce sujet de thèse.

Je remercie tout particulièrement mon co-encadrant de thèse, le professeur **Nicolas DELORME** du Mans Université, France. À titre professionnel, je vous remercie pour les échanges scientifiques si enrichissants, pour le regard physico-chimique et l'ouverture que vous m'avez apportée, ainsi de m'avoir donné la possibilité de passer un an de ma thèse dans votre unité de recherche Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM). À titre plus personnel, je vous remercie pour votre bienveillance, votre gentillesse, votre compréhension, votre soutien, et en un mot votre grande humanité.

Je voudrais remercier vivement les membres de jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je remercie le professeur **Jean LE BIDEAU** de l'Université de Nantes, France et la professeure **Anne SAPIN-MINET** de l'Université de Lorraine, France. Votre participation en tant que rapporteurs de ce travail de thèse a été un grand honneur pour moi. Je remercie le professeur **Xavier GARRIC** de l'Université de Montpellier 1, France, d'apporter ses expertises transverses pour examiner ce travail et encore pour enrichir ce jury de thèse pluridisciplinaire.

Je remercie aussi sincèrement les membres de mon comité de suivi individuel de ma thèse, le professeur **Mischa ZELZER** de l'Université de Nottingham, Royaume-Uni, et le professeur **Lionel SANGUINET** de l'Université d'Angers, France, pour leurs brillants commentaires et suggestions tout au long des réunions du comité de suivi individuel de thèse. Je me suis vraiment développée pour bien comprendre le projet et surmonter des défis majeurs dans mon travail de recherche.

Je voudrais remercier le professeur **Xavier GARRIC** UMR5247 de l'université de Montpellier 1, France, de m'avoir fourni le polymère pour mes travaux de recherche. Merci également à l'assistant professeur clinique **Gaëtan DELCROIX**, de l'Université de Miami, États-Unis, de m'avoir fourni des produits nécessaires pour la culture cellulaire.

Je vous remercie du fond du cœur, **Laurence SINDJI**, CRCINA-GLIAD, Université d'Angers, France, de m'avoir formée en biologie et aussi de votre suit attentive de mes manipulations. Merci pour vos conseils techniques multiples notamment en prévention, hygiène et sécurité. Merci pour votre aide durant ces années, pour votre attention lorsque j'avais un problème ou bien quand j'étais malade, elle faisait mes manipulations à ma place sans aucune hésitation. Merci pour votre gentillesse, votre temps, votre patience, votre aide à construire des protocoles et aussi ton coup de main pour m'aider à interpréter les résultats obtenus. Je vous dois toutes les compétences techniques que j'ai acquises au cours de toutes ces années. Votre aide est toujours appréciable.

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à **Jérôme CAYON** et **Catherine GUILLET** de la plateforme PACEM, **Rodolphe PERROT** et **Romain MALLET** du Service Commun d'Imagerie et d'Analyses Microscopiques (SCIAM). Je suis très reconnaissant à eux pour leur expertise, leur temps et leur aide au cours de mes manipulations.

Je souhaite remercier mes collègues du bureau CRCINA-GLIAD: **Mathie NAJBERG**, **Hélène GREGOIRE**, **Nela BUCHTOVA**, **Déborah CASAS** et **Ulung KHOE**. Merci à **Sylvie AVRIL** pour ton soutien, ton écoute, ta disponibilité, tes conseils. Je voudrais remercier d'autres collègues de l'équipe : **Anne CLAVREUL**, **Charlotte ROY**, **Morgane MASSARD**, **Clément TETAUD**, **Muhammad HAJI MANSOR** et **Melody RIAUD**.

Merci à la Région Pays de La Loire qui a financé mon travail de thèse dans le cadre du projet **MECASTEM**.

Je tiens tout particulièrement à remercier mes copines les plus chères, **Fatima Zahra**, **Hajar**, **Souhaila**, **Soumaya**, **Soha**, **Rahma, Marwa, Naglaa** et **Douae**. Vous représentez beaucoup pour moi et vous m'avez apporté un soutien moral pour chaque étape du doctorat et suffisamment de force pour franchir tous les obstacles.

Je remercie sincèrement et affectueusement mes sœurs **Rajae**, **Laila** et **Dounia** pour leur soutien et les moments de bonheur partagés ensemble. Ces années à distance ont été très difficiles pour moi et pour vous aussi. Dounia, merci pour ton soutien, ta disponibilité, tes conseils dès que j'ai besoin même si tu es plus petite que moi. Merci d'être là, simplement. Tu comptes tellement pour moi... Je remercie mes deux trésors, mes chers petits frères **Mohammed Amine** et **Rayan**, qui avec une petite phrase toute spontanée et naturelle et adorable par téléphone, m'ont redonné du courage et de la motivation pour continuer à avancer sur ce chemin difficile que j'ai choisi. Je vous aime…

Une énorme pensée est naturellement adressée à **mon père** et **ma mère**. Je ne suis pas certaine que vous ayez vraiment compris ce que cela représentait de faire une thèse mais vous avez toujours été là pour moi pour me soutenir quel que soit ma situation. Les mots ne peuvent pas exprimer à quel point je suis reconnaissante à vous. Je vous remercie tendrement et sincèrement pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci de m'avoir toujours fait confiance, toujours accompagnée, même sur les routes qui n'étaient ni les plus sûres ni les plus simples. Merci pour votre soutien indéfectible durant tout mon parcours. **Papa**, merci pour ton soutien total. Combien de fois me suis-je rappelée la petite phrase que tu me dis depuis mon enfance « rien ne serais facile, tu vas arriver jusqu'au bout juste il faut patienter » …**Maman**, merci de m'avoir écouté. Merci de m'avoir compris quand je suis énervée. Et c'est entièrement grâce à vous si je suis arrivée là où je suis aujourd'hui. Vous êtes ma source d'espoir pour continuer dans cette aventure, au moment de faiblesse je pense à vous et automatiquement cela me donne le courage pour faire l'impossible afin d'arriver jusqu'à la fin. Je ne sais pas comment je pourrais vous remercier un jour de tout ce que vous avez fait pour moi. J'espère que vous serez fiers de moi...

Le meilleur pour la fin, **Karim** tu es toujours là pour moi. Merci pour ton soutien, ton aide, tes encouragements, tes mots justes dans les moments les plus difficiles…. et bien entendu pour ton amour…

Develop success from failure.
Discouragement and failure are two of the surest stepping stones to success.

Dale Carnegie

SOMMAIRE

Introduction générale……1

Chapitre 1 : Étude bibliographique et objectifs de recherche…… 5

1. La médecine régénérative ……6

1.1 Le choix du biomatériau…… 9

1.1.1 Catégories des biomatériaux ……9

1.1.1.1. Les céramiques et verres……9

1.1.1.2. Les métaux ……10

1.1.1.3. Les matériaux Composites……10

1.1.1.4. Les matériaux naturels……10

1.1.1.5. Les polymères de synthèse ……11

1.1.1.5.1. PLGA : Acide poly (lactique-co-glycolique) ……12

1.1.1.5.2. PEG : polyéthylène glycol ……16

1.1.1.5.3. Les Poloxamères ……17

1.1.2. Techniques de formulation des « scaffolds » ……18

1.1.2.1. Système microparticulaires ……19

1.1.2.1.1. Processus d'émulsion et évaporation-extraction de solvant ……19

1.1.2.1.2. Technique de coacervation simple ……20

1.1.2.1.3. Technique par atomisation-séchage (spray drying) ……22

1.1.3. Les domaines d'applications des biomatériaux ……22

1.1.4. Propriétés de biomatériaux ……24

1.2. Le choix de la composante cellulaire ……24

1.2.1. Les cellules souches ……24

1.2.2. Les différents types de cellules souches ……25

1.2.3. Les cellules souches pluripotentes ……25

1.2.4. Les cellules souches multipotentes ……26

1.2.4.1. Les cellules souches neurales ……26

1.2.4.2. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) ……27

1.2.4.2.1. Identification et localisation des CSM ……27

1.2.4.2.2. Phénotype des CSM ……29

1.2.4.2.3. L'utilisation des CSM en médecine régénérative de tissu nerveux ……30
1.2.4.2.4. Cellules MIAMI : sous population des CSM ……32
1.3. Le choix du microenvironnement pour la régénération du SNC : les microcarriers pharmacologiquements actifs ……34
2. Les différents paramètres qui influencent le comportement des cellules à la surface d'un matériau ……37
2.1. Caractéristiques physico-chimiques du matériau ……37
2.1.1. La topographie de surface ……37
2.1.2. La rigidité de surface ……38
2.1.3. Caractère hydrophile ou hydrophobe de surface ……41
2.1.4. L'énergie libre de surface ……43
2.1.5. La charge de surface ……43
2.2. Adsorption des protéines sur un matériau ……44
2.2.1. Les interactions biomatériau/protéines ……44
2.2.2. Conformation des protéines ……45
Objectifs du travail de thèse ……47
Chapitre 2 : Propriétés physicochimiques des microsphères (MS) ……49
1. La formulation des MS et des films modèles ……50
1.1. Formulation des MS ……50
1.2. Élaboration des surfaces modèles ……52
2. Techniques de caractérisation des MS et des films modèles ……54
2.1. Diffusion de la lumière ……54
2.2. Potentiel zêta ……54
2.3. Microscopie électronique à balayage (MEB) ……55
2.4. Microscope à force atomique (AFM) ……55
2.5. La Spectrométrie de Masse d'Ions Secondaires à Temps de Vol (ToF-SIMS).58
2.6. La mesure de l'énergie de surface ……60
3. Résultats ……62
3.1. Distribution de taille des microsphères (MS) ……62
3.2. Morphologie et la topographie des MS ……63
3.3. Charge de surface des MS ……65
3.4. Composition chimique des MS ……65

3.5. Énergie de surface des MS-modèle 2D ……..67
3.6. Méthodes de préparation des surfaces modèles ……..67
3.7. Propriétés mécaniques des MS ……..73
4. Conclusion ……..74
Chapitre 3: The impact of polymeric microparticles on the behavior of stem cells in tissue engineering ……..75
Chapitre 4 : Discussion Générale ……119
Conclusion et perspective ……129
Références ……..132

TABLE DES ABREVIATIONS

3-D : 3 dimensions

B

BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor

bFGF: basic fibroblast growth factor

BMP: Bone Morphogenetic Protein

C

CFU-F: Colony-Forming Unit- Fibroblastes

CNTF: Ciliary Neurotrophic Factor

CSH : Cellule souche hématopoïétique

CSM : Cellule souche mésenchymateuse

CSN: Cellule souche nerveuse

E

EGF: Epidermal Growth Factor

E/F: EGF/ bFGF

F

FDA: Food and Drug Administration

FGF8: Fibroblast growth factor 8

FN: Fibronectine

G

GDNF: Glial cell-derived neurotrophic factor

GFAP: Glial fibrillary acidic protein

H

HSP 27: Heat Shock Protein 27

I

IDO : Indoleamine 2,3-dioxygénase

IFN-γ : Interferon-gamma

IL-1 : Interleukin-1

IL-6 : Interleukin-6

IL-8 : Interleukin-8

IL-12 : Interleukin-12

iPS : Cellules pluripotentes induites

L

L-Dopa : Levo-dihydroxyphénylalanine

LM: Laminine

M

MEC : Matrice extracellulaire

MIAMI: Marrow-isolated adult multilineage inducible

MPA : Microcarrier pharmacologiquement actif

MS : Microsphère

N

NFM : Neurofilament-M

P

P188 : Poloxamer188®

P21: cyclin-dependent kinase inhibitor 1

PDL : poly-D-lysine

PEG : polyéthylène glycol

PLGA : Acide poly(lactique-co-glycolique)

POE: Poly(oxy-éthylène)

POP: Poly(oxy-propylène)

PVA: Alcool polyvinylique

R

RMS: Root mean square

S

SNC : Système nerveux central

Sp7 : Ostérix

T

TNF-α: Tumor necrosis factor

ToF-SIMS: Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry

U

UCHL1: Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1

V

VEGF: Vascular endothelial growth factor

VEGF-A: Vascular endothelial growth factor A

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1: Évolution comparative du nombre de patients sur liste d'attente et du nombre de patients transplantés 7
Figure 2: Concept de l'ingénierie tissulaire 8
Figure 3: Structure de l'acide poly (lactique-co-glycolique) avec n et m le nombre de monomères d'acide lactique et d'acide glycolique, respectivement 12
Figure 4: Structure chimique de l'acide Lactique 14
Figure 5: Hydrolyse de l'acide Poly (lactique-co-glycolique) 14
Figure 6: Structure chimique du poloxamère, avec x et y les motifs de répétition d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène, respectivement. Le motif oxyde de propylène est moins hydrophile que le motif oxyde d'éthylène 18
Figure 7: Formulation de microsphères par procédé d'émulsion simple (H/E) 20
Figure 8: Principe de la coacervation simple : dispersion du principe actif dans la solution de polymère (a), formation des gouttelettes de coacervat (b), dépôt du coacervat (c), fusion des gouttelettes de coacervat et formation d'un enrobage continu (d), solidification de l'enveloppe (e) 21
Figure 9: Identification et localisation des CSM 28
Figure 10: Facteurs et molécules indispensables pour l'immuno-régulation et la réparation tissulaire par les CSM 30
Figure 11: Biopsie de la moelle osseuse 31
Figure 12: Concept des microcarriers pharmacologiquement actifs 36
Figure 13: Rigidité physiologique de différents tissus et cellules humaines 39
Figure 14: Facteurs régulant la différenciation cellulaire 41
Figure 15: Un schéma montrant (a) une surface hydrophile avec un angle de contact avec l'eau inférieur à 90 °; (b) surface hydrophobe avec un angle de contact avec l'eau supérieur à 90 ° et (c) surface superhydrophobe avec un angle de contact de l'eau supérieur à 120° 42
Figure 16: Les différentes étapes pour la formulation des microsphères par la technique d'émulsion huile dans eau avec évaporation-extraction du solvant.....51
Figure 17: Protocole expérimental pour le Nettoyage à MeOH/HCl et l'UV-Ozone.....53

Figure 18: Représentation des différentes étapes de fabrication d'un film mince par spin-coating.....54
Figure 19: Caractérisation des microparticules par AFM.....56
Figure 20: Courbes d'approches et de rétraction de la pointe de l'AFM représentant la déflexion du levier en fonction de la position verticale du scanner piézo-électrique.....57
Figure 21: Principe de la Spectrométrie de Masse d'Ions Secondaires à Temps de Vol (ToF-SIMS).....58
Figure 22: A) Tableau récapitulatif des ions utilisés pour la calibration des spectres massiques positifs et négatifs. B) Pics ioniques négatifs et positifs utilisés pour l'identification et la reconstitution d'images des particules en fonction des différents composants.....60
Figure 23: Principe de mesure de l'angle de contact et la tension de surface.....62
Figure 24: Microsphères de PLGA et PLGA-P188-PLGA obtenues par émulsion simple puis extraction-évaporation du solvant. A) distribution de la taille des microsphères, B) morphologie des microsphères (MEB). Barre d'échelle : 100 µm.....63
Figure 25: Propriétés de surface des MS. A) Images en microscopie électronique à balayage (MEB) de la morphologie des, a) et b) MS-PLGA, c) section transversale des MS-PLGA, d) et e) MS-PLGA-P188-PLGA, c) section transversale des MS- PLGA-P188-PLGA. B) Topographie de surface de MS par microscopie à force atomique (AFM), a) MS-PLGA et b) MS-PLGA-P188-PLGA.....64
Figure 26: Potentiel zêta des MS de PLGA et de PLGA-P188-PLGA dans différents pH...65
Figure 27: Imagerie ToF-SIMS de la surface de MS montrant la localisation du PLGA ($C_3H_3O^+$ & $C_3H_4O^+$), du poloxamère 188 ($C_3H_6O^+$, $C_3H_7O^+$ & $C_3H_8O^+$) et du PVA (m/z 59) à la surface de MS-PLGA et MS-PLGA-P188-PLGA MS.....66
Figure 28: observation par le microscope optique des films élaborés à partir de l'émulsion de la phase aqueuse et/phase organique. A) PLGA et B) PLGA-P188-PLGA. ..68
Figure 29: Caractérisation du film de polymères. Microscopie optique, A) PLGA et B) PLGA-P188-PLGA. Images AFM, C) topographie du film PLGA, D) topographie du film PLGA-P188-PLGA, E) topographie du film PLGA après le dépôt du PVA et F) topographie du film PLGA-P188-PLGA après le dépôt du PVA.....69
Figure 30: Angle de contact avant et après dépôt du film de PVA à la surface des films de polymères.....72

Figure 31: Les courbes de force vs. déformation (avec la courbe d'approche et de retrait) à la surface des MS-PLGA et MS-P188-PLGA.....73

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1: Les domaines d'application des biomatériaux en ingénierie tissulaire 23
Tableau 2: Caractérisation des CSM par immuno-marquage en cytométrie de flux.....29
Tableau 3: La rigidité physiologique de différents tissus et cellules humains [149].....39
Tableau 4: Caractérisation de films minces de polymères synthétisés par la technique du spin-coating. Angle de contact, énergie libre de surface et polarité des films minces de PLGA et PLGA-P188-PLGA (n = 6). 70

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

À ce jour, environ 1 personne sur 8 en Europe est touchée par des troubles du système nerveux central (SNC) (chiffres-clés : Institut du Cerveau et de la Moelle Épinière) [1], sachant qu'avec le vieillissement de la population ce chiffre va encore augmenter [2]. Parmi ces atteintes, on trouve les maladies neurodégénératives telles que la maladie de de Parkinson et d'Alzheimer dont leurs causes restent peu ou pas connues ce qui a poussé la recherche médicale à se focaliser sur le traitement de ces symptômes.

Malheureusement les traitements existants à l'heure actuelle, ne font que ralentir la progression de la maladie et ce sur une durée limitée. Par exemple la maladie de Parkinson qui est causée par la dégénérescence de neurones dopaminergiques présents dans le striatum, est traitée par une administration de L-Dopa (levo-dihydroxyphénylalanine) dans le but de pallier le faible taux de dopamine dans le striatum. Cependant, les effets bénéfiques du traitement semblent diminuer avec le temps laissant place à de lourds effets secondaires[3, 4].

De ce fait, les maladies neurodégénératives restent en échec thérapeutique et la nécessité de trouver un traitement efficace reste primordiale. C'est pourquoi, la recherche médicale s'est tournée vers de nouvelles approches thérapeutiques face à ces atteintes du SNC. La thérapie cellulaire, qui semble prometteuse, consiste à transplanter des cellules souches au niveau du site de lésion du SNC. De cette manière, elles pourront soit remplacer les cellules dégénérées, soit participer à la protection et/ou la réparation des cellules du site de lésion par la sécrétion de molécules de réparation tissulaire. Pour des applications thérapeutiques, le prélèvement de cellules souches nerveuses (CSN) chez le donneur est nécessaire mais cela présente quelques difficultés en raison de leur localisation dans le cerveau [5, 6].

Contrairement aux CSN, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) ont l'avantage de pouvoir être prélevées très aisément à partir de plusieurs tissus. Différentes études ont montré que ces cellules possèdent la capacité de se différencier en cellules des différents phénotypes mésodermaux, notamment en ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes, cellules stromales de la moelle osseuse, ainsi qu'en cellules endothéliales et musculaires.

En outre, ces cellules montrent une capacité de différenciation vers un phénotype neuronal et peuvent sécréter des facteurs de réparation neuronaux, ce qui permet d'envisager leurs utilisations pour régénérer les sites présentant des lésions dans le SNC [7, 8] . Les CSM et particulièrement une sous population, les cellules MIAMI (Marrow-isolated adult multilineage inducible), ont déjà démontré leur efficacité de neuroprotection/réparation dans la maladie de Parkinson et suite à des ischémies cérébrales [9]. De plus, les cellules MIAMI prétraitées avec deux facteurs de croissance des cellules souches nerveuses EGF (Epidermal Growth Factor) et bFGF (basic fibroblast growth factor), MIAMI E/F, se spécifient vers un phénotype neuronal [10]. Malheureusement, les cellules transplantées dans le SNC ont une survie et intégration dans le parenchyme cérébral qui est très limitée [11, 12].

La médicine régénératrice s'impose désormais comme une stratégie d'avenir pour recréer, régénérer ou restaurer la fonction d'un tissu lésé. Une des approches de la médicine régénératrice repose sur l'utilisation de trois éléments qui doivent être choisies avec discernement :

- Un biomatériau
- Une composante cellulaire
- Le microenvironnement (composants biomimétiques)

Un biomatériau de type échaffaudage ou « scaffold » permet de stimuler la survie des cellules qui ont besoin d'un support pour adhérer et empêcher ainsi leur mort par un mécanisme de type anoïkose (anoikis) [13]. Le biomatériau peut être d'origine synthétique ou biologique, dégradable ou non, et fournit un support adéquat en 3 dimensions aux cellules transplantées. Un « scaffold » qui sera utilisé dans le cerveau doit être biocompatible avec celui-ci, avoir une petite taille et être biodégradable afin de faciliter l'intégration dans cet organe fragile. La composante cellulaire est majoritairement représentée par les cellules souches, comme par exemple les CSM adultes prélevées à partir de la moelle osseuse qui est facile d'accès permettant aisément leur prélèvement. De plus, l'utilisation de composants biomimétiques associés aux « scaffolds » souvent dérivés de la matrice extracellulaire (MEC), peut également être utilisé afin de favoriser la survie, la prolifération et aussi la différenciation des cellules vers un

phénotype donné. Parmi ces facteurs, la LM est une protéine de la matrice extracellulaire qui a démontré sa capacité à orienter la différenciation des CSM vers des cellules neuronales [14].

Ces dernières années, il a été mis en évidence que les propriétés physico-chimiques des supports polymériques régissent également le comportement des CSM (adhésion, survie et différenciation). Le développement de biomatériaux avec des propriétés biologiques et physicochimiques contrôlées est essentiel afin d'établir l'approche thérapeutique appropriée en médicine régénérative du système nerveux.

Chapitre 1 :

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ET

OBJECTIFS DE RECHERCHE

Chapitre 1 : Étude bibliographique

1 La médecine régénérative

Suite à un accident, une pathologie ou un vieillissement, il est commun, pour le patient de lui implanter un tissu ou un organe entier prélevé chez un donneur pour remplacer celui endommagé. À ce jour, de nombreuses maladies chroniques peuvent seulement être guéries par greffe d'organes. Cependant, l'écart entre le nombre de donneurs et les receveurs en attente ne cesse de s'accroitre (Figure 1). Depuis 2005, le nombre de patients transplanté est relativement constant avec, en 2012, une diminution de 5% des donneurs par rapport à l'année 2011 ; la demande (patients sur liste d'attente), en revanche, s'accroit de façon quasi-linéaire avec un déficit actuel de presque 300%. Pour cela, la médecine réparatrice et régénérative pourrait participer à combler ce déficit en contribuant à réparer une lésion ou un organe malade par le remplacement des parties endommagées par un nouveau tissu cellulaire créé à partir de cellules souches ou de biomatériaux adaptés. Ces substituts biologiques peuvent également réparer les tissus lésés par la sécrétion des facteurs de réparation tissulaire. Cette alternative réaliste est illustrée par le développement de nombreuses approches thérapeutiques nouvelles utilisant l'ingénierie tissulaire, thérapie cellulaire, thérapie génique regroupés sous le nom de médecine régénérative.

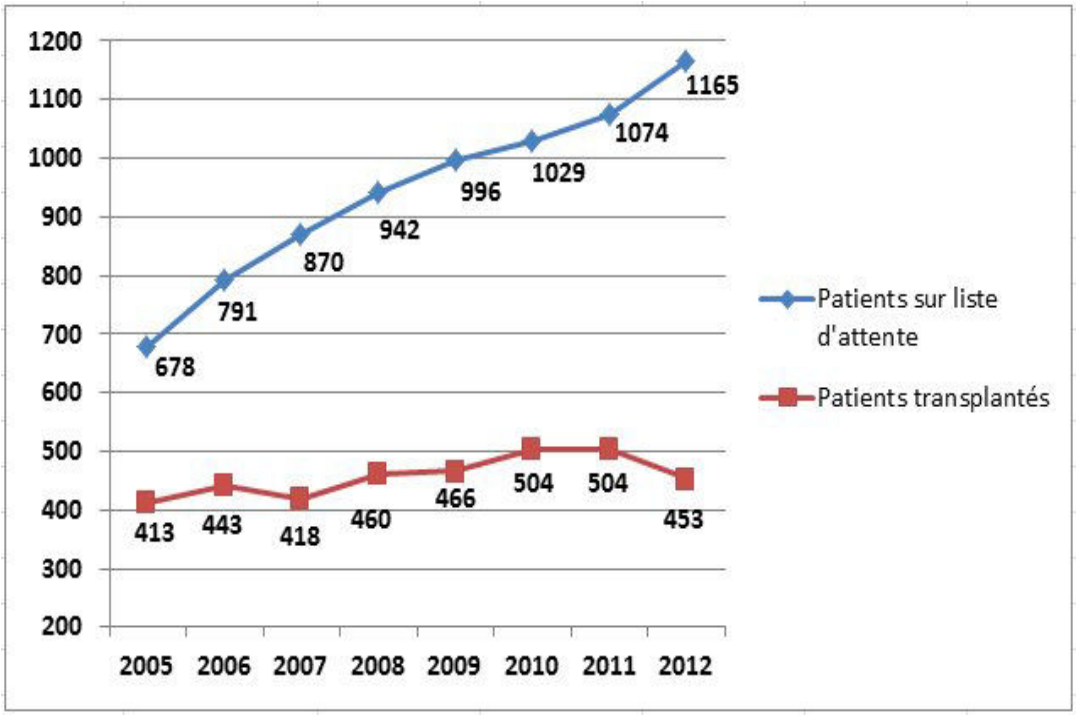


Figure 1: Évolution comparative du nombre de patients sur liste d'attente et du nombre de patients transplantés [15]

La médecine régénérative comprend le domaine de l'ingénierie tissulaire qui est basée sur le développement d'un nouveau tissu ou organe qui sera implanté au niveau de tissu dégénéré dans le but de le restaurer et de ralentir ou stopper sa dégénération [16, 17].

Le principe de l'ingénierie tissulaire repose sur l'association de cellules à un support synthétique ou naturel afin de construire un assemblage tri-dimensionnel et fonctionnel pour ces cellules (Figure 2) permettant la construction d'un nouveau tissu sain. L'ingénierie tissulaire nécessite des connaissances dans les sciences des matériaux (physico-chimie des colloïdes, physique et chimie des solides et des polymères, …), et les sciences de la vie (biologie cellulaire et moléculaire, physiologie, chirurgie, imagerie, …).

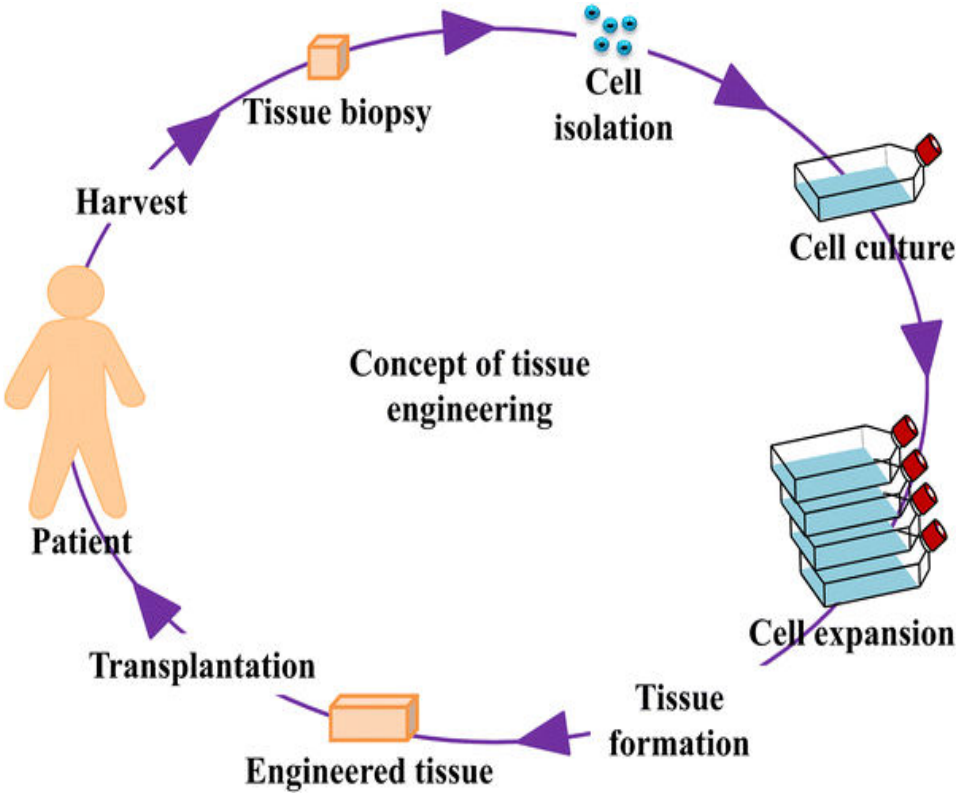


Figure 2: Concept de l'ingénierie tissulaire [18]

Dans le cadre des maladies neurodégénératives qui correspond à la perte des neurones, et malgré les bénéfices de la thérapie cellulaire la régénération du SNC est limitée par des problèmes majeurs notamment la faible survie et intégration des cellules transplantées dans le tissu hôte [19]. Il est donc nécessaire de fournir un support tridimensionnel pour les cellules transplantées qui a pour but d'améliorer leurs comportements, et plus particulièrement leurs survies, prolifération et différenciation. Les biomatériaux sont les supports les plus utilisés dans l'ingénierie tissulaire et les plus répandus pour régénérer différents tissu [20]. Les « scaffolds » ou échafaudages sont choisis en fonction du tissu à régénérer afin de fournir un environnement presque naturel aux cellules transplantées, les scaffolds doivent être biodégradables et biocompatibles avec le tissu que l'on souhaite régénérer.

Avant de pouvoir parler de produit d'ingénierie tissulaire, il est nécessaire dans un premier temps de choisir les cellules et les biomatériaux convenables et qui vont jouer le rôle de support tri dimensionnel (3-D).

1.1 Le choix du biomatériau

La Société Européenne des Biomatériaux (European Society for Biomaterials) a défini un biomatériau comme « un matériau conçu pour interagir avec les systèmes biologiques» [21]. Les matériaux les plus utilisés en ingénierie tissulaire sont composés de polymères naturels ou synthétiques. Ils doivent être biodégradables et biocompatibles avec le tissu hôte ce qui correspond à l'absence de réaction inflammatoire ou toxique au niveau du tissu avec lequel il va interagir.

1.1.1 Catégories des biomatériaux

En ingénierie tissulaire différents types de supports bi ou tridimensionnels sont utilisés selon l'objectif de l'étude. Ces matériaux peuvent être à base de différents composants artificiels, synthétiques, composites ou naturels.

Les différentes catégories de biomatériaux sont :

- Les céramiques et verres
- Les métaux
- Les matériaux composites
- Les matériaux naturels
- Les polymères de synthèse

1.1.1.1. Les céramiques et verres

Les céramiques sont des composants caractérisés par un comportement à la fois fragile et dur, et pour la fabrication des céramiques une température de fusion plus élevée (au-delà de 1000 °C) est utilisée. Les matériaux céramiques ont l'avantage d'être biocompatibles, en particulier avec l'os, difficiles à déformer et résistants aux chocs. Les céramiques les plus utilisées dans le domaine de l'ingénierie tissulaire sont les oxydes d'aluminium, la zircone, le phosphate de calcium, le sulfate de calcium, le carbone et le verre. Les implants de la hanche et des implants dentaires sont notamment fabriqués à partir d'oxydes d'aluminium et zircone. Dans le domaine des biomatériaux, le phosphate de calcium et le

sulfate de calcium sont utilisés principalement dans des substituts de greffe osseuse [22]. La difficulté de fabrication de céramiques constitue le principal inconvénient.

1.1.1.2. Les métaux

Les métaux sont les biomatériaux les plus répandus en orthopédie. Les métaux utilisés comme biomatériaux ont des limites d'élasticité et des résistances à la rupture élevées, comprennent notamment les aciers inoxydables, le titane, les alliages cobalt-chrome, ainsi que l'argent ou le platine. L'acier inoxydable est le plus important de cette catégorie et encore le plus utilisé en chirurgie orthopédique, le titane est également très utilisé dans le même domaine [23]. Le principal inconvénient des métaux pour leur utilisation dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, est leur susceptibilité à la corrosion ce qui a mené à la sélection d'alliage (Titane, Cobalt-Chrome).

1.1.1.3. Les matériaux Composites

Les matériaux composites consistent en assemblages d'au moins deux matériaux. L'association de matériaux présente un intérêt évident afin de renforcer les propriétés des matériaux et améliorer leur qualité pour certaines applications (par exemple : régénération du cartilage) [24]. Ces caractéristiques expliquent pourquoi l'utilisation de ces matériaux augmente depuis 40 ans dans différents domaines.

Bien que les matériaux composites présentent certains points faibles (par exemple la faible interaction entre les deux matériaux peut provoquer une réduction des performances mécaniques), ils gardent des performances réelles (légèreté, rigidité à un effort, etc.) biens meilleurs que les biomatériaux fabriqués à partir d'un seul composant. Le coût élevé impliqué dans la fabrication de composites est un inconvénient.

1.1.1.4. Les matériaux naturels

Les matériaux naturels sont plus utilisés dans le domaine de l'ingénierie tissulaire afin d'éviter les problèmes de biocompatibilité des implants. Ces matériaux fabriqués à base

de biopolymères ont démontrés pour certains, une faible incidence de toxicité ou d'inflammation dans le tissu dégénéré [25, 26]. Ces matériaux, bien qu'ils soient souvent hétérogènes structurellement et chimiquement puisque principalement constitués de matériaux biologiques, évitent une synthèse organique impliquant des composés potentiellement toxiques comme c'est le cas avec les matériaux polymères synthétiques. Dans le cas des matériaux naturels formulés, les protéines et les polysaccharides sont les principaux biopolymères utilisés, qui peuvent présenter dans certains cas d'excellentes propriétés mécaniques. Ainsi, le collagène est le composant le plus prometteur parmi ces biopolymères pour développer des biomatériaux implantables. Cette protéine de la matrice extracellulaire est très abondante chez les mammifères et a été largement utilisé pour de nombreuses applications notamment en chirurgie esthétique, ou en ingénierie tissulaire comme échafaudage supramoléculaire [26]. Le chitosane, polysaccharide d'origine naturelle obtenu par *N*-désacétylation de la chitine est un autre biomatériau couramment utilisé [27].

En général les biopolymères sont utilisés en mélange afin de développer des matrices 3-D utilisables en ingénierie tissulaire. Ils peuvent combiner des protéines des polymère polysaccharidiques et parfois des polymères synthétiques.

1.1.1.5. Les polymères de synthèse

Les polymères synthétiques sont extrêmement utilisés dans le domaine des biomatériaux, en raison de la grande diversité de leurs propriétés : flexibles ou rigides, résistant à l'adhérence de protéines ou au contraire modifiés pour améliorer leur adhérence. Ils peuvent être biodégradables ou non et être mis en forme avec des architectures très variées et plus ou moins complexes. Les polymères synthétiques nécessitent une étape de polymérisation à partir de monomères. Cette synthèse nécessite souvent l'utilisation de catalyseurs ou des solvants organiques et donc une purification poussée avant de pouvoir être formulés. Actuellement, le nombre de polymères synthétiques disponibles pour réaliser des biomatériaux reste relativement limités pour des raisons règlementaires.

La construction des prothèses, utilisées comme échafaudages cellulaires, à base des polymères synthétiques dans lesquels on peut contrôler la densité des liaisons - qui conditionne leurs propriétés mécaniques - favorisent l'utilisation de ces polymères qui

doivent être également compatibles avec l'élément vivant, et pourront ainsi remplacer les matériaux d'origine naturelle.

1.1.1.5.1. PLGA : Acide poly (lactique-co-glycolique)

L'acide poly (lactique-co-glycolique) (PLGA) est une famille de polymères biodégradables approuvés par la « Food and Drug Administration » (FDA). Le PLGA est un polymère qui représente une excellente biocompatibilité, qui a été largement étudié et utilisé comme vecteurs d'administration de médicaments, de protéines et de diverses autres macromolécules telles que l'ADN, l'ARN et les peptides [28-32]. Le PLGA a été approuvés pour différentes utilisations cliniques en thérapie anticancéreuse, hormonothérapie, ainsi que pour le traitement de troubles du système nerveux central [33].

- **Propriétés physico-chimiques de l'acide poly (lactique-co-glycolique)**

Le PLGA est un copolymère d'acide lactique et d'acide glycolique obtenu par réaction de copolymérisation. Au cours de la polymérisation, les unités monomères d'acide glycolique et lactique sont liées ensemble dans le PLGA par des liaisons ester, donnant ainsi un polyester aliphatique linéaire dans lequel les monomères sont répartis de façon aléatoire (Figure 3) [34].

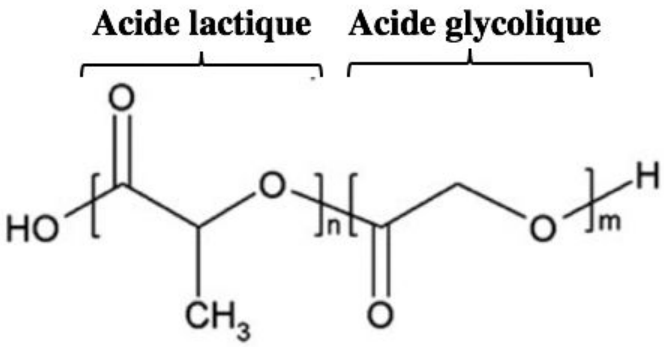


Figure 3: Structure de l'acide poly (lactique-co-glycolique) avec n et m le nombre de monomères d'acide lactique et d'acide glycolique, respectivement [35].

L'acide lactique est un composé chiral avec une chaîne hydrocarbonée composée d'un atome central (chiral) et de deux atomes de carbone terminaux, il existe sous deux formes isomères optiquement actives (Figure 4) [36]. Le PLGA contient généralement la forme L et D en proportion contrôlée. Les propriétés physiques du polymère tel que son poids moléculaire ou le ratio entre les deux monomères lactique/glycolique utilisé dans la polymérisation (ex : PLGA (75 / 25), PLGA (50 / 50) ...) ont une influence sur la résistance mécanique du polymère et sa biodégradabilité. La présence du groupement méthyle dans l'acide lactique le rend moins hydrophile que l'acide glycolique, et par conséquent un PLGA riche en acide lactique absorbera moins d'eau et par la suite se dégradera plus lentement [35]. Le temps d'exposition à l'eau et la température de stockage vont également modifier les propriétés physiques du PLGA [37].

Tous les PLGA sont amorphes et caractérisés par une température de transition vitreuse (Tg) qui correspond au passage du polymère d'un état vitreux à un état caoutchouteux. Le polymère a des propriétés viscoélastiques dépendantes de la température (T) :

- Si T<Tg : le polymère est sous forme vitreuse
- Si T>Tg : le polymère est sous forme caoutchouteuse

La température de transition vitreuse du PLGA est généralement supérieure à 37 °C et, par conséquent, le PLGA a un comportement vitreux, avec une structure de chaîne assez rigide. La Tg diminue avec une diminution de la teneur en acide lactique dans le copolymère et avec une diminution du poids moléculaire [38].
Enfin, le PLGA est soluble dans une large gamme de solvants, notamment les solvants chlorés, le tétrahydofurane, l'acétone et l'acétate d'éthyle [35].

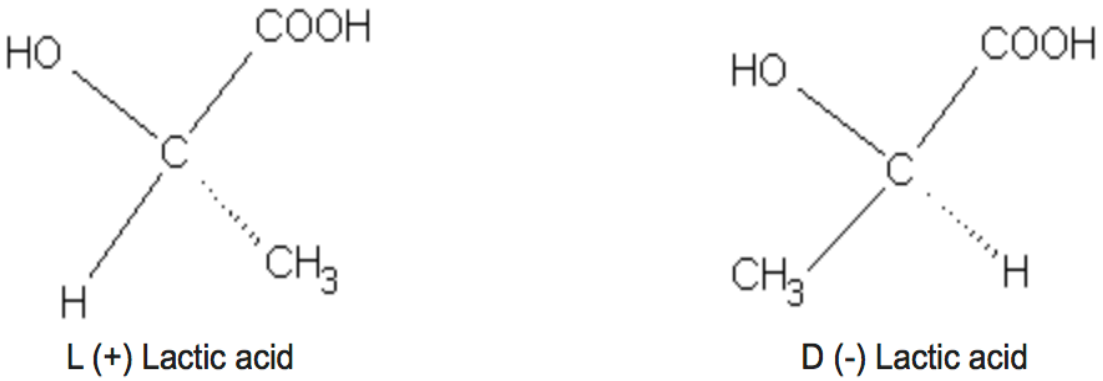


Figure 4: Structure chimique de l'acide Lactique [36].

- **Biodégradabilité et biocompatibilité de l'acide poly (lactique-co- glycolique)**

Le PLGA est l'un des polymères biodégradables les plus utilisés dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. Il subit, dans le corps, une hydrolyse en milieu aqueux pour produire de l'acide glycolique et de l'acide lactique, deux molécules solubles dans l'eau (Figure 5) [39].

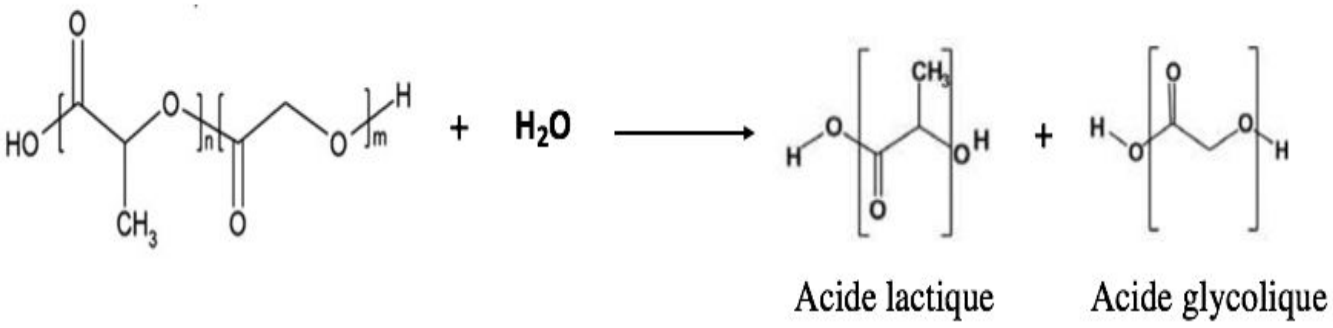


Figure 5: Hydrolyse de l'acide Poly (lactique-co-glycolique) [35]

Le PLGA se dégrade en milieu aqueux par hydrolyse des liaisons ester, initiée en masse puis par érosion. Au cours de sa dégradation, on peut décrire quatre étapes: (i) hydratation: l'eau pénètre dans la région amorphe et perturbe les forces de van der Waals

et les liaisons hydrogènes, entraînant une diminution de la température de transition vitreuse (Tg); (ii) dégradation initiale: clivage des liaisons ester avec diminution du poids moléculaire; (iii) dégradation constante: les groupes terminaux carboxyliques auto-catalysent le processus de dégradation et la perte de masse commence par un clivage massif des liaisons ester, entraînant une perte d'intégrité; (iv) solubilisation: les fragments sont ensuite clivés en molécules solubles en milieu aqueux [40]. Les taux de dégradation peuvent être influencés par différents paramètres: (i) le poids moléculaire: en augmentant le poids moléculaire des PLGA classiques de 10 à 20 à 100 kDa, les taux de dégradation peuvent aller de plusieurs semaines à plusieurs mois; (ii) le rapport entre les monomères d'acide glycolique et d'acide lactique: les PLGA avec une teneur plus élevée en acide lactique étant moins hydrophiles, ils absorbent moins d'eau et se dégradent ensuite plus lentement; (iii) stéréochimie : des mélanges de monomères d'acide lactique D et L sont le plus souvent utilisés pour la fabrication de PLGA, car le taux de pénétration de l'eau est plus élevé dans les régions D, L amorphes, conduisant à une dégradation accélérée du PLGA ; et (iv) la modification des groupes terminaux (« end-capped ») lors de la polymérisation via l'utilisation de catalyseur (octanoate d'étain), par opposition à la présence d'acide carboxylique libre conduit à une demi-vie de dégradation plus longue [41, 42].

Le contrôle de la dégradation des systèmes polymériques à base de PLGA permet la formulation de vecteurs encapsulant des médicaments dont on peut contrôler la vitesse de libération.

Quelle que soit la qualité du biomatériau, celui-ci reste un corps étranger qui entraine une réaction plus ou moins importante après implantation dans l'organisme. Ainsi, l'évaluation de la biocompatibilité selon laquelle le matériau ne doit pas induire de réaction inflammatoire et ne doit pas présenter de toxicité vis-à-vis le tissu biologique nécessite de prendre en compte la durée du contact avec le tissu [43]. Cette durée va dépendre de l'application, mais il faut attendre généralement que le biomatériau constitué de PLGA soit entièrement dégradé pour évaluer correctement sa biocompatibilité. La taille, la forme et les propriétés physico-chimiques du biomatériau utilisé peuvent influencer l'intensité et la durée de l'inflammation.

1.1.1.5.2. PEG : polyéthylène glycol

On appelle polyéthylène glycol ou PEG des polymères polyéthers linéaires de masse molaire modulable (400 <M_w < 100,000 g/mol). Ces polymères sont amphiphiles et solubles dans l'eau ainsi que dans de nombreux solvants organiques (par exemple chlorure de méthylène, éthanol, toluène, acétone et chloroforme). Le PEG est utilisé dans de nombreux secteurs de l'industrie pharmaceutique, car présentant une excellente biocompatibilité [44]. En outre, il est approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) pour une utilisation comme excipient ou comme support dans différentes formulations pharmaceutiques, alimentaires et cosmétiques [45].

Pour la réparation tissulaire, le développement des biomatériaux implantables tels que les hydrogels de PEG [46] présentent de véritables perspectives [47]. Ces hydrogels, dont les propriétés rhéologiques peuvent être modifiées *in situ* ont été conçus pour délivrer localement une large gamme d'agents bioactifs de manière contrôlée et durable. Ces systèmes à libération contrôlée, combinés à des cellules souches dispersées dans un réseau 3D permettent de réguler le devenir des cellules [48]. et la réparation des axones de neurones endommagés [49]. Ces polymères peuvent également réduire le stress oxydatif et l'apoptose après une lésion médullaire [50-52].

Différents types de copolymères contenant une séquence du polyéthylène glycol (PEG) ont été développés afin d'améliorer les performances de formulations incorporant une variété de médicaments. Le PLGA est lui-même un copolymère souvent couplé au PEG, soit sous forme d'un copolymère dibloc A-B (PLGA-PEG) [53-54] ou sous forme de copolymère tribloc de type A-B-A (PLGA-PEG-PLGA) [55] et B-A-B (PEG-PLGA-PEG) [56].

Les copolymères de type diblocs peuvent s'auto-assembler sous forme de micelles avec les chaînes du PEG orientées vers la phase aqueuse externe et les parties hydrophobes du copolymères (PLGA) forment un cœur permettant l'encapsulation de certaines molécules lipophiles. Cette couche de PEG forme alors une barrière stérique hydratée répulsive réduisant les interactions avec les molécules du milieu environnant et améliorant la stabilité des formulations lors du stockage [57]. En outre, les copolymères diblocs permettent de moduler la cinétique de libération des espèces encapsulées.

Les copolymères triblocs du type A-B-A et B-A-B peuvent agir en tant que thermogel avec un bloc A couplé de manière covalente a un bloc B via une liaison ester. Ces copolymères se présentent généralement sous forme d'une solution fluide à basse température et peuvent former un gel de viscosité élevée à plus haute température, notamment à la température corporelle. Les PLGA-PEG-PLGA ou PEG-PLGA-PEG, sont des types de copolymères séquencés composés de segments de PLGA hydrophobes et de segments de PEG hydrophiles. Les segments de PLGA hydrophobes s'agrègent via des interactions hydrophobes attractives et les segments de PEG hydrophiles permettent aux molécules de copolymère d'être stable en solution. À basse température, et en phase aqueuse, les liaisons hydrogène entre les segments de PEG hydrophiles et les molécules d'eau dominent dans la solution aqueuse, ce qui entraîne leur expansion dans l'eau (conformation brosse en bon solvant). En revanche, l'augmentation de la température, fragilise les liaisons hydrogène et diminue leur nombre, ce qui diminue l'expansion des segments PEG et donc les répulsions stériques, tandis que les forces hydrophobes entre les segments du PLGA se renforcent, ce qui conduit à une transition solution-gel. La libération de médicaments à partir des gels formés par les copolymères A-B-A et B-A-B se produit dans deux étapes : la diffusion du médicament à partir de l'hydrogel au cours de la phase de libération initiale, la libération du médicament par l'hydrolyse de la matrice d'hydrogel au cours de la phase ultérieure. Lors de la dégradation d'un gel PEG-PLGA-PEG, il se produit une perte de masse de composants riches en PEG. Par conséquent, le gel restant devient plus hydrophobe dans un environnement aqueux, ce qui réduit la teneur en eau [55,58,59].

1.1.1.5.3. Les Poloxamères

Les poloxamères (ou polyalkène glycol, DCI poloxamer) sont composés de copolymères triblocs poly(oxyde d'éthylène) (POE) - poly(oxyde de propylène) (POP) - poly(oxyde d'éthylène) (POE), illustrés dans la figure 6 [60]. Ce sont des tensioactifs non ioniques synthétiques, utilisés pour l'administration de médicaments et l'imagerie médicale [61] [62, 63]. Différents types de poloxamères sont solubles dans l'eau et l'éthanol et forment des gels thermoréversibles [64]. Selon le rapport entre les unités hydrophiles (POE) et lipophiles (POP), différents copolymère-blocs peuvent être obtenus avec différentes masses moléculaires et des propriétés physico-chimiques modulables (rhéologiques,

tensioactives,…) [65-68]. Plusieurs études ont montré que l'utilisation de poloxamère dans la formulation des « scaffolds » contenant des protéines renforce la protection de ces dernières et permet une libération plus importante et mieux contrôlée [69-71]. Les poloxamères sont souvent utilisés en association avec un autre polymère comme le PLGA pour la fabrication de biomatériaux (notamment des microsphères biodégradables), afin d'augmenter la libération de protéines encapsulées, notamment aux temps court et ainsi éviter l'effet couramment observé d'une libération précoce et massive (« burst-effect ») [70]. Outre son intérêt pour une protection renforcée des protéines, les propriétés intrinsèques du poloxamère 188 (une des variétés très utilisés dans le domaine pharmaceutique) peuvent avoir un effet positif sur la chondrogenèse. Ainsi, il a été observé que le poloxamère P188 exerçait une activité protectrice contre la nécrose des chondrocytes [72, 73]. De plus, d'autres études ont montré que, la présence de poloxamère dans les « scaffolds » améliorait la prolifération cellulaire, ces propriétés étant mises à profit pour des applications en ingénierie tissulaire [74, 75].

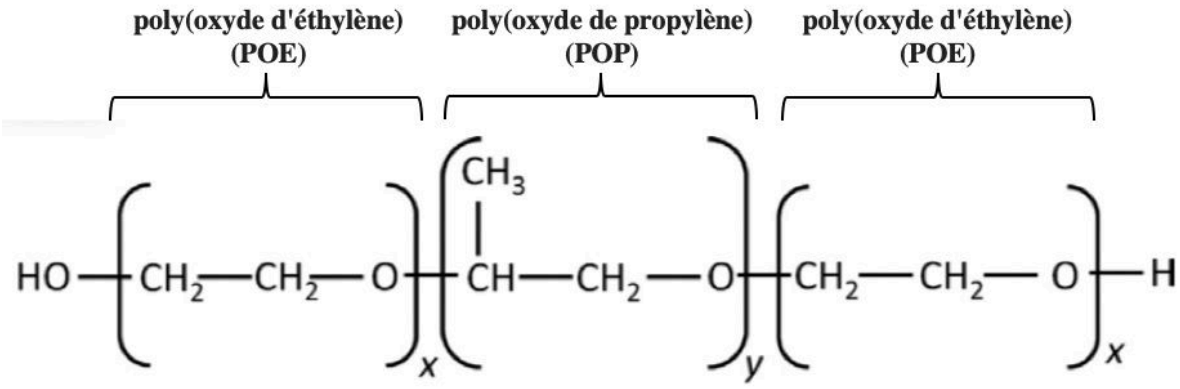


Figure 6: Structure chimique du poloxamère, avec x et y les motifs de répétition d'oxyde d'éthylène et d'oxyde de propylène, respectivement. Le motif oxyde de propylène est moins hydrophile que le motif oxyde d'éthylène [76]

1.1.2. Techniques de formulation des « scaffolds »

Les « scaffolds » peuvent être formulés sous différentes formes et tailles, et permettent d'encapsuler différents types de biomolécules. Cette section décrit diverses techniques de formulation des « scaffolds ».

1.1.2.1. Système microparticulaires

Bien que plusieurs techniques de formulation de microparticules aient été développées et rapportées à ce jour, le choix de la technique dépend de la nature du polymère, de l'utilisation prévue et de la durée du traitement.

1.1.2.1.1. Processus d'émulsion et évaporation-extraction de solvant

- **Procédé par simple émulsion**

Les procédés d'émulsification simple de type huile dans l'eau (H/E) permettent l'obtention des systèmes généralement matriciels de polymères hydrophobes (PLGA par exemple) pour l'encapsulation moléculaire de molécules peu polaires ou la dispersion de nanocristaux ou d'agrégats nanoprécipités (protéiques par exemple). L'exemple le plus étudié est la préparation de microsphère (MS) à base de polymères biodégradables (PLGA, poly (ε-caprolactone (PCL), …). Le polymère est d'abord dissout dans un solvant organique volatil, non miscible à l'eau comme le dichlorométhane (le plus couramment utilisé), puis cette solution est émulsifiée dans un grand volume d'eau en présence d'un agent tensioactif tel que l'alcool polyvinylique (PVA) à une température appropriée et sous agitation. L'émulsion est maintenue à une pression réduite ou atmosphérique avec un contrôle de la vitesse d'agitation pendant que le solvant s'évapore. L'extraction du solvant est obtenue par le transfert de l'émulsion dans un grand volume d'eau (avec ou sans agent tensioactif). Cette étape permet une extraction accélérée du solvant organique par diffusion rapide de ce dernier dans l'eau et permet, ainsi, le durcissement des gouttelettes organiques sous forme de MS. Les MS solides résultantes sont ensuite lavées et collectées par filtration puis lyophilisées dans des conditions appropriées pour produire une poudre de MS injectable après remise en suspension avant administration (Figure 7) [77- 79].

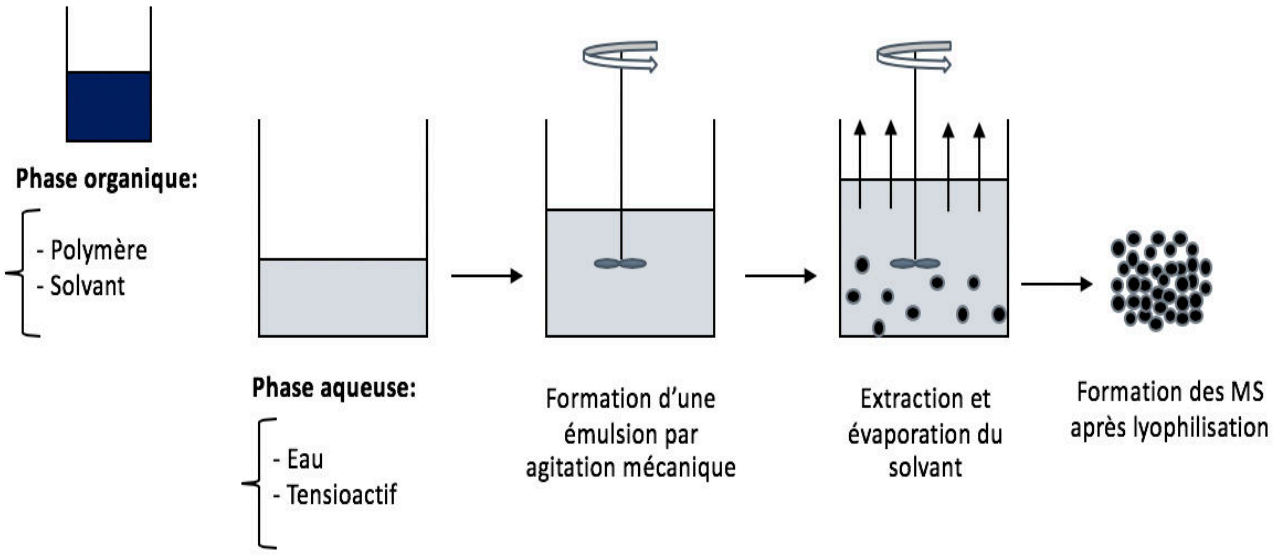


Figure 7: Formulation de microsphères par procédé d'émulsion simple (H/E)

- **Procédé par double émulsion**

Une émulsion eau-dans-huile-dans-eau ($E_1/H/E_2$) est le procédé le plus adaptée à l'encapsulation des médicaments de nature hydrophile tels que les peptides/protéines [80-82] et certaines molécules classiques (antibiotiques, anti-inflammatoires, anticancéreux) [83- 85]. Dans un premier temps, une quantité appropriée de médicament est dissoute dans la phase aqueuse (E_1), puis cette solution de médicament est ajoutée à la phase organique (H) contenant le polymère dissout dans un solvant organique (dichlorométhane ou du chloroforme) sous agitation afin d'obtenir une émulsion primaire (E_1/H). Ensuite, l'émulsion primaire E_1/H est émulsionnée dans une seconde phase aqueuse (E2) contenant un agent tensioactif (PVA) afin de former une double émulsion ($E_1/H/E_2$). Comme dans le cas précédent, des étapes d'extraction, de filtration/purification et de lyophilisation permettent d'obtenir une poudre qui pourra être administrée par différentes voies (dépôts sous cutané, pulmonaire, …).

1.1.2.1.2. Technique de coacervation simple

Ce procédé permet l'encapsulation de substances hydrophiles et lipophiles [30,86,87]. La coacervation est un processus qui consiste à abaisser la solubilité d'un polymère initialement solubilisé dans un solvant organique via un mécanisme de séparation de

phase liquide-liquide. Il en résulte l'obtention de deux phases liquides, l'une comprenant la phase de coacervat qui est riche en polymère et une phase continue appauvrie en polymère. Le médicament, généralement sous forme de cristaux ou d'agrégats, est préalablement dispersé dans la solution de polymère et les gouttelettes de coacervat s'adsorbent sur les particules de médicament si elles ont des capacités de mouillage suffisantes. Le solvant du polymère est ensuite progressivement extrait des gouttelettes de coacervat adsorbées et la désolvatation induit la coalescence des gouttelettes de coacervation et la formation d'un film d'enrobage. Cette suspension est ensuite transférée dans un grand volume d'un agent de durcissement organique miscible avec le solvant du polymère. Suite à une extraction rapide et efficace du solvant restant dans le film d'enrobage, les microparticules sont formées (Figure 8). Finalement les microparticules sont lavées, filtrées puis lyophilisées.

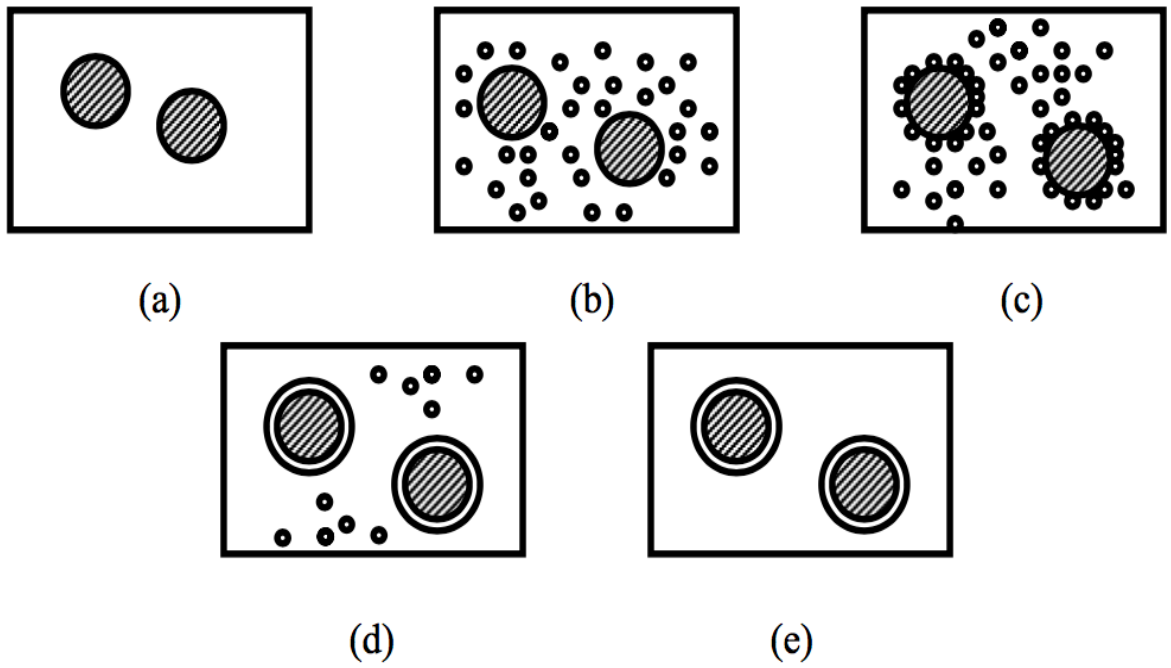


Figure 8: Principe de la coacervation simple : dispersion du principe actif dans la solution de polymère (a), formation des gouttelettes de coacervat (b), dépôt du coacervat (c), fusion des gouttelettes de coacervat et formation d'un enrobage continu (d), solidification de l'enveloppe (e) [88].

1.1.2.1.3. Technique par atomisation-séchage (spray drying)

Cette méthode est connue pour encapsuler toutes sortes de médicaments / peptides / protéines dans des microparticules sans perte significative de leur activité biologique. Les techniques d'émulsion nécessitent un contrôle précis des paramètres de formulation pour une efficacité d'encapsulation optimale [89]. Les techniques de séparation de phases tendent à produire des particules agglomérées mais nécessitent également l'élimination de grandes quantités de phase organique durant le procédé de fabrication. Cela rend le processus difficile pour la transposition industrielle et pose de nombreux problème réglementaires liés à la présence de solvants toxiques résiduels. Alternativement, le séchage par pulvérisation est très rapide, relativement simple à mettre en œuvre et nécessite peu de variables de formulation, ce qui le rend approprié pour la production industrielle. Dans ce procédé, des MS chargées de médicament / protéine / peptide sont préparé en pulvérisant une dispersion solide dans l'huile ou une émulsion eau dans huile dans un courant d'air chauffé. Le type de médicament (hydrophobe ou hydrophile) détermine le choix du solvant à utiliser dans le processus. La nature du solvant utilisé, la température d'évaporation du solvant et le débit d'alimentation affectent la morphologie des MS. Le principal inconvénient de ce procédé à l'échelle du laboratoire (sur de faibles volumes) est l'adhérence des microparticules aux parois internes du séchoir ce qui conduit à des rendements de fabrication faibles. Cet inconvénient est généralement résolu lors de la transposition d'échelle. Un autre inconvénient est la difficulté d'obtenir une poudre de microparticules de granulométrie et forme contrôlée.

1.1.3. Les domaines d'applications des biomatériaux

Les biomatériaux sont étudiés pour des applications médicales ou diagnostic dans diverses spécialités. Le tableau 1 donne quelques exemples d'applications dans ces domaines :

Domaine	Applications
Cardiovasculaire	Valves cardiaques, matériel pour circulation extracorporelle, tubulures, pompes, cœur artificiel, assistance ventriculaire, stimulateurs cardiaques
Chirurgie plastique et esthétique	Matériaux et implants pour chirurgie esthétique, drains de chirurgie, colles tissulaires, peau artificielle
Chirurgie orthopédique	Prothèses articulaires (hanche, coude, genou, poignet…), ligaments, tendons ou cartilage artificiel
Endocrinologie et la Chronothérapie	Pancréas artificiel, pompes portables et implantables pour la libération contrôlée de médicament
Odontologie ou la Stomatologie	Matériaux de restauration, comblement dentaire et osseux, implants pour reconstruction maxillo-faciale
Ophtalmologie	Implants, lentilles, coussinets de récupération, gels ophtalmiques
Urologie et Néphrologie	Dialyseurs, poches, cathéters et tubulures pour dialyse, rein artificiel portable, prothèses, matériaux pour le traitement de l'incontinence
Radiologie et imagerie	Produits de contraste, produits pour embolisation, produits pour radiologie interventionnelle

Tableau 1: Les domaines d'application des biomatériaux en ingénierie tissulaire [90, 22].

1.1.4. Propriétés de biomatériaux

Actuellement, les biomatériaux (ou scaffolds) jouent un rôle primordial dans l'ingénierie tissulaire [91], du SNC, pour cela les scaffolds doivent présenter certaine caractéristiques spécifiques :

- Ils doivent être de petite taille afin de pouvoir être implantés au sein du SNC.
- Ils doivent être composé de biomatériaux biodégradables et biocompatibles.
- Ils doivent fournir un support 3 dimensionnel aux cellules transplantées
- Les surfaces des scaffolds peuvent être fonctionnalisées avec une composante biomimétique afin de favoriser l'attachement, l'adhésion, la prolifération et également la différenciation des cellules.
- Ils peuvent inclure des facteurs trophiques permettant la migration, la prolifération et la différenciation des cellules implantées.
- Leurs propriétés physico-chimiques doivent être caractérisées afin de favoriser les processus d'adhésion, de migration, de prolifération et de différenciation cellulaires.

La composante cellulaire est le deuxième élément indispensable dans un dispositif d'ingénierie tissulaire. Dans la partie suivante, nous évoquerons les cellules qui sont utilisées en ingénierie tissulaire, depuis leur origine jusqu'à leurs évaluation précliniques et cliniques.

1.2. Le choix de la composante cellulaire

1.2.1. Les cellules souches

En biologie cellulaire, une cellule souche est une cellule immature indifférenciée, caractérisée par la capacité de s'auto-renouveler sur une très longue durée et de se différencier en cellules spécifiques d'organe [92]. Les cellules souches jouent un rôle primordial dans le développement des organismes ainsi que dans la réparation des tissus lésés. Ces cellules souches peuvent être classées selon leur potentiel de différenciation ou leur origine biologique.

1.2.2. Les différents types de cellules souches

Les cellules souches sont classées selon leur potentiel de différenciation et se distinguent en quatre types :

- **Les cellules souches totipotentes** peuvent se différencier en tout type de cellules embryonnaires : ectoderme, mésoderme et endoderme ainsi que des annexes extra-embryonnaires. Une cellule souche totipotente, comme par exemple l'œuf fécondé, peut donc conduire au développement d'un organisme vivant en entier.

- **Les cellules souches pluripotentes** ont le potentiel de donner, *in vitro* et *in vivo*, les trois feuillets embryonnaires qui vont constituer tout l'organisme, mais ces cellules ne peuvent pas reproduire un être humain en entier.

- **Les cellules souches multipotentes** peuvent se différencier en plusieurs lignées cellulaires différentes dérivants du même feuillet embryonnaire (cellules souches hématopoïétiques, cellules souches mésenchymateuses). Ces cellules sont présentes chez l'embryon et chez l'adulte.

- **Les cellules souches unipotentes** ne peuvent se différencier que vers un seul type cellulaire spécialisé, mais sont capables de s'auto-renouveler comme toutes les cellules souches.

1.2.3. Les cellules souches pluripotentes

Les cellules souches embryonnaires ont été décrites pour la première fois en 1981. Ce sont des cellules pluripotentes obtenues à partir de la masse interne du blastocyste, qui représente pendant la première semaine suivant la fertilisation, le premier stade de l'embryon.

In vitro, les cellules souches embryonnaires conservent leur état indifférencié dans des conditions appropriées de culture, ce qui leur permet de s'auto-renouveler [93].

Ces cellules font l'objet de très nombreuses controverses pour leurs utilisations dans la recherche médicale, et sont rarement utilisées en ingénierie tissulaire en clinique [94]. L'obstacle majeur au développement de la recherche clinique sur les cellules souches embryonnaires reste d'ordre éthique, car leur isolement nécessite la destruction d'un embryon. L'utilisation de ces cellules en ingénierie tissulaire a donc été limité par les lois sur l'Éthique de 2004 et 2011 qui interdisent les activités de recherche sur l'embryon humain.

Les cellules pluripotentes induites (iPS) sont des cellules souches pluripotentes dérivées de cellules somatiques (adultes ou autres) par reprogrammation induite expérimentalement. Elles ont été découvertes en 2007 par deux équipes qui ont étudié un moyen de les produire en laboratoire [95, 96] . Ces cellules somatiques prélevées chez un donneur sont ensuite modifiées génétiquement *in vitro* pour subir le phénomène de reprogrammation et devenir des cellules souches pluripotentes qui comportent les mêmes propriétés que les cellules souches embryonnaires humaine mais qui sont cette fois parfaitement encadrées sur le plan Éthique. Les iPS peuvent en principe produire tous les types cellulaires de l'organisme.

1.2.4. Les cellules souches multipotentes

Ces cellules ont la capacité de s'autorenouveler et se différencier pour réparer le tissu endommagé ou maintenir le tissu en l'état. Les cellules souches multipotentes sont localisées au niveau de divers tissus dans le corps humain tel que la moelle osseuse, le foie, le cerveau, la peau, le tissu adipeux ainsi que dans le sang [97, 98].

1.2.4.1. Les cellules souches neurales

Ce sont des cellules souches multipotentes, présentes dans le système nerveux qui peuvent s'auto-renouveler, et engendrer des cellules progénitrices différenciées afin de générer des lignées de neurones ainsi que des cellules gliales, telles que des astrocytes et des oligodendrocytes. Les cellules souches du SNC présentent des propriétés semblables que ce soit chez l'embryon ou chez l'adulte. Elles sont isolées d'une zone potentiellement neurogénique et ensuite sont mises en culture et se multiplient en présence de facteurs

de croissance (ex : EGF, bFGF). En absence de ces facteurs mitogènes et en présence d'un substrat permettant leur adhérence, les cellules souches neurales s'engagent par défaut dans une voie de différenciation neuronale ou gliale. L'engagement d'une forte proportion des cellules souches neurales dans une voie de différenciation particulière nécessite des facteurs inducteurs tels le CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) ou le BMP (Bone Morphogenetic Protein) pour la différenciation gliale, et l'hormone thyroïdienne T3 pour les précurseurs de la lignée oligodentrocytaire [99].

Les cellules souches neurales présentent un espoir thérapeutique, en ouvrant une voie pour le traitement de plusieurs maladies neurodégénérative grâce à leurs différentes caractéristiques. Les cellules souches neurales, peuvent donc fournir une source illimitée de cellules neuronale, mais malheureusement ces cellules sont soumises à des problèmes d'ordre éthique car elles sont prélevées à partir des embryons/fœtus. Leur prélèvement à partir d'un cerveau adulte est possible mais reste délicat.

1.2.4.2. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM)

La moelle osseuse contient plusieurs types de cellules souches principalement, les CSM et les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Dans cette étude nous nous intéresseront aux CSM.

Le terme CSM a été donné par Arnold Caplan en 1991 [100]. Les CSM sont des cellules souches multipotentes. Elles peuvent produire plusieurs types de cellules appartenant aux tissus squelettiques, tels que le cartilage, les os, la graisse et les cellules du stroma cellulaire.

1.2.4.2.1. Identification et localisation des CSM

Les CSM sont des cellules souches d'origine mésodermique présentes dans plusieurs tissus de l'organisme adulte, tels que la moelle osseuse. Les premières recherches visant à identifier et isoler des CSM à partir de la moelle osseuse, datent de 1976 et ont démontré que le potentiel ostéogénique, révélé par la transplantation hétérotopique de cellules de

la moelle osseuse, était associé à une sous population mineure de cellules de la moelle osseuse [101]. Ces travaux ont permis une deuxième avancée majeure en montrant que ces colonies étaient des clones provenant d'une cellule, la Colony-Forming Unit-Fibroblastes (CFU-F) et pouvaient se différencier en ostéoblastes. D'autres études sur ces cellules ont confirmé la capacité de se différencier en cellules dérivant du feuillet embryonnaire mésoderme et leur pouvoir de s'auto-renouveler [102]. Les cellules souches mésenchymateuses présentes dans la moelle osseuse peuvent se différencier non seulement en ostéoblastes, chondrocytes, et adipocytes mais également en cellules du type myocardiques et neuronales [103].

Les CSM ou des cellules avec un phénotype proche des CSM ont été également isolées à partir de divers tissus incluant le tissu adipeux, les muscles, le cartilage, la membrane synoviale, la pulpe dentaire, les amygdales, le périoste, les tendons, le tissu fœtal, le placenta, la veine ombilicale, et le système vasculaire [102] (Figure 9).

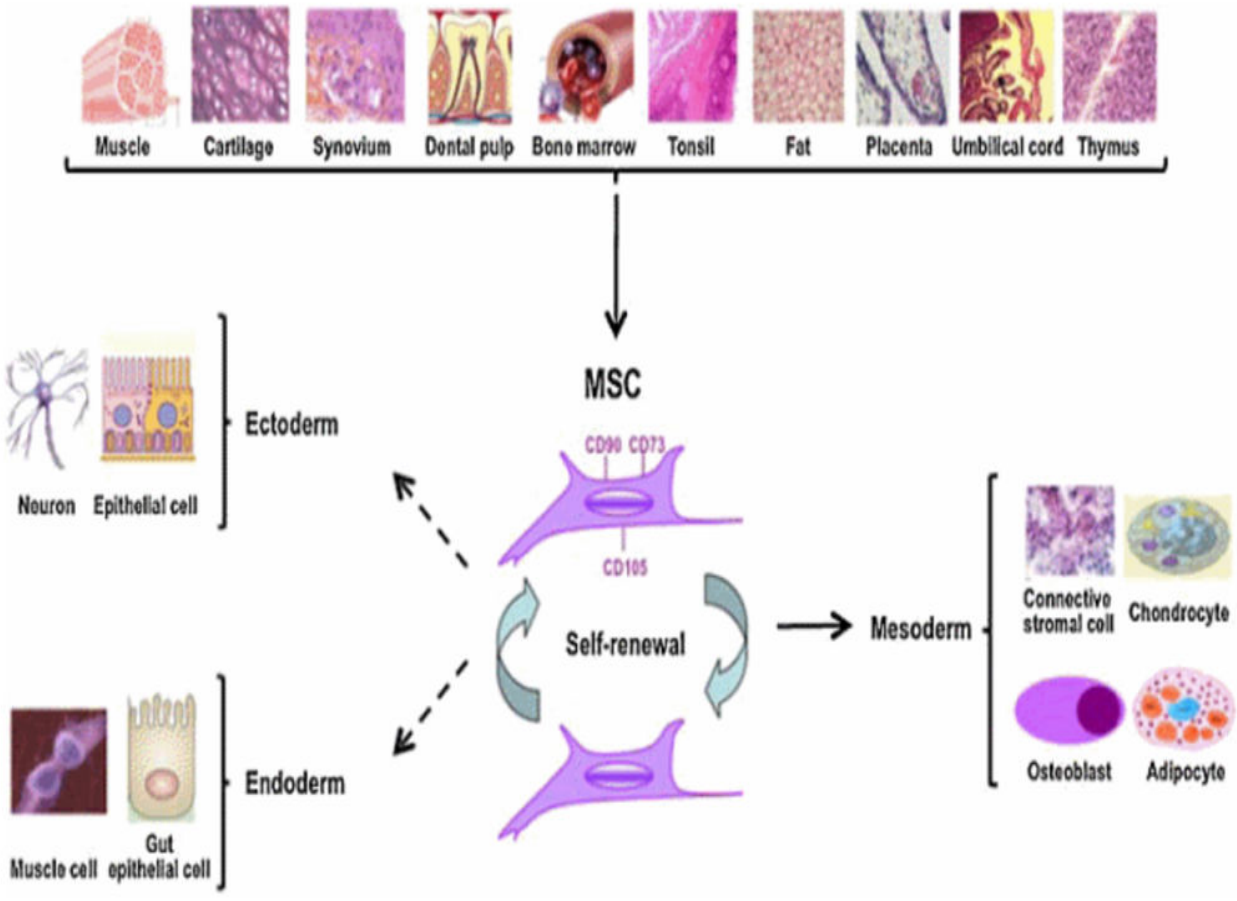


Figure 9: Identification et localisation des CSM[104]

1.2.4.2.2. Phénotype des CSM

Les CSM sont des cellules qui expriment de nombreux antigènes de surface. Ces cellules sont dépourvues de marqueurs spécifiques et uniques, mais la caractérisation précise des CSM est complexe du fait que plusieurs antigènes sont portés également par les cellules hématopoïétiques et les cellules issues de la lignée mésodermique [107]. Il a été montré que la différence entre les espèces de CSM, la source tissulaire et les conditions de culture, influençait le niveau d'expression des épitopes avec une certaine variabilité. En 2006, l'International Society for Cellular Therapy a proposé des standards pour la caractérisation des CSM [105] :

- L'adhérence cellulaire au plastique dans des conditions de culture standard,
- Un phénotype cellulaire défini par cytométrie en flux en utilisant un panel d'antigènes de surface dont l'expression est positive et un panel d'antigènes dont l'expression est négative (Tableau 2).
- Un potentiel de différenciation multipotente *in vitro* dans des conditions standard vers les trois voies mésenchymateuses : ostéoblastes, chondroblastes et adipocytes.

Antigènes présents à la surface des CSM (≥95%)	**Antigènes absents de la surface des CSM (≤2%)**
CD105 (SH2, endogline) CD73 (SH3, SH4, ecto5'nucléotidase) CD90 (Thy-1) CD271 (récepteur de faible affinité au NGF) CD106 (VCAM-1) CD54 (ICAM-1) CD29 (ITGB1) CD44 (Récepteur à l'acide hyaluronique)	CD45 (marqueur leucocytaire) CD34 (progéniteurs hématopoïétiques/cellules endothéliales) CD14 ou CD11b (monocytes et macrophages) CD79α ou CD19 (lymphocytes B) HLA-DR (en l'absence de stimulation par l'interféron γ)

Tableau 2: Caractérisation des CSM par immuno-marquage en cytométrie de flux [105]

Les CSM ont la capacité de régénérer du tissu lésé par la sécrétion d'un large nombre de macromolécules bioactives qui sont à la fois immuno-régulatrices et servent à structurer le microenvironnement tissulaire [106- 108]. De plus, il a été montré que le prétraitement des CSM par des cytokines pro-inflammatoires tel que l'interféron-gamma (IFN-γ), le facteur de nécrose tumorale (TNF-α) ou encore l'interleukine 1 (IL-1) favorisait la production de plusieurs facteurs de croissance possédant une activité anti-inflammatoire tel que IDO (Indoleamine 2,3-dioxygénase) par les cellules [109, 110] (Figure 10).

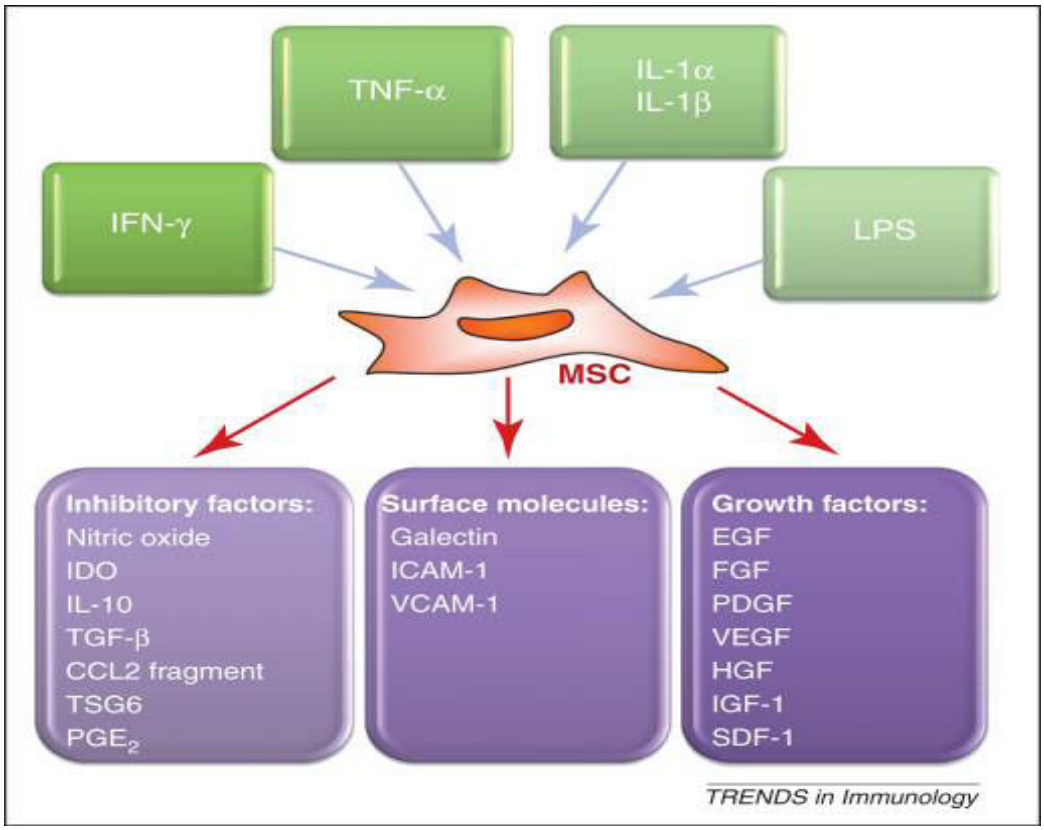


Figure 10: Facteurs et molécules indispensables pour l'immuno-régulation et la réparation tissulaire par les CSM [108]

1.2.4.2.3. L'utilisation des CSM en médecine régénérative de tissu nerveux

De nombreuses sources de cellules souches peuvent être utilisées dans l'ingénierie tissulaire, mais leurs applications soulèvent différents problèmes principalement d'ordre éthiques, ou liés à la quantité limitée de cellules disponibles. À ce jour, l'utilisation de CSM adultes semble être encore la plus prometteuse pour des applications cliniques [111]. Pour traiter diverses pathologies humaines, les CSM ont fait l'objet d'études cliniques depuis une quinzaine d'années, et le potentiel thérapeutique considérable CSM humaines

multipotentes a suscité un intérêt croissant pour une grande variété de disciplines biomédicales.

Les CSM sont présentes principalement dans la moelle osseuse adulte au niveau du sternum, du rachis, du bassin et des épaules. Généralement, le prélèvement de moelle osseuse est fait suite à une biopsie au niveau de la crête iliaque postérieure (Figure 11) [112]. Les CSM sont faciles à prélever chez l'adulte, avec peu de problèmes d'ordre éthique et offrent en plus la possibilité de pouvoir réaliser des greffes autologues.

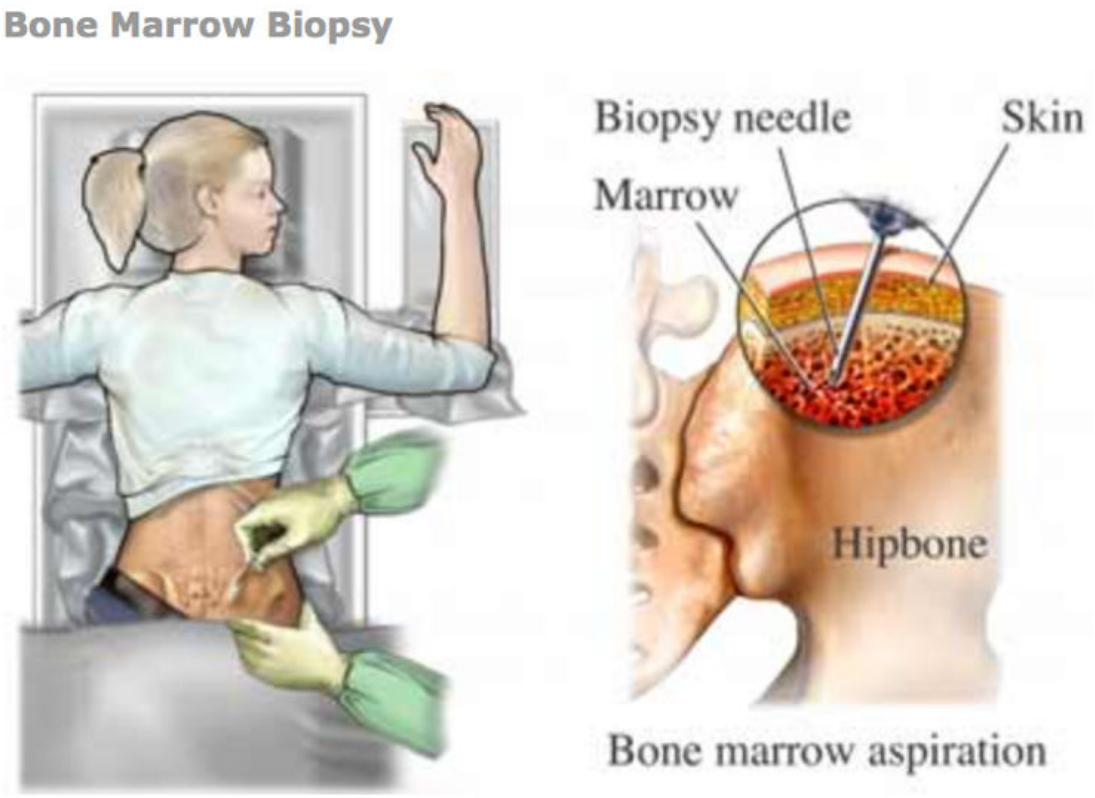


Figure 11: Biopsie de la moelle osseuse [112]

Les CSM ont des effets thérapeutiques majeurs dans la régénération et la réparation des tissus nerveux. En effet, plusieurs études ont montré que la transplantation de CSM avaient un effet neuroprotecteur dans la zone lésée dans différents modèles cérébraux [113, 114], ce qui donne un espoir majeur dans le traitement de nombreuses pathologies neurodégénératives. En outre, des travaux ont montré la plasticité des CSM et leurs

capacités à se transdifférencier en cellules de type neuronales ou gliales [115]. L'étude du sécrétome des CSM montre que ces cellules ont la capacité de produire différents facteurs de croissance et des cytokines/chimiokines qui ont principalement un effet direct sur les cellules neuronales : BDNF, bFGF, GDNF, CNTF, FGF8… Le BDNF est un des facteurs sécrétés par les CSM qui a été identifié comme ayant un effet majeur dans la maladie de Huntington [116]. La production des facteurs neurotrophiques par les CSM est influencée par plusieurs paramètres. Ainsi des études ont montré que l'exposition des CSM à certaines cytokines proinflammatoires, à un environnement hypoxique, à des cellules apoptotiques ou à des microglies activées, potentialisait l'activité neuroprotectrice des CSM en induisant une augmentation de la quantité de facteurs neurotrophiques sécrétés [117- 119].

1.2.4.2.4. Cellules MIAMI : sous population des CSM

Une nouvelle sous-population des CSM a été isolé et décrite sous le nom de cellules « Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible » (MIAMI) [120]. Cette sous-population homogène obtenue à partir de la moelle osseuse de vertèbres ou de la crête iliaque, a la particularité d'être isolée dans des conditions similaires à leur niche *in vivo*, notamment à 3 % d'O_2, et sont ensuite amplifiées en faible densité. De manière intéressante, il a été montré que ces cellules sont capables de se différencier *in vitro* en cellules des trois feuillets embryonnaires. Elles peuvent donc s'engager, *in vitro* [120], dans des voies de différenciations chondrogéniques, ostéogéniques, adipogéniques, et former des structures semblables aux îlots pancréatiques, permettant de sécréter de l'insuline. Elle ont également la possibilité intéressante de s'engager dans des voies de différenciation de type neuronales [7]. Ainsi, *in vitro*, en utilisant un protocole de différenciation en trois étapes (avec notamment des neurotrophines), il a été observé un changement des profils d'expression à travers le suivi de marqueurs de la différenciation neuronale telle que Nestine, β3-tubuline et finalement le Neurofilament-M (NFM), confirmant ainsi l'hypothèse du potentiel de différenciation des cellules MIAMI vers un phénotype neuronal [121]. Suite à cette différenciation neuronale les cellules MIAMI peuvent exprimer des canaux ioniques fonctionnels avec un courant entrant et un courant sortant, ce qui conforte l'idée de les utiliser en médecine régénérative dans les troubles du système nerveux central [122]. De plus, ces cellules expriment naturellement plus de

facteurs agissant sur la survie, l'angiogenèse, la neuroréparation et la neuroprotection que les autres CSM [123]. Ces cellules expriment des chimiokines comme la fractalkine (un anti-apoptotique et un agent pro-prolifératif des cellules vasculaires), l'IL-8 (cytokine angiogénique et artériogénique) ou encore l'IL-6 (permettant une réponse pro/anti-inflammatoire). D'autres cytokines telles que l'IL-12, l'IFN-α ou des facteurs de croissance BDNF, VEGF, … peuvent être également exprimées [7]. Enfin, les cellules MIAMI peuvent aussi exprimer d'autres protéines comme UCHL1 (Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1) qui pourrait induire une neuroprotection pour certaines maladies neurodégénératives (dysfonction dans la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer), ou HSP 27 (une cytokine impliquée dans la prévention de la sénescence, la neuroprotection, l'immunmodulation et l'athéroprotection) [7]. En outre, les cellules MIAMI ont un renouvellement protéique plus rapide que les autres CSM. Cela permet d'envisager d'utiliser ces cellules de manière à produire localement et rapidement des facteurs neuroprotecteurs et neuroréparateurs au site de la lésion.

De manière intéressante, il a déjà été démontré qu'il est possible de pré-induire les cellules MIAMI avec des facteurs de croissance tels que EGF et bFGF en précurseurs neuraux/neuronaux [10]. Le traitement aux E/F (EGF/bFGF) induit une diminution de la prolifération et une augmentation de l'expression de P21, indiquant leur engagement vers une différenciation et un changement de morphologie cellulaire en adoptant des formes de type arborisé caractéristiques du phénotype neural/neuronal. Ces cellules répondent mieux, après prétraitement utilisant des neurotrophines, au protocole de différenciation neuronale pour finalement se différencier en cellules qui expriment des marqueurs neuronaux comme le neurofilament– moyen (NFM) [10]. Une autre étude a montré que le traitement par E/F des cellules MIAMI induisait l'augmentation de l'expression de certaines protéines comme un facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF-A), avec une augmentation de l'angiogenèse, impliqué dans la neuroprotection et la neurogènèse; ce traitement pourrait également avoir un effet sur la migration des cellules neuronales [124]. Il apparait donc que les cellules MIAMI peuvent se révéler comme un atout dans la lutte contre les maladies neurodégénératives.

1.3. Le choix du microenvironnement pour la régénération du SNC : les microcarriers pharmacologiquements actifs

Le choix du microenvironnement est essentiel afin que les cellules transplantées puissent maintenir un stade de différenciation, survivre et sécréter des facteurs de croissance permettant un processus de régénération neuronal. Ce microenvironnement cellulaire, peut impliquer plusieurs facteurs biochimiques, physico-chimiques et mécaniques. Il peut être en partie mimé *in vitro* à l'aide de modèles de culture en deux ou trois dimensions. Cette approche est complétée par l'étude des signaux cellulaires spécifiques susceptibles d'améliorer la construction tissulaire par les cellules [125]. Dans des modèles 3-D, même si ceux-ci miment de plus près l'environnement physiologique, les mécanismes biologiques et physico-chimiques sont moins connus que pour les modèles 2-D.

Les molécules de la MEC sont produites par les cellules et se trouvent soit sur la surface des cellules soit entre les cellules. On peut les classer en 3 groupes : les glycoprotéines adhérentes (laminine (LM) et fibronectine (FN) entre autres), les glycosaminoglycanes et protéoglycanes, et les protéines fibrillaires (collagène et élastine). Les glycoprotéines sont impliquées dans l'adhérence des cellules sur un tissu via leur fixation sur les intégrines membranaires exprimées. Leur adsorption à la surface de matériaux permettrait donc d'augmenter l'adhérence des cellules au support, voir même de réguler le comportement des cellules s'y accrochant via différents mécanismes (par exemple interaction intégrine/ligand) [126]. Un support présentant des peptides capables d'interagir avec les protéoglycanes membranaires et les intégrines de la cellule induisent une différenciation ectodermique [127]. Il a été rapporté que la laminine-A pouvait induire une différenciation neuronale et ce via son interaction avec l'intégrine spécifique α6β1 [14]. Ceci marque à la fois l'importance du choix des peptides/protéines à adsorber à la surface du support mais aussi l'importance des intégrines impliquées dans les interactions cellule-support. Par ailleurs, l'interaction entre la LM et l'intégrine α6-β1 aurait aussi un rôle dans l'échappement à l'anoïkose [128]. De ce fait, la LM semble être un bon candidat pour la fonctionnalisation de support 3-D, afin de permettre l'adhésion de cellules.

Les facteurs de croissance sont largement utilisés dans le domaine de l'ingénierie tissulaire afin de favoriser la croissance tissulaire. L'injection directe des facteurs de croissance peut accélérer la régénération de cellules mais n'est pas assez efficace.

Les micro-carriers pharmacologiquement actifs (MPA)

Dans le laboratoire nous avons développé et breveté un outil d'ingénierie tissulaire qui repose sur l'utilisation de biomatériaux fournissant un support adéquat, dites « biomimétiques », en 3 dimensions aux cellules transplantées en combinaison avec la libération d'un facteur de croissance au sein d'un vecteur unique de petite taille, les microcarriers pharmacologiquement actifs (MPA) (Montero-Menei et al PCT/ WO 03/092657 A1. 2003 ; Montero-Menei et al PCT/EP2013/056813). Les MPA sont des MS d'acide poly(lactique-co-glycolique) PLGA biodégradables et biocompatibles recouvertes d'une molécule de la matrice extracellulaire (MEC) permettant l'adhésion des cellules et fournissant un microenvironnement en 3 dimensions *in vitro* et *in vivo*. De plus, les MPA libèrent un facteur thérapeutique au cours de leur dégradation, qui peut agir en synergie avec la surface biomimétique pour maintenir la survie et favoriser la différenciation des cellules transportées, mais qui pourra également avoir un effet direct sur le tissu hôte [129]. Après implantation, la dégradation des MPA est totale en 2 mois environ, et permet une intégration optimale des cellules dans le parenchyme cérébral sans induire de réaction inflammatoire notoire [121, 122]. De part le choix de la molécule utilisée pour la surface biomimétique et du facteur encapsulé, les MPA constituent un outil multifonction utilisable dans de nombreux contextes et avec toute une variété de cellules (Figure 12).

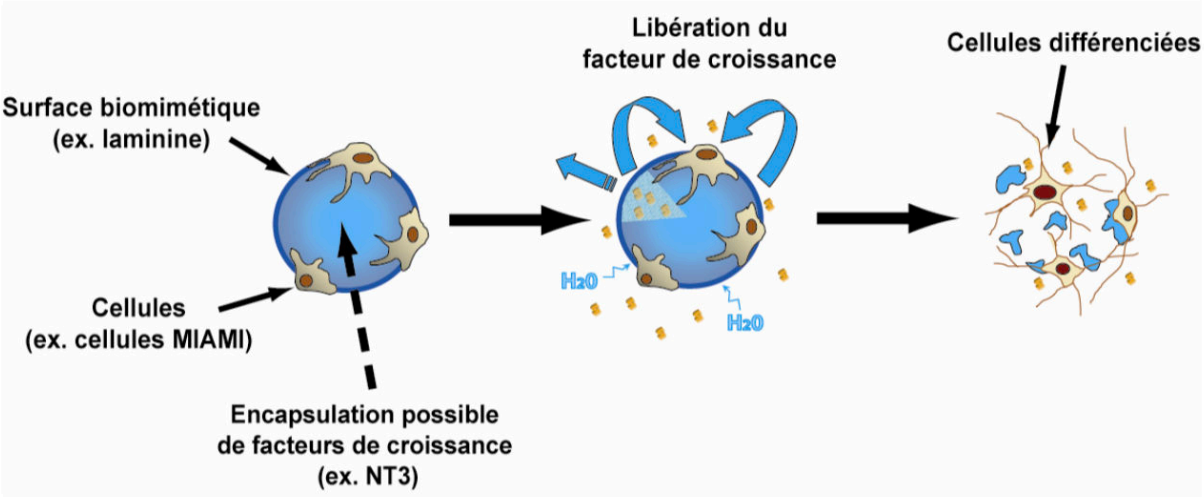


Figure 12: Concept des microcarriers pharmacologiquement actifs [129]

L'utilisation de cellules MIAMI prétraités ou pas avec EGF et bFGF couplées à des MPA recouverts de molécule de la MEC a montré son efficacité *in vivo* en thérapie cellulaire dans des modèles d'ischémie cérébrale [9]. Les MPA favorisent la survie des cellules, leur différenciation vers un phénotype neuronal et leur effet neuroprotecteur/réparateur lors d'ischémies cérébrales. Dans d'autres études, l'utilisation de ces cellules portées par des MPA et libérant un facteur de croissance s'est montrée pertinente. Il a été montré que les MPA recouvertes de FN et libérant du VEGF empêchent la mort par apoptose des CSM [130] et des précurseurs endothéliaux [131] portées par ces MPA. De même, des cellules MIAMI pré-traitées en E/F portées par des MPA recouverte d'une surface biomimétique de LM et libérant du NT-3 ont un effet neuroprotecteur et neuroréparateur sur le système dopaminergique en dégénérescence. Cet effet semble être associé à la meilleure survie de cellules MIAMI et à leur capacité à secréter des facteurs de réparation tissulaire comme le GDNF, le VEGF [132, 133]. Ces études ont mis en évidence que les MPA améliorent la survie et différenciation neuronale des cellules transportées à leur surface et que lorsqu'ils délivrent des facteurs neurotrophiques, cet effet est plus important.

En parallèle de leur application pour les pathologies du SNC, les MPA ont été adaptées à la réparation du cartilage et du tissu cardiaque ischémique [134- 136].

2. Les différents paramètres qui influencent le comportement des cellules à la surface d'un matériau

Ces dernières années, des progrès ont été accomplies dans la compréhension des mécanismes biologiques qui influencent le comportement des cellules en ingénierie tissulaire. Cependant, il a été montré que les cellules sont sensibles aux propriétés physico-chimiques et mécaniques du substrat sur lequel elles adhèrent. Les « scaffolds » « idéaux » sont des biomatériaux qui fournissent un support initial permettant aux cellules d'adhérer, puis de survivre, de proliférer et/ou de se différencier, ainsi que de former une MEC [137]. Ces comportements des cellules à la surface d'un matériau dépend des caractéristiques physico-chimiques du matériau (charge, mouillabilité, caractère hydrophile ou hydrophobe, groupements fonctionnels spécifiques de surface et de la topographie de sa surface). Plusieurs études ont notamment montré que le comportement des cellules est considérablement influencé par la topographie et la microstructure (porosité, taille des pores, forme des pores, interconnectivité, surface spécifique) [138] ainsi que par les propriétés mécaniques [139, 140].

2.1. Caractéristiques physico-chimiques du matériau

La morphologie, la composition chimique, l'hydrophilie ou la mouillabilité de surface du matériau corrélée à l'énergie libre de surface (γ_S), sont quelques paramètres qui décrivent les propriétés physico-chimiques de surface d'un matériau [141, 142]. Ces différents paramètres ne sont pas toujours indépendants les uns des autres.

2.1.1. La topographie de surface

La topographie de surface peut affecter le comportement des cellules neuronales transportées par des scaffolds. Des études ont montré que la topographie d'un substrat ou scaffold 3-D peut faciliter la différenciation neuronale et l'alignement des neurites. Lorsque les cellules souches sont cultivées dans des scaffolds poreux de polystyrène, la croissance des neurites suite à la différenciation neuronale de ces cellules a été significativement améliorée par rapport à la culture sur une surface plane [143]. La rugosité du matériau peut également influencer l'adhérence des cellules. Dans le cas

d'ostéoblastes humains, par exemple, il apparait que la rugosité du support doit être faible pour permettre au cytosquelette d'épouser la forme de la surface métallique (Ti6Al4V) et permettre un bon étalement cellulaire [144]. Cependant d'autres études montrent des résultats contradictoires. En effet, D.D. Deligianni et al. ont montré que l'augmentation de la rugosité des surfaces d'hydroxyapatite favorise, *in vitro*, l'adhérence des cellules de la moelle osseuse [145]. Ces résultats indiquent que la rugosité seule ne régule pas l'adhérence mais que la composition chimique du substrat module aussi la réponse. Ils montrent également que le type de cellule utilisée dans chaque étude doit être prise en compte car les résultats peuvent être différents.

La réponse des cellules en fonction des caractéristiques micro-topographiques ou nano-topographiques dépend principalement du type et de la taille de la cellule. Pour les cellules plus grandes, comme les ostéoblastes et les précurseurs neuronaux, une rugosité importante de la surface pourrait être impliquée dans le processus de prolifération [146]. Aussi, en augmentant la rugosité d'un biomatériau composé de titane il est possible de favoriser un phénotype ostéoblastique propice à la formation de tissu osseux [147]. A l'inverse, les cellules souches pluripotentes induites peuvent se différencier vers un phénotype neuronal lorsque le support présente une faible rugosité [148].

Le comportement des cellules dépend donc de la morphologie de surface d'un matériau et en particulier de sa rugosité mais ce comportement diffère selon la nature des cellules utilisées.

2.1.2. La rigidité de surface

Un autre paramètre impliqué dans les processus régissant le développement cellulaire en présence de biomatériaux et qui a été longtemps négligé par les biologistes, est la rigidité du support. Ainsi, la peau n'a pas la même rigidité ou élasticité que le squelette osseux ou le système sanguin et lymphatique. D'un point de vue physique, la rigidité désigne la relation entre une force appliquée sur la surface d'un matériau et sa déformation. Cette force appliquée par unité de surface (N/m^2) peut également s'exprimer par une contrainte mesurée en Pascal (Pa). La rigidité d'un certain nombre de tissus a été mesurée (Tableau 3 et Figure 13), sur des tissus mous (tissu cérébral par exemple) ou sur des tissu

plus rigide (tissu osseux par exemple) et montre des différences de rigidité de plusieurs ordres de grandeurs.

Tissu	Cérébral	Musculaire	Adipeux	Artérien	Osseux
nN/μm^2 (= *k*Pa)	0,1 – 10	12 – 100	20	100 – 3 8000	17 000 000 28 900 000

Tableau 3: La rigidité physiologique de différents tissus et cellules humains [149]

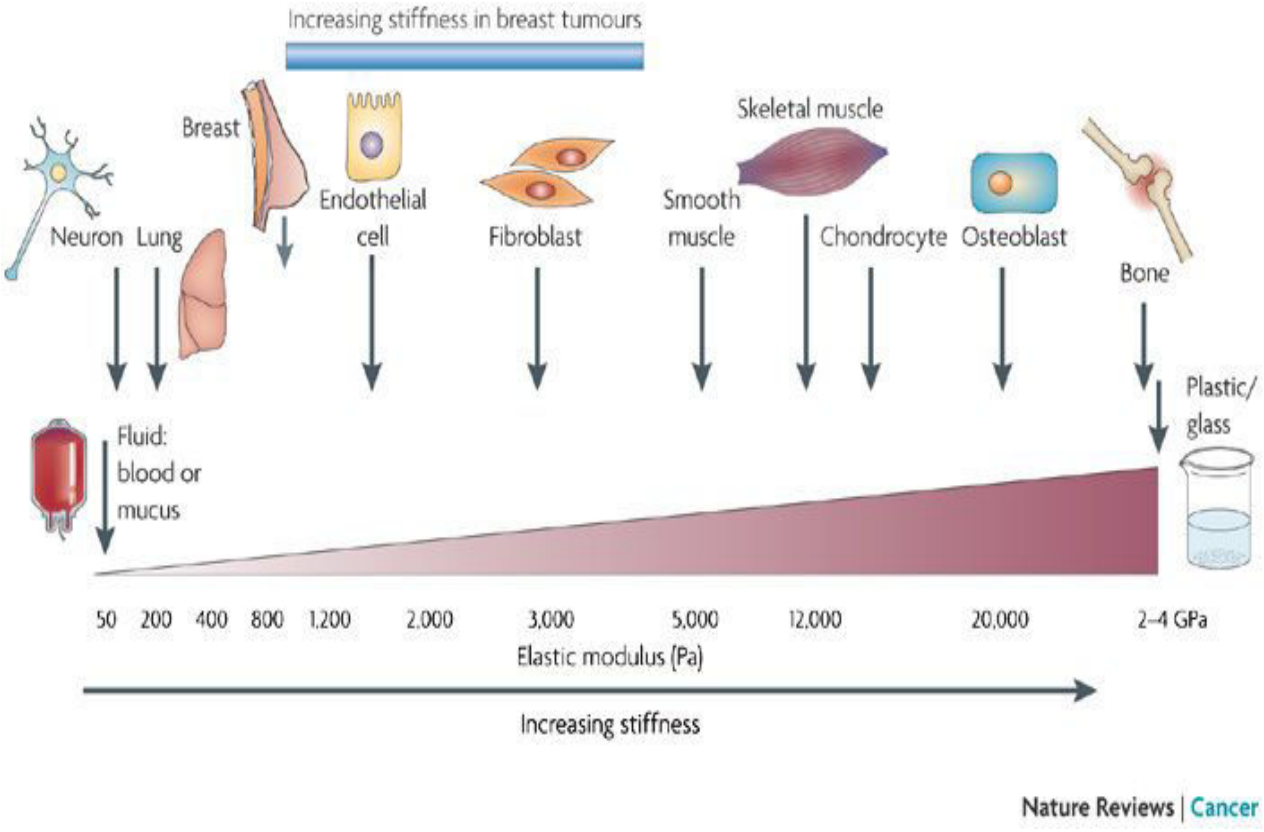


Figure 13: Rigidité physiologique de différents tissus et cellules humaines [150]

La technique du gel de rigidité contrôlable a été développé pour la première fois par Pelham et Wang (1997), afin de montrer que le comportement de cellules fibroblastiques et épithéliales peut être influencé par la rigidité de différentes supports [151].

L'étalement cellulaire et l'organisation du cytosquelette d'actine ainsi que la morphologie, l'activité des lamellipodia et la migration des cellules dépendraient de ce facteur. Au niveau moléculaire, la distribution de la vinculine et la phosphorylation des tyrosines de plusieurs protéines dépendrait également de la rigidité, suggérant une transmission des signaux de l'environnement cellulaire vers l'environnement intracellulaire. D'autres équipes ont ensuite montré que nombreux types cellulaires sont sensibles à la rigidité du substrat comme les cellules endothéliales [152, 153] et les cellules musculaires lisses [154].

Plusieurs études récentes ont rapporté que la prolifération et la différenciation des cellules souches sont modulées par la rigidité du substrat mais aussi par l'élasticité de la matrice extracellulaire [139] (Figure 14). La préparation de gels de polyacrylamide (PA) de différentes élasticités permettant la culture de CSM ont montré que les CSM exprimaient un marqueur de cellules neuronales, la β3-tubuline, sur les substrats souples dont les propriétés mécaniques sont proches du tissu cérébral. Celles cultivées sur des substrats dont l'élasticité était proche du tissu osseux exprimait le CBFα1 (core-binding factor subunit alpha-1) aussi connu comme Runx2 (Runt-related transcription factor 2) qui est un facteur de transcription impliqué dans la différenciation en ostéoblaste [139]. De même, il a été constaté que les biomatériaux d'élasticité de 1 kPa conduisent à une différenciation neuronale des CSM humaines, alors que les biomatériaux d'élasticité de 10 kPa conduisent à une différenciation gliale [155]. Les cellules souches neuronales répondent aussi à la rigidité de la MEC, qui a un effet sur la différenciation de ces cellules. En utilisant un système de culture synthétique présentant une élasticité qui varie entre 10 et 10000 Pa il a été observé que l'allongement cellulaire et la différenciation étaient inhibées sur les substrats souples (10 Pa), alors que ces cellules se multipliaient sur des substrats plus dur d' élasticité de l'ordre de 100 Pa ou plus [156].

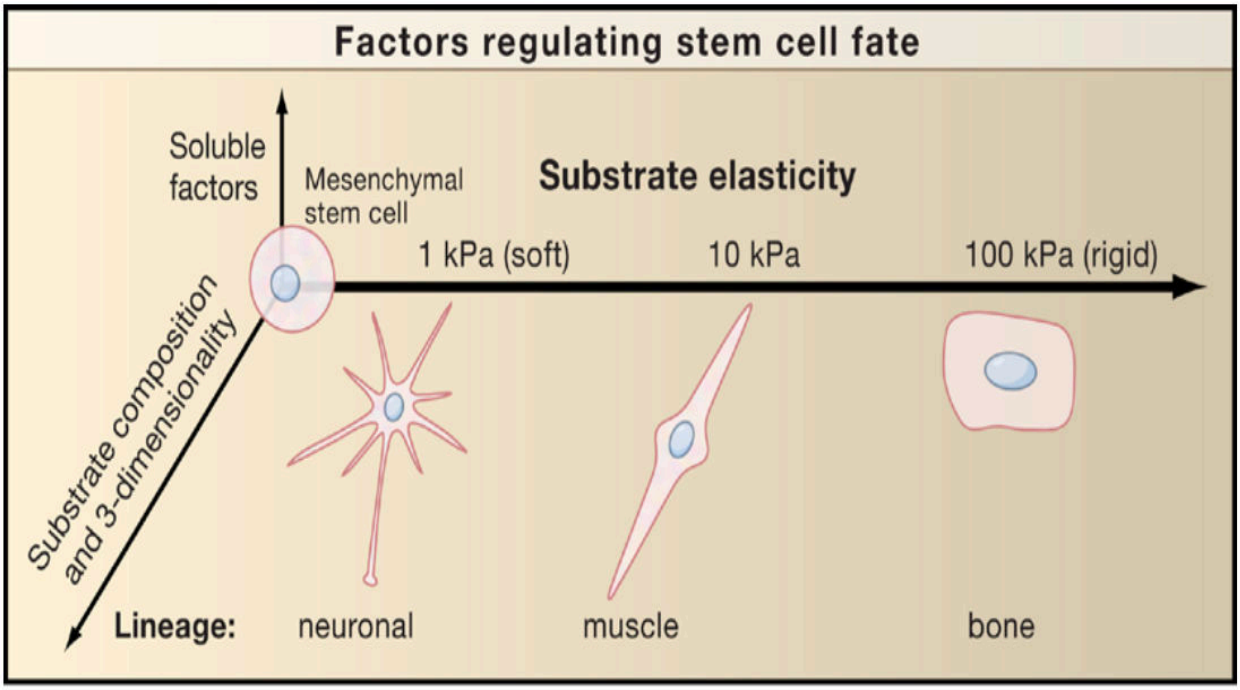


Figure 14: Facteurs régulant la différenciation cellulaire [157]

2.1.3. Caractère hydrophile ou hydrophobe de surface

Selon plusieurs études, il est important de mettre l'accent sur le caractère hydrophile et hydrophobe des divers biomatériaux qui joue un rôle primordial sur le comportement des cellules [158, 159]. Généralement, le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface est décrit en termes de mouillabilité avec l'eau. La mouillabilité est couramment déterminée par la mesure d'angle de contact en utilisant la méthode de la goutte posée. La surface est considérée hydrophobe si l'eau ne s'étale pas sur le substrat et la goutte déposée forme une calotte sphérique avec un angle d'équilibre important. L'eau s'étalera plus, voire spontanément, sur une surface hydrophile avec un angle de contact faible ou proche de zéro[160] (Figure 15). Dans le cas de cellules souches humaines issues de la moelle osseuse interagissant à la surface de polymères plus ou moins hydrophiles, l'adhérence et l'étalement de ces cellules étaient meilleurs sur les surfaces hydrophiles que sur les surfaces hydrophobes. Les cellules attachées à des surfaces hydrophiles étaient largement aplaties, indiquant une fixation et un étalement relativement forts, alors que la majorité des cellules sur des surfaces hydrophobes étaient arrondies,

indiquant un attachement médiocre [161]. Sur des surfaces polymères présentant différents degrés de mouillabilité déterminés par la mesure d'angles de contact, l'adhérence et la prolifération *in vitro* de cellules endothéliales humaines ont été étudiés. L'adhésion des cellules augmentait avec l'augmentation de l'angle de contact des surfaces du polymère hydrophile de type cellulose et l'adhésion optimale s'est généralement produite sur des polymères modérément mouillables conduisent à un profil d'adsorption de protéines et / ou cellulaire favorable à la croissance de cellules endothéliales humaines [162]. Pour le même type cellulaire, une faible adhérence a été mesurée sur des surfaces de PMMA rendues hydrophobe après traitement plasma, suite au dépôt de molécules de fluor [163].

Tous ces résultats suggèrent que les polymères modérément mouillables conduisent à un profil d'adsorption de protéines sériques et / ou cellulaire favorable à la croissance de cellules humaines.

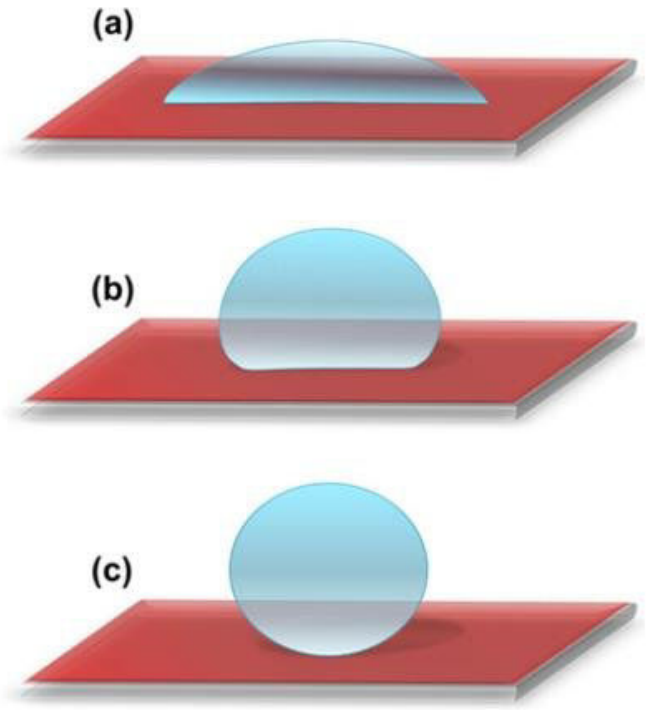


Figure 15: Un schéma montrant (a) une surface hydrophile avec un angle de contact avec l'eau inférieur à 90 °; (b) surface hydrophobe avec un angle de contact avec l'eau

supérieur à 90 ° et (c) surface superhydrophobe avec un angle de contact de l'eau supérieur à 120° [164].

2.1.4. L'énergie libre de surface

L'énergie libre de surface γ_s provient des interactions intermoléculaires à une interface. Il est possible de calculer les contribution polaires (d'origine électrostatiques ou acido-basiques de la surface) ou dispersive (interactions de type Van der Waals) de l'énergie libre de surface d'un solide en mesurant les angles de contact à l'aide de différents liquides polaires et apolaires dont on connait les contributions polaires et dispersives de leur énergie de cohésion [165]. Ces études permettent d'accéder aux énergies de surface du solide, à l'échelle moléculaire, ce qui est difficile à obtenir par d'autres méthodes souvent destructrices. Quelques études ont relié l'adhérence des cellules à l'énergie libre de surface des matériaux. Il a été montré que les matériaux présentant un caractère hydrophile important ayant une faible énergie de surface, typiquement inférieure à 5 mJ/m^2 (hydrogels), ou des matériaux ayant un caractère hydrophobe important avec une énergie de surface d'origine dispersive de l'ordre de 40 mJ/m^2 (silicone, PTFE : polytétrafluoroéthylène par exemple), développaient une plus faible adhérence cellulaire comparée aux matériaux d'énergie de surface intermédiaire (polyméthylméthacrylate par exemple) [166]. Une autre étude réalisée sur des fibroblastes, a permis de constater, cependant, qu'il ne semble pas exister de relation linéaire entre l'énergie libre de surface de polymères (déduites des mesures de l'angle de contact) et l'adhérence, l'étalement ou la migration cellulaire [167]. L'énergie libre totale de surface est donc une donnée souvent utilisée pour comparer les matériaux mais ne suffit pas à prédire les phénomènes d'adhérence cellulaire.

2.1.5. La charge de surface

De nombreuses études ont eu pour but de corréler les charges exprimées à la surface d'un matériau à l'adhérence cellulaire. Ces études, réalisées sur plusieurs types cellulaires, ont montré une adhérence très faible sur des surfaces chargées négativement, contenant des

groupements carboxylates (COO^-), sulfates (SO_4^{2-}) ou sulfonates (SO_3^-) [168, 169], ainsi qu'une forte adhérence et prolifération cellulaire sur les surfaces chargées positivement [170]. Cependant, dans une étude, malgré la présence de charges négatives en surface les cellules présentent une forte adhérence et prolifération [171]. Il semble donc que la nature des charges est importante à prendre en compte mais il faut le considérer dans un plus grand contexte des caractéristiques physico-chimiques.

2.2. Adsorption des protéines sur un matériau

2.2.1. Les interactions biomatériau/protéines

La modification de la composition de surface des biomatériaux a fait l'objet de très nombreuses études afin de fournir aux cellules un support approprié. Très souvent, des protéines comme les molécules d'adhérence où des molécules de la MEC sont utilisées pour recouvrir les biomatériaux et assurer une bonne adhérence cellulaire. Il a été montré que l'adhérence, l'étalement et la prolifération cellulaire pouvaient être contrôlés, via l'adsorption des protéines impliquées dans le domaine du revêtement des biomatériaux en contrôlant la quantité de diamines dans les polymères. Une étude a analysé le comportement de cellules endothéliales de l'aorte bovine sur une surface à base de polystyrène sur lequel des nombres variables des unités porteurs de groupements amine tertiaire de FN et de vitronectine ont été greffées. Les résultats montrent que l'adhérence et l'étalement des cellules augmentaient avec la l'augmentation de la proportion de groupements aminés. En effet, l'adsorption des protéines à la surface des polymères peut contrôler l'adhérence, l'étalement et la prolifération cellulaire [172]. De plus, l'adsorption des protéines à la surface des biomatériaux est fortement influencée par les paramètres physico-chimiques de surface et particulièrement la topographie ou les énergies de surface d'origine polaire et dispersives [173, 174].

La quantité de protéines actives qui s'adsorbent à la surface de ces biomatériaux va donc avoir un impact également sur l'adhérence et le comportement cellulaire et par conséquent sur la prolifération. Ce dernier paramètre sera détaillé dans cette partie bibliographique car nous l'avons également choisi comme axe de recherche lors de notre étude.

En général il est admis que l'adsorption des protéines à la surface d'un matériau est contrôlée par plusieurs facteurs qui varient selon le matériau et les protéines. Lorsqu'un biomatériau polymérique est mis en contact avec une protéine, une interaction se traduit rapidement à l'interface biomatériau/protéines. Ces interactions dépendent de plusieurs paramètres :

i) Des propriétés et des caractéristiques intrinsèques de la protéine dans son milieu (point isoélectrique, distribution de charges, structure tridimensionnelle en solution...).
ii) De la nature chimique du substrat (nature, amphiphilie, charge, topographie, …).
iii) Du milieu environnant (pH, la force ionique...) qui peut également influencer l'adsorption des protéines à la surface des biomatériaux en modifiant la conformation protéique mais aussi les propriétés de surface du substrat (charge, énergie de surface, …).

La concentration des protéines dans le milieu, leur affinité pour la surface et la vitesse de transport vers la surface (présence d'une barrière d'énergie par exemple), sont des paramètres qui influencent la cinétique d'adsorption des protéines. Ainsi, une protéine qui a une forte affinité pour le polymère malgré sa faible concentration peut être adsorbée rapidement alors qu'une protéine qui a une faible affinité va être adsorbée en moindre quantité même si cette dernière est en forte concentration. Il a également été montré que, la nature des protéines adsorbées et leurs cinétiques d'adsorption sur les matériaux sont influencées par le matériau employé. (composition chimique, topographie locale, rugosité caractère hydrophile,…) [175, 176].

2.2.2. Conformation des protéines

Il est généralement admis que les protéines peuvent changer leurs conformations en fonction des propriétés physico-chimiques d'une surface. En effet, plusieurs études ont constaté que, les cellules adhèrent plus sur des verres hydrophiles que sur des verres silanisés hydrophobes pour une même quantité de protéine adsorbée (par exemple la FN) [177, 178]. L'hypothèse émise est qu'il y a un changement de conformation de la FN selon le matériau sur lequel s'adsorbe la protéine ce qui impacte le comportement de la cellule.

Ainsi, la FN présente une conformation inactive lorsqu'elle est adsorbée sur des surfaces hydrophobes, ce qui empêche l'adhérence des cellules. Les interactions entre le matériau recouverts des protéines actives et les cellules déclenchent différents signaux dans la cellule induisant des modifications de la croissance cellulaire, de l'expression phénotypique, de la morphologie ou de l'activité biologique de la cellule [179, 180].

La charge de surface peut également moduler l'adsorption des protéines et orienter les liaisons et la spécificité des intégrines de la membrane cellulaire, jouant ainsi un rôle sur l'adhésion cellulaire. Thevenot et al. ont mentionné que l'incorporation de charges négatives peut faciliter l'adsorption de protéines qui favorisent l'adhésion et les réponses cellulaires [181].

La conclusion qu'on peut tirer de ce chapitre bibliographique est que l'impact des propriétés de surface d'un matériau sur le comportement cellulaire diffère d'une façon remarquable dans la littérature, selon le type cellulaire étudié, les conditions expérimentales, ainsi que les méthodes d'analyse et d'interprétation des résultats. Dans ce sens, et afin d'étudier l'effet des propriétés de surface du support sur le comportement de cellules, nécessite une étude approfondie de tous les paramètres physico-chimiques cités dans ce chapitre sur le même type cellulaire. C'est dans ce contexte que nous avons étudié et comparé l'impact que peuvent avoir les MPA formulées par deux biomatériaux (PLGA et PLGA-P188-PLGA) sur l'adhérence et puis la différenciation neuronale de cellules MIAMI.

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Ce travail a été réalisé dans le cadre du développement dans notre laboratoire d'une stratégie innovante de médecine régénératrice, pour les maladies neurodégénératives. Cette approche associe cellules souches et microsphères (MS) à base de polymères synthétiques recouvertes de molécules de la MEC et pouvant libérer des facteurs de croissance, les MPA. Une sous-population humaine de CSM, les cellules MIAMI issues de la moelle osseuse, présentant un grand potentiel de différenciation et sécrétant des fortes quantités des facteurs de réparation tissulaire sont des cellules d'intérêt pour la médecine régénératrice du SN. Ces cellules MIAMI pré-traitées par des facteurs de croissance E/F et sur un substrat de LM se différencient en cellule de type neuronale[10, 121, 133, 182], portées par des MPA libérant ou non des facteurs de croissance ont déjà démontré leurs efficacités de neuroprotection/réparation dans la maladie de Parkinson et suite à des accidents vasculaires cérébraux.. Notre équipe a démontré l'avantage des MPA, constitués de PLGA et de PLGA-P188-PLGA un polymère plus hydrophile. Notamment, ces MPA de PLGA-P188-PLGA ont un profil de libération de facteurs de croissance encapsulés plus intéressant car tout le facteur de croissance encapsulé est libéré sous forme actif [74] [183]. Par ailleurs, notre équipe a également remarqué une différence d'adhérence de cellules MIAMI sur les MPA formulés avec ces deux polymères qui n'a pas été étudié de façon approfondie. Il a aussi observé un nombre supérieur des CSM suite à une culture de 7 jours de ces cellules sur les MPA de PLGA-P188-PLGA comparé aux MPA de PLGA [74].

Ce travail de thèse a pour objectif d'étudier le comportement des cellules MIAMI en fonction des propriétés physicochimiques et mécaniques des deux types de MPA composées de PLGA et PLGA-P188-PLGA. Nous avons volontairement exclu de notre étude la possibilité des MPA de libérer un facteur de croissance et nous nous sommes concentrés sur l'impact des propriétés de surface des MPA sur les cellules MIAMI.

Les principales étapes de ce travail ont été définies comme suit :

Dans un premier temps, nous avons étudié les caractéristiques physicochimique et mécanique des MS avant le recouvrement avec la LM et la PDL.

Dans un second temps, nous avons étudié les propriétés physicochimiques des MS après le recouvrement par LM et PDL, et comparé la distribution du recouvrement sur les MPA. Cela nous a permis de déterminer les paramètres influant directement sur l'adsorption de la LM et PDL par les MPA de PLGA et PLGA-P188-PLGA.

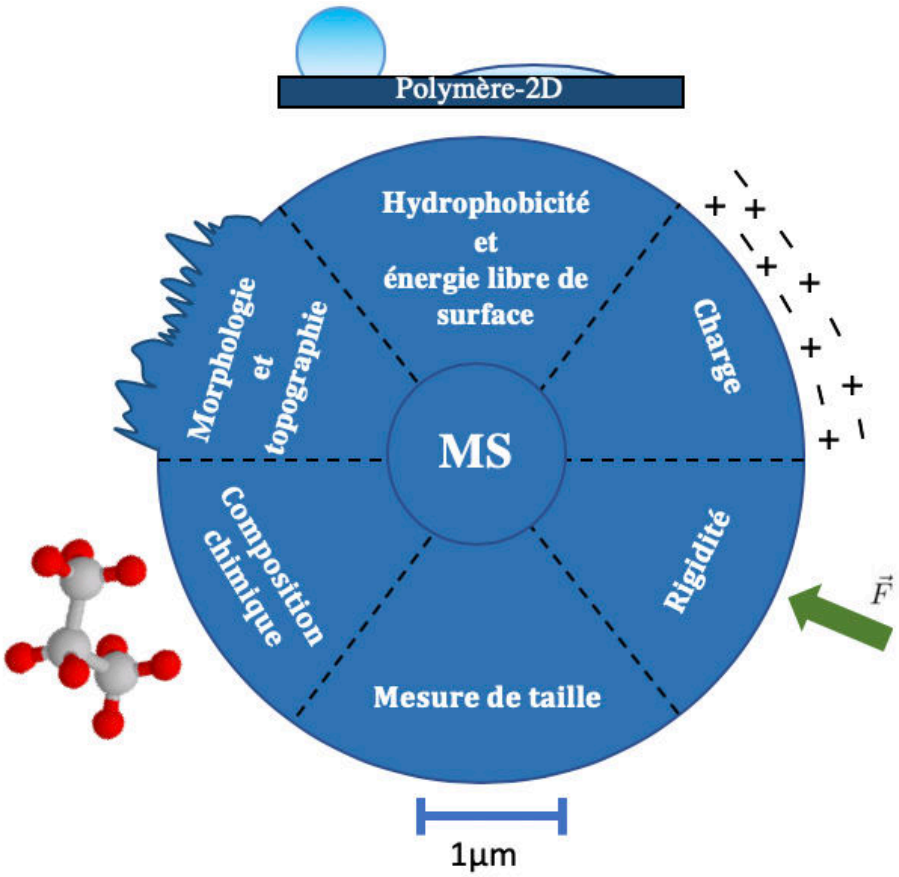
Dans un troisième temps, nous avons comparé l'adhérence des cellules MIAMI E/F à la surface des MPA à court terme, l'expression des intégrines et les contacts focaux. Cela nous a permis également de corréler ce comportement cellulaire et les propriétés physico-chimiques de la surface des MPA, et déterminer les facteurs principaux influençant d'une manière directe sur l'adhérence et la morphologie des cellules sur les deux types de MPA.

Ensuite à long terme, nous nous sommes intéressés à étudier la différenciation des cellules MIAMI E/F après 7 jours de culture à la surface des MPA dans un très faible pourcentage de sérum. Nous avons étudié l'expression de marqueurs spécifiques de la différenciation ostéoblastique (expression du gène Ostérix (Sp7)), astrocytaire (expression du gène Glial fibrillary acidic protein (GFAP)) ou encore neuronale (expression du Nestine, β3-tubuline et Neurofilament-M (NFM)). Nous avons également analysé le nombre de cellules sur les MPA à ce moment.

Dans la dernière partie de ce travail nous avons étudié la sécrétion des molécules de la matrice extracellulaire (LM et FN) par les cellules MIAMI E/F à la surface des MPA.

Chapitre 2 :

PROPRIETES PHYSICOCHIMIQUES DES MICROSPHERES (MS)



Chapitre 2 : Propriétés physicochimiques des microsphères (MS)

Afin d'optimiser et faciliter la compréhension des interactions des cellules MIAMI et MPA, une étude physicochimique des propriétés de surface des MS (non fonctionnalisée) a été d'abord mise en place. Notre objectif dans ce chapitre est d'étudier les différentes propriétés physicochimiques de la surface de deux MS du PLGA et du PLGA-P188-PLGA formulées de la même manière. Dans un premier temps par l'étude de la surface grâce à un modèle en 2D de la surface polymérique après préparation des films minces similaires aux MS préparées par simple émulsion (huile dans eau) suivie d'extraction/évaporation du solvant. Dans un deuxième temps après formulation des MS par cette technique d'émulsion et d'extraction/évaporation du solvant.

Dans le chapitre qui suit celui-ci (chapitre 3), on va présenter tous les résultats de ce travail de thèse sous forme d'un article scientifique. Mais on n'a pas pu détailler les différentes étapes de caractérisation de surface des MS (non fonctionnalisée). En outre, les différentes méthodes utilisées pour caractériser ces MS n'ont pas été détaillées non plus. Pour cela, dans ce chapitre nous avons choisi de présenter les résultats de propriétés physicochimiques et mécanique des MS de façon approfondie, même si certains aspects sont redites dans l'article du chapitre 3 mais avec moins de détails.

1 La formulation des MS et des films modèles

1.1 Formulation des MS

Les MS de PLGA et de PLGA-P188-PLGA ont été formulées par une méthode d'émulsion huile dans eau avec évaporation-extraction du solvant [74, 184]. Dans notre projet nous avons utilisé 2 polymères :

- Acide poly(lactique-co-glycolique) ou PLGA (Indice de polydispersité de 1,9) : polymère avec un ratio d'acide lactique/glycolique de 37.5/25 (Mw = 22 KDa).
- PLGA-P188-PLGA (Indice de polydispersité de 1,8) : un copolymère tribloc de type A-B-A, le PLGA-Poloxamer188-PLGA dans lequel le segment (B) est le poloxamère

188 (Mw = 8.4 KDa), et le segment (A) est le polymère de PLGA avec un ratio d'acide lactique/glycolique de 25/50 (Mw = 40 KDa).

Dans un premier temps, la phase organique (100 mg de PLGA ou de PLGA-P188-PLGA, dissous dans 1 ml de dichlorométhane et 340 µl d'acétone) a été émulsifiée dans un réacteur avec une solution aqueuse d'alcool polyvinylique (Mowiol® 4-88) à 4 % m/v et par agitation mécanique pendant 1 minute (à une vitesse de 550 rotations par minutes (rpm) pour le PLGA et 600 rpm pour le PLGA- P188-PLGA). Après addition de 66 ml d'eau deionisé et 10 minutes d'agitation (première extraction), la solution d'émulsion a été transférée dans un second réacteur contenant 334 mL d'eau deionisée et agitée pendant 20 minutes à 300 rpm afin d'évaporer les solvants organiques (seconde extraction). Finalement, les MS formées ont été filtrées sur une membrane filtre Millipore Durapore (SVPP) de 5µm, et lyophilisées (Figure 16). Deux paramètres influent sur la taille des MS: la vitesse de l'agitation mécanique (émulsion et extraction 1) et la concentration de la phase aqueuse (PVA) (% m/v) [185] .

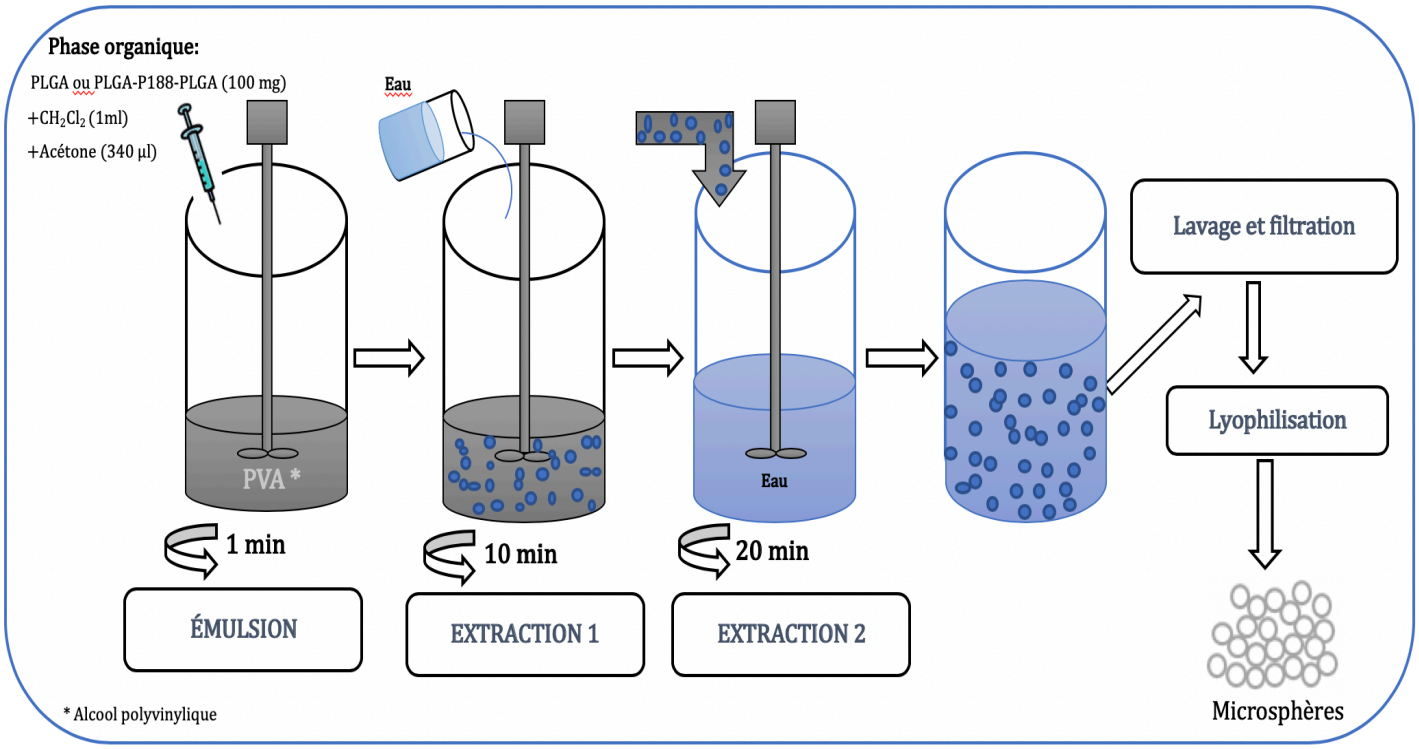


Figure 16: Les différentes étapes pour la formulation des microsphères par la technique d'émulsion huile dans eau avec évaporation-extraction du solvant

1.2. Élaboration des surfaces modèles

Les substrats utilisés sont des wafers de silicium intrinsèques (non dopés) d'épaisseur 500-550 µm avec une seule face polie d'orientation cristalline (100). La rugosité de ces substrats est proche de 0.2 nm (par AFM). Des substrats de 2x2 cm ont été découpés.

Avant de réaliser des dépôts sur les substrats de silicium il est nécessaire de les nettoyer.

Nettoyage à MeOH/HCl et l'UV-Ozone (Figure 17) **:** Dans cette procédure de nettoyage, les substrats de silicium sont immergés dans une solution de méthanol et d'acide chlorhydrique HCl (37%) pendant 30 min ce qui permet de retirer les polluants (particulaires) de tailles micrométriques et une grande partie des contaminants organiques. Après cette procédure, les substrats de silicium sont séchés puis nettoyés sous rayonnement ultra-violet (UV, longueur d'onde 254 nm) et en présence d'un flux d'Ozone pendant 10 min. Cette étape donne lieu à la formation d'un oxygène radicalaire qui permet d'oxyde la majorité des composés organiques en cassant les liaisons chimiques. A la fin du nettoyage, la surface des substrats n'est plus composée exclusivement que de groupements d'oxyde de silicium SiOx ($0<x<2$).

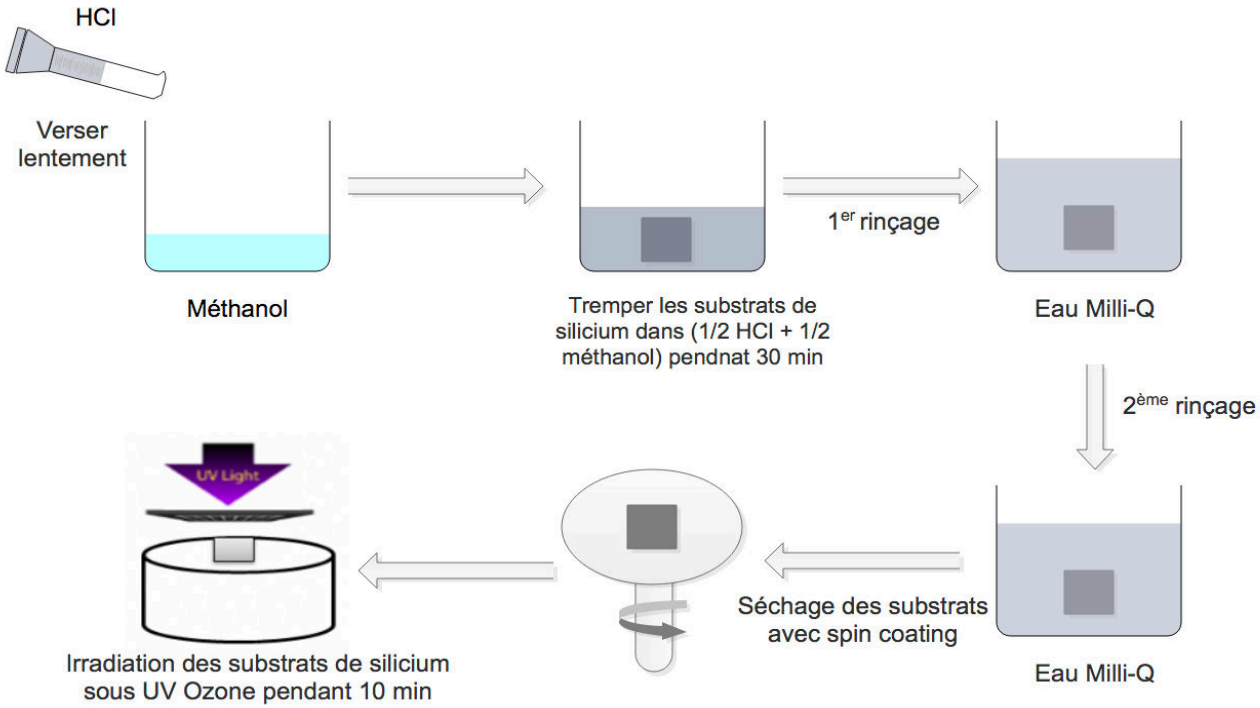


Figure 17: Protocole expérimental pour le Nettoyage à MeOH/HCl et l'UV-Ozone

Dépôt des films minces par spin coating

Pour la fabrication des films minces déposés sur un substrat nous avons choisi d'utiliser le "spin-coating" qui permet l'obtention des films minces homogènes d'épaisseurs reproductibles et homogènes [186, 187]. La fabrication de ces films par "spin-coating" commence par le dépôt d'une quantité de solution sur le substrat de silicium (Figure 18. a). Ensuite le substrat est mis en rotation à une vitesse constante (Figure 18. b) pendant une durée contrôlée afin que cette solution se répande sur tout le substrat grâce à la force centrifuge. Ainsi, l'épaisseur de la solution sur le substrat s'amenuise du fait de la rotation qui augmente l'étalement et donc la surface du film mince et accélère l'évaporation du solvant (Figure 18. c & d). La solution devient de plus en plus pauvre en solvant et donc de plus en plus visqueuse avec le temps jusqu'à ne plus pouvoir s'écouler.

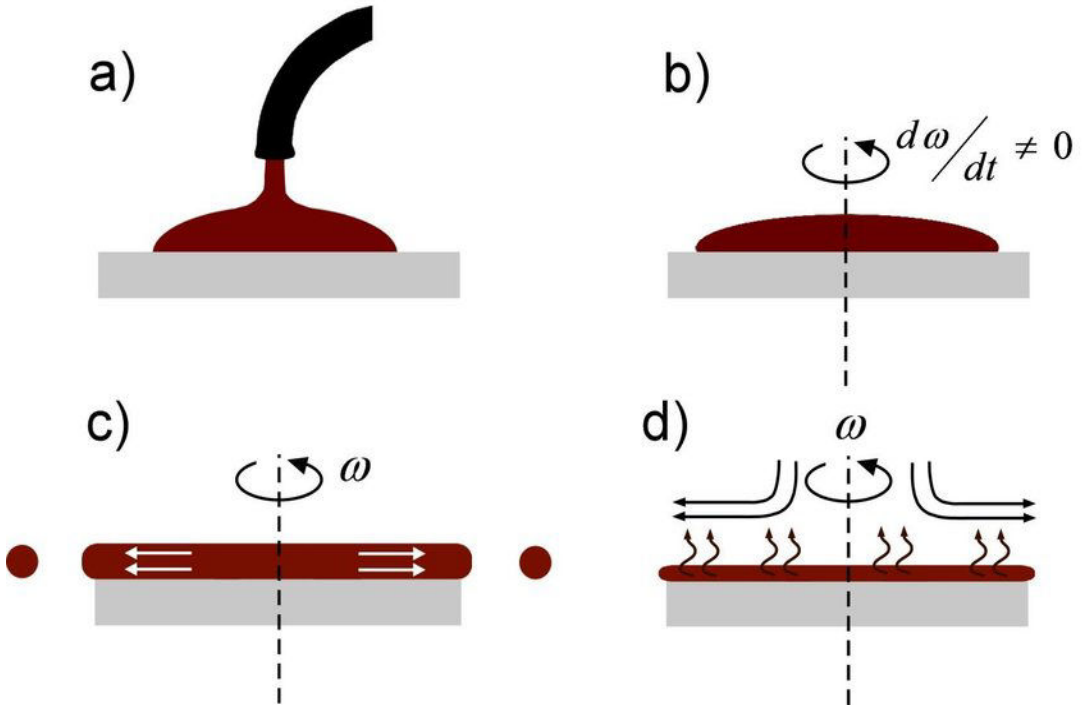


Figure 18: Représentation des différentes étapes de fabrication d'un film mince par spin- coating

2 Techniques de caractérisation des MS et des films modèles

2.1 Diffusion de la lumière

Le diamètre moyen et la distribution en taille des MS formulées ont été mesuré à l'aide d'un compteur Multisizer® Coulter (Beckman Coulter, Roissy, France) (n = 3).

2.2 Potentiel zêta

Le Zetasizer (Nano Series DTS 1060, Malvern Instruments S.A., Worcestershire, Royaume-Uni) est l'appareil utilisé pour évaluer la charge des MS avant et après le « coating ». Les mesures du potentiel zêta de ces microparticules sont effectuées en suspension aqueuse à différents pH (5.9, 7 et 8.4). Les résultats sont présentés sous forme de moyenne ± écart type (N = 3, n = 3).

2.3 Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB) est basée sur l'émission d'un faisceau d'électrons sur une surface de l'échantillon. Ces électrons interagissent avec la matière présente à la surface et permettent d'obtenir une image de haute résolution. La morphologie de surface des MS a été déterminée par MEB comme décrit dans la référence [129]. Les échantillons ont été préparés en collage minutieux des MS sur le porte-objet du MEB en utilisant une pastille carbone autocollante comme interface afin d'assurer une bonne conduction des électrons. Les échantillons ont ensuite été métallisés (recouverts d'une fine couche de métal) par pulvérisation de platine. Ce procédé permet d'augmenter l'intensité en électrons secondaires et d'éliminer les effets de charges (qui viendraient concurrencer et altérer le contraste topographique).

Des coupes transversales de MS de PLGA et de PLGA-P188-PLGA ont été également analysées par MEB. Ces coupes sont obtenues à l'aide du coupe Cryostat (Leica Biosystem CM3050 S) qui est un dispositif cryogénique qui permet de réaliser des coupes des MS d'une épaisseur entre 4-50µm. Le microtome situé à l'intérieur du Cryostat permet d'obtenir des coupes d'épaisseur identique (10µm) à partir des MS congelées à -20°C.

2.4. Microscope à force atomique (AFM)

Le microscope à force atomique fait partie de la famille des microscopes à champ proche. Elle regroupe l'ensemble des microscopes qui mettent en interaction une sonde avec la surface de l'échantillon afin d'en imager les propriétés locales à l'échelle nanométrique. Les interaction entre une pointe d'une finesse de l'ordre de 10 nm, avec la surface sont analysées et permettent d'obtenir des informations sur les propriétés physiques de la surface comme la rugosité [188]. Cette technique présente de nombreux avantages puiqu'elle ne nécessite aucun traitement particulier des échantillons, et permet d'analyser la topographie de surface en trois dimensions. Pour cette étude, nous avons utilisé une AFM (Agilent 5500 AFM) pour déterminer la topographie et la rugosité de surface des MS. Les microscopes à force atomique peuvent être utilisés selon différents modes. Dans notre étude nous avons utilisé le mode contact intermittent (appelé aussi mode vibrant ou encore mode « tapping »), qui permet d'éviter d'endommager les surface fragiles ou

molles. Dans ce mode de fonctionnement, la surface est imagée en faisant osciller le bras de levier ou « cantilever » près de sa fréquence de résonance en touchant à fréquence constante la surface des microparticules (Figure 19). Toute variation de la fréquence et déflection du bras de levier, liée aux interactions pointe-surface, est suivie par un faisceau laser réfléchi vers une photodiode. Les variations de cette réflexion engendrées par la topographie de surface sont enregistrées en temps quasi-réel *via* une boucle de rétro-contrôle permettant à un tube piézo-électrique (sur lequel est fixé l'échantillon) de modifier la position en Z de l'échantillon de façon à rétablir la position initiale du laser. Après balayage ligne par ligne (en X et en Y), les informations sont traitées sous forme d'image en 3 dimensions ; une analyse statistique est réalisée avec le logiciel Gwyddion afin d'obtenir des informations sur la tendance centrale et la dispersion des rugosités mesurées sur une aire donnée (version 2.41).

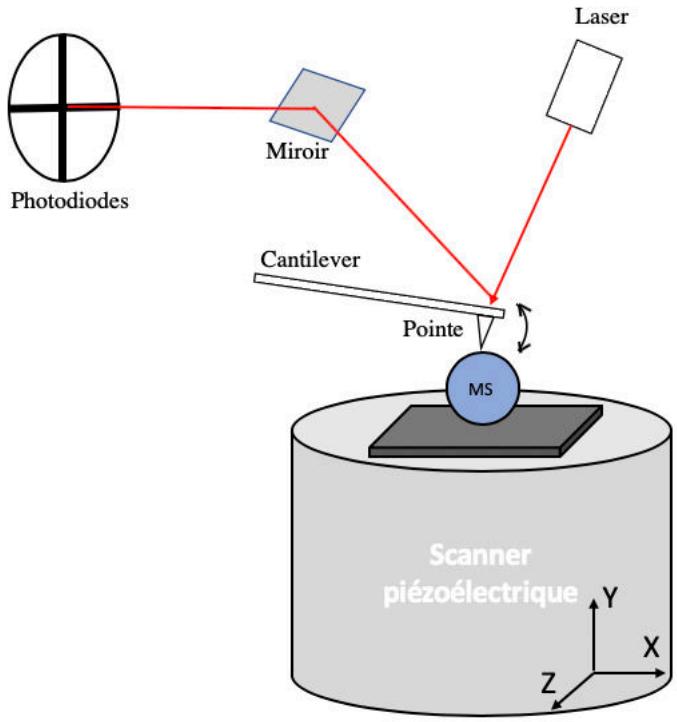


Figure 19: Caractérisation des microparticules par AFM

La mesure de rigidité apparente de la surface des MS est évaluée par la mesure de la force exercée par la pointe en fonction de la distance verticale pointe-échantillon. Quand la pointe est très proche de la surface, la déflexion du levier augmente du fait des forces existant entre la pointe et l'échantillon. Les interactions peuvent être soit attractive (forces dispersives de Van der Waals) soit répulsive (origine stérique). En revanche, lorsque la pointe est loin de l'échantillon, la déflexion du levier ne varie pas. Ces mesures fournissent des courbes dites « force-distance », qui renseignent sur les forces d'adhésion et la raideur de l'échantillon.

Le principe de fonctionnement est le suivant (Figure 20) :

1) La pointe est rapprochée de l'échantillon. Il n'y a pas d'interaction (déflexion nulle).

2) La pointe interagit sur la surface de l'échantillon avec une force déterminée.

3) L'échantillon s'élève encore, et fait défléchir le microlevier (déflexion positive).

4) et 5) La pointe se retire, et si elle adhère à l'échantillon le levier s'infléchit vers le bas.

6) Lorsque la force de rétraction du levier dépasse la force d'adhésion entre la pointe et la surface de l'échantillon, la liaison casse, et le levier revient à sa position de repos. Ceci constitue la phase de rétraction.

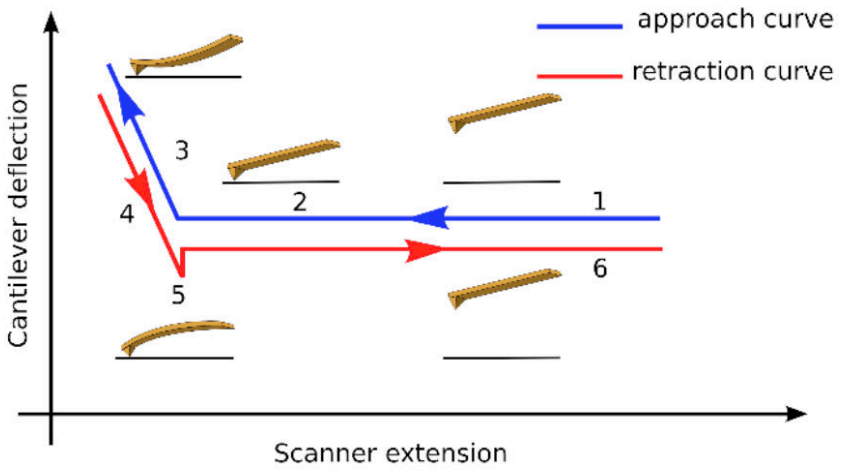


Figure 20: Courbes d'approches et de rétraction de la pointe de l'AFM représentant la déflexion du levier en fonction de la position verticale du scanner piézo-électrique [189]

2.5. La Spectrométrie de Masse d'Ions Secondaires à Temps de Vol (ToF-SIMS)

Cette technique est basée sur le bombardement de la surface de l'échantillon par des ions primaires énergétiques, qui ionisent de nombreux éléments à la surface de l'échantillon. L'émission d'ions secondaires fournit des informations sur la composition chimique, qui peuvent être détectées et analysées par un spectromètre de masse (Figure 21).

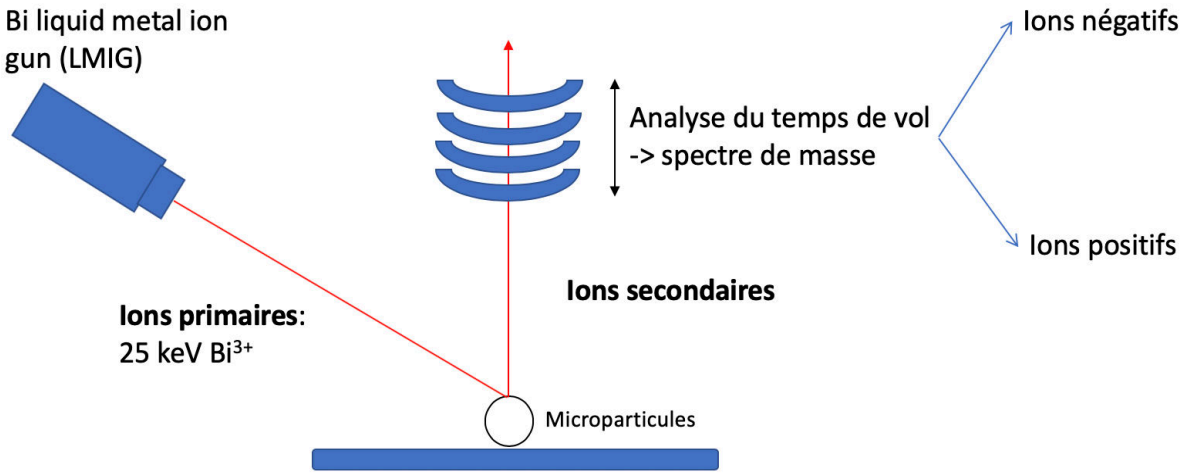


Figure 21: Principe de la Spectrométrie de Masse d'Ions Secondaires à Temps de Vol (ToF-SIMS)

Pour l'analyse de tous les matériaux constitutifs des microparticules, des films minces de PLGA, PLGA-P188-PLGA et PVA sont élaborés sur des lames du verre avec la technique de spin-coating. Les films protéiques de LM et PDL sont formés après incubation des surfaces de verre à 37 ° C pendant 90 min dans des solutions protéiques. Les MS et les MPA ont été préparées en recouvrant une lame du verre avec un scotch double face et en repandant les microparticules dessus. Par la suite, les microparticules non attachées sont éliminées par application d'un flux d'air à la surface de la lame de verre. Cette étape permet d'éviter la perte de matériel lors de la mise sous vide de l'appareil ToF-SIMS et les risques de contamination de l'appareil.

Les références et les échantillons ont tous été analysés avec un appareil de type ION-TOF TOF-SIMS IV instrument (Münster, Germany) équipé d'un canon à ion métallique liquide Bi (LMIG) capable de bombarder la cible avec un rayonnement d'une intensité de 25 KeV d'ions primaires Bi^{3+} sous un angle de 45°. La cible du rayonnement mesure 1 à 2 µm dans le mode « high-current bunched mode ». Le chargement ionique de l'échantillon est compensé avec un canon à électrons de faible énergie. Les images d'échantillons d'intérêt ont été prises avec la plus haute résolution via un balayage d'une zone de 250 x 250 µm avec 256 x 256 pixels.

Les données ont été analysées avec le logiciel commercial IONTOF (surfacelab 6). Les résultats d'analyse ionique positive et négative ont été traités séparément. Dans un premier temps, les courbes ont été calibrées avec des listes d'ions témoins (Figure 22. A)) afin de permettre la comparaison entre les différents échantillons. Ensuite, l'analyse des spectres massiques des échantillons contrôle et une étude de la littérature nous ont permis de définir des pics ioniques propres à chaque composé (Figure 22. B)). Les pics relatifs à chaque composant des MS ont par la suite été corrélés avec les spectres des échantillons d'intérêt. Cela nous a permis de générer des images à partir des ions spécifiques de chaque composé. Nous avons aussi défini des zones d'intérêt autour des MS afin de séparer les MS du scotch double face utilisé pour la préparation des lamelles et ainsi éviter un bruit de fond supplémentaire. Finalement, les images ont été traitées par normalisation aux ions totaux (ce qui permet de pallier les différences d'intensité ionique dues à la sphéricité des MS), par addition (réunion des images composées à partir d'ions différents mais caractéristiques d'un même composé), et par égalisation des intensités ioniques (ce qui permet une analyse comparative entre les différents types de MS).

A)

Positif			Negatif		
Ion	mu +/-	Mass	Ion	mu +/-	Mass
CH3	5	15,022927	CH	10	13.00837
C2H5	5	29,038577	CH2	10	14.0162
C3H7	5	43,054227	C_3H	10	37.00837
C4H9	5	75,069877	C_4H	10	49.00837

B)

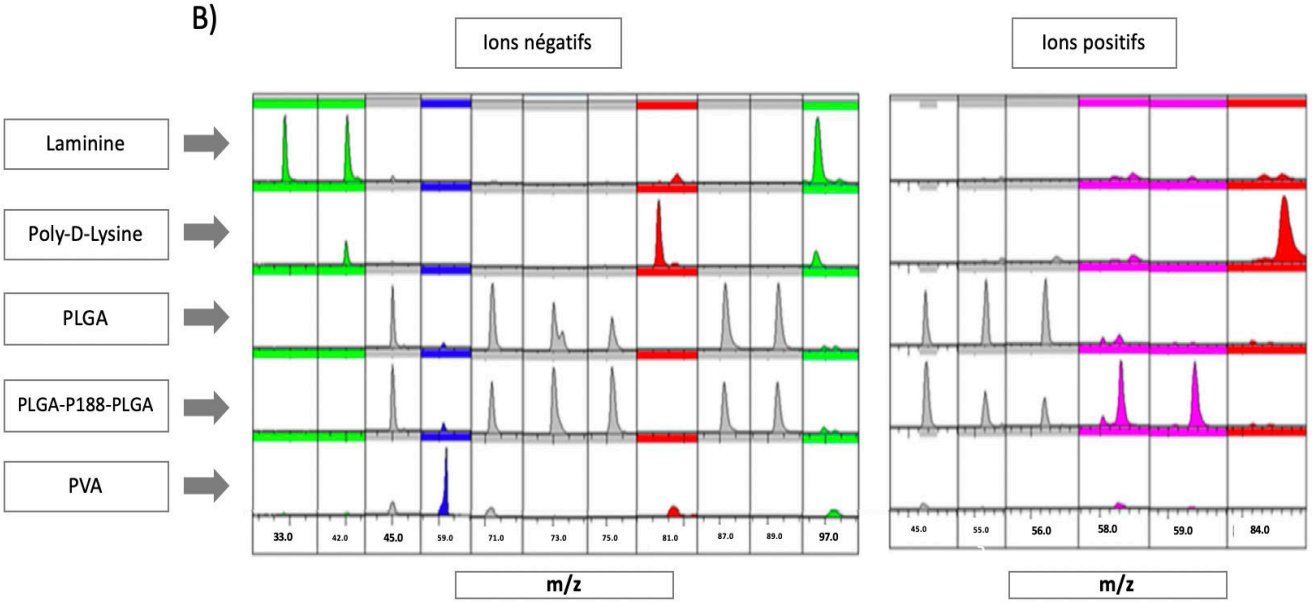


Figure 22: A) Tableau récapitulatif des ions utilisés pour la calibration des spectres massiques positifs et négatifs. B) Pics ioniques négatifs et positifs utilisés pour l'identification et la reconstitution d'images des particules en fonction des différents composants

2.6. La mesure de l'énergie de surface

On peut déduire le caractère hydrophile ou hydrophobe d'une surface, par la mesure d'angle de contact θ au point triple à l'interface goutte liquide déposée/surface de l'échantillon/air (Figure 23). Cela est rendu possible en imageant la forme de la goutte déposée sur la surface à caractériser.

Dans le cas d'une goutte d'eau déposée sur une surface solide, l'augmentation de l'angle de contact traduit une augmentation de l'hydrophobie de la surface et une diminution de son hydophilicité. Typiquement, des surfaces purement apolaires sont caractérisées par des angles généralement supérieurs à 90° pour l'eau pure alors que des surfaces hydrophiles génèrent avec l'eau des angles faibles voire inférieurs à 10° (mouillabilité totale).

La mesure de l'angle de contact permet une évaluation rapide et qualitative de l'énergie libre de surface du polymère en 2-D. L'énergie libre de surface γ_s est divisée en une contribution dispersive γ_s^d (liée au groupement chimique apolaires permettant des interactions de type Van der Waals avec le milieu environnant) et une contribution polaire, γ_s^p , (liée aux groupements de surfaces généralement chargés électriquement et conduisant à des interactions acide/base ou des liaisons hydrogène avec le milieu environnat. Ces contributions ou composantes dispersives et polaires ont été déterminés à partir de la mesure de deux ensembles d'angles de contact réalisées avec deux liquides de référence : l'eau (liquide polaire) et le diiodométhane (liquide apolaire) en utilisant le modèle de de Fowkes [190].

$$\boldsymbol{\gamma_s^d = \frac{\gamma_l\,(1+\cos\Theta)^2}{4}}$$

$$\boldsymbol{\gamma_s^p = \left\{0,5\,\gamma_l\,(1+\cos\Theta) - \left(\gamma_s^d\,\gamma_l^d\right)^{\frac{1}{2}}\right\}^2 \Big/ \gamma_l^p}$$

Où, Θ, γ_l , γ_l^d et γ_l^p , sont l'angle de contact, l'énergie libre de surface totale, la composante de dispersion et la composante polaire de l'énergie libre de surface du liquide, respectivement. Les valeurs des énergies libres de surface des liquides d'essai proviennent de la littérature [191].

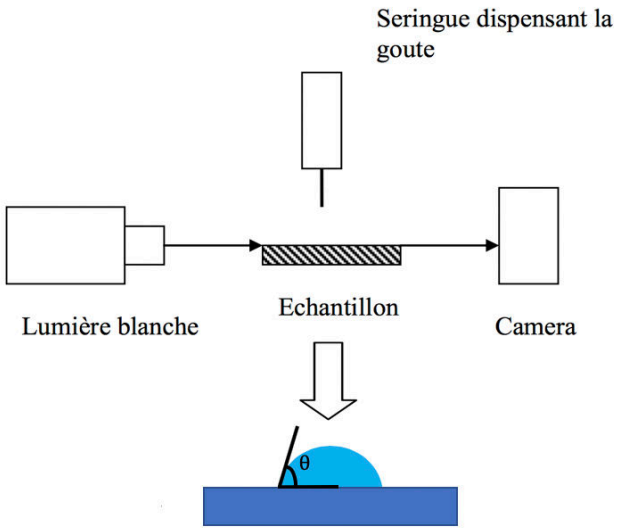


Figure 23: Principe de mesure de l'angle de contact et la tension de surface

3. Résultats

3.1. Distribution de taille des microsphères (MS)

Les graphiques de la figure 24 .A nous informent sur la distribution de taille obtenue par diffusion de la lumière des MS de PLGA et de PLGA-P188-PLGA séchées par lyophilisation. Les tailles moyennes des MS sont respectivement 64±22 µm et 65±23 µm pour les MS de PLGA et les MS de PLGA-P188-PLGA.

L'observation des MS de PLGA et de PLGA-P188-PLGA par la microscopie électronique à balayage confirme les valeurs obtenues par diffusion de la lumière et montrent que les MS formées sont de forme sphérique (Figure 24. B).

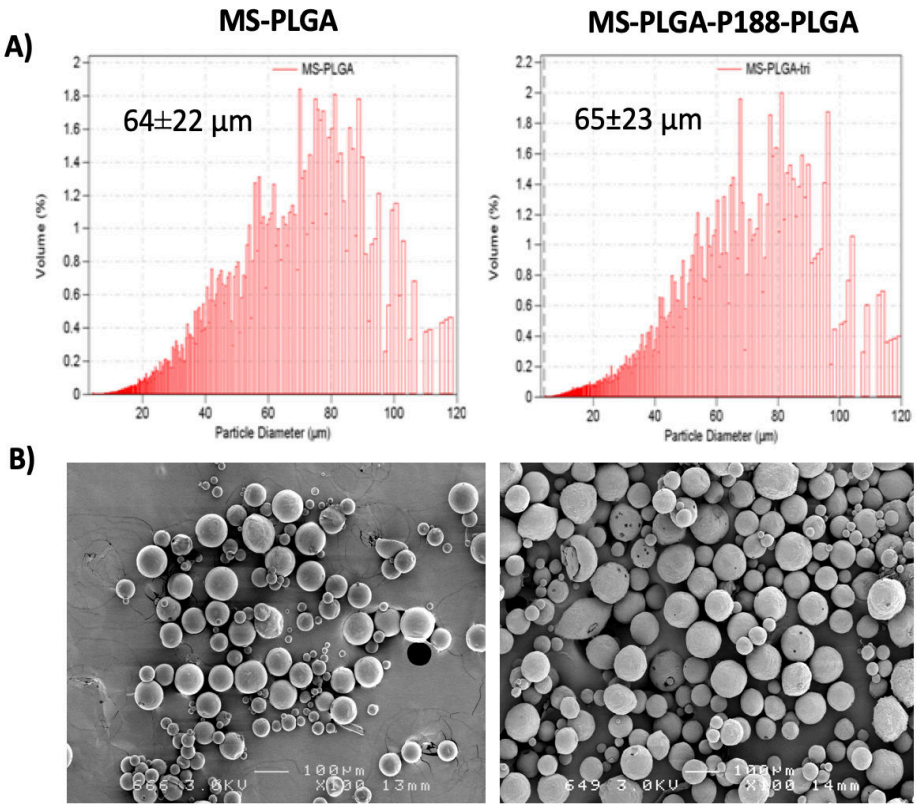


Figure 24: Microsphères de PLGA et PLGA-P188-PLGA obtenues par émulsion simple puis extraction-évaporation du solvant. A) distribution de la taille des microsphères, B) morphologie des microsphères (MEB). Barre d'échelle : 100 µm.

3.2. Morphologie et la topographie des MS

Nous observons en MEB que les MS de PLGA présentent une surface lisse (Figure 25. A-a), présentant des trous de tailles diverses (Figure 25. A-b). Les images réalisées sur des coupes de MS-PLGA montrent que la morphologie intérieure est différente (Figure 25. A-c)) puisqu'elle est plus hétérogène et rugueuse.

Les MS PLGA-P188-PLGA présentent une morphologie de surface plus rugueuse que celle des MS PLGA (Figure 25. A-d)). A plus fort grossissement (Figure 25. A-e)) nous pouvons observer une surface granuleuse. La coupe de ces MS montre que l'intérieur est bien homogène, et que la morphologie granuleuse n'est présente qu'à la surface (Figure 25. A-f).

Les résultats précédents sont confirmés par AFM. Les MS de PLGA présentent une surface lisse (rugosité RMS (root mean square) de 7 nm) avec la présence de trous de diamètres variant entre (0,1-0,6 µm) et des profondeurs supérieures à 20 nm (Figure 25. B-a). Les MS du PLGA-P188-PLGA présentent une surface plus rugueuse (rugosité RMS = 12 nm), avec la présence de grains à leur surface (Figure 25. B-b).

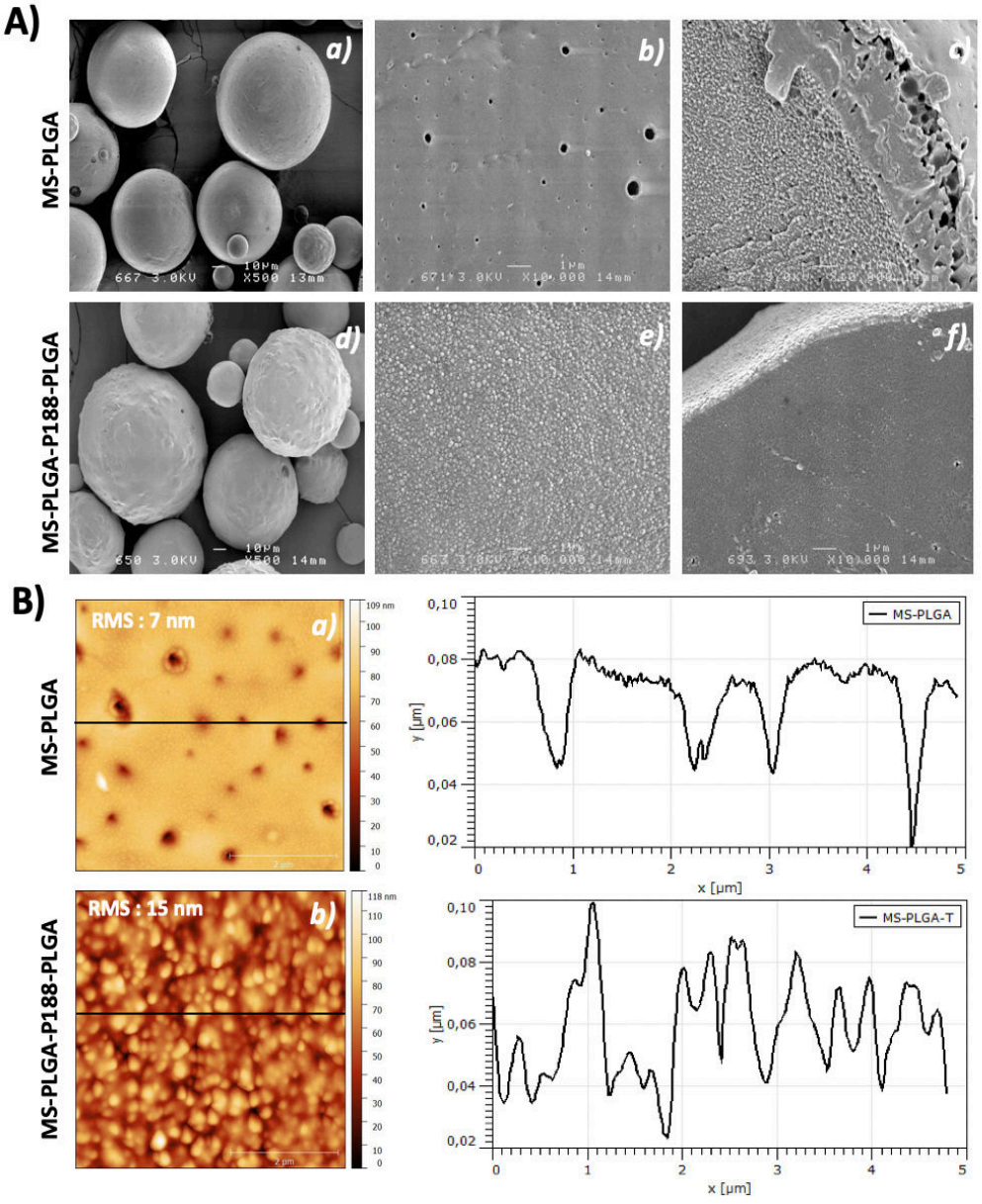


Figure 25: Propriétés de surface des MS. A) Images en microscopie électronique à balayage (MEB) de la morphologie des, a) et b) MS-PLGA, c) section transversale des MS-PLGA, d) et e) MS-PLGA-P188-PLGA, c) section transversale des MS- PLGA-P188-PLGA. B) Topographie de surface de MS par microscopie à force atomique (AFM), a) MS-PLGA et b) MS-PLGA-P188-PLGA

3.3. Charge de surface des MS

Les mesures de potentiel zêta montrent que les deux types de MS possèdent sur la gamme de pH testé une charge négative (Figure 26). On remarque que quel que soit le pH, la surface des MS de PLGA-P188-PLGA est moins chargée que celles des MS de PLGA.

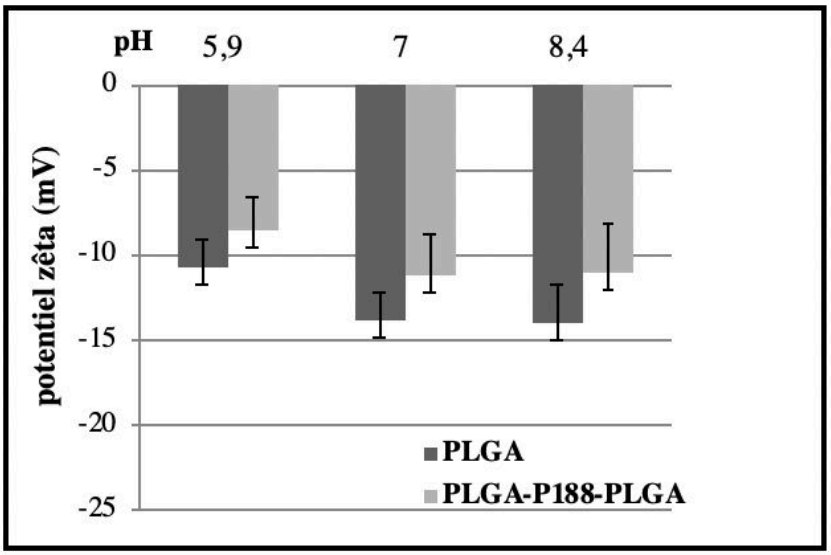


Figure 26: Potentiel zêta des MS de PLGA et de PLGA-P188-PLGA dans différents pH

3.4. Composition chimique des MS

Dans l'optique de caractériser chimiquement les MS composées de PLGA et de PLGA-P188-PLGA, nous avons analysé par ToF-SIMS 3 molécules de références qui entrent dans la composition des MS :

- PLGA
- Poloxamère 188
- PVA

Les résultats montrent que le signal des ions spécifiques du PLGA est similaire pour les deux types des MS (Figure 27. a & b). En outre, nous avons constaté que le signal des ions spécifiques du poloxamère 188 est visualisé sur les MS de PLGA-P188-PLGA est n'est pas présente sur les MS de PLGA (Figure 27. c & d).

Sur les MS de PLGA-P188-PLGA le signal du P188 est plus intense que celui du PLGA ce qui semble indiquer (Figure 27. b & d) que le segments hydrophiles (P188) du copolymère tribloc PLGA-P188-PLGA s'orientent préférentiellement à la surface.

Le surfactant utilisé dans la préparation des MS (PVA) est présent de manière hétérogène sur la surface des deux types de MS (Figure 27. e & f). Il semble que les MS-PLGA présentent plus de PVA à leur surface que les MS de PLGA-P188-PLGA.

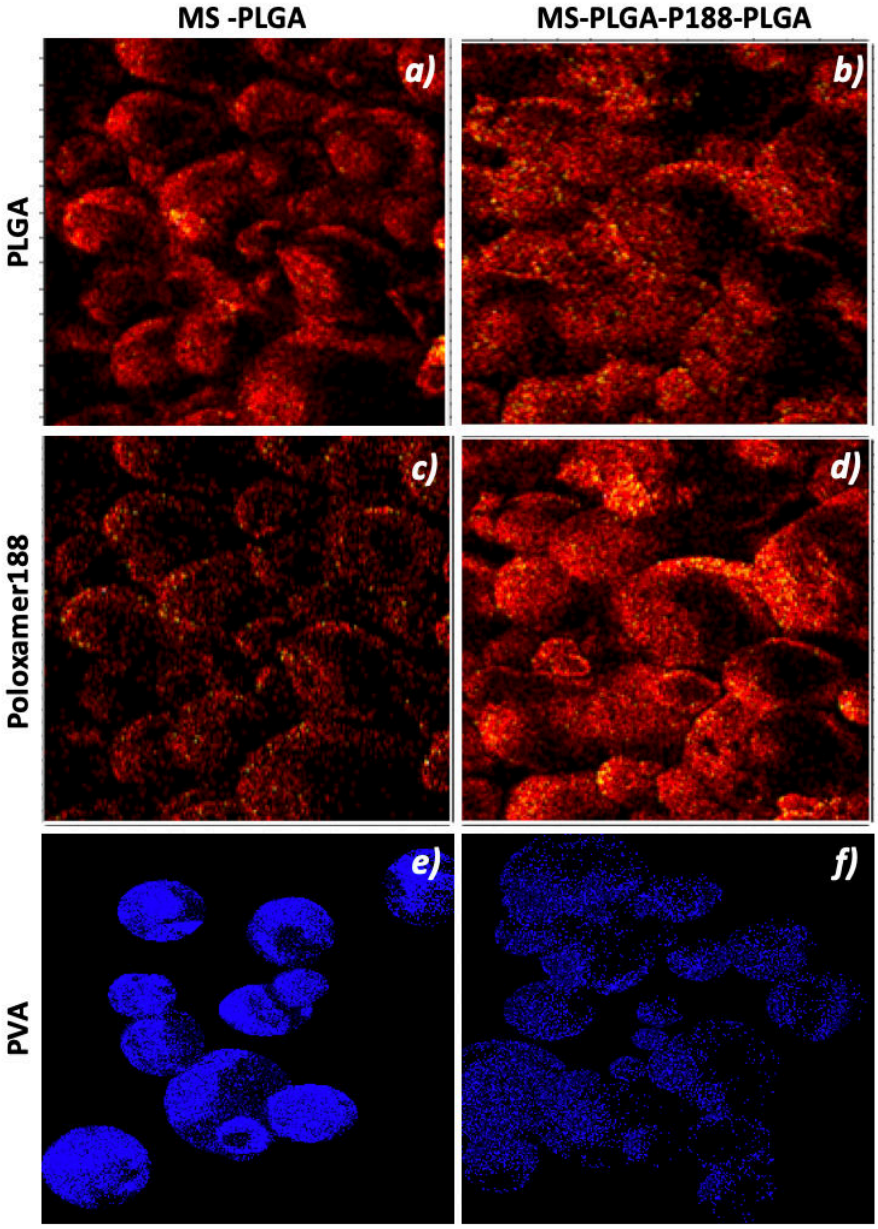


Figure 27: Imagerie ToF-SIMS de la surface de MS montrant la localisation du PLGA ($C_3H_3O^+$ & $C_3H_4O^+$), du poloxamère 188 ($C_3H_6O^+$, $C_3H_7O^+$ & $C_3H_8O^+$) et du PVA (m/z 59) à la surface de MS-PLGA et MS-PLGA-P188-PLGA MS.

Nous pouvons conclure que les MS de PLGA et de PLGA-P188-PLGA ne présentent pas la même morphologie, ni la même composition chimique de surface. Afin de pouvoir aller plus loin dans l'analyse des propriétés physico-chimiques nous avons choisis de préparer des échantillons 2D modélisant la surface des MS et permettant la mesure des énergies de surface.

3.5. Énergie de surface des MS-modèle 2D

La première approche de cette étude a été d'élaborer des films minces similaires aux MS préparées par simple émulsion (huile dans eau) suivie d'extraction/évaporation du solvant. Ensuite, l'énergie de surface et la polarité de surface ont été quantifiées par la mesure des angles de contact avec différents liquides.

3.6. Méthodes de préparation des surfaces modèles

Méthode 1 : Fabrication des films minces à partir de l'émulsion huile/eau

La technique d'émulsion huile dans eau extraction / évaporation de solvant a été utilisée pour la formulation des MS. Le polymère PLGA ou PLGA-P188-PLGA a été dissous dans l'acétone et dichlorométhane. Cette phase organique a été ajoutée lentement à une solution aqueuse de PVA (Alcool polyvinylique) et homogénéisé à 500 tr / min pendant une minute. Cette émulsion a été déposée sur un substrat de silicium par spin-coating afin d'élaborer des films minces comparables aux surfaces des MS. Comme le montre la figure 28, en microscopie optique et pour les deux types de polymères nous avons observé la formation d'un film inhomogène (irisation) sur lequel sont présentes des MS de différentes tailles distribuées sur le substrat, (Figure 28. A & B). Le dépôt direct de l'émulsion ne peut donc pas être considéré comme une méthode convenable pour modéliser les surfaces des MS.

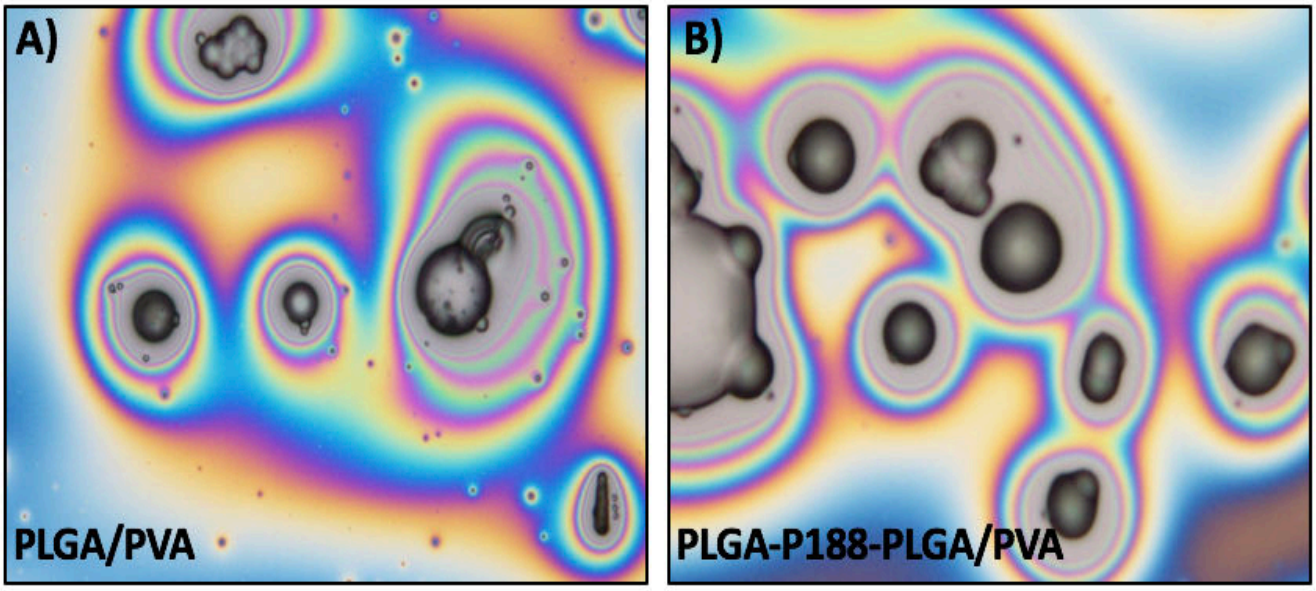


Figure 28: observation par le microscope optique des films élaborés à partir de l'émulsion de la phase aqueuse et/phase organique. A) PLGA et B) PLGA-P188-PLGA.

Méthode 2 : Formation du film en deux étapes

Cette méthode est basée sur la formulation d'un film mince par dépôt de la phase organique contenant le PLGA ou le PLGA-P188-PLGA par spin-coating, puis par-dessus, la formation d'une couche du PVA par dépôt d'une solution aqueuse de ce surfactant.

1ère couche (phase organique) :

La microscopie optique montre que le film de PLGA est homogène (Figure 29. A). La topographie AFM des films indique la présence de trous à la surface comme observé sur la surface des MS (Figure 25. A-b & B-a). Cependant, ces trous sont moins larges que ceux présents sur la surface des MS (Figure 25. B-a). Les mesures AFM indiquent que les films présentent une épaisseur de 1,5 µm et une rugosité de surface de 1,6 nm (Figure 29. A & C). D'après les résultats obtenus, on constate que les films de PLGA présentent la même morphologie que les MS en terme d'homogénéité de surface et par la présence de trous. Cependant, ces deux modèles ne présentent pas une structure parfaitement identique (sur le plan de la rugosité et de la profondeur des trous).

La microscopie optique montre que le film de PLGA-P188-PLGA est moins homogène que le film de PLGA (Figure 29. B). Comme le montre la topographie par AFM, aucun trou n'a été détecté sur ces films et la morphologie est granuleuse comme celle observée sur les MS. L'épaisseur du film mesurée par AFM est voisine de 1 µm et sa rugosité est de 2,2 nm (Figure 29. B & D).

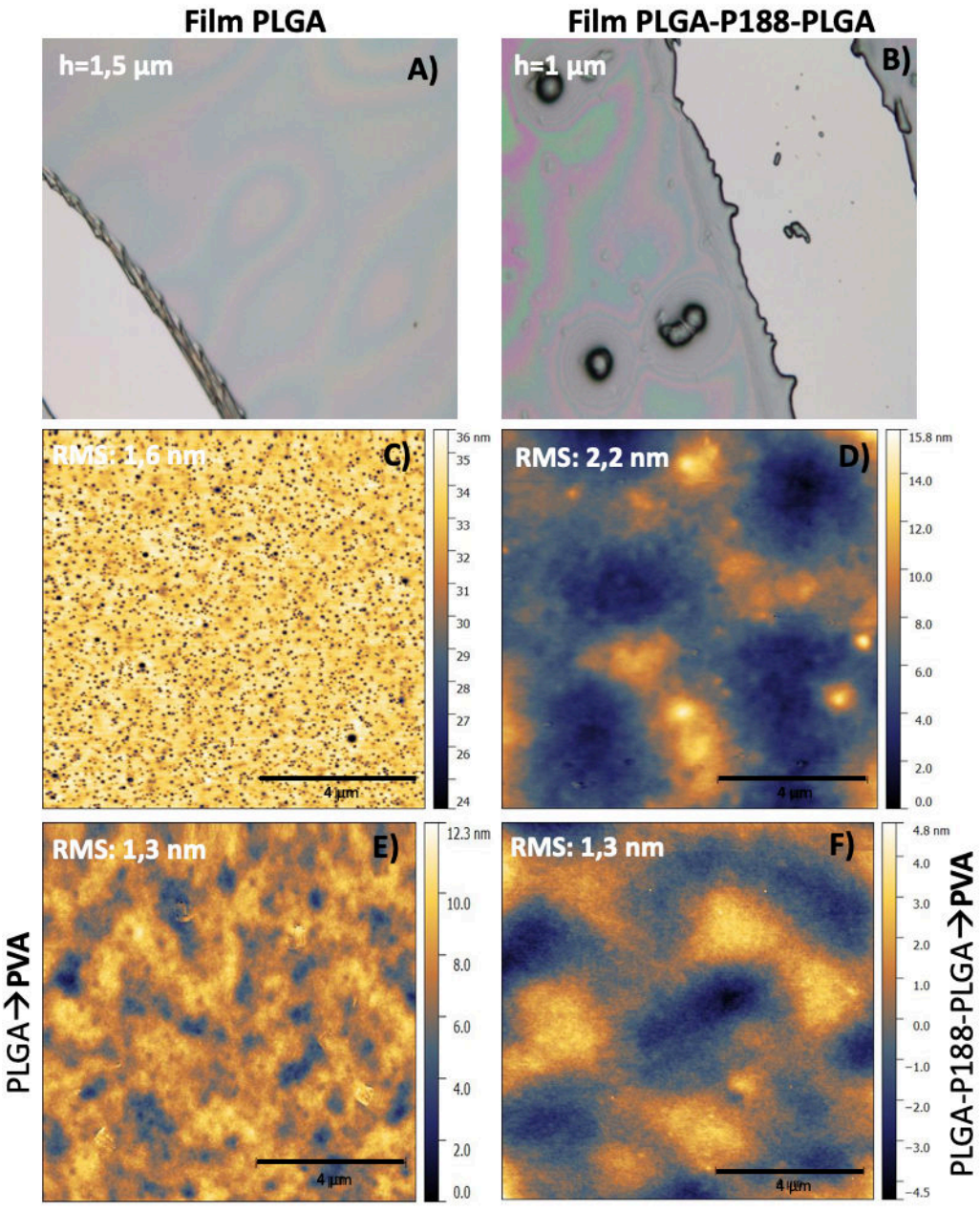


Figure 29: Caractérisation du film de polymères. Microscopie optique, A) PLGA et B) PLGA-P188-PLGA. Images AFM, C) topographie du film PLGA, D) topographie du film PLGA-P188-PLGA, E) topographie du film PLGA après le dépôt du PVA et F) topographie du film PLGA-P188-PLGA après le dépôt du PVA.

Pour les deux types de polymères, les films minces et les MS présentent des morphologies similaires. Les rugosités des films sont plus faibles que celles mesurées sur les MS mais les épaisseurs de films sont également beaucoup plus faibles. Ainsi, la morphologie de surface observée pour les MS est principalement gouvernée par la morphologie du polymère. Le PLGA semble former des structures poreuses en surface à l'inverse du PLGA-P188-PLGA. Les résultats précédents permettent de supposer que les surfaces composées de films minces sont de bons modèles pour étudier l'énergie de surfaces des MS.

Mesure de l'énergie de surface

L'angle de contact mesuré avec une goutte d'eau sur le film de PLGA est d'environ 66,5 ° et d'environ 48,1 ° sur les films de PLGA-P188-PLGA. De même, l'angle de contact du diiodométhane a été mesuré sur les surfaces les films de PLGA et de PLGA-P188-PLGA et les valeurs obtenues sont respectivement 41,4 ° et 43,8 °. L'énergie libre de surface calculée à partir des valeurs d'angle de contact et le modèle de Fowkes est respectivement de 48,2 ± 0,4 mJ / m^2 et de 57,8 ± 0,4 mJ / m^2 pour les surfaces de PLGA et PLGA-P188-PLGA (Tableau 4). Le calcul de la composante polaire de l'énergie de surface indique clairement que le polymère PLGA-P188-PLGA présente une polarité plus forte de l'ordre de 35% comparée à celle du PLGA qui est de 19% (Tableau 4).

	θ_{eau} (°)	θ_{CH2I2} (°)	γ_s^p (mJ .m^{-2})	γ_s^d (mJ .m^{-2})	γ_s (mJ .m^{-2})	Polarité (%)
PLGA	66,5±0,6)	41,4±0,7	9,3±0,3	38,9±0,2	48,2±0,4	19±1
PLGA-P188-PLGA	48,1±0,5	43,8±0,6	20,2±0,3	37,6±0,3	57,8±0,4	35±1

Tableau 4: Caractérisation de films minces de polymères synthétisés par la technique du spin-coating. Angle de contact, énergie libre de surface et polarité des films minces de PLGA et PLGA-P188-PLGA (n = 6).

Cette différence de polarité s'explique probablement par la présence du bloc P188 très polaire dans la composition du PLGA-P188-PLGA.

2ème couche (phase aqueuse) : **Influence du PVA**

Les mesures de ToF-SIMS ont montré la présence importante de PVA sur les MS de PLGA et moindre sur les MS de PLGA-P188-PLGA. Afin d'étudier l'influence du PVA sur l'énergie de surface et sur la morphologie des films nous avons déposé une couche de PVA sur les surfaces modèles.

Après dépôt de la solution de PVA sur la surface des films PLGA et PLGA-P188-PLGA (Figure 29. E & F) nous remarquons que les trous détectés sur les films de PLGA ont disparus. Alors que la structure du film de PLGA-P188-PLGA ne semble pas être modifiée. On remarque également une diminution de la rugosité des films PLGA-P188-PLGA après dépôt du PVA. Afin de démontrer la présence de PVA sur la surface des films nous avons étudié la variation de la mouillabilité des surfaces.

La présence de PVA à la surface des polymères a été confirmée par la mesure des angles de contact. En effet il apparait que les angles de contact avec l'eau après dépôt du film de PVA sont sensiblement les mêmes que ceux obtenus sur un film de PVA seul (Figure 30).

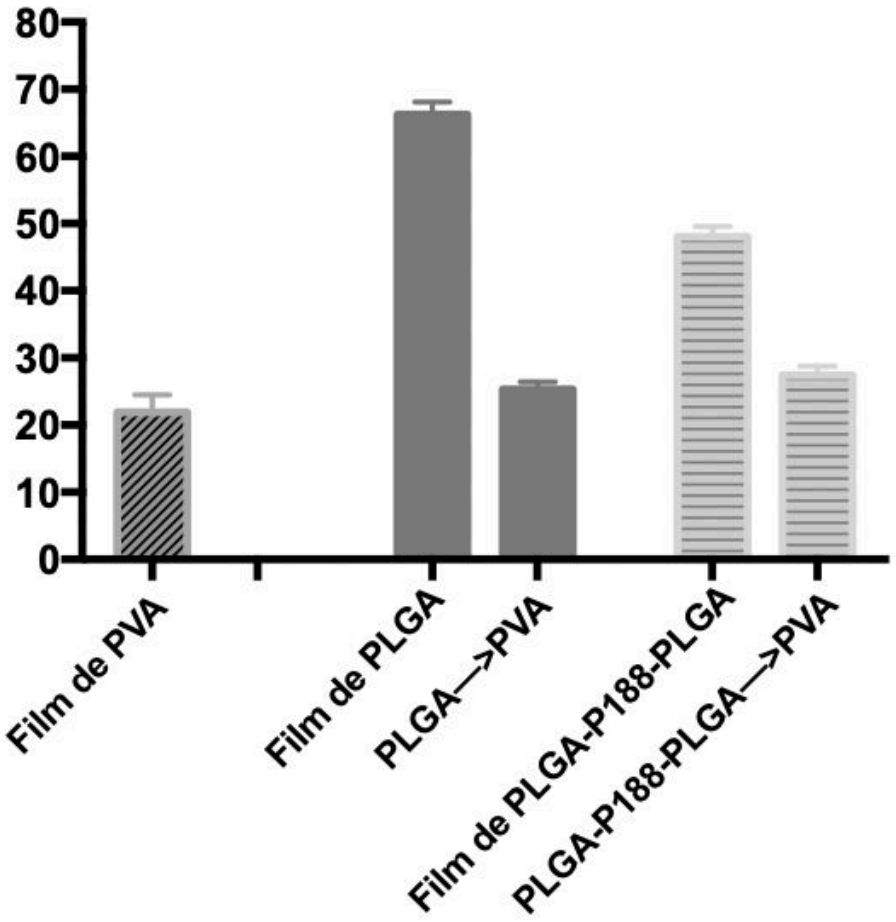


Figure 30: Angle de contact avant et après dépôt du film de PVA à la surface des films de polymères

On peut conclure que le PVA se dépose d'une manière homogène à la surface des films de PLGA et de PLGA-P188-PLGA. Ceci indique que le PVA a une bonne affinité avec les deux types de polymères ce qui peut expliquer sa présence détectée par Tof-SIMS dans la composition finale des MS. L'effet du dépôt de PVA sur les films modèles de PLGA (remplissage des trous) n'est pas observé sur les MS. Ceci est probablement dû au fait que la quantité de PVA déposé sur les surfaces modèles (non rincées) est beaucoup plus importante que celles présentes sur les MS. Ceci est clairement une limite du modèle film mince.

3.7. Propriétés mécaniques des MS

Les propriétés des surfaces étant un facteur pouvant influencer l'adhésion cellulaire, nous avons mesuré la rigidité des MS. La figure 31 présente les courbes de force-déformation moyennes obtenues par AFM sur les deux types de MS. On remarque que la rigidité des MS-PLGA (calculée à partir de la pente de la courbe de force) est plus importante (0,708 N/m) que celle des MS-PLGA-P188-PLGA (0,104 N/m). Une autre façon d'analyser ces courbes consiste à comparer, pour une même force appliquée par la pointe de l'AFM (par exemple 50nN) la déformation de la surface des MS de PLGA (50nm) et des MS de PLGA-P188-PLGA (500nm). Ces différences confirment bien la plus grande rigidité de surface des MS de PLGA.

L'analyse des courbes de retrait montre que la force d'adhésion entre la pointe AFM (silice) et la surface des MS de PLGA est beaucoup plus grande (350 nN) que celle avec la MS de PLGA-P188-PLGA qui est pratiquement inexistante (6nN). La surface de PLGA étant moins polaire que celle du PLGA-P188-PLGA, ce résultat peut sembler surprenant. Ce résultat semble être expliqué par les forces attractives pointe-échantillon de type Van der Waals qui sont plus importantes avec les MS de PLGA (moins polaires) que pour les MS de PLGA-P188-PLGA (peu de forces attractives).

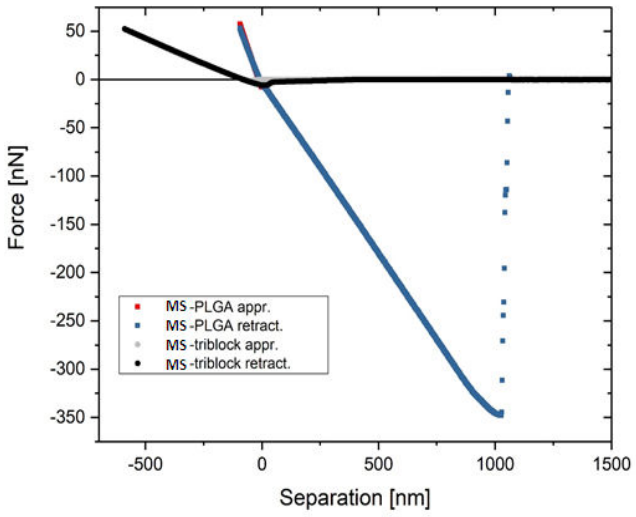


Figure 31: Les courbes de force vs. déformation (avec la courbe d'approche et de retrait) à la surface des MS-PLGA et MS-P188-PLGA

4. Conclusion

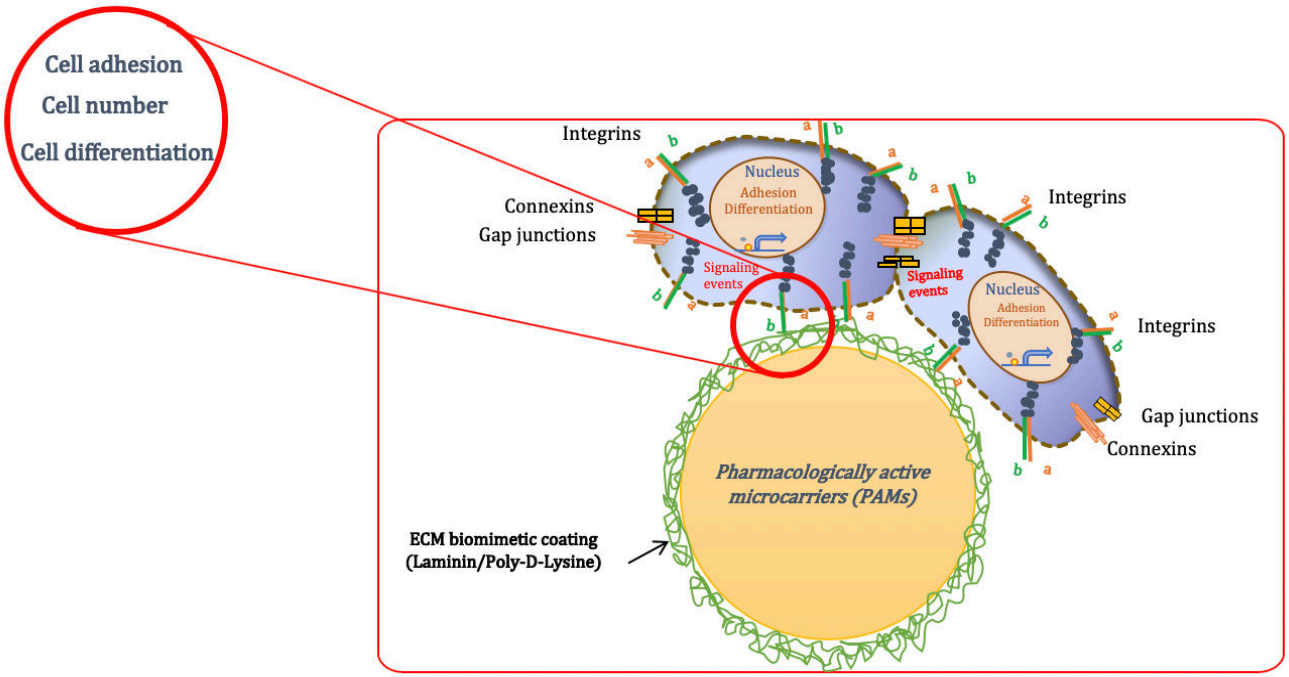
Notre objectif était de déterminer les différents paramètres physico-chimiques des MS. On peut résumer les résultats dans le tableau suivant.

	MS PLGA	MS PLGA-P188-PLGA	Méthode utilisée
Morphologie	Lisse avec des trous	Granuleuse	MEB, AFM
Charge de surface	Négative	Moins négative	Potentiel zêta
Composition chimique	PVA en surface	P188 en surface, peu de PVA	ToF-SIMS
Hydrophilie de la surface	% polarité=19	% polarité=35	Angle de contact, énergie libre de surface
Rigidité	Importante	Faible	AFM
Force d'adhésion	Importante	Faible	AFM

On constate que la morphologie, la rigidité des MS sont très différentes et contrôlées par le polymère utilisé. En revanche, l'énergie de surface et le caractère hydrophile sont dues à la nature du polymère mais également à la présence ou non de PVA sur la surface.

Chapitre 3:

THE IMPACT OF POLYMERIC MICROPARTICLES ON THE BEHAVIOR OF STEM CELLS IN TISSUE ENGINEERING



CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Les cellules sont sensibles aux propriétés physiques et chimiques de la surface sur laquelle ils adhèrent [139]. La charge, la rugosité, la rigidité, la mouillabilité, la polarité de la surface des « scaffolds » et aussi les composantes biomimétiques associées aux « scaffolds » sont tous des facteurs qui peuvent influencer le comportement des cellules [192, 193]. Les MPA développées dans notre laboratoire [74, 129] sont formulés soit d'un copolymère, acide poly (lactique-co-glycolique) (PLGA) polymère approuvé par la « food and drug administration » (FDA), soit d'un copolymère tribloc de type A-B-A, le PLGA-Poloxamer188-PLGA dans le lequel un segment (B) polyoxyde d'éthylène (POE) - polyoxyde propylène (POP) -polyoxyde d'éthylène (POE) ou Poloxamer188 est présent. Elles sont recouvertes de molécules de la MEC afin de stimuler l'adhésion, survie et différenciation des cellules [122]. Nous avons choisi d'utiliser la LM car nos études rapportent que la LM induit la croissance des neurites et augmente l'expression du neurofilament-M dans les cellules MIAMI [132]. Ces cellules sont une sous population homogène des CSM qui ont la capacité d'exprimer des facteurs propres aux cellules souches embryonnaires [7], ce qui leur donne un potentiel de différenciation plus important que les autres CSM. De plus le prétraitement des cellules MIAMI avec E/F induit ces cellules vers une spécification neuronale [10].

Afin d'optimiser les interactions des cellules MIAMI E/F à la surface de MPA, et d'étudier leurs propriétés de surface une première approche a consisté à mettre en place des surface analogues aux MPA en 2D. Nous avons eu des difficultés à réaliser ces surfaces en 2D et nous avons ainsi décidé de travailler directement sur les MPA.

Au cours de ce travail, nous avons procédé en plusieurs étapes. Tout d'abord, la formulation de MS et des MPA suite au recouvrement par la LM et PDL. Par la suite la caractérisation de leur taille, ainsi que l'étude de la rugosité et la topographie de la surface de MS et de MPA. Le recouvrement de surface a été étudié également par imagerie par microscopie confocale à fluorescence. En outre, la charge des surfaces de MS avant et après coating a également été étudiée par la mesure du potentiel zêta dans des solutions de différents pH. Afin de vérifier les résultats d'adsorption de la LM à la surface des MPA,

d'étudier la localisation de la PDL et de mieux comprendre pourquoi la LM n'a pas la même capacité à s'adsorber sur les MS de PLGA et de PLGA-P188-PLGA, nous avons utilisé la technique de spectrométrie de masse des ions secondaires à analyse du temps de vol.

Nous avons également étudié le comportement d'adhérence qu'avaient les cellules MIAMI E/F sur les MPA formulées avec du PLGA et du PLGA-P188-PLGA fonctionnalisées ou non avec le mélange de la LM et la PDL. Dans le but d'étudier la différenciation de cellules MIAMI E/F en fonction de la surface de MPA, après 7 jours de culture en milieu appauvri en sérum, nous avons nous avons suivi l'expression de marqueurs spécifiques de la différenciation cellulaire par RT-qPCR, western blot et immunomarquages qui nous permettra de savoir si les cellules peuvent s'engager dans une voie de différenciation ostéoblastique (Ostérix), astrocytaire (GFAP) ou encore neuronale (Nestine, β3-tubuline et NFM). Finalement, la sécrétion des molécules de la MEC par les cellules MIAMI sur les deux types de MPA a aussi été analysée.

Chapitre 3 : The impact of polymeric microparticles on the behavior of stem cells in tissue engineering

Assia Rmaidi [1]; Nicolas Delorme [2]; Mischa Zelzer [3]; Raphael Dima [1]; Laurence Sindji [1]; Frank Boury [1]; Claudia N. Montero-Menei [1]

[1] INSERM CRCINA U1232 Centre de Recherche en Cancérologie et Immunologie Nantes-Angers Equipe GLIAD, Université d'Angers-France.

[2] Institut des Molécules et Matériaux du Mans (IMMM), F-72085 Le Mans, France.

[3] School of Pharmacy, Boots Science Building University Park, University of Nottingham, United Kingdom

ABSTRACT

Polymeric, biodegradable, biocompatible microspheres are promising as scaffolds to carry the implanted cells. Recently, it has been shown that poly(lactic-co- glycolic acid) (PLGA) and PLGA-P188 (Poloxamer188)-PLGA based microparticles that are surface functionalized with an extracellular matrix protein, fibronectin (FN), and a cationic peptide, PDL (poly-D-Lysine), improve stem cell adhesion and enhance cell viability. While the protein/polymer and microparticles/cells interactions it is not well understood because of the poor information on the interplay between chemical and physical microparticle surface properties, protein adsorption and cell response remain unclear. The aim of this study is to determine the different physicochemical parameters of polymeric microparticles coated with laminin (LM), that can affect the protein adsorption and stem cell response. We noticed, that the poloxamer 188 prevent the adsorption of the coating on the surface of the PLGA-P188-PLGA microparticles. The cells adhere quickly and spread on the surface of PLGA microparticles is due to the presence of the coating on these surfaces. While the cells present a ronde morphology on the surface of PLGA-P188-PLGA microparticles is due to the less coating presented on these surfaces. In the long term the cells exhibit the same behavior regardless of the type of support. In addition, we have shown that cells are able to secrete extracellular matrix molecules in the same way on both types of pharmacologically active microcarriers.

1. Introduction

Mesenchymal stem cells (MSCs) have been currently used in cell therapy studies in the nervous system to repair damaged tissue, as they can be isolated from a variety of sources, are easily accessible and have the potential for autologous transplantation. Moreover, they may differentiate into different cell types and are able to secrete soluble tissue repair factors [1-3]. A homogenous subpopulation of MSCs, named "Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible" (MIAMI), which express several pluripotency markers are able to differentiate into neuronal-like cells. Notably, a pre-treatment with Epidermal Growth Factor (EGF)/basic fibroblast growth factor (FGF2) allowed their specification towards a neuronal lineage and under the influence of a sequential addition of neurotrophins into immature neurons with electrophysiological properties [4-5]. They also respond to a laminin substrate by expressing mature neuronal markers and to dopaminergic inducers acquiring this neuronal phenotype [6]. They furthermore show some degree of *in vivo* neuronal differentiation and they can secrete high amounts of tissue repair factors, some of which are involved in the protection/induction of blood vessels [7]. However, cell therapy is limited by several problems such as survival and integration of the cells implanted in the tissue.

Tissue engineering, which combines cells with scaffolds based on biomaterials can improve the survival and differentiation, of the transported cells in vivo. Toward this goal, many synthetic polymers such as co-polymers, poly(D,L-lactic-co-glycolic) (PLGA), which have been approved by the medical regulatory agencies have been used, but to improve cell adhesion on their surfaces they need to be functionalized with extracellular matrix (ECM) molecules [6, 8]. Our group has developed pharmacologically active microcarriers (PAMs), which are biodegradable and biocompatible microspheres made with PLGA and coated with ECM molecules that provide a 3-dimensional biomimetic support for cells. In addition, PAMs can be concomitantly loaded with growth factors released in a sustained and controlled manner around the grafted cells [9]. These combined properties of PAMs induce stem cell engraftment due to enhanced survival and differentiation leading to functional improvements in different animal models of degenerative or ischemic disorders [6, 10-12]. A novel formulation of polymeric PAMs formed with A-B-A block copolymer in which segment A are PLGA polymers and the segment B is a commercial tri-

block (Pluoronic® F-68) named Poloxamer188, was developed to enhance protection and release of encapsulated growth factors [11]. It has also been reported that MSCs located on the surface of PAMs not delivering growth factors, but with a functionalized surface of fibronectin composed of PLGA-P188-PLGA survived 7 days longer than on the same surface of PLGA [11]. It is unclear how the PAMs of PLGA or PLGA-P188-PLGA affected the behavior of the stem cells. However, it is now known that the surface properties of the polymeric scaffolds, which include both chemical and physical characteristics [13], can actively instruct stem cells and direct their behavior.

It has been shown that stem cells are sensitive to the physical, mechanical and chemical scaffold's properties; including wettability, protein adsorption, charge, roughness, stiffness, and chemical composition [14]. MSCs are known to be strongly affected by the properties of culture substrates [15], the culture environment modification can control the stem cell differentiation [16]. It has also been shown that the stiffness of the substrate defined the differentiation lineage of the MSCs. Stiff substrates with bone-like properties were found to be osteogenic, substrates of intermediate stiffness that mimic muscle were myogenic, and relatively soft substrates that mimic the mechanical properties of brain tissue were found to be neurogenic [17]. Furthermore, it has been reported that surface roughness can impact cell fate. By varying the roughness of the support one can induce stem cells rather to an osteoblastic phenotype [18] or to a neuronal phenotype [19]. Numerous studies in the literature have indicated that ECM adsorption by biomaterials can influence and control stem cell behavior and function [20]. Protein adsorption to scaffolds surface is primarily driven by the surface chemistry. It is obvious, therefore, that a simple modification of the physical properties of the surface of the scaffolds, or the chemical composition of the biomaterial can make significant changes not only on the adsorption of the ECM molecules but also impact the cellular response.

The chemistry and physicochemical properties of PAMs made of PLGA and PLGA-Poloxamer188-PLGA, must be understood to unveil the parameters that directly influences the cells and thus optimize their composition and obtain better cell adhesion and hence cell response. We have designed PAMs of PLGA and PLGA-Poloxamer188-PLGA coated with laminin and poly-D-lysine, characterized their physical and chemical properties and evaluated them for their ability to induce cell adhesion and neuronal

differentiation of EGF/FGF2 pre-treated MIAMI cells. Several physico-chemical techniques are used to characterize the PAMs before and after the laminin surface functionalization. The objective is to understand how the nature of the biomaterial influences the protein functionalization performed on these surfaces and which parameter is more influential on the adhesion and neuronal differentiation of the cells.

2. Methods

2.1. PLGA-P188-PLGA synthesis

The triblock copolymer PLGA-P188-PLGA (A-B-A triblock copolymer) synthesis and characterization was performed as previously described by GIS IBISA and ITMO cancer [11]. Briefly, PLGA–P188–PLGA polymer was prepared by ring-opening polymerization (ROP) of D,L-lactide and glycolide using P188 as an initiator, and stannous octoate [$Sn(Oct)_2$] as a catalyst at 140 °C. After 5 days, the polymerized products were recovered by dissolution in dichloromethane, and then precipitated, filtered, washed and dried overnight under reduced pressure, until stabilization of the final product.

2.2. Polymeric film formation and characterization

2.2.1. Spin coating technique

Polymeric films were prepared on silicon substrates by a spin coating method. Before coating, silicon wafers were cleaned by Methanol/HCl UV-Ozone cleaning method, where the wafers were soaked for about 30 min in a solution of Methanol and HCl (volume ratio, 1:1). The wafers were then rinsed with Millipore water. The manufacture of the films by "spin-coating" begins with a solution of polymer (PLGA or PLGA-P188-PLGA) was dissolved in dichloromethane and acetone. This solution is placed in excess on a silicon substrate. Then the substrate is rotated at a constant speed (2000 rpm) for a controlled time (30s) so that this solution spreads over the entire silicon substrate by the centrifugal force.

2.2.2. Contact angle measurements

The contact angle measurement permits a rapid and qualitative evaluation of surface free energy of polymer on 2-D. The surface free energy γ_s is divided into a dispersive part (γ_s^d) and non-dispersive part (polar part) (γ_s^p) of the sample were determined from two sets of contact angles (water and diiodomethane) according to Fowkes equation [21].

$$\boldsymbol{\gamma_s^d = \frac{\gamma_l\,(1+\cos\Theta)^2}{4}}$$

$$\boldsymbol{\gamma_s^p = \left\{0,5\,\gamma_l\,(1+\cos\Theta) - \left(\gamma_s^d\,\gamma_l^d\right)^{\frac{1}{2}}\right\}^2 \Big/ \gamma_l^p}$$

Where, Θ, γ_l, γ_l^d and γ_l^p, are the contact angle, the total surface free energy, the dispersion component and the polar component of the surface free energy of the liquid, respectively. The values of the surface free energies of the test liquids are obtained from the literature [22].

2.3. Formulation of MS and PAMs

PLGA and PLGA-P188-PLGA of 60 µm microspheres (MS) in diameter were prepared by using oil-in-water (o/w) emulsion solvent evaporation-extraction method [11, 23]. Briefly, the organic phase containing the polymer (100 mg PLGA or PLGA-P188-PLGA) was dissolved in dichloromethane/acetone and emulsified in 4% w/v of the aqueous solution polyvinyl alcohol (PVA) at 1 °C. After two cycles of solvent evaporation and extraction with deionized water stirring the formed microspheres were filtered with (5 µm, Millipore Durapore® Membrane Filter (SVPP)) and then freeze-dried and kept it in -20 °C. To obtain pharmacologically active microcarriers (PAMs), the microspheres of PLGA and PLGA-P188-PLGA were coated with laminin (LM) (Sigma) and poly-d-lysine (PDL) (Sigma). PDL was used to favor cell attachment on PAMs surface. Each tube was covered with sigmacote® to prevent product loss on the tube walls. The final concentration of the coating molecules was 15 µg/mL of LM only, PDL only and the mixture of LM/PDL (corresponding to a 50:50 ratio of LM: PDL) in Dulbecco's Phosphate-

Buffered Saline (DPBS). The microspheres were suspended in these solutions, and placed under rotation at 15 rpm at 37 °C during 1h30min. After coating, PAMs were washed 3 times with 1% antibiotic-antimycotic solution (Sigma Aldrich), then lyophilized and kept at −20 °C.

2.4. Characterization of MS and PAMs

2.4.1. Size and zeta potential

Average diameter and size distribution of MS were evaluated using a Multisizer® Coulter Counter (Beckman Coulter, Roissy, France) (n=3). Zeta potential of MS was measured using a Malvern Zetasizer® (Nano Series DTS 1060, Malvern Instruments S.A., Worcestershire, UK). Results are presented as the mean ± standard deviation (N=3, n=3).

2.4.2. Atomic force microscopy (AFM)

The surface topography and roughness of the MS and PAMs were obtained by atomic force microscopy analysis (AFM), with Agilent 5500 AFM equipped with an environmental chamber. The samples were adhered by sprinkling onto a glass slide, and the analysis was carried out by intermittent contact (AC) mode in air, the cantilever oscillates at a frequency near to the resonance touching softly the sample surface, the system detects the variations in topography by changes in the cantilever oscillation frequency or amplitude. Image processing and statistical analysis were performed with Gwyddion freeware (2.41 version).

The stiffness and interaction forces of MS surface were determined by AFM. The analysis of the deviation of the lever, using a laser, allows determine the exact path of the tip and measuring the interaction forces between the latter and the sample. The stiffness was determined by the ability to deform the surface with a force apply on the surface of the MS.

2.4.3. Scanning electron microscopy (SEM)

MS surface morphology were imaged by scanning electron microscopy (SEM) as described [9], to show surface differences among polymer. Briefly, the samples were prepared by sprinkling onto an adhesive carbon tape attached to an aluminum SEM stubs; the gold sputtering was carried out on the samples prior to morphological analysis, and finally observed. MS cross-sections obtained after cryogenic cutting (Leica Biosystem CM3050 S), also were imaged by SEM.

2.4.4. Immunofluorescence

The localization of laminin on the surface of the microspheres was determined by immunofluorescence labeling and observation by confocal microscopy. Lyophilized PAMs (1 mg) were incubated at 4 °C overnight with anti-laminin antibody (100 µg/mL in the mixture of DPBS/BSA/0,2 % Tween 20) under rotation, samples were then washed 3 times. Detection was performed by incubation with a secondary biotinylated anti-mouse IgG (2,5 µg/mL in DPBS/BSA/0,2 % Tween 20) for 1h at RT, and after three washes, samples were incubated with streptavidin–fluoroprobe 547 (1:1000 in DPBS) at RT for 40 min. After washing, samples were mounted and observed by confocal microscopy (LEICA TCS SP8, Mannhein, Germany). (N=3 n=2 and 5-6 images per sample under the same parameters).

2.4.5. Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (ToF-SIMS)

This technique is based on the bombardment of the sample surface by energetic primary ions, which ionizes many elements. Secondary ion emission supplies information about the chemical composition, which can be detected and analyzed by a mass spectrometer.
For analysis of all the materials constituting the microparticles, PLGA, PLGA-P188-PLGA and PVA are coated onto the glass surface with spin coating technique, LM and PDL are incubated with glass surfaces at 37 °C for 90 min. The MS and PAMs are placed on double sided sticky tape and ToF-SIMS analysis was performed using an ION-TOF IV (GmbH, Münster, Germany) instrument, equipped with a Bi liquid metal ion gun (LMIG) shooting a beam of 25 keV Bi^{3+} primary ions towards the samples under an angle of 45 ° in relation to the normal and has a beam spot of 1-2 µm in the high-current bunched mode. Ion

images of the samples were recorded in the Burst Alignment (BA) mode, which allows for higher resolution, using 250 x 250 μm^2 raster scans with 256 x 256 pixels and 1 shot per pixel. The spectrum was analyzed by commercial IONTOF software (Surfacelab 6).

2.5. Formation and characterization of E/F MIAMI/PAMs complexes

2.5.1. Culture of MIAMI cells

MIAMI cells were isolated from iliac crest from a human male post-mortem organ donor (Anonymous 65 years, male). This protocol was performed in collaboration with the « Coordination Hospitalière de prélèvements d'organes, de tissus ou de cellules » and has the agreement of the French Agency of Biomedicine. The cells are stored in the University Hospital of Angers under declaration number DC2011-1467. The cells were expanded at low density in DMEM-low glucose supplemented with 3% fetal bovine serum (FBS) at low oxygen conditions (3% O_2) as previously described [4]. To enhance neuronal specification, MIAMI cells were pre-treated in vitro for 10 days with 20 ng/mL of EGF, FGF2 [5], and 5 µg/mL of heparin under low oxygen tension (E/F MIAMI cells).

2.5.2. Adhesion of E/F MIAMI on PAMs surface

E/F MIAMI cells were washed with DPBS, detached with Accutase® solution (Sigma) and centrifuged at 1400 rpm for 10 min. E/F MIAMI cells (180×10^3) were incubated with 0.5 mg MS or PAMs in 24-well ultra-low attachment plates (ULA, 3473, Corning Costar) at 37°C, 3% O_2 as previously described [6] [10]. Cell adhesion on MS or PAMs surface were assessed by light microscopy, the observations were estimated at various time intervals (4h, 24h and 7 days). To evaluate the effect of the different surface properties of PAMs on the neuronal commitment of E/F MIAMI cells, after 4h, the expansion medium was replaced with DMEM/F12 containing glucose and 0,5% FSB and the cells were incubated for 7 days 37 °C in 5% CO2, 21% O2. The viability after 7 days was estimated by using the Cyquant cell Proliferation Assay® (molecular Probes, Eugene, OR) following the manufacturer's guidelines.

2.5.3. Integrin expression by flow cytometry

We studied the expression of integrins of E/F MIAMI cells before seeding on the PAMs (t = 0) and after 4 hours of adherence of E/F MIAMI cells to the PAMs surface functionalized with the mixture of protein LM and PDL.

Cells were washed with DPBS to eliminate the non-adherent cells, the adherent cells were detached and washed before distribution in 96 well plates (10^5 cells/50 µL). Mouse or rat monoclonal anti-integrin antibodies (10 µg/mL, CD29, CD104, CD49b and CD49f or alternatively β1, α6, β4 and α2, respectively) or IgG1,*k* and IgG2a,*k* isotypic antibodies (all from BD Biosciences, Le Pont De Claix, France) solutions diluted in DPBS, 5% FBS, 0.02% azide were added for 1h at 4 °C. After washing, FITC-conjugated anti-mouse antibody (Dako), or PE-Cy7-anti-Rat (Thermo Fisher scientific) were added for 30 min at 4 °C. Every washing step was performed with DPBS, 5% FBS, 0.02% azide. Fluorescent signal was acquired using a FACS Canto™II (BD Biosciences). The data were then analyzed using the BD FACSDIVA™ software.

2.5.4. Vinculin and F-actin immunofluorescence

The focal adhesion plaques were studied before seeding on PAMs (at time 0) and after 4h of E/F MIAMI cell adhesion on PAMs by immunofluorescence of Vinculin. F-actin fibers were visualized by Phalloidin staining. After washing with DPBS, E/F MIAMI cells and the E/F MIAMI cells-PAMs complexes were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) (Sigma) at 4 °C for 15 min, then permeabilized for 5 min with DPBS containing 0.2% Triton X-100 (DPBS-T) (Sigma) and saturated with DPBS-T-4%BSA, 10% normal goat serum (NGS) (Sigma) at RT for 45 min. After 3 washes in DPBS, E/F MIAMI cells-PAMs complexes were then incubated overnight at 4 °C with anti-Vinculin (EPR8185, Abcam) antibody in DPBS-T-4% BSA. Controls used isotype IgG (BD Biosciences). After 3 washes, samples were incubated with secondary biotinylated anti-rabbit (1:200, Vector, Burlingame, CA, USA) in DPBS-T-4% BSA for 1h at RT, washed and furtherincubated with streptavidin–FITC (1:500 in DPBS) at RT for 40 min. Samples were also incubated with Phalloidin coupled with a fluorescent molecule of streptavidin–Rhodamine (TRITC) (Sigma, 1:300) for 45 min at RT. Before observation with confocal microscopy samples were incubated with DAPI (1:1000, Sigma) for 3 min at RT.

2.6. Differentiation of E/F MIAMI cells on PAMs surface

The extraction of protein and RNA was carried out with a kit (AllPrep® RNA/Protein, Qiagen, Courtaboeuf, France). Samples protein and RNA concentrations were determined using a ND-2000 NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware USA).

2.6.1. RT-qPCR

RT-qPCR was used to evaluate the gene expression of neural/neuronal, astrocyte and early osteoblastic markers **(Table 1)** by E/F MIAMI cells at day 0 and after 7 days on the surface PLGA or PLGA-P188-PLGA PAMs coated with LM+PDL. RT-qPCR experiments were performed following the guidelines of the PACEM core facility ("Plateforme Analyse Cellulaire Et Moléculaire", Angers, France) [10, 23]. Briefly, first strand complementary DNA (cDNA) synthesis was performed with a SuperScript™ II (SSII) Reverse Transcriptase (Invitrogen), in combination with random hexamers (Amersham Biosciences, Orsay, France) using 1mg RNA according to the manufacturer's guidelines. Five microliters of cDNA (1:20) were mixed with iQ SYBR Green Supermix (Biorad) and primer mix (0.2mM). The amplification was carried on a Chromo4 thermocycler (Biorad) with a first denaturation step at 95 °C for 3 min and 40 cycles of 95 °C for 10 s, 55 °C for 15 s and 72 °C for 15 s. A melting curve of the products determined the specificity of the primers. The GAPDH was the most stable housekeeping gene as estimated in previous studies [10, 24]. A mean cycle threshold value (Ct) was obtained from 2 measurements for each cDNA. The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used to determine the gene expression, which $\Delta\Delta Ct = [(Ct_{\text{gene of interest}} - Ct_{\text{HSK}})_{\text{Test}} - (Ct_{\text{gene of interest}} - Ct_{\text{HSK}})_{\text{Ctrl}}]$ described by Livak et al. [25].

Gene	Full name	NM accession number	Sequences
NFM	Neurofilament, medium polypeptide	NM_005382	F= 5'-GACCTCAGCAGCTACCAG-3' R= 5'-CTAGTCTCTTCACCCTCCAG-3'
β3-TUB	Homo sapiens tubulin, beta 3	NM_006086	F= 5'-CCAGTA TGAGGGAGA TCG-3' R= 5'-CACGTACTTGTGAGAAGAGG-3'
Sp7	Sp7 transcription factor	NM_152860	F= 5'-GGGACTCAACAACTCTGGG -3' R= 5'-AATGAGTGGGAAAAGGGAGG-3'
Nes	Nestin	NM_006617	F= 5'-AGAAACAGGGCCTACAGAG-3' R= 5'-AAAGCTGAGGGAAGTCTTG-3'
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	NM_002055	F= 5'-AGTTGCAGTCCTTGACCTG-3' R= 5'-CTCGTCCTTGAGGCTCTG-3'
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase	NM_002055	F= 5'-CTACAGGAAGCTGCTAGAGG -3' R= 5'-TTAATGACCTCTCCATCCCG-3'

Table 1: Human specific primer sequences validated in RT-qPCR

2.6.2. Western blot

β3-tubulin expression by E/F MIAMI cells at day 0 and after 7 days of culture on the surface of PAMs was confirmed by western blotting. Protein samples were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis on 7.5 % polyacrylimide gels. The proteins were loaded at 30 µg per well and then 7 µl of the size scale (Precision Plus, Protein™ Dual Color Standard). After protein migration in the gel, they were transferred onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane with a semi-dry transfer device TRANS-BLOT® SD. The membrane was saturated with TBS, 0.1% Tween20 and 4% BSA for one hour at RT. After 3 washes with TBS and 0.1% Tween20, the membrane was incubated overnight with the monoclonal Anti-β-tubulin isotype III (SDL.3D10, Sigma, St Louis, USA) diluted at 1:400 with 2% BSA/TBS/0.1% Tween 20. After washing, the secondary antibody anti-mouse (1/10000) was added for 1h at RT. After 3 washes, the membranes were revealed with ECL Super Signal West Femto (Thermo Scientific) and observed with an imager (ImageQuant LAS400). The quantification of blots was performed using ImageJ software. Protein levels were normalized with β-actin (Sigma).

2.6.3. Immunostaining

NFM immunostaining of E/F MIAMI cells cultured on the PAMs surface for 7 days was performed to confirm its expression as previously described [26]. Briefly, cells on PAMs were incubated with monoclonal Anti-Neurofilament 160 antibody produced in mouse (90 µg/mL, Sigma, St Louis, USA) was used and IgG1,*k* was used as an isotype control (1:50, BD Biosciences, Rungis, France). Detection was performed with a secondary biotinylated anti-mouse (2,5 µg/mL, Eurobio, Courtaboeuf, France) and streptavidine-fluoroprobe 547 (1:1000) and DAPI (1:1000, Sigma). Images were acquired with a confocal microscope (Leica TCS SP8, Mannheim, Germany).

2.7. Secretion of ECM molecules by MIAMI cells on PAMs surface

The secretion of ECM molecules by E/F MIAMI cells was evaluated after adhesion on the surface of both types of PAMs (PLGA and PLGA-P188-PLGA), coated with LM+PDL. After 24 hours in DMEM/F12 containing glucose and 0,5% FSB media, the cells/PAMs aggregates were transferred to Nunc Lab-Tek® II chamber slide™. After three days of growth, they were fixed in a 4% paraformaldehyde solution for 15 min. The cells were blocked with DPBS-T-4%BSA, 10% normal goat serum (NGS) at RT for 45 min, then probed with anti-laminin mouse monoclonal antibody (100 µg/mL) and anti-fibronectin mouse monoclonal antibody (100 µg/mL) in the mixture of DPBS/ BSA, overnight at 4°C. The cells were washed with DPBS and incubated with secondary biotinylated anti-mouse IgG (2,5 µg/mL) for 1 hour at RT. After washing, samples were incubated with streptavidin–fluoroprobe 547, diluted 1:1000, for 40 min at RT. Nuclei were stained with DAPI diluted 1:1000. Finally, the samples were observed by confocal microscopy.

2.8. Statistical analysis

Data are presented as the mean value of three independent experiments +/- standard deviation (SD). Significant differences between samples were determined using an ANOVA test, followed by Dunnett's multiple comparison tests, unless otherwise stated. The threshold P-value was set to 0.05, unless otherwise stated. In the figures, * indicates significant difference at $p < 0.05$, ** at $p< 0.001$.

3. Results

3.1. Polymeric films characterization

The water contact angle of the PLGA film is about 66,5°, it decreased to about 48,1° on the PLGA-P188-PLGA films. This shows the improvement in wettability of PLGA-P188-PLGA surfaces. Similarly, the contact angle for diiodomethane was measured on PLGA and PLGA-P188-PLGA surfaces and the values obtained are 41,4° and 43,8°, respectively. The surface free energy calculated from the contact angle values are 48,2 ± 0,4 mJ/m^2 and 57,8 ± 0,4 mJ/m^2 for PLGA and PLGA-P188-PLGA respectively **(Table 2)**. In addition, the PLGA-P188-PLGA polymer presented a higher polarity of 35 ± 1 % compared to PLGA with a polarity of 19 ± 1 % **(Table 2)**.

	Surface free energy					
	Contact angle (°)		Surface free energy (mJ/m^2)			Polarity (%)
	Water	Diiodomethane	Dispersive (γ_s^d)	Polar (γ_s^p)	Total (γ_s)	
PLGA	66,5 ± 0,6	41,4 ± 0,7	38,9 ± 0,2	9,3 ± 0,3	48,2 ± 0,4	19 ± 1
PLGA-P188-PLGA	48,1 ± 0,5	43,8 ± 0,6	37,6 ± 0,3	20,2 ± 0,3	57,8 ± 0,4	35 ± 1

Table 2: Characterization of polymeric films (2D) synthesized by spin coating technique. Contact angle, surface free energy and polarity of PLGA and PLGA-P188-PLGA films (n=6).

3.2. Surface properties of MS

AFM imaging of MS **(Figure 1. A)** revealed the difference in topography of PLGA and PLGA-P188-PLGA MS. The PLGA MS have a smooth surface with a mean roughness of 7 nm and the presence of holes of different sizes. This is more clearly seen on the profile of height deviations from the line drawn on the topography image. PLGA-P188-PLGA MS have a rough surface compared to PLGA (root mean square RMS: 12 nm), with the

presence of granules on their surfaces, better observed on the profile height deviations from the line drawn on the topography image. The morphology of PLGA MS observed by SEM present a smooth surface, with the presence of holes of different sizes. The core-shell of PLGA MS shows a spongy structure under the smooth surface **(Figure 1. B)**. On the contrary, the PLGA-P188-PLGA MS have a rough surface and at high magnification, many granules are observed. The internal cross-section morphology of PLGA-P188-PLGA MS shows a smooth interior and the granules form a thin layer on the surface of PLGA-P188-PLGA MS **(Figure 1. B)**.

ToF-SIMS imaging of the surface of MS shows the localization of the PLGA polymer on the surface of both PLGA and PLGA-P188-PLGA MS. It also shows the presence of the Poloxamer 188 segment on the surface of PLGA-P188-PLGA MS and its absence on the PLGA MS **(Figure 1. C)**. The PVA used in the formulation process is also detected on the surface of the MS, with more PVA on the PLGA MS compared to PLGA-P18-PLGA MS (**Figure 1. C)**.

The mechanical surface properties of the MS evaluated by the adhesion strength and the rigidity with AFM, shows that the adhesion strength between the AFM silica tip and the surface of PLGA MS is much greater (350 nN) than that with PLGA-P188-PLGA MS (6 nN) **(Figure 1. D)**. Furthermore, for the same applied force of 50 nN on the surface of the microspheres, the PLGA MS deform much less (50 nm) than the PLGA-P188-PLGA MS (500 nm). The slope of the force curve gives the rigidity of the surface of PLGA MS, which is 0,708 N/m and a bit less, 0.104 N/m for the PLGA-P188-PLGA MS **(Figure 1. D)**.

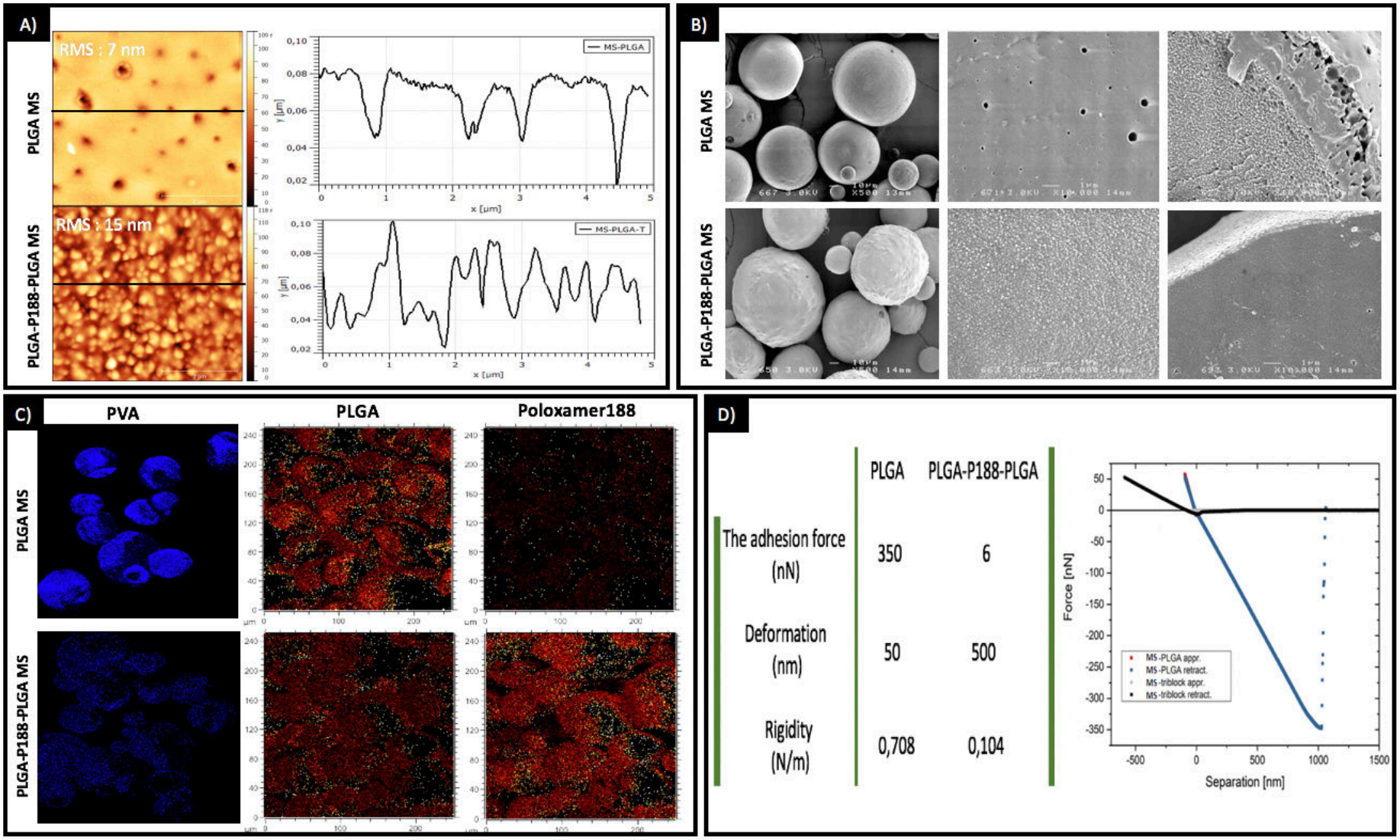


Figure 1: Surface Properties of MS. A) Surface topography of MS by atomic force microscopy (AFM) and the root mean square average of the profile height deviations from the mean line, recorded within the evaluation length showing that MS of PLGA-P188-PLGA had a rough surface compared to PLGA. **B)** Scanning electron microscopy (SEM) images of PLGA and PLGA-P188-PLGA microspheres showing that MS-PLGA present a smooth surface with presence of holes, while PLGA-P188-PLGA MS had a rough surface with granules. Internal cross-section morphology of PLGA MS shows a spongy structure under the smooth surface and a thin granular layer on the surface of PLGA-P188-PLGA MS with a dense core-shell. **C)** ToF-SIMS imaging of the surface of uncoated MS shows the localization of PVA (blue) (m/z 59), of PLGA ($C_3H_3O^+$ & $C_3H_4O^+$) and of Poloxamer 188 ($C_3H_6O^+$, $C_3H_7O^+$ & $C_3H_8O^+$) on the surface of PLGA MS and PLGA-P188-PLGA MS. **D)** Elastic properties of PLGA and PLGA-P188-PLGA MS, curve force versus deformation for the applied force on the surface of the microspheres (50 nN), with approach and withdrawal curve on the surface of PLGA and PLGA-P188-PLGA microsphere.

3.3. More LM/PDL adsorption on PLGA PAMs compared to PLGA-P188-PLGA PAMs

Zeta Potential measurements of microparticle surface charge showed that non-functionalized MS are negatively charged **(Figure 2. A-a)**. After coating with only LM the PAMs made of both types of polymers also present a negative charge regardless of the pH **(Figure 2. A-b)**. Whereas after coating with PDL only or with LM+PDL a positive charge is obtained from PAMs made with both types of polymers **(Figure 2. A-c & A-d)**. Moreover, the PLGA PAMs coated with only PDL have a higher positive charge than the PLGA-P188-PLGA PAMs, suggesting that PDL adsorbs better on the PLGA surface.

The confocal images show that for the same concentration of LM and PDL (15 µg/mL total) at a 50%LM+50%PDL proportion, LM immunostaining is less intense on the surface of PLGA-P188-PLGA PAMs compared to PLGA PAMs, suggesting a poor adsorption of LM on the former PAMs **(Figure 2. B-a) & B-b)**. Even at the highest protein concentration used for the surface functionalization of MS of PLGA-P188-PLGA (40 µg/mL (50%LM+50%PDL)) the LM immunostaining was never as intense as for the PLGA PAMs coated with 15µg/mL (50%LM+50%PDL) **(Figure 2. B-c & B-a)**. Furthermore, the LM immunostaining on the PAMs surface is not homogeneous, suggesting a heterogeneous adsorption of LM on the surface. The ToF-SIMS results confirm the confocal microscopy observations that LM adsorbed better on the surface of PLGA MS than on the surface of PLGA-P188-PLGA MS **(Figure 2. C-a & C-b)**. It is also noted that the majority of PLGA PAMs have a LM coverage of 45 to 100% of their total surface area **(Figure 2. C-a)**, while most PLGA-P188-PLGA PAMs have a LM coverage of 5 to 40% of their total area **(Figure 2. C-b)**. The ToF-SIMS measurements allowed us to show the distribution of PDL on the surface of the PAMs. Similar to LM, PDL adsorbs less at the surface of PLGA-P188-PLGA PAMs than at the surface of PLGA **(Figure 2. C-c & C-d)**. Furthermore, in the absence of PDL (PAMs coated with 100%LM at 15µg/mL) the signal intensity for LM on PLGA PAMs is more intense than on the PLGA-P188-PLGA PAMs **(Figure 2. C-e) & C-f)**.

The surface modification of the PAMs is also apparent by examining the topography of both PAMs by AFM. The results show that the PLGA PAMs have an increased roughness

of 72 nm compared to the uncoated MS, while the PLGA-P188-PLGA PAMs also increased their surface roughness after coating but not as much, passing from 17 nm root mean square to 27 nm **(Supplementary file: Figure 1)**.

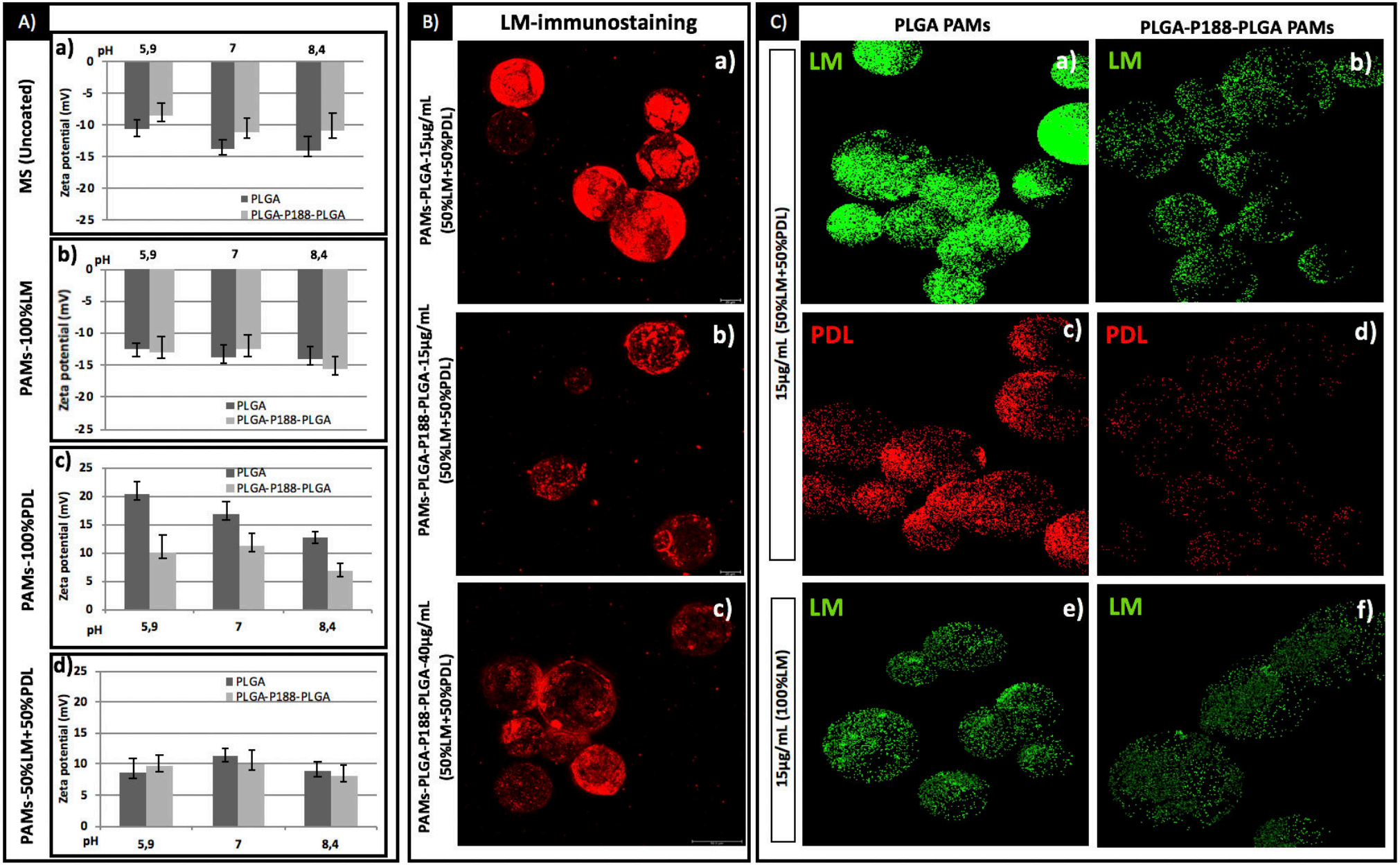


Figure 2: Surface properties of PAMs. A) Zeta potential of MS of PLGA and PLGA-P188-PLGA before and after coating with LM only, PDL only and with the mixture LM+PDL at different pH (N=3, n=3). **B)** PAMs-LM biomimetic surface observed after anti-LM immunofluorescence for PLGA PAMs (a) and PLGA-P188-PLGA (b) coated with 15 µg/mL (50%LM+50%PDL) and PLGA-P188-PLGA PAMs (c) coated with 40 µg/mL (50%LM+50%PDL) (N=3, n=2). **C)** ToF-SIMS imaging of the surface of PAMs showing the distribution of LM and PDL from secondary ion image generated from the diagnostic anions identified within the ToF-SIMS spectra LM (green) (m/z 33, 42 & 97) and PDL (red) (m/z 81 & 84). PLGA PAMs (a, c) and PLGA-P188-PLGA PAMs (b, d) were coated with 15µg/mL (50%LM+50%PDL) and 15µg/mL) (100%LM) (d, e) (N=2). Normalized images at total ions. Images: 250x250µm.

3.4. PDL enhance the LM adsorption on PLGA PAMs

LM seems not to influence the adsorption of PDL, as the amount of PDL on the surface of PLGA PAMs does not change in the presence or in the absence of LM **(Supplementary file: Figure 2)**. On the other hand, in the presence of PDL in the coating, LM appears to be more adsorbed on the surface of PLGA PAMs than in the absence of PDL (**Figure 2. C-a & C-e)**. To better understand this, the PLGA microparticles exposed sequentially to PDL and then to LM (and the opposite) were studied. The results show that the LM ion intensities for PAMs coated with PDL and then with LM are higher than PAMs coated with LM alone, while there is no difference on the intensity of PDL in the absence or in the presence of LM when subsequent coatings are performed. These results suggest that the presence of PDL does indeed promote LM adsorption on the surface of PLGA PAMs **(Supplementary file: Figure 3)**.

The results also show that LM adsorbs heterogeneously on the surface of PAMs, and on the same PAMs. This could be due to the aggregation of the LM molecules with the PDL molecules during the coating. Dynamic light scattering technique shows that the molecules of LM with PDL form complexes as soon as they are together in the solution, reaching an average size of around 0.8 - 1.1 μm after 30 min. The complexes remain and seem stable until at least 90 min (**Supplementary file: Figure 4)**.

3.5. Cells adhering to PAMs: different cells morphology

We further determined if the differences observed on the functionalized surfaces of PAMs affect cell adhesion properties. The E/F MIAMI cells did not adhere to non-functionalized MS of PLGA and even less to PLGA-P188-PLGA **(Figure 3. a & d)**. The E/F MIAMI cells adhered and spread on the surface of PLGA PAMs after 4 hours, showing a flattened morphology and covering the entire PAMs surface **(Figure 3. b)**. After 24 hours, the cells formed 3D complexes with different PAMs **(Figure 3. c)**. The E/F MIAMI cells adhere less and do not cover the whole surface of the PLGA-P188-PLGA PAMs after 4 hours. They present a round morphology on the surface of PAMs **(Figure 3. e)**. After 24 hours cells

form clusters on the surface of PAMs and also end up forming 3D complexes with different PAMs **(Figure 3. f)**.

We then evaluated the pattern of expression of some integrin subunits (β1, α2, α6) binding LM by flow cytometry and found a similar level of expression in E/F MIAMI cells. The E/F MIAMI cells also highly expressed the integrin subunits β1 and α2, which bind to different ECM molecules including LM, after adhesion for 4 hours on the surface of both types of PAMs (PLGA or PLGA-P188-PLGA). The subunit alpha 6, which specifically binds LM, was detected but at lower levels (< 35% of cells). The expression of the β4 subunit, which also binds to LM, was increased (11%) in E/F MIAMI cells on the surface of PAMs-PLGA compared to the expression (6%) by E/F MIAMI cells before adhesion on PAMs (t=0). On the contrary, the cells on the surface of PLGA-P188-PLGA PAMs did not express the β4 subunit (0,5%) **(Supplementary file: Figure 5)**.

In order to visualize the focal points of adhesion and the stress fibers on the adhering E/F MIAMI cells an immunostaining against vinculin and a staining for actin fibers by phalloidin was performed. We can visualize the location of vinculin on the focal adhesion points anchoring the cells to the 2D surface as well as the actin fibers connecting the different adhesive zones **(Figure 4. a)**. The cells on the surface of PAMs with LM and PDL coating show a diffuse staining of vinculin with a few clear puncta observed, suggesting the presence of few focal adhesions. The actin filaments are also observed along the ventral and dorsal surface of the cells which are elongated on PLGA PAMs and rounded on PLGA-P188-PLGA PAMs **(Figure 4. b & c)**. In the absence of LM on the surface of PAMs (PAMs coated only with 100% PDL), cells express less vinculin and no clear focal adhesions are observed (**Figure 4. d & e)** compared to cells on the surface of PAMs coated with the mixture of LM+PDL.

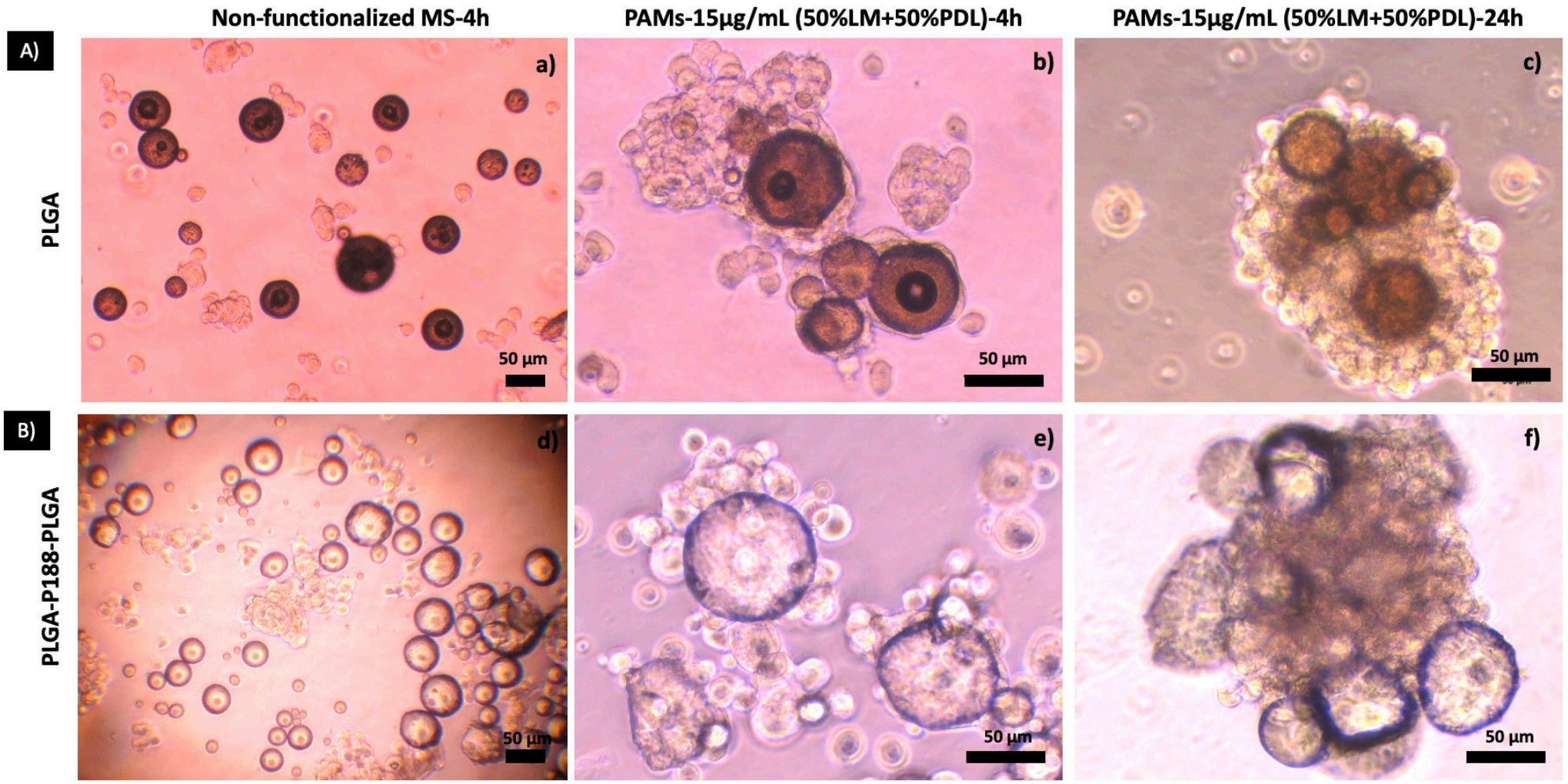


Figure 3: Adherence and morphology of E/F MIAMI cells on MS and PAMs surfaces. Adherence of E/F MIAMI cells (180 x 10^3) seeded with 0.5 mg of MS or PAMs on ultra-low attachment well plates observed by optic microscopy. **A)** With PLGA MS there is a slight attachment of the cells at 4h (a) but on PAMs the cells adhere and spread on the surface at 4h (b) and form a 3D complex at 24h (c). B) With PLGA-P188-PLGA MS there is no interaction at 4h (d), but the cells adhere onto the PAMs surface at 4h (e) although they maintain a round morphology and finally form a 3D complex at 24h (f) (N=4). Scale 50µm.

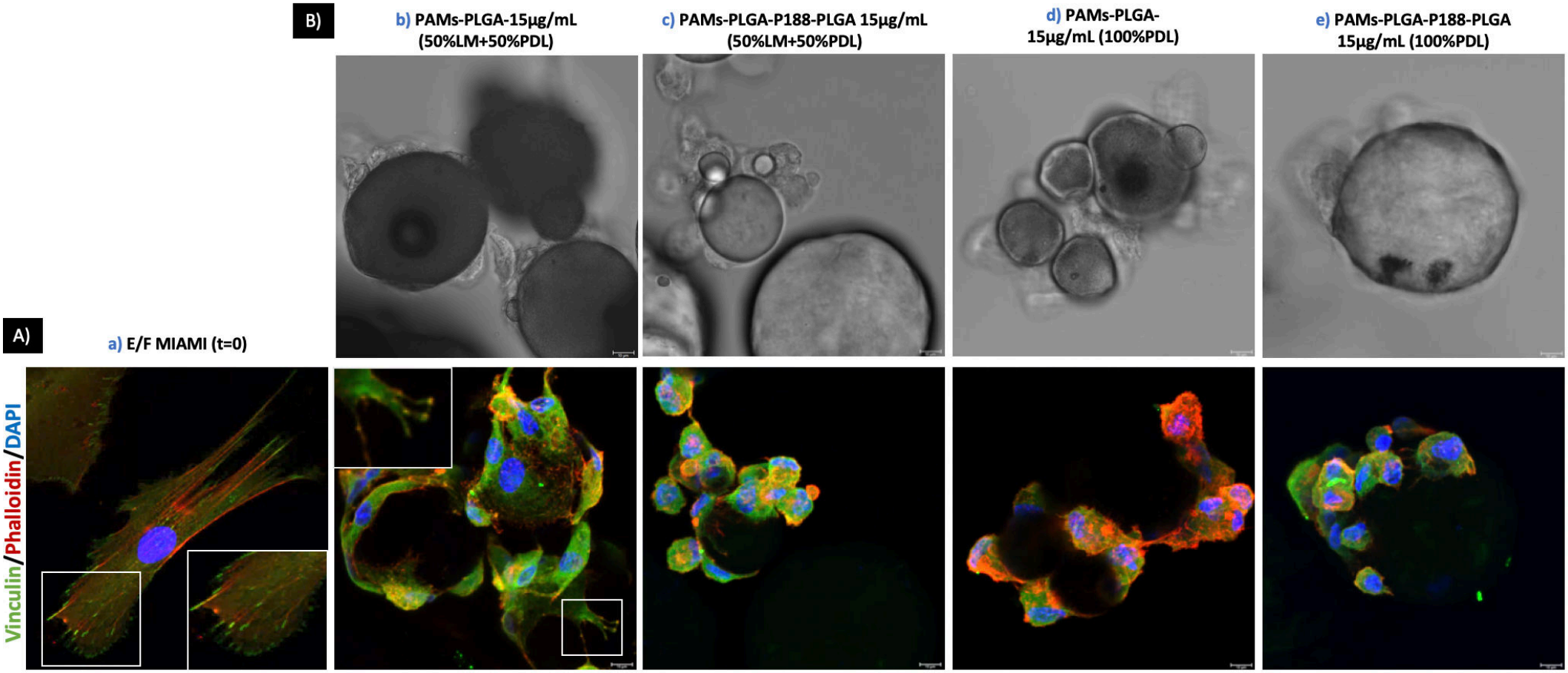


Figure 4: Regulated formation of focal adhesion by E/F MIAMI cells after 6 hours of adhesion on flat (2D) and on PAMs (3D) surfaces. Confocal microscopy images of vinculin (green) after immunofluorescence and actin filaments after phalloidin staining (red), for visualization of focal adhesions in 2D surface. **A)** As a control, E/F MIAMI cells were plated on coated glass substrate (2D), vinculin and F-actin form detectable aggregates of focal adhesions. **B)** Vinculin and F-actin are expressed and are diffusely distributed throughout the cytoplasm of E/F MIAMI cells on the surface of PAMs. On PLGA PAMs (b) a few focal adhesions are observed on the cells that spread on the surface compared to PLGA-P188-PLGA PAMs (c), both coated with 15µg/mL (50%LM+50%PDL). In the absence of LM in the coating (only PDL), vinculin expression by E/F MIAMI cells on the surface of PAMs-PLGA (d) and of PAMs-PLGA-P188-PLGA (e) is slightly lower compared to the other conditions. (N=2, n=2).

3.6. Similar behavior of E/F MIAMI cells on PAMs surface in long term

To determine the effect of the surface properties of PAMs on the survival and neuronal differentiation of E/F MIAMI they were cultured with low serum (0,5%) conditions.
After 7 days, the cells end up adhering in a similar manner on the PAMs of PLGA and PLGA-P188-PLGA and form a large interconnected 3D complex of cells and PAMs **(Figure 5. A-a & A-b)**. Furthermore, we note that the number of cells found on PAMs after 7 days of culture is similar on the surface of PLGA or PLGA-P188-PLGA PAMs coated with 15µg/mL (50%LM+50%PDL) **(Figure 5. B)**.

E/F MIAMI cells cultured on the surface of PAMs showed a slight increase for the mRNA of the neural marker Nestin, while β3-Tubulin gene expression, characteristic of immature neuronal cells, decreased on the surface of PAMs compared to E/F MIAMI cells at t= 0 before adhesion on PAMs. Accordingly, there was a high expression of the mature neuronal marker Neurofilament M by E/F MIAMI cells on the surface of PAMs. The expression level of the neural/neuronal markers (Nestin, β3-Tubulin and NFM) by E/F MIAMI cells on the surfaces of PLGA and PLGA-P188-PLGA PAMs was similar **(Figure 6. A)**. To determine whether culture conditions stimulated E/F MIAMI cell differentiation to other lineages, gene expression of astrocyte (GFAP) and osteoblastic (Sp7) markers was assessed. When E/F MIAMI cells were cultured on PAMs surface, GFAP expression was slightly decreased compared to E/F MIAMI cells at t= 0. The expression of the early osteoblastic marker, Sp7, was significantly higher when E/F MIAMI cells were cultured on the surface of both types of PAMs of PLGA and PLGA-P188-PLGA compared to E/F MIAMI cells at t=0 **(Figure 6. A)**. The decreased expression of β3-Tubulin at the protein level by E/F MIAMI cells on the surface of PAMs of PLGA and PLGA-P188-PLGA compared to E/F MAIMI cells at t=0 was confirmed by western blot analysis **(Figure 6. B)**. NFM-immunostaining images show that the E/F MIAMI cells express NFM in their cytoplasm, regardless of the type of PAM (PLGA or PLGA-P188-PLGA) **(Figure 6. C)**, while the expression of NFM by E/F MIAMI on 2D support was less **(Supplementary file: Figure 6)**, thus confirming the RT-qPCR results. It was also noticed that the cells in direct contact with the PAMs have a more intense NFM expression than the cells in the periphery of the complexes **(Figure 6. C)**.

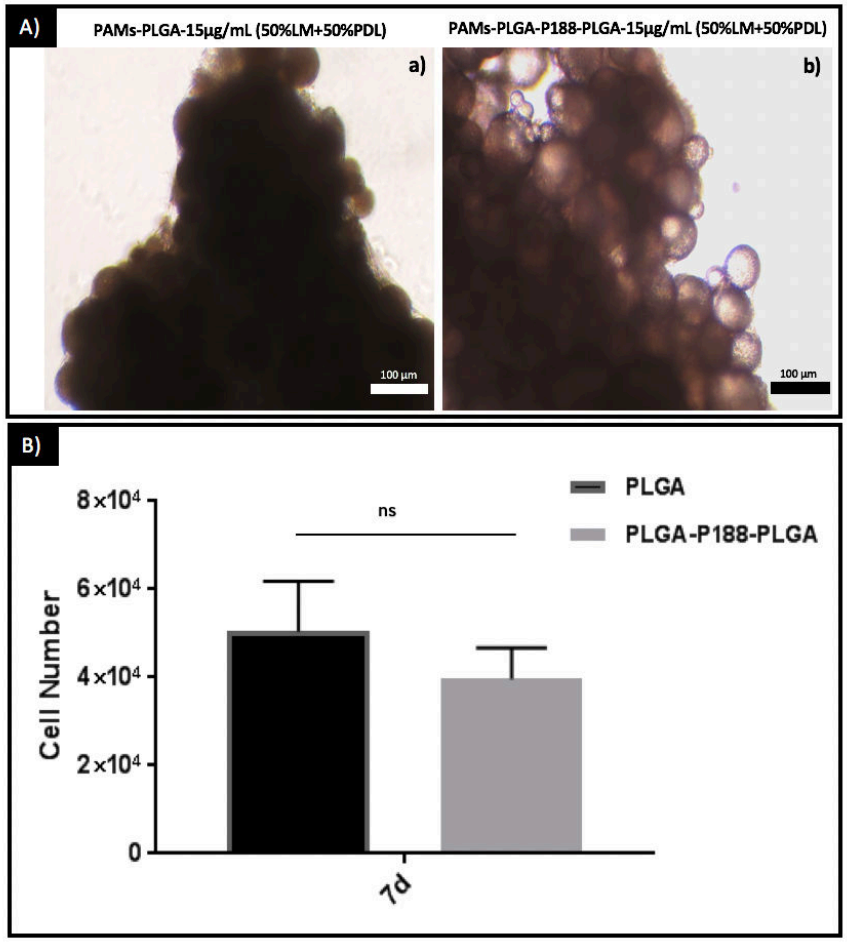


Figure 5: Adhesion and survival of E/F MIAMI cells on the surface of PAMs after 7 days. A) Adherence of E/F MIAMI cells on PAMs of PLGA (a) and PLGA-P188-PLGA coated with 15µg/mL (50%LM+50%PDL) (b) (N=4). **B)** Quantification of E/F MIAMI cells number by CyQUANT technique on PAMs of PLGA and PLGA-P188-PLGA coated with LM/PDL mixture (N = 3).

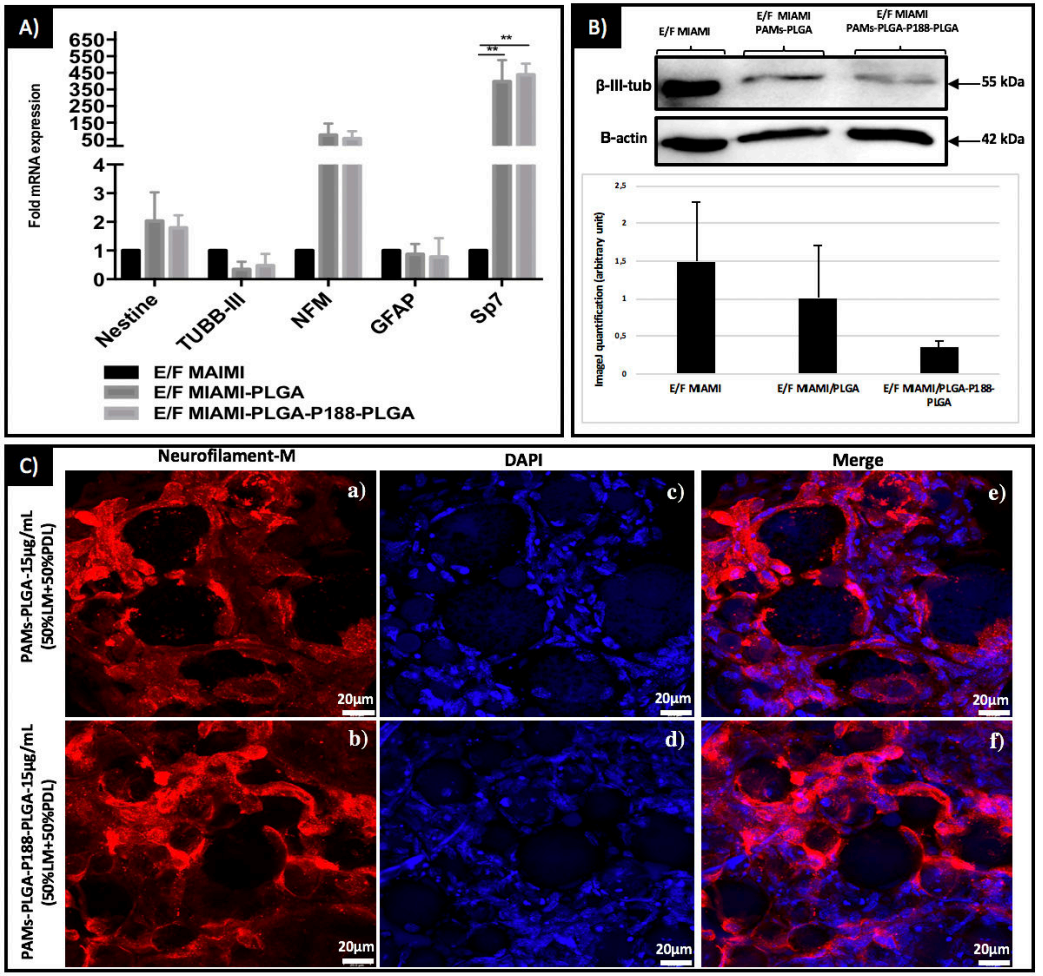


Figure 6: The differentiation behavior of E/F MIAMI cells on the surface of PAMs (LM + PDL) after 7 days. A) The fold mRNA expression of neural/neuronal markers (Nestin, β3-tubulin, NFM), astrocytic (GFAP) and osteoblastic (Sp7) markers were evaluated. Values of the mean ± SD of RT-qPCR arbitrary units. Statistical analysis comparing to E/F MIAMI cells (2D, t=0) (Control). * indicates significant difference $p < 0.05$, ** $p < 0.001$. (N=3, n=2). **B)** Representative western blot for protein expression of the early neuronal marker, β-III-tubulin, and the quantification showing that its expression was reduced in the cells cultured on the surface of PAMs, notably for PLGA-P188-PLGA, compared to E/F MIAMI cells on 2D at t=0 (N=2). **C)** Immunostaining of the mature neuronal marker neurofilament M (NFM) in E/F MIAMI cells on PLGA PAMs (a) and PLGA-P188-PLGA PAMs (b) DAPI (c and d) and Merge (e and f) showing that NFM is strongly expressed by cells on direct contact with the surface of PAMs. (N=2, n=2). Scale 20 µm.

3.7. Secretion of ECM by E/F MIAMI cells on the surface of PAMs

The FN and LM secretion profile of E/F MAIMI cells on the surface of PLGA and PLGA-P188-PLGA PAMs was assessed at day 4 **(Figure 7)**. E/F MIAMI cells secreted FN molecules on the surface of both types of PAMs regardless of the coating (LM/PDL or PDL only) **(Figure 7. a, b & c)**. The results show that E/F MIAMI cells are also able to secrete LM molecules on the surface of PLGA and PLGA-P188-PLGA PAMs coated with LM/PDL and with PDL only **(Figure 7. d, e & f)**. Noteworthy, the E/F MAIMI cells secrete more FN molecules compared to LM molecules. Moreover, the FN molecules form a network on the surface of PAMs after secretion, while the LM molecules form small patches on the surface of PAMs.

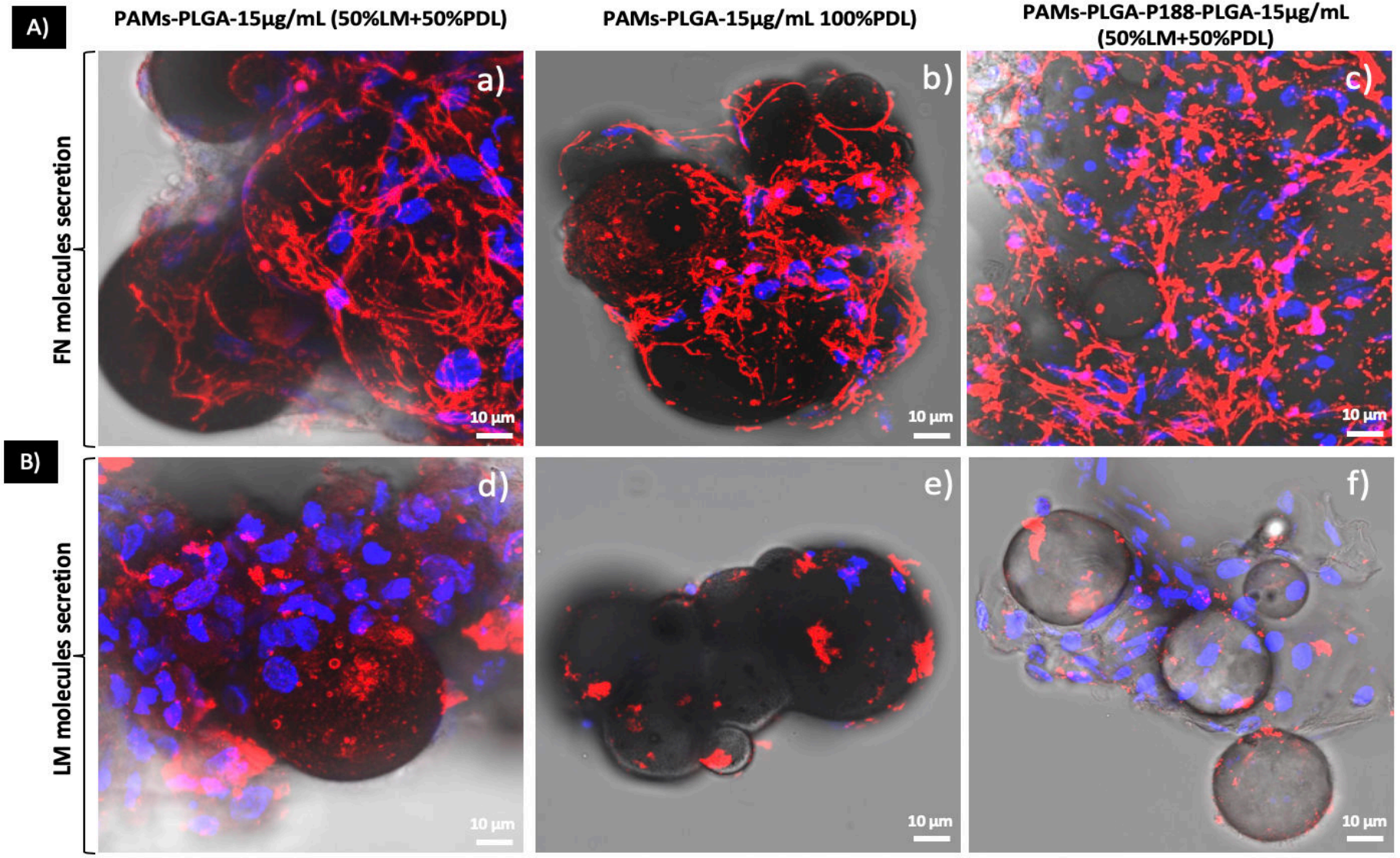


Figure 7: Extracellular matrix molecule secretion by E/F MIAMI cells after 4 days on the surface of PAMs. A) Fibronectin secretion profile of E/F MIAMI cells on PLGA PAMs (15µg/mL, 50%LM+50%PDL) (a), PLGA PAMs (15µg/mL 100%PDL) (b) and PLGA-P188-PLGA PAMs (15µg/mL50%LM+50%PDL) (c). **B)** Laminin secretion profile of E/F MIAMI cells on PLGA PAMs (15µg/mL 50%LM+50%PDL) (d), PLGA PAMs (15µg/mL 100%PDL) (e), and PLGA-P188-PLGA PAMs (15µg/mL 50%LM+50%PDL) (f) (N=2, n=2). Scale bar 10 µm.

4. Discussion

Biodegradable biomaterial scaffolds have previously been reported to have several advantages in repair of damaged neuronal tissue. These scaffolds combined with stem cells can help prevent the formation of scar tissue and concentrate neurotrophic growth factors, while promoting axonal regeneration in the injured neural tissue [27, 28]. It has been shown that PAMs transporting adult bone marrow-derived MSCs on their surface increased their survival, neuronal differentiation and enhanced their paracrine tissue repair potential thus restoring the damaged neuronal tissue [6, 10, 26, 27], but, the impact of the surface properties of PAMs on the behavior of MSCs has not been reported. In this study we sought to comprehend the surface properties affecting the protein adsorption and in turn the adhesion and the neuronal differentiation of the transported cells to be able to tailor the most appropriate PAMs for the desired application. We found that more LM and PDL absorbed to the PLGA surface than to the PLGA-P188-PLGA MS and that the cells adhered better to the functionalized PLGA PAMs. We have also correlated the hydrophobicity, topography, polarity and adhesive character of the polymer to the adsorption of the proteins. We also show that the amount of coating, surface charge, surface free energy and the surface rigidity of PAMs affect the adhesion of cells, essential for the anchorage dependent survival of these cells. However, interestingly in the long term, once they adhere, the E/F MAIMI cells behave similarly on the surface of PAMs in terms of cell number and neuronal differentiation regardless of the polymer type.

Several studies show that although the amount of proteins adsorbed by the surface tended to increase with an increase in surface roughness there was no significant effect on the amount of adsorbed proteins [29- 31]. Scopelliti et al. show that the adsorption of proteins depends significantly on surface nanostructure and that the relevant morphological parameter regulating the protein adsorption process is the nanometric pore shape [32]. In the present study, the microspheres of PLGA and PLGA-P188-PLGA present a different surface topography, PLGA microspheres show a smooth surface with holes of different depth that varies between 20-100 nm and PLGA-P188-PLGA MS have a rougher surface of RMS 15 nm. LM is a large flexible protein, composed of three different polypeptide chains, shaped like a cross, with three short arms and one long arm

measuring approximately 49 ± 6 and 76 ± 11 nm, respectively [33]. The conformation and size of LM may facilitate their penetration to holes that characterize PLGA MS surface, thus explaining the increased adsorption of LM to the PLGA surface compared to the PLGA-P188-PLGA MS. Furthermore, the successive coating on the PLGA PAMs surfaces show that PDL promotes the adsorption of LM. PDL is a synthetic peptide composed of repeating lysine units, which carry cationic amine units and normally will be attracted to the two types of MS, which were negatively charged. However, PDL adsorbed better to PLGA MS and then the negatively charged LM adhered better to the PLGA MS. These results seem to be explained by the electrostatic interaction of PDL molecules with the surface of the MS on the one hand, and on the other hand with LM molecules because of opposite charge. These results show nevertheless, that the electrostatic interactions between the polymer and the proteins were not the main parameter influencing LM adsorption to the polymer surface when used alone as in this condition LM still adsorbed better to the PLGA surface.

ToF-SIMS surface analysis revealed the presence of PVA at the surface of both types of MS, with slightly more on the PLGA MS, probably due to its hydrophobic composition. The polyvinyl alcohol (PVA) is a biocompatible surfactant commonly used to stabilize emulsion droplets in microparticle production [34]. Even if the PLGA microparticles had a greater amount of associated PVA than the PLGA-P188-PLGA microparticles, PVA did not prevent the adsorption of LM and PDL on these surfaces.

The hydrophobic/hydrophilic property of a material mainly depends on its surface chemistry. The poloxamer 188 of the PLGA-P188-PLGA polymer should be deposited on the surface of the MS during the formulation process, due to its hydrophilicity profile. Accordingly, the wettability of PLGA-P188-PLGA was slightly higher than the PLGA based surface due to the poloxamer 188 segments which are copolymers composed of hydrophilic poly (ethylene oxide) and poly (propylene oxide) units. This polymer was detected by ToF-SIMS analysis on the surface of the PLGA-P188-PLGA MS and could correspond to the thin granular layer observed by SEM all around the MS and detected by AFM. LM and PDL did not adsorb well on PLGA-P188-PLGA surface. The presence of the hydrophilic segment poloxamer 188 can prevent the adsorption of the proteins in accordance with reports stating that biomaterials that have hydrophilic surfaces

disadvantage protein adsorption compared to hydrophobic surfaces which tend to bind more protein [35, 36]. The presence of poly (ethylene oxide) in biomaterial composition is one of the most resistant polymers to adsorption of proteins [37, 38]. In addition, the PLGA-P188-PLGA had a higher surface free energy and a higher polarity than the PLGA, which can favor more interactions with polar species than the PLGA, due to the hydrophilic segment poloxamer 188. In general, hydrophobic surfaces are considered to be more protein-adsorbent than are hydrophilic surfaces because of the strong hydrophobic interactions occurring at these surfaces, in direct contrast to the repulsive solvation forces arising from strongly bound water at the hydrophilic surface [39, 40]. The arms of LM molecule are formed by stretches, these stretches are rich in heptad repeats of non-polar amino acids, which reduces their interaction on the surface of PLGA-P188-PLGA MS with a higher polarity. Furthermore, the MS of PLGA presented an adhesive surface compared to PLGA-P188-PLGA, which explains the capacity of the MS of PLGA to adsorb LM and PDL on their surfaces.

The positive charge of PAMs surface functionalized with LM+PDL promotes a first attachment of E/F MIAMI cells by electrostatic forces created between the surface of PAMs and the negatively charged cellular membrane. LM adsorbed differently on these PAMs, it was more adsorbed on PLGA PAMs than on PLGA-P188-PLGA PAMs. Consequently, cell morphology was different on the surface of both PAMs after 4 hours. They were rather round on the PLGA-P188-PLGA PAMs and spread on the surface of PLGA PAMs. However, no major difference was observed on the expression profile by E/F MIAMI cells of the α6, β1 and α2 integrins, forming part of the integrin receptors for LM [41, 42]. Only a few more β4-positive cells were found when they were grown on PLGA PAMs that had a higher amount of LM knowing that β4 coupled to the α6 subunit is a specific receptor for laminin [43]. When the cells adhere to a surface, they further form focal adhesion contacts. Vinculin is an essential protein of integrin-based focal adhesions involved in the adherence of cells to the extracellular matrix proteins. These focal adhesions also regulate actin filaments rearrangements and signaling pathways involved in cell differentiation among other cell behaviors [42, 44]. Cell adhesion studies are generally done on 2D cultures as it is easier to visualize these docking proteins than in a 3D environment [45]. We here observed that the cells grown on the 2-D substrate promoted the docking to focal contacts of the protein vinculin, while its cytoplasmic form

prevailed in cells embedded in 3-D substrates. Indeed, when E/F MIAMI cells were cultured on PLGA PAMs, which present a stiff surface with 0,708 N/m, the cells could spread better and some focal adhesion contacts with vinculin punctate forms with assembled F-actin cytoskeleton were detected. While, for cells on the surface of PLGA-P188-PLGA PAMs, which present a soft surface with 0,104 N/m, a rearrangement of cell cytoskeleton seemed to occur and vinculin and F-actin were detected mainly in the cytoplasm taking the form of the rounded cell. Furthermore, it seems that LM molecules on the surface of PLGA PAMs promote the punctate forms of vinculin as they are not observed on PLGA PAMs functionalized with only PDL.

The influence of PAMs roughness on cell adhesion was negligible in this study probably due to the small nanometric difference of surface roughness between the two PAMs. The difference in surface roughness of the two types of PAMs was of around 50nm and varied from 72 nm for PLGA PAMs to 27 nm for PLGA-P188-PLGA PAMs. Accordingly, it has been shown that there is no influence on adhesion mechanisms for human MSCs when the surface roughness of a biomaterial is within the range of 10 and 100 nm [46]. On the other hand, it has been shown that the adhesion of MSCs was most enhanced on soft surfaces [47]. Accordingly, the surface elasticity of PLGA-P188-PLGA PAMs could enhance the adhesion of E/F MIAMI cells on their surface even though there is less adsorption of LM and PDL by these PAMs. Moreover, the surface free energy also can promote the adhesion of cells to a substrate. Cell adhesion moves from poor to good at around 55 mJ/m^2 [48]. In this study, the PLGA-P188-PLGA had a surface free energy at $57 \pm 0, 4$ mJ/m^2 which can favor the adhesion of E/F MIAMI cells even with less coating.

The adhesion of E/F MIAMI cells to the PAMs is essential for their survival as they are anchorage dependent cells. Accordingly, in this study at 7 days we observed the same number of cells on both PAMs. However, it could not be excluded that more cells proliferated on the PLGA-P188-PLGA PAMs. In any case, at this same time-point the neuronal differentiation of E/F MIAMI cells was similar on both PAMs as evidenced by the expression profile of neuronal markers. We noticed that the expression by E/F MIAMI cells of the early neuronal marker b3-tubulin decreased after culture on the PAMs, whereas the late neuronal marker NFM increased strongly on the surface of PAMs. In this regard, our group has shown that E/F MIAMI cells under neurotrophin stimulation

differentiate into a neuronal phenotype on a laminin surface *in vitro* with a similar pattern of expression [5, 6, 26]. In this study, no neurotrophin supplement was added but it has been shown that MSCs in a soft 3D environment (1kPa) differentiated toward a neuronal lineage and not towards a glial phenotype as observed with the supple PLGA-P188-PLGA PAMs [49]. This could explain the neuronal differentiation observed on PLGA-P188-PLGA PAMs even though they have less LM on their surface. It could also be assumed that LM present in greater quantities on PLGA PAMs, could induce neuronal differentiation in E/F MIAMI cells. The similarities of survival and neuronal differentiation observed on both types of PAMs, regardless of their surface properties, could also be explained by the secretion of ECM molecules by the E/F MIAMI cells adhering on the PAMs after 4 days of culture. The secreted molecules observed in this study, LM and fibronectin, deposited on the surface of PAMs. These molecules promote neuronal differentiation and cell survival, respectively [6, 50]. The 3D cell culture PAM models are better than the traditional 2D monolayer culture as they resemble *in vivo* architecture, cell–cell interactions and cell–ECM interactions. PAMs may also serve as microcarriers transporting cells for transplantation studies but also as growth factor carriers, thus promoting the survival and differentiation of cells through the combined action of the biomimetic surface and the growth factor. In this regard, PLGA-P188-PLGA PAMs are interesting as they show a complete release of active growth factors [11, 26].

Conclusion

Our results demonstrated that the hydrophobicity of PLGA has a major effect on protein adsorption, whereas, in the presence of the poloxamer 188 (hydrophilic polymer) on the surface of PLGA-P188-PLGA MS, which forms an insulating layer the proteins adsorb less. In addition, the holes present on the surface of PLGA MS promote the adsorption of LM, while the surface topography of PLGA-P188-PLGA MS does not play a major role. The cells did not seem to adhere strongly at first to PLGA-P188-PLGA PAMs with less LM on their surface than on PLGA PAMs, they remained round, and no focal contacts were clearly observed, however they seemed to adhere over time, probably due to their surface free energy. They survived and differentiated into neuronal-like cells expressing NFM, probably due to their supple surface in the same manner as the cells on PLGA PAMs presenting a LM surface inducing neuronal differentiation. Moreover, the cells secrete their own ECM on the surface of both types PAMs over time also contributing to diminish their initial differences of surface properties. Therefore, both PAMs studied in our project can be used as microcarriers for various biomedical applications, and especially for neurodegenerative medicine.

Acknowledgements

This research is part of the MECASTEM project. This project was funded by the “Région Pays de La Loire”. We are thankful to the SCIAM “Service Commun d’Imagerie et d’Analyse Microscopique” platform of Angers for confocal microscopy images managed by Rodolphe Perrot and scanning electron microscopy (SEM) managed by Romain Mallet. We are also thankful to the PACeM “Plateforme d'Analyse Cellulaire et Moléculaire” platform of Angers, we thank Catherine Guillet for assistance with flow cytometry technique, and Jérôme Cayon who provided us with his expertise in RT-qPCR field. We are thankful to our colleagues who provided expertise that greatly assisted the research in this project.

References

[1] A. Augello and C. De Bari, 'The regulation of differentiation in mesenchymal stem cells', *Hum. Gene Ther.*, vol. 21, no. 10, pp. 1226–1238, Oct. 2010.

[2] A. M. DiMarino, A. I. Caplan, and T. L. Bonfield, 'Mesenchymal Stem Cells in Tissue Repair', *Front Immunol*, vol. 4, Sep. 2013.

[3] D. Kyurkchiev *et al.*, 'Secretion of immunoregulatory cytokines by mesenchymal stem cells', *World J Stem Cells*, vol. 6, no. 5, pp. 552–570, Nov. 2014.

[4] V. M. Tatard *et al.*, 'Neurotrophin-directed differentiation of human adult marrow stromal cells to dopaminergic-like neurons', *Bone*, vol. 40, no. 2, pp. 360–373, Feb. 2007.

[5] G. J.-R. Delcroix, K. M. Curtis, P. C. Schiller, and C. N. Montero-Menei, 'EGF and bFGF pre-treatment enhances neural specification and the response to neuronal commitment of MIAMI cells', *Differentiation*, vol. 80, no. 4, pp. 213–227, Nov. 2010.

[6] G. J.-R. Delcroix *et al.*, 'The therapeutic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells combined with pharmacologically active microcarriers transplanted in hemi-parkinsonian rats', *Biomaterials*, vol. 32, no. 6, pp. 1560–1573, Feb. 2011.

[7] S. Roche *et al.*, 'Comparative analysis of protein expression of three stem cell populations: models of cytokine delivery system in vivo', *Int J Pharm*, vol. 440, no. 1, pp. 72–82, Jan. 2013.

[8] R. S. Bhati, D. P. Mukherjee, K. J. McCarthy, S. H. Rogers, D. F. Smith, and S. W. Shalaby, 'The growth of chondrocytes into a fibronectin-coated biodegradable scaffold', *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 56, no. 1, pp. 74–82, 2001.

[9] V. M. Tatard *et al.*, 'Pharmacologically active microcarriers: a tool for cell therapy', *Biomaterials*, vol. 26, no. 17, pp. 3727–3737, Jun. 2005.

[10] N. Daviaud, E. Garbayo, L. Sindji, A. Martínez-Serrano, P. C. Schiller, and C. N. Montero-Menei, 'Survival, differentiation, and neuroprotective mechanisms of human stem cells complexed with neurotrophin-3-releasing pharmacologically active microcarriers in an ex vivo model of Parkinson's disease', *Stem Cells Transl Med*, vol. 4, no. 6, pp. 670–684, Jun. 2015.

[11] M. Morille *et al.*, 'New PLGA–P188–PLGA matrix enhances TGF-β3 release from pharmacologically active microcarriers and promotes chondrogenesis of mesenchymal stem cells', *Journal of Controlled Release*, vol. 170, no. 1, pp. 99–110, Aug. 2013.

[12] M. Savi *et al.*, 'Enhanced engraftment and repairing ability of human adipose-derived stem cells, conveyed by pharmacologically active microcarriers continuously releasing HGF and IGF-1, in healing myocardial infarction in rats', *J Biomed Mater Res A*, vol. 103, no. 9, pp. 3012–3025, Sep. 2015.

[13] B. D. Boyan, T. W. Hummert, D. D. Dean, and Z. Schwartz, 'Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response', *Biomaterials*, vol. 17, no. 2, pp. 137–146, Jan. 1996.

[14] H.-I. Chang and Y. Wang, 'Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds', 2011.

[15] A. Fried, A. Shamay, S. Wientroub, and D. Benayahu, 'Phenotypic expression of marrow cells when grown on various substrata', *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 61, no. 2, pp. 246–254, May 1996.
[16] J. A. Burdick and G. Vunjak-Novakovic, 'Engineered microenvironments for controlled stem cell differentiation', *Tissue Eng Part A*, vol. 15, no. 2, pp. 205–219, Feb. 2009.
[17] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher, 'Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification', *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 677–689, Aug. 2006.
[18] H. Kawahara, Y. Soeda, K. Niwa, M. Takahashi, D. Kawahara, and N. Araki, 'In vitro study on bone formation and surface topography from the standpoint of biomechanics', *J Mater Sci Mater Med*, vol. 15, no. 12, pp. 1297–1307, Dec. 2004.
[19] Z. Li *et al.*, 'Influence of surface roughness on neural differentiation of human induced pluripotent stem cells', *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, vol. 64, no. 3, pp. 355–366, Jan. 2016.
[20] A. Phadke, C.-W. Chang, and S. Varghese, 'Functional Biomaterials for Controlling Stem Cell Differentiation', in *Biomaterials as Stem Cell Niche*, K. Roy, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010, pp. 19–44.
[21] F. M. Fowkes, 'ATTRACTIVE FORCES AT INTERFACES', *Ind. Eng. Chem.*, vol. 56, no. 12, pp. 40–52, Dec. 1964.
[22] C. D. Volpe and S. Siboni, 'Some Reflections on Acid–Base Solid Surface Free Energy Theories', *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 195, no. 1, pp. 121–136, Nov. 1997.
[23] J.-P. Karam *et al.*, 'Pharmacologically active microcarriers associated with thermosensitive hydrogel as a growth factor releasing biomimetic 3D scaffold for cardiac tissue-engineering', *Journal of Controlled Release*, vol. 192, no. Supplement C, pp. 82–94, Oct. 2014.
[24] E. M. André *et al.*, 'Characterization and comparison of two novel nanosystems associated with siRNA for cellular therapy', *Int J Pharm*, vol. 497, no. 1–2, pp. 255–267, Jan. 2016.
[25] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, 'Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2−ΔΔCT Method', *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, Dec. 2001.
[26] S. Kandalam *et al.*, 'Pharmacologically active microcarriers delivering BDNF within a hydrogel: Novel strategy for human bone marrow-derived stem cells neural/neuronal differentiation guidance and therapeutic secretome enhancement', *Acta Biomater*, vol. 49, pp. 167–180, 2017.
[27] E. Garbayo, G. J.-R. Delcroix, P. C. Schiller, and C. N. Montero-Menei, 'Advances in the Combined Use of Adult Cell Therapy and Scaffolds for Brain Tissue Engineering', 2011.
[28] K. S. Straley, C. W. P. Foo, and S. C. Heilshorn, 'Biomaterial design strategies for the treatment of spinal cord injuries', *J. Neurotrauma*, vol. 27, no. 1, pp. 1–19, Jan. 2010.
[29] K. Cai, J. Bossert, and K. D. Jandt, 'Does the nanometre scale topography of titanium influence protein adsorption and cell proliferation?', *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 49, no. 2, pp. 136–144, May 2006.
[30] M. Han, A. Sethuraman, R. S. Kane, and G. Belfort, 'Nanometer-Scale Roughness

Having Little Effect on the Amount or Structure of Adsorbed Protein', *Langmuir*, vol. 19, no. 23, pp. 9868–9872, Nov. 2003.
[31] K. Rechendorff, M. B. Hovgaard, M. Foss, V. P. Zhdanov, and F. Besenbacher, 'Enhancement of Protein Adsorption Induced by Surface Roughness', *Langmuir*, vol. 22, no. 26, pp. 10885–10888, Dec. 2006.
[32] P. E. Scopelliti *et al.*, 'The Effect of Surface Nanometre-Scale Morphology on Protein Adsorption', *PLoS One*, vol. 5, no. 7, Jul. 2010.
[33] C. H. Chen, D. O. Clegg, and H. G. Hansma, 'Structures and dynamic motion of laminin-1 as observed by atomic force microscopy.', *Biochemistry*, vol. 37, no. 22, pp. 8262–8267, Jun. 1998.
[34] S. N. Alhosseini *et al.*, 'Synthesis and characterization of electrospun polyvinyl alcohol nanofibrous scaffolds modified by blending with chitosan for neural tissue engineering', *Int J Nanomedicine*, vol. 7, pp. 25–34, 2012.
[35] B. E. Rabinow *et al.*, 'Biomaterials with permanent hydrophilic surfaces and low protein adsorption properties', *J Biomater Sci Polym Ed*, vol. 6, no. 1, pp. 91–109, 1994.
[36] S. H. Hyon, W. I. Cha, Y. Ikada, M. Kita, Y. Ogura, and Y. Honda, 'Poly(vinyl alcohol) hydrogels as soft contact lens material', *J Biomater Sci Polym Ed*, vol. 5, no. 5, pp. 397–406, 1994.
[37] Y. S. Lin, V. Hlady, and C.-G. Gölander, 'The surface density gradient of grafted poly (ethylene glycol): preparation, characterization and protein adsorption', *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 3, no. 1–2, pp. 49–62, Sep. 1994.
[38] K. Bergström *et al.*, 'Effects of branching and molecular weight of surface-bound poly(ethylene oxide) on protein rejection', *J Biomater Sci Polym Ed*, vol. 6, no. 2, pp. 123–132, 1994.
[39] L.-C. Xu and C. A. Siedlecki, 'Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces', *Biomaterials*, vol. 28, no. 22, pp. 3273–3283, Aug. 2007.
[40] E. Ostuni, R. G. Chapman, R. E. Holmlin, S. Takayama, and G. M. Whitesides, 'A Survey of Structure−Property Relationships of Surfaces that Resist the Adsorption of Protein', *Langmuir*, vol. 17, no. 18, pp. 5605–5620, Sep. 2001.
[41] S. Mruthyunjaya, R. Manchanda, R. Godbole, R. Pujari, A. Shiras, and P. Shastry, 'Laminin-1 induces neurite outgrowth in human mesenchymal stem cells in serum/differentiation factors-free conditions through activation of FAK-MEK/ERK signaling pathways', *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 391, no. 1, pp. 43–48, Jan. 2010.
[42] Z. Li, H. Lee, and C. Zhu, 'Molecular mechanisms of mechanotransduction in integrin-mediated cell-matrix adhesion', *Experimental Cell Research*, vol. 349, no. 1, pp. 85–94, Nov. 2016.
[43] C. M. Niessen *et al.*, 'The α6β4 Integrin Is a Receptor for both Laminin and Kalinin', *Experimental Cell Research*, vol. 211, no. 2, pp. 360–367, Apr. 1994.
[44] M. A. Schwartz, 'Integrins and Extracellular Matrix in Mechanotransduction', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 2, no. 12, Dec. 2010.
[45] S. I. Fraley *et al.*, 'A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility', *Nat. Cell Biol.*, vol. 12, no. 6, pp. 598–604, Jun. 2010.

[46] S. Giljean, M. Bigerelle, and K. Anselme, 'Roughness statistical influence on cell adhesion using profilometry and multiscale analysis', *Scanning*, vol. 36, no. 1, pp. 2–10, 2014.
[47] J. K. V. Tam, K. Uto, M. Ebara, S. Pagliari, G. Forte, and T. Aoyagi, 'Mesenchymal stem cell adhesion but not plasticity is affected by high substrate stiffness', *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 13, no. 6, p. 064205, 2012.
[48] J. M. Schakenraad and H. J. Busscher, 'Cell—polymer interactions: The influence of protein adsorption', *Colloids and Surfaces*, vol. 42, no. 3, pp. 331–343, Dec. 1989.
[49] G. J. Her, H.-C. Wu, M.-H. Chen, M.-Y. Chen, S.-C. Chang, and T.-W. Wang, 'Control of three-dimensional substrate stiffness to manipulate mesenchymal stem cell fate toward neuronal or glial lineages', *Acta Biomaterialia*, vol. 9, no. 2, pp. 5170–5180, Feb. 2013.
[50] E. Garbayo *et al.*, 'Neuroprotective properties of marrow-isolated adult multilineage-inducible cells in rat hippocampus following global cerebral ischemia are enhanced when complexed to biomimetic microcarriers', *Journal of Neurochemistry*, vol. 119, no. 5, pp. 972–988, Dec. 2011.

SUPPLEMENTARY FILE

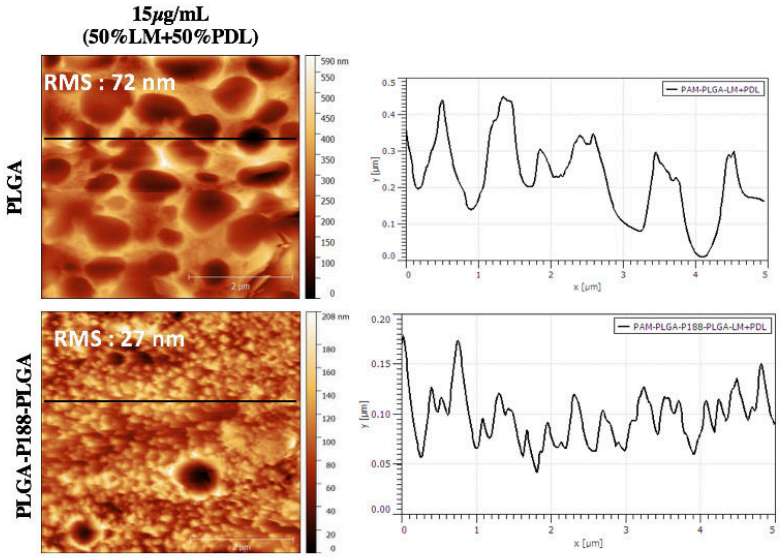


Figure 1: Surface topography of PAMs by atomic force microscopy (AFM) and the root mean square average of the profile height deviations from the mean line, recorded within the evaluation length.

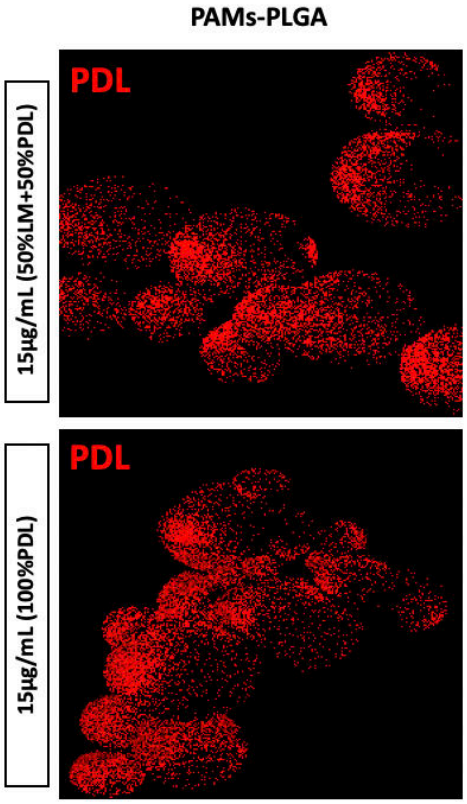


Figure 2: PDL distribution on the surface of PLGA PAMs coated with the mixture LM+PDL and with PDL only

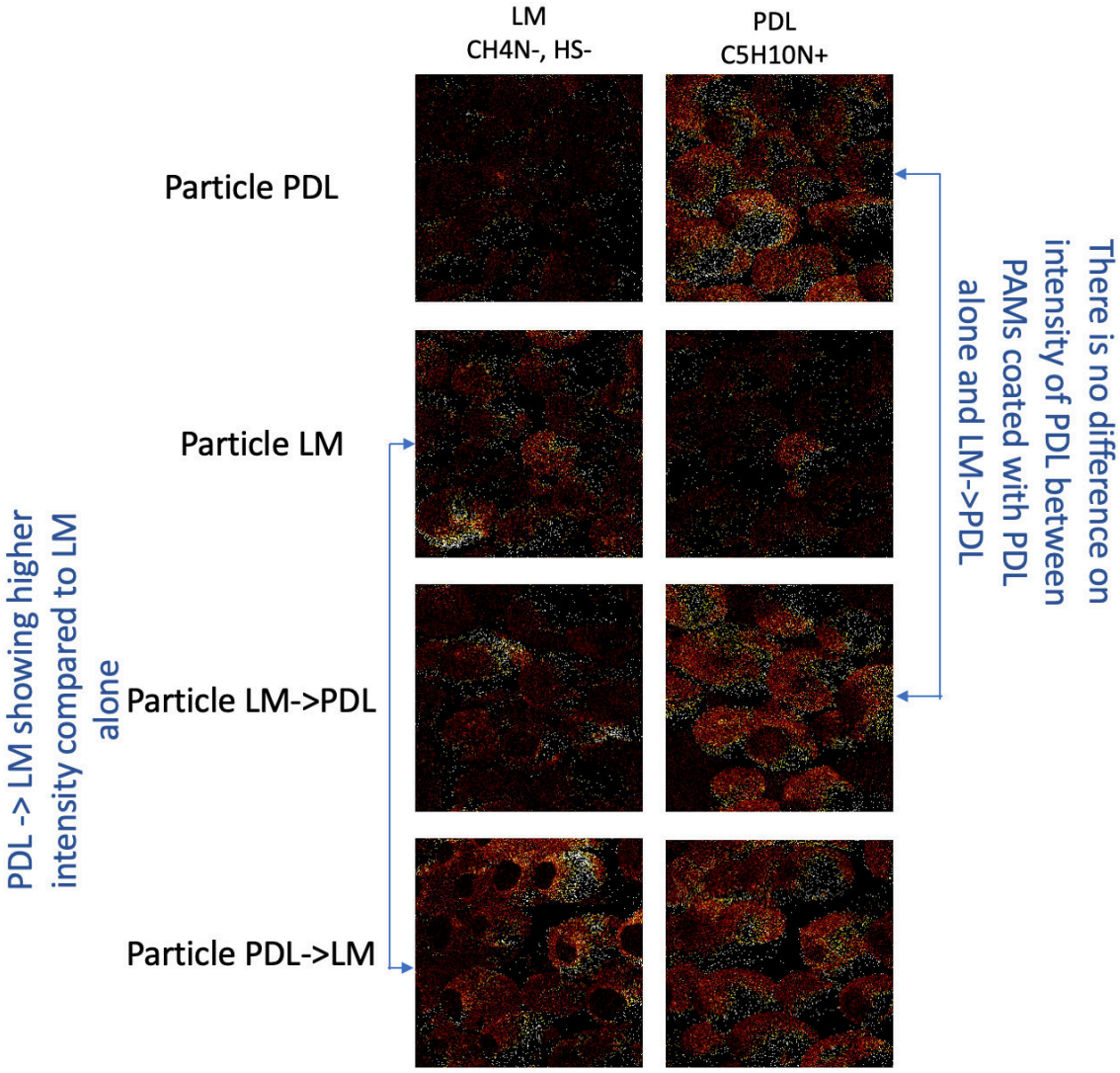


Figure 3: ToF-SIMS imaging of the PLGA PAMs surface exposed to sequential coating.

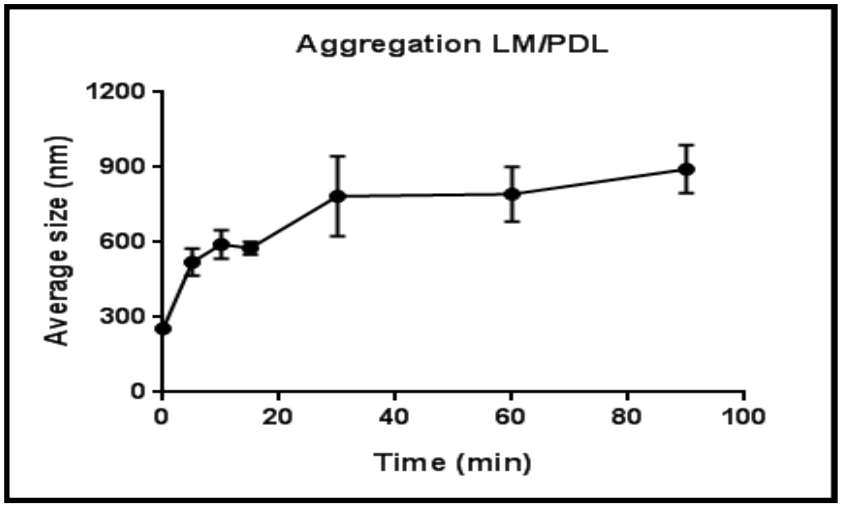


Figure 4: Measuring laminin and poly-d-lysine aggregation with dynamic light scattering (DLS). Size of complexes of LM molecules mixture with PDL molecules in DPBS buffer over time (N=3).

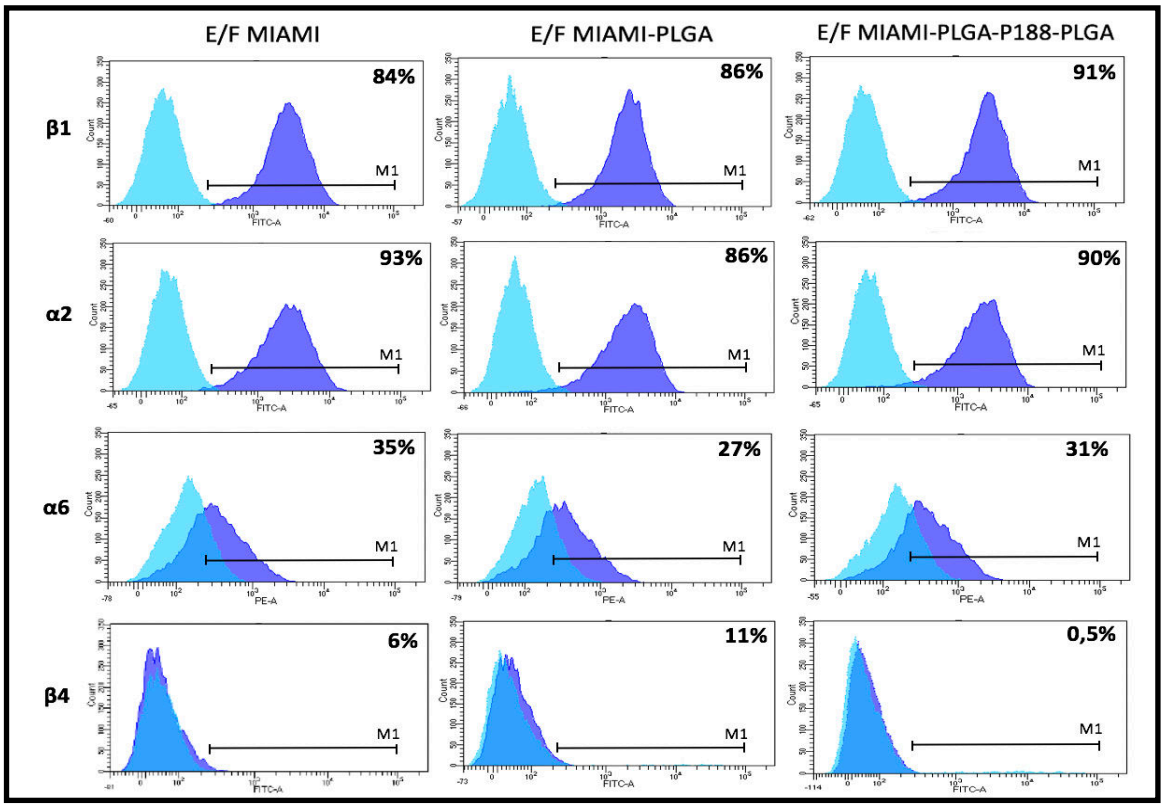


Figure 5: E/F MIAMI cells integrin subunit expression at t=0 (E/F MIAMI), and after 4 hours of adhesion on the surface of PAMs (PLGA and PLGA-P188-PLGA). Using flow cytometry, we observed that E/F MIAMI cells strongly expressed the integrin subunits beta 1 and alpha 2 whatever the type of support (2D or 3D). Subunit alpha 6 is less expressed by E/F MIMAI cells compared to beta 1 and alpha 2 on 2D or 3D substrate. The second subunit which is specified to interact only with LM was detected but at much lower level. (β1: N=4), (β4: N=3) (α2: N=3) and (α6: N=4).

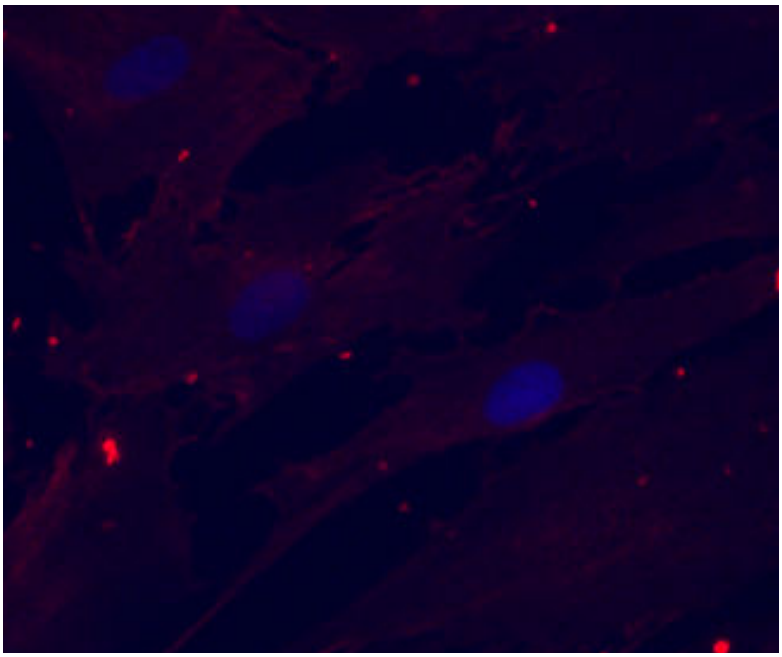


Figure 6: NFM expression by E/F MIAMI cells on 2D surface

Conclusion

Cette étude décrit les propriétés de surface de deux types de microsphères composées de PLGA et PLGA-P188-PLGA, et la caractérisation d'adsorption de laminine et poly-D-lysine (PDL) sur la surface de ces microsphères. Plusieurs techniques physiques, chimiques et mécaniques ont été utilisées pour caractériser la surface des microparticules avant et après recouvrement par les molécules de la MEC.

La technique de ToF-SIMS montre la localisation de poloxamère 188 à la surface des microsphères composées de PLGA-P188-PLGA. Dans ce travail, nous avons montré que la présence du bloc hydrophile « poloxamère 188 » dans la composition chimique du polymère PLGA-P188-PLGA empêche l'adsorption de molécules de la matrice extracellulaire en formant une couche isolante sur ces surfaces. Cependant, les MPA de PLGA, adsorbent bien les deux molécules qui composent le « coating » quoiqu'ils présentent différentes charges (LM : négative et PDL : positif). En outre, le PLGA-P188-PLGA avait une énergie libre et une polarité de surface plus élevées que le PLGA, ce qui peut favoriser l'interaction avec les espèces polaires, en raison d'existence du polymère hydrophile (poloxamère 188).

L'attachement de cellules à la surface de MPA semble être favorisé par les interactions électrostatiques entre la membrane cellulaire (chargé négativement) et la surface de MPA (chargé positivement après coating). La variation d'adsorption des protéines à la surface des MPA semble entrainer une adhérence différente de cellules MIAMI E/F. Les cellules n'empruntent pas la même forme à la surface des MPA, elles sont plutôt rondes et adhèrent peu sur les MPA de PLGA-P188-PLGA, tandis que les cellules sont étalées sur les MPA de PLGA.

Les MPA de PLGA-P188-PLGA présentent une forte énergie libre de surface et en outre ces supports présentent une surface moins rigide par rapport aux MPA de PLGA. Ceci suggère que malgré une faible quantité de LM et PDL à la surface les cellules sont influencées par ces paramètres qui stimulent l'adhérence des cellules. En effet les cellules MIAMI finissent par adhérer aux MPA de PLGA-P188-PLGA.

Nous avons également montré que les cellules MAIMI E/F sur les MPA pouvait sécréter leur propre matrice extracellulaire sur les MPA quel que soit le type du polymère et du coating. Ceci permet d'expliquer que après 7 jours les cellules MIAMI E/F ont le même comportement sur les deux types de MPA, en nombre des cellules ou encore l'expression des marqueurs des voies de différenciation neuronale (Nestin, β3-tubulin et Neurofilament-M), astrocyte (GFAP). On en déduit donc que l'adhésion des cellules MIAMI aux MPA et la sécrétion ultérieure de molécules de la MEC suffit à les induire la différenciation neuronale à un stade tardif. Finalement, nous avons montré que les MPA favorisent la différenciation neuronale de cellules MIAMI.

Chapitre 4 :

DISCUSSION GENERALE

Chapitre 4 : Discussion générale

L'ingénierie tissulaire ou médecine régénérative du SNC basée sur le fait d'associer un biomatériau biocompatible à des cellules appropriées, a pour but de restaurer les cellules endommagées et de ralentir/stopper la progression des maladies neurodégénératives. Cependant, pour les applications cliniques, il est nécessaire de disposer de cellules facilement accessibles, facile à cultiver et qui peuvent aussi se différencier en précurseurs neuronaux. Nous avons choisi de travailler avec une sous-population de CSM, les cellules « marrow-isolated adult multilineage inducible » MIAMI, obtenues de la moelle osseuse de la crête iliaque. De plus les cellules MIAMI peuvent se différencier en cellules dérivant des 3 feuillets embryonnaires, y compris notamment les cellules de phénotype neuronal. Il est également essentiel de choisir le bon biomatériau afin de fournir un microenvironnement en 3-D aux cellules qui va favoriser leur comportement après implantation dans le tissu hôte. Pour cela, nous avons tenté d'étudier l'interaction cellules/biomatériau afin de comprendre et définir les spécifications physico-chimiques des MS qui impactent l'adhérence, la survie et la différenciation neuronale des cellules E/F MIAMI.

Au cours de ce travail, nous avons procédé en plusieurs étapes. Tout d'abord, nous avons mis au point la caractérisation physico-chimique des MS formulées par la même technique mais avec des polymères légèrement distincts PLGA et PLGA-P188. Le PLGA est un copolymère souvent utilisé pour des applications biomédicales, car il subit une hydrolyse dans le corps en présence de l'eau ce qui favorise la production des métabolites; acide lactique et acide glycolique [35]. Le PLGA est relativement hydrophobe, ainsi pour assurer la stabilité et la cinétique de libération des médicaments encapsulés, des polymères hydrophiles tel que le poloxamère est co-polymérisé avec le PLGA pour surmonter ces défis. Les MS obtenues ont été recouvertes avec un mélange de LM et PDL, et caractérisées sur le plan physico-chimique. Par la suite, des observations au cours du temps ont été faites afin de s'assurer que les cellules E/F MIAMI adhérent à la surface des MPA. Finalement, nous avons suivi le devenir de ces cellules à la surface de ces deux types

de MPA (PLGA et PLGA-P188-PLGA), afin de déterminer les effets des propriétés de surface de MPA sur le comportement cellulaire.

Nous avons étudié l'adsorption de la molécule de la matrice extracellulaire LM et PDL à la surface de MS de PLGA et de PLGA-P188-PLGA par microscopie confocale et TOF SIMS. Nous avons constaté que les MPA de PLGA et de PLGA-P188-PLGA n'offraient pas les mêmes avantages pour l'adsorption des protéines lors de l'étape de recouvrement. La LM et la PDL s'adsorbent beaucoup moins sur les MS composées de PLGA-P188-PLGA que sur les MS composées de PLGA. Nous avons aussi remarqué que la LM s'adsorbe de manière hétérogène à la surface des MS. Il est donc probable que les propriétés physico-chimiques et mécaniques des MS ainsi que, la structure des protéines jouent un rôle sur l'adsorption des protéines sur ces surfaces.

Nous avons premièrement pensé que la charge globale des MS pourrait intervenir dans la capacité d'adsorption de la LM et la PDL par ces surfaces. Les mesures de potentiel zêta des MS de PLGA et de PLGA-P188-PLGA montrent que les MS de PLGA-P188-PLGA ont une charge globale moins négative que les MS de PLGA quel que soit le pH du milieu (5,9 ; 7 ; 8,4). L'adsorption des protéines sur la surface est maximale à leur point isoélectrique [194, 195] grâce aux interactions électrostatiques produites avec la surface [196]. Les MS de PLGA possédant plus de charges négatives à leur surface du fait de la présence de groupements carboxyliques terminaux présentent dans ce polymère. Selon les interactions électrostatiques ces surfaces attireraient les molécules de PDL chargée positivement qui pourraient alors s'adsorber plus facilement. Ce phénomène ne se vérifie pas sur les MS de PLGA-P188-PLGA. Les molécules de LM possèdent une charge négative similaire à la charge globale des MS (PLGA et PLGA-P188-PLGA), mais la LM s'adsorbe sur les deux surfaces et également mieux sur les MS-PLGA que sur les MS-PLGA-P188-PLGA. En général, l'adsorption des protéines de grande taille est différente de celle de petite taille, parce que les macromolécules sont susceptibles d'interagir en plusieurs points avec la surface. Norde et al. montrent que les protéines peuvent s'adsorber sur une surface malgré un effet de répulsion électrostatique, d'autres mécanismes sont donc impliqués [197]. Ils montrent que l'adsorption des protéines est toujours favorable sur les surfaces hydrophobes quelle que soit la charge globale de la surface et de la protéine. L'interaction entre la surface et la protéine adsorbée (interaction hydrophobe) est prédominante par

rapport aux effets de répulsion électrostatique et donc devient le mécanisme majeur de l'adsorption des protéines sur les surfaces hydrophobes. D'une façon plus générale toutes les protéines s'adsorbent sur les surfaces hydrophobes, et l'adsorption des protéines augmente avec l'augmentation de l'hydrophobicité de la surface [198]. Une étude faite par la même équipe mais sur les surfaces hydrophiles, montre que quand la protéine et la surface ont de charges opposées, les interactions électrostatiques entre protéine et surface sont mises en jeu pour l'adsorption. Cependant, quand la protéine et la surface ont la même charge, seules les protéines « molles » peuvent s'adsorber sur la surface entrainant la perte de structure de la protéine adsorbée, contrairement aux protéines « dures » dont la structure ne pourrait pas être modifiée et finalement ne pourrait pas s'adsorber [197]. La présence du segment poloxamère 188 à la surface de MS-PLGA-P188-PLGA rend ces MS plus hydrophile ce qui empêche l'adsorption de LM et PDL sur ces surfaces, mais pourraient mieux conserver leur conformation active. Le PLGA est riche en acide lactique ce qui lui rend plus hydrophobe, permet une meilleure adsorption des protéines mais elles risquent de perdre leur activité.

Nous avons également remarqué que la topographie des MS de PLGA et de PLGA-P188-PLGA diffère, tandis que, les MS-PLGA présentent une surface lisse avec la présence des trous de différentes tailles de diamètre et de profondeur. Ainsi, les MS-PLGA-P188-PLGA présentent une surface rugueuse avec la présence des grains. Scopelliti et al. ont montré que l'adsorption des protéines dépend de manière significative de la nanostructure de surface et que le paramètre morphologique pertinent régulant le processus d'adsorption des protéines est la forme nanométrique des pores [199]. Les trous observés par AFM et MEB à la surface de MS de PLGA, présentent une taille de profondeur variable entre 20-100 nm. Plusieurs études ont été effectué sur la forme et la taille de la LM. L'observation des molécules de LM au microscopie électronique en utilisant une ombre rotative, a montré que les trois chaînes s'assemblaient pour former une structure en croix asymétrique, avec un long bras d'environ 77 nm et trois bras courts, dont deux sur 34 nm et un de 48 nm [200, 201]. En effet, les trous à la surface de MS de PLGA peuvent faciliter la pénétration des molécules de LM et donc, une partie de l'adsorption de la LM est favorisé par la topographie de surface. La polarité de la surface joue aussi un rôle important sur l'adsorption de la protéine, plusieurs équipes ont montré que la quantité adsorbée d'albumine de sérum bovin augmente sur les surfaces apolaires [202, 203]. Nos

résultats montrent que le PLGA-P188-PLGA à un pourcentage de polarité plus important que celui du PLGA, 35% et 19%, respectivement. Ces résultats expliquent pourquoi les molécules de la LM et de PDL adsorbent fortement sur les surfaces de PLGA qui ont une faible polarité par rapport au PLGA-P188-PLGA. La forte polarité de ce dernier empêche l'adsorption des protéines à sa surface.

Les propriétés adhésives de la surface jouent également un rôle important lors l'adsorption des protéines sur un biomatériau et c'est la force d'adhésion lors de la rétraction qui est mesurée. En général, les interactions spécifiques entre les surfaces macroscopiques sont mesurées par AFM, tandis que la rétraction de la pointe de la surface dépend fortement de la nature et de la longueur du lien polymère. La force d'adhésion entre la pointe AFM (silice) et MS-PLGA est beaucoup plus grande (350 nN) que celle avec le MS-PLGA-P188-PLGA (6nN). Cela suggère que le polymère de PLGA présente une forte force d'adhésion avec la PDL et la LM expliquant probablement leur forte adsorption.

La réaction des cellules à la topographie de la surface sur laquelle elles adhèrent est un des paramètres les plus étudiés dans le domaine de la culture cellulaire sur des supports. La rugosité de MPA de PLGA-P188-PLGA après le recouvrement avec LM et PDL n'a quasiment pas changé (de 15 à 27 nm), tandis que la rugosité de la surface de MPA de PLGA a augmenté après le recouvrement (de 7 à 72 nm). L'augmentation de la rugosité de MPA de PLGA après recouvrement pourrait être expliquée par l'adsorption des protéines par ces surfaces, tandis que la faible augmentation de la rugosité de PLGA-P188-PLGA explique la faible adsorption des protéines sur ces surfaces. Récemment, le mécanisme d'adhérence de CSM isolé à partir de la moelle osseuse sur des biomatériaux dans la plage de rugosité comprise entre 10 et 100 nm a été étudié. Les résultats montent que les rugosités de surfaces de biomatériaux dans cet intervalle n'ont aucune influence sur les mécanismes d'adhérence cellulaire [204]. Ceci suggère que dans notre étude la rugosité n'est pas en paramètre influant sur l'adhérence de cellules MIAMI aux MPA.

Les cellules E/F MIAMI présentent une morphologie différente à la surface de deux types de MPA pendant les premières 4 heures d'adhérence. Elles sont rondes sur les MPA de PLGA-P188-PLGA avec une adhérence plus faible à la surface et plus étalées sur les MPA de PLGA associé à une adhérence plus forte, mais elles finissent par adhérer sur les deux

MPA. La différence d'adhérence de cellules E/F MIAMI à court terme à la surface des MPA, est due probablement à la quantité de protéines adsorbés, à la distribution sur les MPA et aux propriétés des protéines de recouvrement et ne dépend pas de la rugosité de surface de MPA. La PDL présente en plus grande quantité sur la surface des MPA de PLGA joue probablement un rôle sur l'attachement au départ des cellules à sa surface. Les forces physiques non spécifiques dans lesquelles on trouve les forces électrostatiques jouent un rôle dans l'attachement des cellules aux surfaces des biomatériaux. La majorité des cellules présentent des charges ioniques négatives à l'extérieur de la membrane et si le substrat est chargé positivement, grâce à la PDL chargée positivement, la plupart des cellules seront attirées par ces forces électrostatiques [205]. Il était montré que les cellules stromales dérivées de la moelle osseuse de rat adhèrent significativement mieux dans des hydrogels chargés positivement que dans des hydrogels chargés négativement [206]. Le rôle de la PDL dans cette étude est ainsi de favoriser l'attachement des cellules E/F MIAMI sur les MPA. Les interactions électrostatiques entre la cellule et le support sont importantes dans l'attachement de cellules sur une surface mais l'adhérence par la suite fait intervenir des interactions plus spécifiques grâce aux molécules d'adhésions [207]. Ainsi les MPA de PLGA qui adsorbent plus des PDL à leur surface permettent un fort attachement des cellules au départ puis une interaction avec la LM pour leur adhérence par la suite.

Les MPA de PLGA ont également une distribution plus importante de FN sur leur surface comparée au MPA de PLGA-P188-PLGA et les cellules adhérent plus rapidement et s'étalent sur leur surface. Nos observations sont en conformité avec les résultats de Bhati et al. qui ont montré que l'adsorption de FN à la surface de biomatériaux permettrait d'augmenter l'adhérence des cellules au support et aussi peuvent réguler le comportement des cellules s'y accrochant [126]. Un exemple particulièrement clair est fourni par Zamarron et al. qui ont montré que le pourcentage de cellules attachées et étalées augmente avec l'augmentation de la concentration de FN sur les supports [208] . L'adhésion de cellules à des molécules de la MEC se fait par l'intermédiaire de récepteurs membranaire, les intégrines, qui se lient spécifiquement à des protéines d'adhésion telles que la FN, la vitronectine et la LM.

Les études de l'expression des intégrines de cellules E/F MIAMI à la surface de MPA montrent que globalement les cellules expriment plus de sous-unitéś β1 et α2 à la membrane quand elles sont cultivées sur les deux types de MPA (PLGA et PLGA-P188-PLGA). Elles expriment aussi la sous-unité α6. On pourrait alors supposer que la LM, présente en plus grande quantité sur les MS de PLGA, pourrait ensuite induire une différenciation neuronale chez les cellules E/F MIAMI via cette intégrine α6β1. En effet, il a été démontré l'implication des voies de signalisation des intégrines α6β1 dans la croissance des neurites induite par la laminine-1 dans les cellules souches mésenchymateuses en l'absence de sérum et de facteurs de différenciation [14]. Les intégrines des cellules E/F MIAMI sont exprimées aussi sur la surface de MPA de PLGA-P188-PLGA quoique que ces microparticules adsorbent moins de LM sur leurs surfaces. Ces résultats peuvent être expliqués par l'effet des paramètres physico-chimiques ou mécanique du support qui peut influencer l'expression des intégrines. Une étude a montré que, sur des supports recouverts de FN, les forces de traction exercées par les intégrines α5β1 augmentent avec la rigidité des supports [209].

Ainsi, nous avons voulu poursuivre l'étude de l'adhérence des cellules MIAMI sur les MPA lorsque celles-ci commencent à former des agrégats cellules/MPA à 6heures après adhérence. La liaison des ligands matriciels aux intégrines permet d'initier une signalisation de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (outside-in) qui aboutit à une modulation du comportement cellulaire. Suite à l'interaction du ligand avec les intégrines, des molécules sur la face cytosolique vont s'assembler pour former les structures d'adhérence [210]. Pour cela, nous avons étudié l'expression de F-actine (protéine de cytosquelette) et vinculine (protéine d'adaptatrice, qui fait le lien entre les protéines de structure et l'actine pour consolider ce point d'ancrage) par les cellules E/F MIAMI après 6h d'adhérence à la surface de MPA. La vinculine et F-actine ont été bien détecté dans les cellules E/F MIAMI qui adhèrent aux surfaces planes (2D), néanmoins, à la surface des MPA (3D) la vinculine ne forme pas des agrégats, les deux protéines se trouvent dans le cytoplasme. Ochsner et al. montre que l'organisation du cytosquelette d'actine est contrôlé par la dimensionnalité du support (2D vs 3D), alors que la formation de fibres d'actine est favorisée dans les environnements 3D pour une forme projetée (xy) donnée [211]. La forme de F-actine et vinculine exprimé par les cellules prend la forme de la cellule à la surface des MPA (étalées sur les PLGA et rondes sur les PLGA-P188-PLGA).

D'une manière générale, quel que soit le type des cellules, l'étalement cellulaire dépend de la rigidité du support. L'aire d'étalement augmente avec la rigidité du support, du même que le nombre et la taille des structures d'adhérences telles que les adhérences focales. Dans ce contexte nous avons remarqué qu'en présence du LM à la surface de MPA (surface rigide) les cellules E/F MAIMI expriment la vinculine sous forme des agrégats. En outre, l'expression de vinculine dans le cytoplasme semble être favorisée à la surface de MPA moins rigide même en absence de LM sur ces supports (MPA de PLGA-P188-PLGA avec 100% PDL). Nous avons finalement montré que les cellules finissent toutes par adhérer à la surface des MPA en formant un seul agrégat cellules/MPA quel que soit le type du polymère.

Dans ce travail, les cellules MIAMI ont été prétraitées avec les facteurs de croissance E/F avant de les associer aux MPA. Les cellules MIAMI expriment légèrement plus de nestine sur la surface des MPA à 7 jours sans E/F en comparaison avec les cellules en 2D (t=0, prétraité aux E/F). Nous avons aussi remarqué qu'après 7 jours d'adhérence sur des MPA ces cellules expriment les marqueurs neuraux (Nestine et β3-tubulin) de la même façon sur la surface de deux types de MPA (PLGA et PLGA-P188-PLGA). On a remarqué par l'utilisation de deux techniques (Western blot et RT-qPCR) que l'expression de la β3-Tubuline diminue à la surface des MPA, tandis que, ces cellules expriment de façon plus importante le marqueur de différenciation neuronal tardif (NFM) par rapport aux cellules en 2D, confirmant une observation précédant [183]. Il a été montré que, lors de la différenciation neuronale des cellules E/F MIAMI, le profil d'expression de la β3-tubuline est similaire à celui des précurseurs neuronaux, avec une première augmentation suivie d'une diminution, tandis que l'expression de NFM est similaire à celle des neurones qui augmente dans les cellules neuronales matures [10, 212]. Il est donc important de noter que le prétraitement des cellules MIAMI par des facteurs de croissance E/F peut initier la différenciation neurale de ces cellules, qui terminera par une différenciation neuronale à la surface de deux types de MPA PLGA et PLGA-P188-PLGA. Dans ce sens d'autres études du laboratoire, ont également permis d'observer une augmentation de la longueur des neurites et de l'expression de protéines neuronales (β3-Tubuline et NFM) lorsque les cellules MIAMI étaient différenciées sur un substrat de LM par rapport au FN *in vitro* [132]. Même si les MPA de PLGA et de PLGA-P188-PLGA ne possèdent pas le même recouvrement de LM, les cellules MIAMI expriment les marqueurs de différenciation

neuronale suggérant que les MPA suffisent à induire les cellules en différenciation neuronales jusqu'à un stade tardif. Comme indiqué précédemment, la croissance et la différenciation des cellules peuvent être régulées par la forme des cellules à la surface en 3D. Les cellules MIAMI expriment un niveau assez faible du marqueur astrocytaire (GFAP) et plus fortement le marqueur ostéoblastique précoce (Sp7) lorsqu'elles adhèrent à la surface de MPA de PLGA et de PLGA-P188-PLGA. Les résultats de ce travail, confirment que les cellules MIAMI ont la capacité de conserver leur potentiel de différentiation en ostéoblastes. Il faudra étudier leur différenciation en ostéoblaste à des temps plus long afin de confirmer l'expression de ce phénotype. Des résultats préliminaires ne nous ont pas permis d'observer une différenciation terminale en ostéoblaste sécrétant des molécules minéralisées. Lors des études réalisées dans le laboratoire avec les cellules MIAMI E/F adhérées sur les MPA et implantées dans le cerveau une morphologie de type ostéoblastique n'a pas été observée [132, 133]. Cependant, si nous envisageons d'implanter ces agrégats cellules MIAMI/MPA dans le cerveau il est important de vérifier cette éventualité et de réaliser des marquages détectant des cellules ostéoblastiques.

Plusieurs études ont démontré que les CSMs sécrètent une large gamme de facteurs de réparation tissulaire, tels que les facteurs de croissance, qui modulent l'environnement de la lésion et favorisent l'angiogenèse, réduisent l'inflammation et améliorent la réparation tissulaire [213]. Cependant, la sécrétion des molécules de la matrice extracellulaire par les CSM est très peu étudiée. Dans ce projet, nous avons étudié la sécrétion de la FN et de la LM par les cellules E/F MAIMI à la surface des deux types de MPA. D'une manière intéressante, nous avons remarqué que les cellules E/F MAIMI sont capables de sécréter les molécules FN et LM indépendamment du type de polymère ou bien des molécules de recouvrement. En outre, nous avons observé que le niveau de sécrétion de la FN par ces cellules est plus élevé et forme un réseau à la surface des MPA par rapport aux molécules de LM. Nos résultats sont en accord avec l'équipe de P. R. Amable et al. qui ont montré que les CSM isolées de différents tissus sont capables de sécréter toutes les molécules de la matrice extracellulaire telle que, la LM, la FN …[214]. D'autres études dans la littérature ont montré que la croissance cellulaire en culture 3D favorise la synthèse de la matrice extracellulaire par les cellules pour former une structure similaire au tissu d'où elles sont issues [215, 216]. Ainsi, il a été démontré que le microenvironnement cellulaire est un important régulateur de la synthèse des

molécules de la matrice extracellulaire par l'implication des voies de signalisation complexes. La synthèse des molécules de la matrice extracellulaire par les cellules E/F MIAMI à la surface de MPA pourrait également avoir un effet sur ces cellules à long terme. Le faible recouvrement de LM à la surface de MPA de PLGA-P188-PLGA a probablement été compensé par les molécules synthétisées par les cellules elles-mêmes.

Nous pourrions conclure que les MPA de PLGA et de PLGA-P188-PLGA sont des bons supports pour les cellules E/F MIAMI, en favorisant leur adhérence, et la sécrétion des molécules de la matrice extracellulaire.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

Conclusion et perspectives

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier l'effet des propriétés physico-chimiques et mécaniques des microcarriers pharmacologiquement actifs sur le comportement des cellules MIAMI et notamment leur adhérence et différenciation.

Dans la première partie, nous avons pu déterminer les différents paramètres physico-chimique et mécanique des deux types de MS de PLGA et de PLGA-P188-PLGA. Aussi nous n'avons pas été capables d'identifier tous les paramètres de surface sur le modèle 3-D. Pour cela, nous avons essayé d'élaborer un modèle 2-D analogues au MS. Nous avons montré que la morphologie, la rigidité des MS de PLGA et de PLGA-P188-PLGA sont différentes et dépendent notamment de la nature du polymère.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons étudié les propriétés physicochimiques des MS après recouvrement de la surface avec LM+PDL et leur effet sur le comportement des cellules MIAMI E/F. Il a été démontré que :

- Les MS de PLGA et de PLGA-P188-PLGA n'avaient pas la même capacité à adsorber la LM et la PDL à leur surface.
- La présence de poloxamère dans la composition chimique des MS de PLGA-P188-PLGA empêche l'adsorption de LM et PDL sur leurs surfaces.
- La présence de LM et PDL à la surface de MPA de PLGA favorise l'attachement et l'étalement des cellules sur ces surfaces à court terme, tandis que, la faible adsorption du coating à la surface des MPA de PLGA-P188-PLGA ne favorise pas les cellules à attachées rapidement sur ces surfaces, en outre les cellules attachées présentent une morphologie ronde.
- Après 7 jours d'adhérence des cellules MIAMI E/F à la surface de MPA de PLGA et de PLGA-P188-PLGA, expriment de la même manière les gènes de différents phénotypes ; ostéoblaste, astrocytaire et neuronale.
- Les cellules MIAMI E/F sécrètent de la même manière des molécules de la matrice extracellulaire à la surface de MPA quel que soit le type du polymère.

En conclusion, cette étude a permis d'étudier les propriétés physicochimiques et mécaniques des MS formulées de deux types de polymère (PLGA et PLGA-P188-PLGA), et corrélait ces propriétés avec la différence de distribution de coating sur ces surfaces. Aussi, nous avons pu comprendre le comportement des cellules MIAMI E/F sur ces supports à court et à long terme.

Ces recherches ont fourni des résultats prometteurs et soulevé de nombreuses perspectives.

Il semble envisageable, dans un premier temps, d'évaluer l'effet des propriétés de la surface du PLGA et de PLGA-P188-PLGA sur l'activité des protéines qui composent la surface biomimétique des MPA. Il serait nécessaire d'étudier l'effet de l'activité des protéines sur le mécanisme de transduction du signal (le mécanisme par lequel une cellule répond à l'information qu'elle reçoit de l'environnement extérieur de la cellule).

Une autre perspective de ce travail est d'étudier la sécrétion des molécules de réparation tissulaire par les cellules MIAMI E/F à la surface de MPA. En parallèle, étudier la possible différence en molécules sécrétées par ces cellules sur les deux types de polymère (PLGA et PLGA-P188-PLGA) avec différents « coating », afin de déterminer plus précisément dans quelles conditions les cellules MIAMI E/F pourraient sécréter ces molécules. Finalement, étudier par la suite l'efficacité de ces composants synthétisés par les cellules à la surface de MPA sur la réparation tissulaire à l'aide d'un modèle animal.

REFERENCES

REFERENCES

[1] 'Chiffres-clés', *Institut du Cerveau et de la Moelle Epinière*.

[2] 'Le vieillissement de la population mondiale et le cas de la France'.

[3] S. M. Papa, T. M. Engber, A. M. Kask, and T. N. Chase, 'Motor fluctuations in levodopa treated parkinsonian rats: relation to lesion extent and treatment duration', *Brain Res.*, vol. 662, no. 1–2, pp. 69–74, Oct. 1994.

[4] S. Fahn, 'Is levodopa toxic?', *Neurology*, vol. 47, no. 6 Suppl 3, pp. 184S-195S, Dec. 1996.

[5] A. Björklund and O. Lindvall, 'Cell replacement therapies for central nervous system disorders', *Nat. Neurosci.*, vol. 3, no. 6, pp. 537–544, Jun. 2000.

[6] O. Lindvall, 'Parkinson disease. Stem cell transplantation', *Lancet*, vol. 358 Suppl, p. S48, Dec. 2001.

[7] S. Roche *et al.*, 'Comparative analysis of protein expression of three stem cell populations: models of cytokine delivery system in vivo', *Int J Pharm*, vol. 440, no. 1, pp. 72–82, Jan. 2013.

[8] R. A. Boomsma and D. L. Geenen, 'Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis', *PLoS ONE*, vol. 7, no. 4, p. e35685, 2012.

[9] E. Garbayo *et al.*, 'Neuroprotective properties of marrow-isolated adult multilineage-inducible cells in rat hippocampus following global cerebral ischemia are enhanced when complexed to biomimetic microcarriers', *Journal of Neurochemistry*, vol. 119, no. 5, pp. 972–988, Dec. 2011.

[10] G. J.-R. Delcroix, K. M. Curtis, P. C. Schiller, and C. N. Montero-Menei, 'EGF and bFGF pre-treatment enhances neural specification and the response to neuronal commitment of MIAMI cells', *Differentiation*, vol. 80, no. 4, pp. 213–227, Nov. 2010.

[11] P. Brundin *et al.*, 'Survival of intracerebrally grafted rat dopamine neurons previously cultured in vitro', *Neurosci. Lett.*, vol. 61, no. 1–2, pp. 79–84, Oct. 1985.

[12] O. Isacson, L. M. Bjorklund, and J. M. Schumacher, 'Toward full restoration of synaptic and terminal function of the dopaminergic system in Parkinson's disease by stem cells', *Ann. Neurol.*, vol. 53 Suppl 3, pp. S135-146; discussion S146-148, 2003.

[13] S. M. Frisch and E. Ruoslahti, 'Integrins and anoikis', *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 9, no. 5, pp. 701–706, Oct. 1997.

[14] S. Mruthyunjaya, R. Manchanda, R. Godbole, R. Pujari, A. Shiras, and P. Shastry, 'Laminin-1 induces neurite outgrowth in human mesenchymal stem cells in serum/differentiation factors-free conditions through activation of FAK-MEK/ERK signaling pathways', *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 391, no. 1, pp. 43–48, Jan. 2010.

[15] 'Swisstransplant: Bilan annuel alarmant - moins de 100 donneurs d'organes en 2012',.

[16] R. Langer and J. P. Vacanti, 'Tissue engineering', *Science*, vol. 260, no. 5110, pp. 920–926, May 1993.
[17] R. M. Nerem and A. Sambanis, 'Tissue Engineering: From Biology to Biological Substitutes', *Tissue Engineering*, vol. 1, no. 1, pp. 3–13, Mar. 1995.
[18] J. X. Law, L. L. Liau, A. Saim, Y. Yang, and R. Idrus, 'Electrospun Collagen Nanofibers and Their Applications in Skin Tissue Engineering', *Tissue Eng Regen Med*, vol. 14, no. 6, pp. 699–718, Dec. 2017.
[19] P. Hagell and P. Brundin, 'Cell survival and clinical outcome following intrastriatal transplantation in Parkinson disease', *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 60, no. 8, pp. 741–752, Aug. 2001.
[20] F. J. O'Brien, 'Biomaterials & scaffolds for tissue engineering', *Materials Today*, vol. 14, no. 3, pp. 88–95, Mar. 2011.
[21] J.-L. Pariente, L. Bordenave, and P. Conort, 'Biomatériaux, Biomatériels et Biocompatibilité', p. 4.
[22] M. M. Stevens, 'Biomaterials for bone tissue engineering', *Materials Today*, vol. 11, no. 5, pp. 18–25, May 2008.
[23] Y. Chen *et al.*, 'Mechanical properties and biocompatibility of porous titanium scaffolds for bone tissue engineering', *J Mech Behav Biomed Mater*, vol. 75, pp. 169–174, 2017.
[24] F. T. Moutos and F. Guilak, 'Composite scaffolds for cartilage tissue engineering', *Biorheology*, vol. 45, no. 3–4, pp. 501–512, 2008.
[25] H. Cheung, M. Ho, K. Lau, F. Cardona, and D. Hui, 'Natural fibre-reinforced composites for bioengineering and environmental engineering applications', *Composites Part B: Engineering*, vol. 40, no. 7, pp. 655–663, Oct. 2009.
[26] F.-M. Chen and X. Liu, 'Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering', *Progress in Polymer Science*, vol. 53, pp. 86–168, Feb. 2016.
[27] M. Rodríguez-Vázquez, B. Vega-Ruiz, R. Ramos-Zúñiga, D. A. Saldaña-Koppel, and L. F. Quiñones-Olvera, 'Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine', *BioMed Research International*, 2015.
[28] C. Bouissou, J. J. Rouse, R. Price, and C. F. van der Walle, 'The influence of surfactant on PLGA microsphere glass transition and water sorption: remodeling the surface morphology to attenuate the burst release', *Pharm. Res.*, vol. 23, no. 6, pp. 1295–1305, Jun. 2006.
[29] P. Q. Ruhe, E. L. Hedberg, N. T. Padron, P. H. M. Spauwen, J. A. Jansen, and A. G. Mikos, 'rhBMP-2 release from injectable poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/calcium-phosphate cement composites', *J Bone Joint Surg Am*, vol. 85-A Suppl 3, pp. 75–81, 2003.
[30] R. A. Jain, 'The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices', *Biomaterials*, vol. 21, no. 23, pp. 2475–2490, Dec. 2000.
[31] S.-S. Huang, I.-H. Li, P. Hong, and M. Yeh, 'Evaluation of protective efficacy using a nonstructural protein NS1 in DNA vaccine–loaded microspheres against dengue 2 virus', *Int J Nanomedicine*, vol. 8, pp. 3161–3169, 2013.

[32] J. Présumey *et al.*, 'PLGA microspheres encapsulating siRNA anti-TNFalpha: Efficient RNAi-mediated treatment of arthritic joints', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 82, no. 3, pp. 457–464, Nov. 2012.

[33] D. J. Burgess, D. J. A. Crommelin, A. S. Hussain, M.-L. Chen, and EUFEPS, 'Assuring quality and performance of sustained and controlled release parenterals: EUFEPS workshop report', *AAPS PharmSci*, vol. 6, no. 1, p. E11, Mar. 2004.

[34] C. D. C. Erbetta, R. J. Alves, J. M. Resende, R. F. de S. Freitas, and R. G. de Sousa, 'Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer', *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, vol. 03, p. 208, Apr. 2012.

[35] H. K. Makadia and S. J. Siegel, 'Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier', *Polymers*, vol. 3, no. 3, pp. 1377–1397, Aug. 2011.

[36] N. Narayanan, P. K. Roychoudhury, and A. Srivastava, 'L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization', *Electronic Journal of Biotechnology*, vol. 7, no. 2, Aug. 2004.

[37] M. L. Houchin and E. M. Topp, 'Physical properties of PLGA films during polymer degradation', *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 114, no. 5, pp. 2848–2854, 2009.

[38] P. I. P. Park and S. Jonnalagadda, 'Predictors of glass transition in the biodegradable poly-lactide and poly-lactide-co-glycolide polymers', *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 100, no. 3, pp. 1983–1987, 2006.

[39] J. P. Kitchell and D. L. Wise, '[32] Poly(lactic/glycolic acid) biodegradable drug—polymer matrix systems', in *Methods in Enzymology*, vol. 112, Academic Press, 1985, pp. 436–448.

[40] C. Engineer, J. Parikh, and A. Raval, 'Review on Hydrolytic Degradation Behavior of Biodegradable Polymers from Controlled Drug Delivery System', p. 7.

[41] X. S. Wu and N. Wang, 'Synthesis, characterization, biodegradation, and drug delivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: Biodegradation', *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 12, no. 1, pp. 21–34, Jan. 2001.

[42] L. Lu *et al.*, 'In vitro degradation of porous poly(l-lactic acid) foams', *Biomaterials*, vol. 21, no. 15, pp. 1595–1605, Aug. 2000.

[43] J. M. Anderson, 'Chapter 4 Mechanisms of inflammation and infection with implanted devices', *Cardiovascular Pathology*, vol. 2, no. 3, Supplement, pp. 33–41, Jul. 1993.

[44] M. Stefani, J. Coudane, and M. Vert, 'In vitro ageing and degradation of PEG–PLA diblock copolymer-based nanoparticles', *Polymer Degradation and Stability*, vol. 91, no. 11, pp. 2554–2559, Nov. 2006.

[45] F. Fuertges and A. Abuchowski, 'The clinical efficacy of poly(ethylene glycol)-modified proteins', *Journal of Controlled Release*, vol. 11, no. 1, pp. 139–148, Jan. 1990.

[46] M. P. Lutolf *et al.*, 'Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices', *Nat. Biotechnol.*, vol. 21, no. 5, pp. 513–518, May 2003.

[47] M. P. Lutolf and J. A. Hubbell, 'Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering', *Nat. Biotechnol.*, vol. 23, no. 1, pp. 47–55, Jan. 2005.
[48] M. K. Nguyen, O. Jeon, M. D. Krebs, D. Schapira, and E. Alsberg, 'Sustained localized presentation of RNA interfering molecules from in situ forming hydrogels to guide stem cell osteogenic differentiation', *Biomaterials*, vol. 35, no. 24, pp. 6278–6286, Aug. 2014.
[49] B. K. Kwon *et al.*, 'A systematic review of non-invasive pharmacologic neuroprotective treatments for acute spinal cord injury', *J. Neurotrauma*, vol. 28, no. 8, pp. 1545–1588, Aug. 2011.
[50] J. Luo and R. Shi, 'Diffusive oxidative stress following acute spinal cord injury in guinea pigs and its inhibition by polyethylene glycol', *Neuroscience Letters*, vol. 359, no. 3, pp. 167–170, Apr. 2004.
[51] J. Luo and R. Shi, 'Polyethylene glycol inhibits apoptotic cell death following traumatic spinal cord injury', *Brain Research*, vol. 1155, pp. 10–16, Jun. 2007.
[52] J. Luo, R. Borgens, and R. Shi, 'Polyethylene glycol immediately repairs neuronal membranes and inhibits free radical production after acute spinal cord injury', *Journal of Neurochemistry*, vol. 83, no. 2, pp. 471–480, 2002.
[53] J. Cheng *et al.*, 'Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery', *Biomaterials*, vol. 28, no. 5, pp. 869–876, Feb. 2007.
[54] Y. Li *et al.*, 'PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats', *J Control Release*, vol. 71, no. 2, pp. 203–211, Apr. 2001.
[55] A. A. Ghahremankhani, F. Dorkoosh, and R. Dinarvand, 'PLGA-PEG-PLGA tri-block copolymers as in situ gel-forming peptide delivery system: effect of formulation properties on peptide release', *Pharm Dev Technol*, vol. 13, no. 1, pp. 49–55, 2008.
[56] B. Jeong, Y. H. Bae, and S. W. Kim, 'In situ gelation of PEG-PLGA-PEG triblock copolymer aqueous solutions and degradation thereof', *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 50, no. 2, pp. 171–177, May 2000.
[57] M. Tobío, R. Gref, A. Sánchez, R. Langer, and M. J. Alonso, 'Stealth PLA-PEG nanoparticles as protein carriers for nasal administration', *Pharm. Res.*, vol. 15, no. 2, pp. 270–275, Feb. 1998.
[58] S. Duvvuri, K. G. Janoria, and A. K. Mitra, 'Development of a novel formulation containing poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres dispersed in PLGA-PEG-PLGA gel for sustained delivery of ganciclovir', *J Control Release*, vol. 108, no. 2–3, pp. 282–293, Nov. 2005.
[59] M. Garinot *et al.*, 'PEGylated PLGA-based nanoparticles targeting M cells for oral vaccination', *J Control Release*, vol. 120, no. 3, pp. 195–204, Jul. 2007.
[60] 'Poloxamer Thermogel Systems as Medium for Crystallization | SpringerLink'.
[61] Y. Liu, Y. Zhu, G. Wei, and W. Lu, 'Effect of carrageenan on poloxamer-based in situ gel for vaginal use: Improved in vitro and in vivo sustained-release properties', *Eur J Pharm Sci*, vol. 37, no. 3–4, pp. 306–312, Jun. 2009.

[62] L. Mayol, F. Quaglia, A. Borzacchiello, L. Ambrosio, and M. I. L. Rotonda, 'A novel poloxamers/hyaluronic acid in situ forming hydrogel for drug delivery: Rheological, mucoadhesive and in vitro release properties', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 70, no. 1, pp. 199–206, Sep. 2008.

[63] S. M. Moghimi and A. C. Hunter, 'Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine', *Trends in Biotechnology*, vol. 18, no. 10, pp. 412–420, Oct. 2000.

[64] Y. Yuan *et al.*, 'Thermosensitive and mucoadhesive in situ gel based on poloxamer as new carrier for rectal administration of nimesulide', *Int J Pharm*, vol. 430, no. 1–2, pp. 114–119, Jul. 2012.

[65] H. Almeida, M. H. Amaral, P. Lobão, and J. M. S. Lobo, 'In situ gelling systems: a strategy to improve the bioavailability of ophthalmic pharmaceutical formulations', *Drug Discovery Today*, vol. 19, no. 4, pp. 400–412, Apr. 2014.

[66] R. Asasutjarit, S. Thanasanchokpibull, A. Fuongfuchat, and S. Veeranondha, 'Optimization and evaluation of thermoresponsive diclofenac sodium ophthalmic in situ gels', *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 411, no. 1, pp. 128–135, Jun. 2011.

[67] A. V. Kabanov, E. V. Batrakova, and V. Y. Alakhov, 'Pluronic® block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery', *Journal of Controlled Release*, vol. 82, no. 2, pp. 189–212, Aug. 2002.

[68] M. L. Veyries *et al.*, 'Controlled release of vancomycin from Poloxamer 407 gels', *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 192, no. 2, pp. 183–193, Dec. 1999.

[69] A. Giteau *et al.*, 'Reversible protein precipitation to ensure stability during encapsulation within PLGA microspheres', *Eur J Pharm Biopharm*, vol. 70, no. 1, pp. 127–136, Sep. 2008.

[70] A. Paillard-Giteau *et al.*, 'Effect of various additives and polymers on lysozyme release from PLGA microspheres prepared by an s/o/w emulsion technique', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 75, no. 2, pp. 128–136, Jun. 2010.

[71] D. Blanco and M. J. Alonso, 'Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres: effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants', *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 45, no. 3, pp. 285–294, May 1998.

[72] S. A. Rundell, D. C. Baars, D. M. Phillips, and R. C. Haut, 'The limitation of acute necrosis in retro-patellar cartilage after a severe blunt impact to the in vivo rabbit patello-femoral joint', *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 23, no. 6, pp. 1363–1369, 2005.

[73] D. M. Phillips and R. C. Haut, 'The use of a non-ionic surfactant (P188) to save chondrocytes from necrosis following impact loading of chondral explants', *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 22, no. 5, pp. 1135–1142, 2004.

[74] M. Morille *et al.*, 'New PLGA–P188–PLGA matrix enhances TGF-β3 release from pharmacologically active microcarriers and promotes chondrogenesis of

mesenchymal stem cells', *Journal of Controlled Release*, vol. 170, no. 1, pp. 99–110, Aug. 2013.

[75] J. Pan, N. Liu, H. Sun, and F. Xu, 'Preparation and Characterization of Electrospun PLCL/Poloxamer Nanofibers and Dextran/Gelatin Hydrogels for Skin Tissue Engineering', *PLOS ONE*, vol. 9, no. 11, p. e112885, Nov. 2014.

[76] M. L. Bruschi, F. B. Borghi-Pangoni, M. V. Junqueira, and S. B. de Souza Ferreira, 'Chapter 12 - Nanostructured therapeutic systems with bioadhesive and thermoresponsive properties', in *Nanostructures for Novel Therapy*, D. Ficai and A. M. Grumezescu, Eds. Elsevier, 2017, pp. 313–342.

[77] I. D. Rosca, F. Watari, and M. Uo, 'Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation', *J Control Release*, vol. 99, no. 2, pp. 271–280, Sep. 2004.

[78] T. W. King and C. W. Patrick, 'Development and in vitro characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF)-loaded poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/poly(ethylene glycol) microspheres using a solid encapsulation/single emulsion/solvent extraction technique', *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 51, no. 3, pp. 383–390, Sep. 2000.

[79] H. Sah, 'Microencapsulation techniques using ethyl acetate as a dispersed solvent: effects of its extraction rate on the characteristics of PLGA microspheres', *Journal of Controlled Release*, vol. 47, no. 3, pp. 233–245, Sep. 1997.

[80] Y. Fu *et al.*, 'In vitro sustained release of recombinant human bone morphogenetic protein-2 microspheres embedded in thermosensitive hydrogels', *Pharmazie*, vol. 67, no. 4, pp. 299–303, Apr. 2012.

[81] J. Rui *et al.*, 'Controlled release of vascular endothelial growth factor using poly-lactic-co-glycolic acid microspheres: in vitro characterization and application in polycaprolactone fumarate nerve conduits', *Acta Biomater*, vol. 8, no. 2, pp. 511–518, Feb. 2012.

[82] S. Ravi, K. K. Peh, Y. Darwis, B. K. Murthy, T. R. R. Singh, and C. Mallikarjun, 'Development and characterization of polymeric microspheres for controlled release protein loaded drug delivery system', *Indian J Pharm Sci*, vol. 70, no. 3, pp. 303–309, Jun. 2008.

[83] T. K. Giri, C. Choudhary, null Ajazuddin, A. Alexander, H. Badwaik, and D. K. Tripathi, 'Prospects of pharmaceuticals and biopharmaceuticals loaded microparticles prepared by double emulsion technique for controlled delivery', *Saudi Pharm J*, vol. 21, no. 2, pp. 125–141, Apr. 2013.

[84] F. Ito, H. Fujimori, and K. Makino, 'Factors affecting the loading efficiency of water-soluble drugs in PLGA microspheres', *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 61, no. 1, pp. 25–29, Jan. 2008.

[85] G. Ruan, S.-S. Feng, and Q.-T. Li, 'Effects of material hydrophobicity on physical properties of polymeric microspheres formed by double emulsion process', *Journal of Controlled Release*, vol. 84, no. 3, pp. 151–160, Dec. 2002.

[86] H. Tamber, P. Johansen, H. P. Merkle, and B. Gander, 'Formulation aspects of biodegradable polymeric microspheres for antigen delivery', *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, no. 3, pp. 357–376, Jan. 2005.
[87] C. Dai, B. Wang, and H. Zhao, 'Microencapsulation peptide and protein drugs delivery system', *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 41, no. 2–3, pp. 117–120, Mar. 2005.
[88] P. Legrand, J.-P. Benoit, S. Briançon, E. Fattal, H. Fessi, and C. Passirani, 'Sphéroïides et formes vectorisées', in *Pharmacie Galénique: Formulation et Technologie pharmaceutique*, Maloine, Ed. Maloine, 2007, pp. 221–250.
[89] K. Sollohub and K. Cal, 'Spray Drying Technique: II. Current Applications in Pharmaceutical Technology', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 99, no. 2, pp. 587–597, Feb. 2010.
[90] I. Vesely, 'Heart Valve Tissue Engineering', *Circulation Research*, Oct. 2005.
[91] D. W. Hutmacher, J. T. Schantz, C. X. F. Lam, K. C. Tan, and T. C. Lim, 'State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective', *J Tissue Eng Regen Med*, vol. 1, no. 4, pp. 245–260, Aug. 2007.
[92] L. Coulombel, 'Reprogrammation nucléaire d'une cellule différenciée - On efface tout et on recommence', *Med Sci (Paris)*, vol. 23, no. 6–7, pp. 667–670, Jun. 2007.
[93] L. A. Boyer *et al.*, 'Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells', *Nature*, vol. 441, no. 7091, pp. 349–353, May 2006.
[94] N. S. Hwang, M. S. Kim, S. Sampattavanich, J. H. Baek, Z. Zhang, and J. Elisseeff, 'Effects of three-dimensional culture and growth factors on the chondrogenic differentiation of murine embryonic stem cells', *Stem Cells*, vol. 24, no. 2, pp. 284–291, Feb. 2006.
[95] K. Takahashi *et al.*, 'Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors', *Cell*, vol. 131, no. 5, pp. 861–872, Nov. 2007.
[96] J. Yu *et al.*, 'Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells', *Science*, vol. 318, no. 5858, pp. 1917–1920, Dec. 2007.
[97] S. C. Presnell, B. Petersen, and M. Heidaran, 'Stem cells in adult tissues', *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 13, no. 5, pp. 369–376, Oct. 2002.
[98] A. I. Caplan, 'Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine', *J. Cell. Physiol.*, vol. 213, no. 2, pp. 341–347, Nov. 2007.
[99] B. A. Reynolds and S. Weiss, 'Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system', *Science*, vol. 255, no. 5052, pp. 1707–1710, Mar. 1992.
[100] A. I. Caplan, 'Mesenchymal stem cells', *J. Orthop. Res.*, vol. 9, no. 5, pp. 641–650, Sep. 1991.
[101] A. J. Friedenstein, J. F. Gorskaja, and N. N. Kulagina, 'Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs', *Exp. Hematol.*, vol. 4, no. 5, pp. 267–274, Sep. 1976.
[102] D.-C. Ding, W.-C. Shyu, and S.-Z. Lin, 'Mesenchymal Stem Cells', *Cell Transplantation*, vol. 20, no. 1, pp. 5–14, Jan. 2011.

[103] I. Ullah, R. B. Subbarao, and G. J. Rho, 'Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective', *Biosci Rep*, vol. 35, no. 2, Apr. 2015.
[104] 'MESENCHYMAL STEM CELLS: IMPLICATIONS IN TUMORIGENESIS AND METASTASIS'.
[105] M. Dominici *et al.*, 'Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement', *Cytotherapy*, vol. 8, no. 4, pp. 315–317, Jan. 2006.
[106] F. Bifari, L. Pacelli, and M. Krampera, 'Immunological properties of embryonic and adult stem cells', *World J Stem Cells*, vol. 2, no. 3, pp. 50–60, Jun. 2010.
[107] A. L. Ponte *et al.*, 'The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities', *Stem Cells*, vol. 25, no. 7, pp. 1737–1745, Jul. 2007.
[108] Y. Shi, J. Su, A. I. Roberts, P. Shou, A. B. Rabson, and G. Ren, 'How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses', *Trends Immunol*, vol. 33, no. 3, pp. 136–143, Mar. 2012.
[109] G. Ren *et al.*, 'Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression', *Stem Cells*, vol. 27, no. 8, pp. 1954–1962, Aug. 2009.
[110] M. Krampera *et al.*, 'Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells', *Stem Cells*, vol. 24, no. 2, pp. 386–398, Feb. 2006.
[111] B. M. Abdallah and M. Kassem, 'Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications', *Gene Ther.*, vol. 15, no. 2, pp. 109–116, Jan. 2008.
[112] 'Bone Marrow Biopsy - Western New York Urology Associates, LLC'.
[113] S. Stemberger, A. Jamnig, N. Stefanova, G. Lepperdinger, M. Reindl, and G. K. Wenning, 'Mesenchymal stem cells in a transgenic mouse model of multiple system atrophy: immunomodulation and neuroprotection', *PLoS ONE*, vol. 6, no. 5, p. e19808, 2011.
[114] S. Mora-Lee *et al.*, 'Therapeutic effects of hMAPC and hMSC transplantation after stroke in mice', *PLoS ONE*, vol. 7, no. 8, p. e43683, 2012.
[115] G. C. Kopen, D. J. Prockop, and D. G. Phinney, 'Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains', *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 96, no. 19, pp. 10711–10716, Sep. 1999.
[116] J. M. Canals *et al.*, 'Brain-derived neurotrophic factor regulates the onset and severity of motor dysfunction associated with enkephalinergic neuronal degeneration in Huntington's disease', *J. Neurosci.*, vol. 24, no. 35, pp. 7727–7739, Sep. 2004.
[117] I. Rosová, M. Dao, B. Capoccia, D. Link, and J. A. Nolta, 'Hypoxic preconditioning results in increased motility and improved therapeutic potential of human mesenchymal stem cells', *Stem Cells*, vol. 26, no. 8, pp. 2173–2182, Aug. 2008.
[118] N. B. Isele *et al.*, 'Bone marrow stromal cells mediate protection through stimulation of PI3-K/Akt and MAPK signaling in neurons', *Neurochem. Int.*, vol. 50, no. 1, pp. 243–250, Jan. 2007.

[119] D. Giunti *et al.*, 'Mesenchymal stem cells shape microglia effector functions through the release of CX3CL1', *Stem Cells*, vol. 30, no. 9, pp. 2044–2053, Sep. 2012.
[120] G. D'Ippolito, S. Diabira, G. A. Howard, P. Menei, B. A. Roos, and P. C. Schiller, 'Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential', *Journal of Cell Science*, vol. 117, no. 14, pp. 2971–2981, Jun. 2004.
[121] V. M. Tatard *et al.*, 'Neurotrophin-directed differentiation of human adult marrow stromal cells to dopaminergic-like neurons', *Bone*, vol. 40, no. 2, pp. 360–373, Feb. 2007.
[122] V. M. Tatard, M. C. Venier-Julienne, J. P. Benoit, P. Menei, and C. N. Montero-Menei, 'In vivo evaluation of pharmacologically active microcarriers releasing nerve growth factor and conveying PC12 cells', *Cell Transplant*, vol. 13, no. 5, pp. 573–583, 2004.
[123] A. Rafati *et al.*, 'Chemical and spatial analysis of protein loaded PLGA microspheres for drug delivery applications', *Journal of Controlled Release*, vol. 162, no. 2, pp. 321–329, Sep. 2012.
[124] E. Storkebaum *et al.*, 'Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS', *Nat. Neurosci.*, vol. 8, no. 1, pp. 85–92, Jan. 2005.
[125] H. Hibi, Y. Yamada, M. Ueda, and Y. Endo, 'Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material', *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, vol. 35, no. 6, pp. 551–555, Jun. 2006.
[126] R. S. Bhati, D. P. Mukherjee, K. J. McCarthy, S. H. Rogers, D. F. Smith, and S. W. Shalaby, 'The growth of chondrocytes into a fibronectin-coated biodegradable scaffold', *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 56, no. 1, pp. 74–82, 2001.
[127] P. J. Wrighton, J. R. Klim, B. A. Hernandez, C. H. Koonce, T. J. Kamp, and L. L. Kiessling, 'Signals from the surface modulate differentiation of human pluripotent stem cells through glycosaminoglycans and integrins', *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 111, no. 51, pp. 18126–18131, Dec. 2014.
[128] P. Paoli, E. Giannoni, and P. Chiarugi, 'Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression', *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1833, no. 12, pp. 3481–3498, Dec. 2013.
[129] V. M. Tatard *et al.*, 'Pharmacologically active microcarriers: a tool for cell therapy', *Biomaterials*, vol. 26, no. 17, pp. 3727–3737, Jun. 2005.
[130] C. Penna *et al.*, 'Pharmacologically active microcarriers influence VEGF-A effects on mesenchymal stem cell survival', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 17, no. 1, pp. 192–204, 2013.
[131] C. Musilli *et al.*, 'Pharmacologically active microcarriers for endothelial progenitor cell support and survival', *Eur J Pharm Biopharm*, vol. 81, no. 3, pp. 609–616, Aug. 2012.
[132] G. J.-R. Delcroix *et al.*, 'The therapeutic potential of human multipotent mesenchymal stromal cells combined with pharmacologically active microcarriers

transplanted in hemi-parkinsonian rats', *Biomaterials*, vol. 32, no. 6, pp. 1560–1573, Feb. 2011.
[133] N. Daviaud, E. Garbayo, L. Sindji, A. Martínez-Serrano, P. C. Schiller, and C. N. Montero-Menei, 'Survival, differentiation, and neuroprotective mechanisms of human stem cells complexed with neurotrophin-3-releasing pharmacologically active microcarriers in an ex vivo model of Parkinson's disease', *Stem Cells Transl Med*, vol. 4, no. 6, pp. 670–684, Jun. 2015.
[134] C. Bouffi *et al.*, 'The role of pharmacologically active microcarriers releasing TGF-beta3 in cartilage formation in vivo by mesenchymal stem cells', *Biomaterials*, vol. 31, no. 25, pp. 6485–6493, Sep. 2010.
[135] M. Savi *et al.*, 'Enhanced engraftment and repairing ability of human adipose-derived stem cells, conveyed by pharmacologically active microcarriers continuously releasing HGF and IGF-1, in healing myocardial infarction in rats', *J Biomed Mater Res A*, vol. 103, no. 9, pp. 3012–3025, Sep. 2015.
[136] R. Madonna *et al.*, 'Stem Cell Aging and Age-Related Cardiovascular Disease: Perspectives of Treatment by Ex-vivo Stem Cell Rejuvenation', 2015.
[137] C. M. Agrawal and R. B. Ray, 'Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering', *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 55, no. 2, pp. 141–150, 2001.
[138] F. J. O'Brien, B. A. Harley, I. V. Yannas, and L. J. Gibson, 'The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds', *Biomaterials*, vol. 26, no. 4, pp. 433–441, Feb. 2005.
[139] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, and D. E. Discher, 'Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification', *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 677–689, Aug. 2006.
[140] S. R. Peyton and A. J. Putnam, 'Extracellular matrix rigidity governs smooth muscle cell motility in a biphasic fashion', *J. Cell. Physiol.*, vol. 204, no. 1, pp. 198–209, Jul. 2005.
[141] M. J. Lydon, T. W. Minett, and B. J. Tighe, 'Cellular interactions with synthetic polymer surfaces in culture', *Biomaterials*, vol. 6, no. 6, pp. 396–402, Nov. 1985.
[142] B. D. Ratner, 'New ideas in biomaterials science--a path to engineered biomaterials', *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 27, no. 7, pp. 837–850, Jul. 1993.
[143] M. W. Hayman, K. H. Smith, N. R. Cameron, and S. A. Przyborski, 'Growth of human stem cell-derived neurons on solid three-dimensional polymers', *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 62, no. 3, pp. 231–240, Mar. 2005.
[144] K. Anselme *et al.*, 'Qualitative and quantitative study of human osteoblast adhesion on materials with various surface roughnesses', *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 49, no. 2, pp. 155–166, 2000.
[145] D. D. Deligianni, N. D. Katsala, P. G. Koutsoukos, and Y. F. Missirlis, 'Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength', *Biomaterials*, vol. 22, no. 1, pp. 87–96, Jan. 2000.
[146] M. G. Donoso, A. Méndez-Vilas, J. M. Bruque, and M. L. González-Martin, 'On the relationship between common amplitude surface roughness parameters and

surface area: Implications for the study of cell–material interactions', *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 59, no. 3, pp. 245–251, Apr. 2007.
[147] H. Kawahara, Y. Soeda, K. Niwa, M. Takahashi, D. Kawahara, and N. Araki, 'In vitro study on bone formation and surface topography from the standpoint of biomechanics', *J Mater Sci Mater Med*, vol. 15, no. 12, pp. 1297–1307, Dec. 2004.
[148] Z. Li *et al.*, 'Influence of surface roughness on neural differentiation of human induced pluripotent stem cells', *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, vol. 64, no. 3, pp. 355–366, Jan. 2016.
[149] S. W. Moore, P. Roca-Cusachs, and M. P. Sheetz, 'Stretchy proteins on stretchy substrates: the important elements of integrin-mediated rigidity sensing', *Dev. Cell*, vol. 19, no. 2, pp. 194–206, Aug. 2010.
[150] D. T. Butcher, T. Alliston, and V. M. Weaver, 'A tense situation: forcing tumour progression', *Nat Rev Cancer*, vol. 9, no. 2, pp. 108–122, Feb. 2009.
[151] R. J. Pelham and Y. Wang, 'Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility', *PNAS*, vol. 94, no. 25, pp. 13661–13665, Dec. 1997.
[152] C. F. Deroanne, C. M. Lapiere, and B. V. Nusgens, 'In vitro tubulogenesis of endothelial cells by relaxation of the coupling extracellular matrix-cytoskeleton', *Cardiovasc Res*, vol. 49, no. 3, pp. 647–658, Feb. 2001.
[153] T. Yeung *et al.*, 'Effects of substrate stiffness on cell morphology, cytoskeletal structure, and adhesion', *Cell Motility*, vol. 60, no. 1, pp. 24–34, 2005.
[154] A. Engler, L. Bacakova, C. Newman, A. Hategan, M. Griffin, and D. Discher, 'Substrate Compliance versus Ligand Density in Cell on Gel Responses', *Biophysical Journal*, vol. 86, no. 1, pp. 617–628, Jan. 2004.
[155] G. J. Her, H.-C. Wu, M.-H. Chen, M.-Y. Chen, S.-C. Chang, and T.-W. Wang, 'Control of three-dimensional substrate stiffness to manipulate mesenchymal stem cell fate toward neuronal or glial lineages', *Acta Biomaterialia*, vol. 9, no. 2, pp. 5170–5180, Feb. 2013.
[156] K. Saha *et al.*, 'Substrate modulus directs neural stem cell behavior', *Biophys. J.*, vol. 95, no. 9, pp. 4426–4438, Nov. 2008.
[157] S. Even-Ram, V. Artym, and K. M. Yamada, 'Matrix control of stem cell fate', *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 645–647, Aug. 2006.
[158] C. J. Wilson, R. E. Clegg, D. I. Leavesley, and M. J. Pearcy, 'Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review', *Tissue Eng.*, vol. 11, no. 1–2, pp. 1–18, Feb. 2005.
[159] J.-C. Lin, T.-M. Ko, and S. L. Cooper, 'Polyethylene Surface Sulfonation: Surface Characterization and Platelet Adhesion Studies', *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 164, no. 1, pp. 99–106, Apr. 1994.
[160] A. W. Neumann and R. J. Good, 'Techniques of Measuring Contact Angles', in *Surface and Colloid Science: Volume 11: Experimental Methods*, R. J. Good and R. R. Stromberg, Eds. Boston, MA: Springer US, 1979, pp. 31–91.
[161] M. S. Kim *et al.*, 'Adhesion behavior of human bone marrow stromal cells on differentially wettable polymer surfaces', *Tissue Eng.*, vol. 13, no. 8, pp. 2095–2103, Aug. 2007.

[162] P. B. van Wachem, T. Beugeling, J. Feijen, A. Bantjes, J. P. Detmers, and W. G. van Aken, 'Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities', *Biomaterials*, vol. 6, no. 6, pp. 403–408, Nov. 1985.
[163] N. B. Mateo and B. D. Ratner, 'Relating the surface properties of intraocular lens materials to endothelial cell adhesion damage', *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 30, no. 5, pp. 853–860, May 1989.
[164] R. Hajj 'Procédés de Modification des Fibres naturelles (PROMOF)'
[165] R. J. Good, 'Contact angle, wetting, and adhesion: a critical review', *Journal of Adhesion Science and Technology*, vol. 6, no. 12, pp. 1269–1302, Jan. 1992.
[166] C. M. Cunanan, N. M. Tarbaux, and P. M. Knight, 'Surface properties of intraocular lens materials and their influence on in vitro cell adhesion', *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, vol. 17, no. 6, pp. 767–773, Nov. 1991.
[167] N. J. Hallab, K. J. Bundy, K. O'Connor, R. L. Moses, and J. J. Jacobs, 'Evaluation of Metallic and Polymeric Biomaterial Surface Energy and Surface Roughness Characteristics for Directed Cell Adhesion', *Tissue Engineering*, vol. 7, no. 1, pp. 55–71, Feb. 2001.
[168] K. Smetana, J. Vacik, D. Součková, and Š. Pitrova, 'The influence of chemical functional groups on implant biocompatibility', *Clinical Materials*, vol. 13, no. 1, pp. 47–49, Jan. 1993.
[169] K. Smetana and J. Vacík, 'Anionic polymers for implantation', *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 831, pp. 95–100, Dec. 1997.
[170] S. Hattori, J. D. Andrade, J. B. Hibbs, D. E. Gregonis, and R. N. King, 'Fibroblast cell proliferation on charged hydroxyethyl methacrylate copolymers', *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 104, no. 1, pp. 72–78, Mar. 1985.
[171] P. B. van Wachem *et al.*, 'Adhesion of cultured human endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge', *Biomaterials*, vol. 8, no. 5, pp. 323–328, Sep. 1987.
[172] A. Kikuchi, H. Taira, T. Tsuruta, M. Hayashi, and K. Kataoka, 'Adsorbed serum protein mediated adhesion and growth behavior of bovine aortic endothelial cells on polyamine graft copolymer surfaces', *J Biomater Sci Polym Ed*, vol. 8, no. 2, pp. 77–90, 1996.
[173] B. Thomes, R. Timmons, and R. Eberhart, 'Surface Roughness and Surface Chemistry Effects on Protein Adsorption', in *Proceedings of the 17th Southern Biomedical Engineering Conference*, 1998, pp. 47–47.
[174] K. Rechendorff, M. B. Hovgaard, M. Foss, V. P. Zhdanov, and F. Besenbacher, 'Enhancement of Protein Adsorption Induced by Surface Roughness', *Langmuir*, vol. 22, no. 26, pp. 10885–10888, Dec. 2006.
[175] M. Szycher and C. P. Sharma, *Blood Compatible Materials and Devices: Perspectives Towards the 21st Century*. CRC Press, 1990.
[176] A. S. Hoffman, 'A general classification scheme for "hydrophilic" and "hydrophobic" biomaterial surfaces', *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 20, no. 9, pp. ix–xi, Dec. 1986.
[177] D. J. Iuliano, S. S. Saavedra, and G. A. Truskey, 'Effect of the conformation and orientation of adsorbed fibronectin on endothelial cell spreading and the strength

of adhesion', *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 27, no. 8, pp. 1103–1113, 1993.
[178] F. Grinnell and M. K. Feld, 'Adsorption characteristics of plasma fibronectin in relationship to biological activity', *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 15, no. 3, pp. 363–381, 1981.
[179] www.unitheque.com, 'Biologie moléculaire de la cellule'.
[180] J. M. Schakenraad and H. J. Busscher, 'Cell—polymer interactions: The influence of protein adsorption', *Colloids and Surfaces*, vol. 42, no. 3, pp. 331–343, Dec. 1989.
[181] P. Thevenot, W. Hu, and L. Tang, 'Surface chemistry influences implant biocompatibility', *Curr Top Med Chem*, vol. 8, no. 4, pp. 270–280, 2008.
[182] G. J.-R. Delcroix, P. C. Schiller, J.-P. Benoit, and C. N. Montero-Menei, 'Adult cell therapy for brain neuronal damages and the role of tissue engineering', *Biomaterials*, vol. 31, no. 8, pp. 2105–2120, Mar. 2010.
[183] S. Kandalam *et al.*, 'Pharmacologically active microcarriers delivering BDNF within a hydrogel: Novel strategy for human bone marrow-derived stem cells neural/neuronal differentiation guidance and therapeutic secretome enhancement', *Acta Biomater*, vol. 49, pp. 167–180, 2017.
[184] J.-P. Karam *et al.*, 'Pharmacologically active microcarriers associated with thermosensitive hydrogel as a growth factor releasing biomimetic 3D scaffold for cardiac tissue-engineering', *Journal of Controlled Release*, vol. 192, no. Supplement C, pp. 82–94, Oct. 2014.
[185] T. Kemala, E. Budianto, and B. Soegiyono, 'Preparation and characterization of microspheres based on blend of poly(lactic acid) and poly(ε-caprolactone) with poly(vinyl alcohol) as emulsifier', *Arabian Journal of Chemistry*, vol. 5, no. 1, pp. 103–108, Jan. 2012.
[186] D. E. Bornside, C. W. Macosko, and L. E. Scriven, 'Spin coating: One-dimensional model', *Journal of Applied Physics*, vol. 66, no. 11, pp. 5185–5193, Dec. 1989.
[187] D. B. Hall, P. Underhill, and J. M. Torkelson, 'Spin coating of thin and ultrathin polymer films', *Polymer Engineering & Science*, vol. 38, no. 12, pp. 2039–2045, 1998.
[188] S. N. Magonov and D. H. Reneker, 'Characterization of Polymer Surfaces with Atomic Force Microscopy', *Annual Review of Materials Science*, vol. 27, no. 1, pp. 175–222, 1997.
[189] C. Roduit, 'Membrane elastic heterogeneity studied at nanometrical scale on living cells', p. 238.
[190] F. M. Fowkes, 'ATTRACTIVE FORCES AT INTERFACES', *Ind. Eng. Chem.*, vol. 56, no. 12, pp. 40–52, Dec. 1964.
[191] C. D. Volpe and S. Siboni, 'Some Reflections on Acid–Base Solid Surface Free Energy Theories', *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 195, no. 1, pp. 121–136, Nov. 1997.
[192] H.-I. Chang and Y. Wang, 'Cell Responses to Surface and Architecture of Tissue Engineering Scaffolds', 2011.

[193] B. D. Boyan, T. W. Hummert, D. D. Dean, and Z. Schwartz, 'Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response', *Biomaterials*, vol. 17, no. 2, pp. 137–146, Jan. 1996.
[194] D. I. Hitchcock, 'PROTEIN FILMS ON COLLODION MEMBRANES', *J Gen Physiol*, vol. 8, no. 2, pp. 61–74, Sep. 1925.
[195] C. C. Shepard and A. Tiselius, 'The chromatography of proteins. The effect of salt concentration and pH on the adsorption of proteins to silica gel', *Discuss. Faraday Soc.*, vol. 7, no. 0, pp. 275–285, Jan. 1949.
[196] W. Norde and J. Lyklema, 'The adsorption of human plasma albumin and bovine pancreas ribonuclease at negatively charged polystyrene surfaces: I. Adsorption isotherms. Effects of charge, ionic strength, and temperature', *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 66, no. 2, pp. 257–265, Sep. 1978.
[197] W. Norde, 'My voyage of discovery to proteins in flatland ...and beyond', *Colloids Surf B Biointerfaces*, vol. 61, no. 1, pp. 1–9, Jan. 2008.
[198] L. Bacakova, E. Filova, M. Parizek, T. Ruml, and V. Svorcik, 'Modulation of cell adhesion, proliferation and differentiation on materials designed for body implants', *Biotechnol. Adv.*, vol. 29, no. 6, pp. 739–767, Dec. 2011.
[199] P. E. Scopelliti *et al.*, 'The Effect of Surface Nanometre-Scale Morphology on Protein Adsorption', *PLoS One*, vol. 5, no. 7, Jul. 2010.
[200] H. Rohde, G. Wick, and R. Timpl, 'Immunochemical characterization of the basement membrane glycoprotein laminin', *Eur. J. Biochem.*, vol. 102, no. 1, pp. 195–201, Dec. 1979.
[201] J. Engel *et al.*, 'Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix', *Journal of Molecular Biology*, vol. 150, no. 1, pp. 97–120, Jul. 1981.
[202] Y. L. Jeyachandran, E. Mielczarski, B. Rai, and J. A. Mielczarski, 'Quantitative and Qualitative Evaluation of Adsorption/Desorption of Bovine Serum Albumin on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces', *Langmuir*, vol. 25, no. 19, pp. 11614–11620, Oct. 2009.
[203] G. Anand, S. Sharma, A. K. Dutta, S. K. Kumar, and G. Belfort, 'Conformational Transitions of Adsorbed Proteins on Surfaces of Varying Polarity', *Langmuir*, vol. 26, no. 13, pp. 10803–10811, Jul. 2010.
[204] S. Giljean, M. Bigerelle, and K. Anselme, 'Roughness statistical influence on cell adhesion using profilometry and multiscale analysis', *Scanning*, vol. 36, no. 1, pp. 2–10, 2014.
[205] D. Mazia, G. Schatten, and W. Sale, 'Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy', *J. Cell Biol.*, vol. 66, no. 1, pp. 198–200, Jul. 1975.
[206] P. Lesný, M. Přádný, P. Jendelová, J. Michálek, J. Vacík, and E. Syková, 'Macroporous hydrogels based on 2-hydroxyethyl methacrylate. Part 4: Growth of rat bone marrow stromal cells in three-dimensional hydrogels with positive and negative surface charges and in polyelectrolyte complexes', *J Mater Sci: Mater Med*, vol. 17, no. 9, pp. 829–833, Sep. 2006.

[207] M. Hjortso, *Cell Adhesion in Bioprocessing and Biotechnology*. CRC Press, 1994.
[208] C. Zamarron, M. H. Ginsberg, and E. F. Plow, 'A receptor-induced binding site in fibrinogen elicited by its interaction with platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa', *J. Biol. Chem.*, vol. 266, no. 24, pp. 16193–16199, Aug. 1991.
[209] A. Elosegui-Artola *et al.*, 'Rigidity sensing and adaptation through regulation of integrin types', *Nature Materials*, vol. 13, no. 6, pp. 631–637, Jun. 2014.
[210] R. Zaidel-Bar, S. Itzkovitz, A. Ma'ayan, R. Iyengar, and B. Geiger, 'Functional atlas of the integrin adhesome', *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, no. 8, pp. 858–867, Aug. 2007.
[211] M. Ochsner, M. Textor, V. Vogel, and M. L. Smith, 'Dimensionality Controls Cytoskeleton Assembly and Metabolism of Fibroblast Cells in Response to Rigidity and Shape', *PLOS ONE*, vol. 5, no. 3, p. e9445, Mar. 2010.
[212] I. Ginzburg, A. Teichman, H. J. Dodemont, L. Behar, and U. Z. Littauer, 'Regulation of three beta-tubulin mRNAs during rat brain development.', *EMBO J*, vol. 4, no. 13B, pp. 3667–3673, Dec. 1985.
[213] J. S. Park, S. Suryaprakash, Y.-H. Lao, and K. W. Leong, 'Engineering mesenchymal stem cells for regenerative medicine and drug delivery', *Methods*, vol. 84, pp. 3–16, Aug. 2015.
[214] P. R. Amable, M. V. T. Teixeira, R. B. V. Carias, J. M. Granjeiro, and R. Borojevic, 'Protein synthesis and secretion in human mesenchymal cells derived from bone marrow, adipose tissue and Wharton's jelly', *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 5, no. 2, p. 53, Apr. 2014.
[215] M. Overstreet, A. Sohrabi, A. Polotsky, D. S. Hungerford, and C. G. Frondoza, 'Collagen microcarrier spinner culture promotes osteoblast proliferation and synthesis of matrix proteins', *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, vol. 39, no. 5–6, pp. 228–234, Jun. 2003.
[216] J. H. Fishman, A. González, and M. P. Osborne, 'Breast Cancer Cells Cultured in a System of New Design Presecrete an Extracellular Matrix and Proliferate within It without Cell–Cell Adhesion', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 220, no. 2, pp. 467–471, Mar. 1996.

UNIVERSITE BIOLOGIE BRETAGNE SANTE LOIRE

université angers

Title: Synthetic vectors and mechano-biological approach to optimize the use of stem cells in regenerative medicine

Keywords: Regenerative medicine, mesenchymal stem cell, pharmacologically active microcarriers, polymer, physicochemical properties, cell adhesion, cell differentiation.

Abstract: An approach to regenerative nervous system medicine is to develop biological substitutes with restorative function using stem cells and biomaterials that can be coated with extracellular matrix molecules. We have developed pharmacologically active microcarriers, PAMs. These are PLGA-based, biodegradable and biocompatible polymeric microspheres (MS) coated with adhesion molecules that provide 3-dimensional support for cells. The microcarriers thus associated with the stem cells make it possible, after implantation, to increase the survival and maintain the state of differentiation of the cells they carry, reinforcing their tissue repair effects. These PAMs can also release encapsulated growth factors and to enhance the release of encapsulated proteins a new polymer combination: PLGA-Poloxamer188 (P188) - PLGA has been developed in our laboratory. It has also been shown that PLGA-P188-PLGA PAMs functionalized with fibronectin and poly-D-lysine induce better proliferation of mesenchymal stem cells than PLGA PAMs. These cells are very widely used in regenerative medicine because they are easy to collect, found in the bone marrow, and able to differentiate towards the chondrogenic lineage, osteogenic and under certain conditions, neuronal. We are working with a subpopulation of these cells called MIAMI cells (marrow isolated adult multilineage inducible) that engage in neuronal cell differentiation after treatment with 2 growth factors (EGF / bFGF) and on a laminin matrix support. Recently, it has been demonstrated that the physicochemical properties of polymeric supports also regulate the behavior of stem cells (adhesion, survival and differentiation).

The objective of this study is to study the effect of physicochemical and mechanical properties of surfaces i) MS on laminin and poly-D-lysine adsorption and ii) PAMs on adhesion and neuronal differentiation of MIAMI cells. We have shown that the presence of the hydrophilic "poloxamer 188" block in the PLGA-P188-PLGA polymer composition decreases the adsorption of adhesion molecules by forming a layer on these surfaces. On PLGA PAMs, the adhesion molecules adsorb well regardless of the overall charge of the molecules. These two PAMs have a positive overall charge and allow the attachment of cells to their surface. However, in short-term cell adhesion is stronger on PLGA PAMs compared to PLGA-P188-PLGA PAMs, but in the long-term the cells eventually adhere to both supports. PLGA-P188-PLGA has a high free surface energy and these PAMs have a less rigid surface than PLGA PAMs. Our results suggest that these surface characteristics allow cells to adhere despite the low amount of laminin on these supports. In the long-term the cells exhibit the same behavior whatever the type of PAMs. They differentiate into neuronal cells expressing mature neuron markers such as the neurofilament-M and we find the same number of cells adhered to their surface. Furthermore, we have shown that cells are able to secrete extracellular matrix molecules in the same way on both types of PAMs, probably explaining the similarity of the behavior in long-term.

UNIVERSITE BIOLOGIE BRETAGNE SANTE LOIRE

université angers

Titre : Vecteurs synthétiques et approche mécano-biologique permettant d'optimiser l'utilisation des cellules souches en médecine régénérative

Mots clés : Médecine régénérative, Cellule souche mésenchymateuse, Microcarriers pharmacologiment actif, propriétés, physico-chimiques, adhérence cellulaire, différenciation cellulaire.

Résumé : Une approche de la médecine régénérative du système nerveux consiste à développer des substituts biologiques avec une fonction réparatrice en utilisant des cellules souches et des biomatériaux qui peuvent être recouverts des molécules de la matrice extracellulaire. Nous avons ainsi développé des microcarriers pharmacologiquements actifs, MPA. Ce sont des microsphères (MS) polymériques à base de PLGA, biodégradables et biocompatibles, recouvertes des molécules d'adhérence qui fournissent un support en 3-dimensions aux cellules. Les microcarriers ainsi associés aux cellules souches permettent, après implantation, d'augmenter la survie et de maintenir l'état de différenciation des cellules qu'ils portent, renforçant leurs effets de réparation tissulaire. Ces MPA peuvent également libérer des facteurs de croissance encapsulés et afin d'améliorer le relargage de protéines encapsulées une nouvelle combinaison de polymère : PLGA-Poloxamer188 (P188) -PLGA a été développé dans notre laboratoire. Il a aussi été montré que les MPA de PLGA-P188-PLGA fonctionnalisées avec de la fibronectine et poly-D-lysine induisaient une meilleure prolifération de cellules souches mésenchymateuses que les MPA de PLGA. Ces cellules sont très largement utilisées en médecine régénérative car elles sont faciles à prélever, se trouvant dans la moelle osseuse, et capables de se différencier vers le lignage chondrogénique, ostéogénique et dans certaines conditions, neuronale. Nous travaillons avec une sous population de ces cellules appelées cellules MIAMI (marrow isolated adult multilineage inducible) qui s'engagent vers une différenciation en cellule neuronale après un traitement avec 2 facteurs de croissance (EGF/ bFGF) et sur un support matriciel de laminine. Dernièrement, il a été mis en évidence que les propriétés physico- chimiques des supports polymériques régissent également le comportement des cellules souches (adhésion, survie et différenciation).

L'objectif de cette étude est d'étudier l'effet des propriétés physico- chimiques et mécaniques des surfaces i) des MS sur l'adsorption de laminine et poly-D-lysine et ii) des MPA sur l'adhérence et la différenciation neuronale des cellules MIAMI. Nous avons montré que la présence du bloc hydrophile « poloxamère 188 » dans la composition du polymère PLGA-P188-PLGA diminue l'adsorption de molécules d'adhérence en formant une couche sur ces surfaces. Sur les MPA de PLGA, les molécules d'adhérence s'adsorbent bien quelle que soit la charge globale des molécules. Ces deux MPA ont une charge globale positive et permettent l'attachement de cellules à leur surface. Cependant, l'adhérence à court terme de cellules est plus forte sur les MPA de PLGA comparé aux MPA de PLGA-P188-PLGA mais à la longue les cellules finissent par adhérer aux deux supports. Le PLGA- P188-PLGA présente une forte énergie libre de surface et ces MPA présentent une surface moins rigide que les MPA de PLGA. Nos résultats suggèrent que ces caractéristiques de surface permettent aux cellules d'adhérer malgré la faible quantité de laminine sur ces supports. A long terme les cellules présentent le même comportement quel que soit le type du support. Elles se différencient en cellule de type neuronal exprimant des marqueurs de neurone mature comme le neurofilament et nous trouvons le même nombre de cellules adhérées à leur surface. En outre, nous avons montré que les cellules sont capables de sécréter de la même manière des molécules de la matrice extracellulaire sur les deux types de MPA expliquant probablement la similitude de comportement à long terme.