

Titre: Optimisation de la culture 3D et de la différenciation de cellules
souches pluripotentes humaines pour générer des organoïdes
pancréatiques compatibles avec les exigences pharmaceutiques

Auteur: Alexandre Simard
Author:

Date: 2025

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Simard, A. (2025). Optimisation de la culture 3D et de la différenciation de
cellules souches pluripotentes humaines pour générer des organoïdes
pancréatiques compatibles avec les exigences pharmaceutiques [Mémoire de
maîtrise, Polytechnique Montréal]. PolyPublie.
Citation: <https://publications.polymtl.ca/68617/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**
Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/68617/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Olivier Henry, & Corinne Hoesli
Advisors:

Programme: Génie chimique
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Optimisation de la culture 3D et de la différenciation de cellules souches pluripotentes humaines
pour générer des organoïdes pancréatiques compatibles avec les exigences pharmaceutiques**

ALEXANDRE SIMARD

Département de génie chimique

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

Génie chimique

Août 2025

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

**Optimisation de la culture 3D et de la différenciation de cellules souches pluripotentes humaines
pour générer des organoïdes pancréatiques compatibles avec les exigences pharmaceutiques**

présenté par **Alexandre SIMARD**

en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

Moncef CHIOUA, président

Olivier HENRY, membre et directeur de recherche

Corinne HOESLI, membre et codirectrice de recherche

Gregory DE CRESCENZO, membre

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement l'ensemble de l'équipe du laboratoire Hoesli pour son accueil, son soutien et sa bonne humeur tout au long de mon projet. Travailler dans un environnement aussi stimulant et collaboratif a été un privilège.

Je suis profondément reconnaissant envers mes deux directeurs de maîtrise, la Pre Corinne Hoesli et le Pr Olivier Henry, pour leur accompagnement constant, leur disponibilité et leur encadrement rigoureux. Leur confiance et leurs conseils m'ont permis de progresser tant sur le plan scientifique que personnel.

Je souhaite également exprimer ma gratitude à Praveen Pedabaliyarasimhuni, Lisa Danielczak, Marc-Antoine Campeau, Hamid Ebrahimi Orimi, Julia Manalil, Ahmed Elaraby Mahmoud, Arianna Castro Rojas et Robert Chen pour leurs enseignements, leur aide technique, leurs discussions enrichissantes et leur soutien tout au long du projet.

Une mention toute spéciale à Praveen et Hamid, dont la générosité, les explications détaillées, le soutien constant et les conseils expérimentaux ont été essentiels à mon apprentissage. Merci également à Julia pour le partage de lignées cellulaires et son aide précieuse à plusieurs étapes du projet.

RÉSUMÉ

La demande croissante en thérapies régénératives à grande échelle accentue le besoin de méthodes de production robustes et compatibles avec les bonnes pratiques de fabrication (BPF) pour les cellules souches pluripotentes humaines (hPSC). Les cultures cellulaires en 2D sont laborieuses, difficiles à transposer à grande échelle, et souvent dépendantes de composants d'origine animale, incompatibles avec un usage clinique.

Ce travail visait à développer et à optimiser un protocole de culture en 3D pour la différenciation des hPSC en lignée pancréatique, en amorçant la suspension dès le stade 0, sans recours au Matrigel (matrice extracellulaire artificielle) ni à des supports synthétiques.

Des travaux préliminaires ont été menés avec des cellules MIN6 (lignée cellulaire de souris dérivée de cellules β des îlots pancréatiques) dans un bioréacteur de 30 mL afin d'évaluer la viabilité, la taille des agrégats et les profils métaboliques. Des cellules souches embryonnaires humaines (hESC) de type H1 et des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) ont ensuite été cultivées dans des plaques 6 puits à fond de culture non adhésif, sur mélangeur orbital, puis différenciées vers l'endoderme définitif (stade 1). Dans le but d'optimiser le protocole de différenciation, un plan d'expérience Taguchi L9 a permis d'évaluer les effets de l'activine A (50–150 ng/mL), du CHIR99021 (1,5–4,5 μ M) et de la durée (3–5 jours) sur l'expression du facteur de transcription SOX17 servant de marqueur spécifique de l'endoderme définitif. Les résultats ont été analysés par cytométrie en flux et imagerie automatisée.

Les meilleures conditions ont permis d'atteindre jusqu'à 97 % de cellules positives à SOX17 à partir de cellules iPSC en 3D traitées avec 150 ng/mL d'activine A et 4,5 μ M de CHIR pendant 3 jours. L'utilisation de petits agrégats, plutôt que de cellules uniques, a amélioré la viabilité et l'homogénéité des structures formées, sans recourir à des matrices ou micro-puits spécialisés.

Ce protocole constitue une plateforme évolutive et dépourvue de produits d'origine animale pour la différenciation précoce des hPSC vers la lignée pancréatique, compatible avec les exigences de production BPF.

ABSTRACT

The growing demand for scalable regenerative therapies highlights the need for robust and GMP-compliant production methods for human pluripotent stem cells (hPSC). Traditional 2D culture systems are labor-intensive, difficult to scale, and often rely on animal-derived components that are incompatible with clinical applications.

This study aimed to develop and optimize a 3D culture protocol for hPSC differentiation into the pancreatic lineage, starting at stage 0, using a Matrigel-free suspension approach in both static and dynamic systems.

Preliminary work using MIN6 pancreatic beta cells in a 30 mL stirred-tank bioreactor characterized aggregation behavior, viability, and metabolic profiles. Human embryonic stem cells (H1) and induced pluripotent stem cell (iPSC) lines were then cultured in ultra-low attachment 6-well plates on orbital shakers and differentiated into definitive endoderm (stage 1). A Taguchi L9 experimental design evaluated the influence of activine A (50–150 ng/mL), CHIR99021 (1.5–4.5 μ M), and duration (3–5 days) on SOX17 expression. Outcomes were assessed using flow cytometry and automated image analysis.

Results demonstrated that iPSCs cultured in 3D and treated with 150 ng/mL activine A and 4.5 μ M CHIR99021 for 3 days achieved up to 97% SOX17 positive cells. The use of small clusters, rather than single cells, significantly improved aggregate uniformity and viability. The protocol eliminated the need for synthetic scaffolds or AggreWell™ plates.

This approach provides a scalable and xeno-free platform for early pancreatic differentiation of hPSCs, supporting future GMP-compliant manufacturing processes for cell therapy applications.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ.....	iv
ABSTRACT	v
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	xii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xiv
LISTE DES ANNEXES.....	xv
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Contexte et justification	1
1.2 Objectifs du projet.....	2
1.3 Hypothèses de travail	2
1.4 Structure du mémoire	2
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	4
2.1 Cellules souches pluripotentes	4
2.1.1 Origine et considérations éthiques	4
2.1.2 Profil épigénétique et plasticité	5
2.1.3 Variabilité et standardisation.....	5
2.1.4 Perspectives cliniques	6
2.1.5 Capacités de différenciation	6
2.2 Culture en 3D : avantages et défis.....	7
2.2.1 Contexte général.....	7
2.2.2 Avantages des cultures 3D	7
2.2.3 Limites de la culture 2D	7

2.2.4	Défis techniques en 3D	8
2.2.5	Adaptabilité	8
2.3	Variabilité des protocoles de différenciation pancréatique	9
2.3.1	Protocoles 2D classiques	9
2.3.2	Passage en 3D dès le stade 0	10
2.3.3	Comparaison des approches	11
2.4	Systèmes de culture 3D et bioréacteurs	12
2.4.1	Géométries et dynamiques des bioréacteurs	13
2.4.2	Technologies commerciales disponibles	14
2.4.3	Vers une standardisation des pratiques	16
2.5	Paramètres critiques pour la différenciation pancréatique (stade 1)	16
2.5.1	Activine A	17
2.5.2	CHIR99021	17
2.5.3	SOX17 comme biomarqueur	17
2.6	Synthèse des approches d'évaluation de l'induction endodermique	18
2.6.1	Cytométrie en flux pour la quantification de SOX17	18
2.6.2	Analyse morphologique par imagerie automatisée	18
2.6.3	Traitement et visualisation des données par R et JupyterLab	18
2.6.4	Autres approches d'évaluation dans la littérature	19
2.7	Défis de la différenciation pancréatique à partir de cellules souches pluripotentes	19
2.7.1	Hétérogénéité cellulaire persistante	19
2.7.2	Variabilité inter-lots et inter-lignées	20
2.7.3	Limitations des systèmes de monitoring en temps réel	20
2.7.4	Contraintes liées à la conformité BPF et au coût	20

2.7.5	Maturation fonctionnelle incomplète	20
2.8	Applications cliniques et perspectives en médecine régénérative	21
CHAPITRE 3	MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	23
3.1	Cellules MIN6	23
3.1.1	Culture 2D	23
3.1.2	Passage du 2D au 3D.....	23
3.1.3	Maintenance	24
3.2	Cellules H1	24
3.2.1	Culture 2D	24
3.2.2	Passage du 2D au 3D.....	25
3.2.3	Maintenance stade 0	25
3.2.4	Différenciation stade 1	26
3.3	Cellules iPSC.....	26
3.3.1	Culture 2D	27
3.3.2	Passage du 2D au 3D.....	27
3.3.3	Maintenance	27
3.3.4	Différenciation stade 1	28
3.4	Caractérisation des cultures.....	28
3.4.1	Cytométrie en flux.....	28
3.4.2	Coloration de viabilité cellulaire	29
3.4.3	Analyse d'image (CellProfiler)	30
1.	Conversion en niveaux de gris (Module : ColorToGray)	30
2.	Inversion de contraste (Module : ImageMath).....	30
3.	Correction de l'éclairage (Module : CorrectIlluminationCalculate & CorrectIlluminationApply).....	31

4. Ajustement des niveaux d'intensité (Module : RescaleIntensity).....	31
5. Segmentation des objets primaires (Module : IdentifyPrimaryObjects).....	31
6. Mesure des caractéristiques morphologiques (Module : MeasureObjectSizeShape)	32
7. Filtrage des objets (Module : FilterObjects)	32
8. Exportation des données (Module : ExportToSpreadsheet).....	33
3.4.4 Analyse statistique.....	33
3.5 Méthodologie de mise à l'échelle des bioréacteurs.....	34
3.5.1 Introduction générale (contexte et objectifs).....	34
3.5.2 Paramètres et relations de mise à l'échelle.....	35
3.5.3 Étapes de la mise à l'échelle	38
CHAPITRE 4 RÉSULTATS	40
4.1 Culture des cellules MIN6.....	40
4.1.1 Distribution de taille.....	40
4.1.2 Mesure de la viabilité cellulaire	43
4.2 Culture des cellules H1	44
4.2.1 Distribution de taille.....	44
4.2.2 Résultats de différenciation vers l'endoderme définitif	47
4.2.3 Tentative de différenciation au stade 4	49
4.2.4 Mesure de viabilité cellulaire	50
4.3 Culture des cellules iPSC	51
4.3.1 Distribution de taille.....	52
4.3.2 Analyse de coloration de viabilité cellulaire	54
4.3.3 Cytométrie de flux.....	55
4.3.4 Analyse morphologique par microscopie optique.....	59

4.3.5	Analyse Statistique	61
CHAPITRE 5 DISCUSSION		64
5.1	Rétrospective sur l'utilisation des cellules MIN6	64
5.1.1	Rôle formateur et développement méthodologique	64
5.1.2	Apports scientifiques et exploration des paramètres de culture	64
5.1.3	Limites de la transposition aux cellules souches humaines	65
5.1.4	Transition vers les cellules souches humaines : H1 comme premier modèle	65
5.2	Développer des conditions de culture 3D pour cellules souches embryonnaires H1	66
5.2.1	Retour à une approche exploratoire en plaque 6 puits	66
5.2.2	Changement de stratégie : passage des cellules uniques à petits amas	66
5.2.3	Optimisation de la formation des amas H1	67
5.2.4	Première différenciation réussie et expression de SOX17	67
5.3	Développement et évaluation du protocole 3D avec cellules iPSC	68
5.3.1	Justification du choix des iPSC pour une approche BPF	68
5.3.2	Passage au modèle iPSC et adaptations	68
5.3.3	Plan d'expérience et contraintes liées à la diffusion	69
5.3.4	Viabilité cellulaire et essais en bioréacteur	69
CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS		71
RÉFÉRENCES		73
ANNEXES		77

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 Plan d'expérience Taguchi L9 utilisé pour l'optimisation du stade 1.....	33
Tableau 2 Résultats de l'expression de SOX17 (%) pour chacune des neuf conditions expérimentales du plan Taguchi (Essai 2).....	62
Tableau 3 Comparaison des milieux et facteurs au stade 1 entre différents protocoles.....	77
Tableau 4 Comparaison des milieux et facteurs au stade 2 entre différents protocoles.....	78
Tableau 5 Comparaison des milieux et facteurs au stade 3 entre différents protocoles.....	78
Tableau 6 Comparaison des milieux et facteurs au stade 4 entre différents protocoles.....	79

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 Schéma simplifié du processus de génération de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) à partir de cellules somatiques adultes par reprogrammation génétique.....	5
Figure 2.2 Exemple de protocole de différenciation pancréatique standard réalisé en 2D jusqu'au stade 4 (endoderme pancréatique).....	10
Figure 2.3 Comparaison morphologique entre la culture 2D et 3D de cellules souches pluripotentes humaines. L'échelle est de 200 μ m.....	11
Figure 2.4 Exemples de bioréacteurs utilisés pour la culture cellulaire.....	15
Figure 3.1 Exemple d'identification primaire pour les cellules H1	32
Figure 4.1 Observation des agrégats MIN6 (J1 à J4). Croissance visible jusqu'au Jour 3, suivie d'une fragmentation au jour 4 avec apparition de petits agrégats. Échelle : 200 μ m.....	41
Figure 4.2 Distribution des diamètres des agrégats MIN6 du jour 1 à 4.....	42
Figure 4.3 Histogrammes des diamètres des agrégats MIN6 de J1 à J4	43
Figure 4.4 Coloration de viabilité cellulaire d'agrégats MIN6 au jour 4. Chaque image combine les signaux FITC (cellules vivantes, vert) et TRITC (cellules mortes, rouge). Barres d'échelle = 200 μ m.....	44
Figure 4.5 Images représentatives des agrégats cellulaires formés à partir des cellules H1 durant les trois premiers jours de culture en suspension 3D. A. Jour 1, B. Jour 2, C. Jour 3. Échelle : 200 μ m.....	45
Figure 4.6 Diagrammes en violon illustrant la distribution des diamètres d'agrégats de cellules H1 aux jours 1, 2 et 3.	46
Figure 4.7 Histogrammes de fréquence des diamètres des agrégats H1 pour chaque jour.	46
Figure 4.8 Évolution du diamètre moyen des agrégats H1 entre le jour 1 et le jour 3. La croissance est linéaire et soutenue.	47
Figure 4.9 Image représentative d'agrégats H1 au jour 3 du stade 1 (objectif 10 $\times$). Barre d'échelle: 200 μ m.	48

Figure 4.10 Analyse par cytométrie de flux de l'expression de SOX17 à la fin du stade 1 pour les essais H1-essai 1 et H1-essai 2.....	49
Figure 4.11 Agrégats H1 au jour 4 du stade 4, observés à 4× (gauche) et 10× (droite). Barre d'échelle : 200 µm.....	50
Figure 4.12 Coloration de viabilité cellulaire représentative des cellules H1 aux stades 1 à 4 de la différenciation.	51
Figure 4.13 Histogrammes des tailles des agrégats iPSC au stage 0 pour les essais 1 et 5.	53
Figure 4.14 Représentation en violon de la distribution des diamètres pour les essais 1 et 5.	53
Figure 4.15 Histogramme des tailles des agrégats iPSC au jour 2 pour l'essai 2.	54
Figure 4.16 Évaluation de la viabilité cellulaire par coloration de viabilité cellulaire à la fin du stade 1 pour trois conditions du plan factoriel (essai 5).	55
Figure 4.17 Plan factoriel complet 3×3 utilisé pour l'essai 2.....	58
Figure 4.18 Analyse de viabilité par cytométrie pour une condition de l'essai 5.....	59
Figure 4.19 Morphologie des agrégats 3D d'iPSC à la fin du stade 1 selon les conditions du plan d'expérience. Images capturées en microscopie optique (objectif 10x)	61
Figure 4.20 Effet des variables expérimentales sur SOX17 (%).....	62
Figure 4.21 Analyse de variance (ANOVA) des facteurs influençant SOX17	63

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

Abréviation	Définition
AA	Ascorbic Acid (acide ascorbique)
BPF	Bonnes pratiques de fabrication. Ensemble de normes encadrant la fabrication, le contrôle et la qualité des produits pharmaceutiques, biomédicaux ou alimentaires. L’acronyme BPF correspond à GMP (<i>Good Manufacturing Practices</i>) en anglais.
BSA	Bovine Serum Albumin
CalceinAM	<i>Calcein Acetoxymethyl Ester</i> , forme non fluorescente de la calcéïne qui devient fluorescente dans les cellules vivantes
CHIR	CHIR99021, inhibiteur de GSK3 β
DMSO	Dimethyl Sulfoxyde
DPBS	<i>Dulbecco’s Phosphate Buffered Saline</i> – Tampon salin phosphate formulé selon Dulbecco, utilisé pour rincer les cellules sans calcium ni magnésium
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Sérum fœtal bovin (<i>Fetal Bovine Serum</i>) — supplément nutritif dérivé du sang de fœtus de bovin, couramment utilisé dans les milieux de culture cellulaire pour fournir des facteurs de croissance, des hormones et des protéines.
HEPES	Tampon 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazineéthanesulfonique, utilisé pour maintenir le pH stable en culture cellulaire.
HSA	Human Serum Albumin
iPSC	Induced Pluripotent Stem Cells
LD	Live/Dead (coloration de viabilité cellulaire)
MCDB	Medium for Cell Development and Biotechnology (ex. : MCDB 131)
MIN6	Mouse Insulinoma 6 — lignée cellulaire dérivée d’un insulinome de souris, utilisée comme modèle des cellules β pancréatiques
NKX6.1	NK6 homeobox 1, facteur de transcription associé à la spécification des progéniteurs pancréatiques.
NRC	National Research Council (Conseil national de recherches du Canada)
PDX1	Pancreatic and duodenal homeobox 1, facteur de transcription essentiel au développement du pancréas.
PI	<i>Propidium Iodide</i> (colorant d’ADN utilisé pour identifier les cellules mortes, car il ne traverse que les membranes cellulaires endommagées)
P/S	Penicillin-Streptomycin
RA	Retinoic Acid (acide rétinoïque)
ROCK	Rho-associated protein kinase (kinase associée à la protéine Rho, impliquée dans l’apoptose cellulaire — souvent inhibée pour améliorer la survie cellulaire lors des passages)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SOX17	SRY-box transcription factor 17, marqueur clé de l’endoderme définitif au stade précoce de la différenciation.

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE A Comparaison des Protocoles	77
ANNEXE B Codes R et Python	80
ANNEXE C Protocoles développés au cours de l'étude.....	86

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Contexte et justification

Les avancées récentes dans le domaine de la médecine régénérative offrent de nouvelles perspectives pour le traitement de maladies chroniques et dégénératives, en particulier avec l'utilisation des cellules souches pluripotentes. Cependant, avec l'augmentation de la prévalence des maladies et de la population mondiale, le besoin en thérapies régénératives à grande échelle devient de plus en plus pressant. La production à grande échelle de cellules souches de qualité, adaptées à des applications thérapeutiques, nécessite la mise en place de méthodes de culture rigoureuses et conformes aux bonnes pratiques de fabrication (BPF) (Sali et al., 2025).

La culture de cellules souches en 2D, bien qu'utile pour les recherches à petite échelle, rencontre des limites majeures lorsque l'on cherche à l'étendre à une production à grande échelle. En effet, le processus d'augmentation d'échelle (scale-up) en 2D nécessite l'utilisation de multiples plaques, ce qui entraîne une charge de travail manuelle considérable, une gestion complexe des cultures, et un risque accru de contamination (Lee.B, 2022). De plus, cette méthode ne simule pas de manière optimale l'environnement tridimensionnel des tissus humains, ce qui rend la différenciation cellulaire et la production de cellules souches de qualité clinique difficiles à maîtriser. De surcroît, les cultures 2D reposent souvent sur des produits dérivés d'animaux, tels que le Matrigel, pour favoriser l'adhérence des cellules. Cette utilisation soulève des préoccupations éthiques et de sécurité, et il devient essentiel de trouver des alternatives qui évitent l'utilisation de ces produits d'origine animale, afin de se conformer aux standards BPF et garantir la sécurité des produits finaux (Jensen, 2020)

Dans ce contexte, la culture en 3D émerge comme une solution plus prometteuse. Elle permet de mieux imiter les conditions physiologiques du corps humain, tout en offrant un potentiel de d'augmentation d'échelle (scale-up) plus efficace et plus automatisé, réduisant ainsi les efforts manuels et les risques de contamination (Jensen, 2020). La culture en 3D est donc vue comme un moyen de surmonter les défis du 2D tout en favorisant une meilleure différenciation cellulaire et une plus grande conformité aux normes BPF.

1.2 Objectifs du projet

Ce projet de recherche a pour objectif de développer et d'optimiser des protocoles de culture de cellules souches pluripotentes et de leurs dérivés, avec une emphase particulière sur la culture en 3D. Les objectifs spécifiques incluent :

- Développer un protocole de culture des cellules souches pluripotentes en 3D sur des plaques de 6 puits avec agitation orbitale.
- Développer un protocole de culture des cellules souches pluripotentes et des cellules MIN6 (lignée de cellules bêta pancréatiques) en 3D dans un mini-bioréacteur.
- Mettre au point un protocole pour la différenciation des agrégats sphériques 3D en sphéroïdes pancréatiques au stade 1 de différenciation.
- Évaluer l'impact des différents paramètres de culture sur la croissance et la différenciation des cellules

1.3 Hypothèses de travail

L'hypothèse principale de ce projet repose sur l'idée que la culture cellulaire en 3D, étant plus représentative des conditions physiologiques du corps humain, offrira un environnement plus propice au développement cellulaire et à la différenciation. De plus, la culture en 3D présente des avantages en termes de conformité aux normes BPF en réduisant ou éliminant l'utilisation de produits d'origine animale, tout en étant plus économique à long terme par rapport aux méthodes traditionnelles de culture en 2D, particulièrement pour l'augmentation d'échelle (scale-up) (Jensen, 2020; Duval, 2017).

1.4 Structure du mémoire

Ce mémoire est structuré en plusieurs chapitres. Il débute par une revue de la littérature présentant les connaissances actuelles sur les cellules souches pluripotentes humaines, leur différenciation en cellules pancréatiques, ainsi que les défis associés à la culture 3D. La section suivante décrit la méthodologie expérimentale mise en place, incluant les protocoles de culture, de différenciation et d'analyse. Les résultats expérimentaux obtenus sont ensuite présentés et discutés en lien avec les objectifs initiaux. Enfin, une conclusion générale résume les principaux constats de l'étude et

propose des pistes d'optimisation pour les travaux futurs. Les protocoles développés dans le cadre de ce projet sont présentés en annexe afin de faciliter leur reproduction et leur amélioration.

CHAPITRE 2 Revue de littérature

2.1 Cellules souches pluripotentes

Les cellules souches pluripotentes humaines comprennent deux grandes catégories : les cellules souches embryonnaires humaines (hESC) et les cellules souches pluripotentes induites (iPSC). Bien qu'elles partagent la capacité de se différencier en cellules des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme), elles présentent des différences importantes au niveau de leur origine, de leur profil épigénétique et de leurs applications pratiques.

2.1.1 Origine et considérations éthiques

Les cellules souches embryonnaires humaines (hESC) sont obtenues à partir de la masse cellulaire interne du blastocyste, une structure embryonnaire précoce. Cette origine soulève des enjeux éthiques importants liés à la destruction de l'embryon humain. En réponse à ces préoccupations, les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) ont été développées comme une alternative éthique et techniquement prometteuse. Les iPSC sont générées par reprogrammation génétique de cellules somatiques adultes, généralement des fibroblastes cutanés. Cette reprogrammation repose sur l'introduction de gènes codant pour des facteurs de transcription spécifiques (souvent OCT4, SOX2, KLF4 et c-MYC, appelés facteurs de Yamanaka) qui permettent de ramener la cellule à un état pluripotent.

Le processus de reprogrammation des iPSC est illustré à la Figure 2.1. Après isolement des cellules somatiques, les gènes de reprogrammation sont généralement introduits à l'aide de vecteurs viraux ou non viraux. Les cellules sont ensuite cultivées dans un environnement favorisant leur retour à un état pluripotent. Cette approche permet d'obtenir des cellules fonctionnellement comparables aux hESC, tout en contournant les dilemmes éthiques liés à l'utilisation d'embryons (Yamanaka, 2020; Abdelalim et al., 2014).

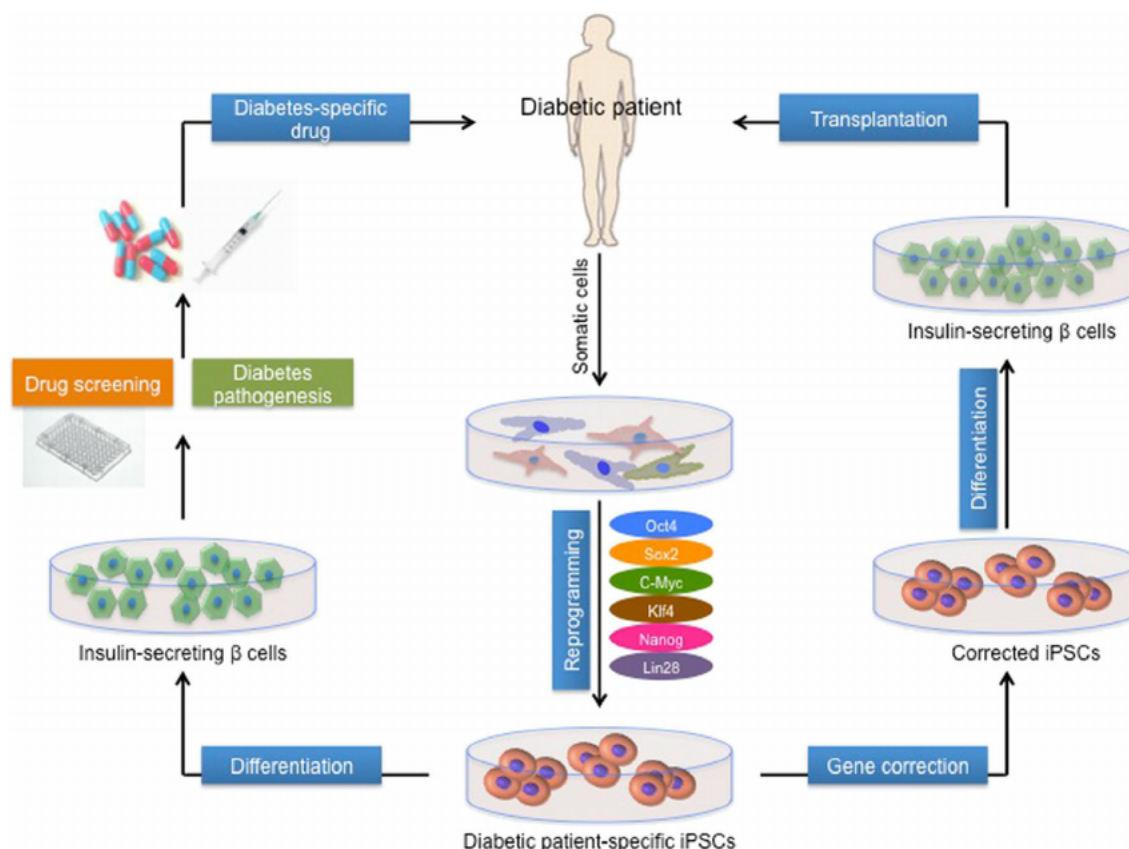


Figure 2.1 Schéma simplifié du processus de génération de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) à partir de cellules somatiques adultes par reprogrammation génétique. Tirée de *Pluripotent stem cells as a potential tool for disease modelling and cell therapy in diabetes*.

2.1.2 Profil épigénétique et plasticité

Les iPSC peuvent conserver une mémoire épigénétique liée à leur tissu d'origine, influençant parfois leur efficacité de différenciation dans certains lignages. Cependant, cette empreinte peut aussi représenter un avantage dans des applications ciblées. Les hESC présentent un profil plus stable, souvent considéré comme représentatif de la pluripotence « primée », mais cela ne garantit pas nécessairement une meilleure performance dans tous les protocoles de différenciation (Schwartzentruber et al., 2019).

2.1.3 Variabilité et standardisation

Les iPSC sont sujettes à une plus grande variabilité inter-lignées, liée aux méthodes de reprogrammation, à l'origine cellulaire et aux vecteurs utilisés. Toutefois, cette diversité est de plus

en plus maîtrisée grâce à l'évolution des techniques de génération et de caractérisation. Les hESC, bien que dérivées plus uniformément, ne sont pas exemptes de variabilité, et leur disponibilité reste limitée par des considérations réglementaires (Schwartzentruber et al., 2019).

2.1.4 Perspectives cliniques

Les iPSC présentent un fort potentiel pour les thérapies personnalisées, notamment les applications autologues, en réduisant le risque de rejet immunitaire. Elles offrent également une accessibilité accrue dans les laboratoires, ce qui favorise leur adoption dans des projets de recherche translationnelle. Les hESC restent pertinentes pour certaines applications cliniques allogéniques, mais leur usage demeure encadré de manière plus stricte (Mandai et al., 2021).

2.1.5 Capacités de différenciation

Les deux types de cellules peuvent être dirigés vers une vaste gamme de lignages cellulaires, bien que des ajustements de protocole soient souvent nécessaires pour s'adapter aux caractéristiques spécifiques de chaque lignée. Dans certains cas, les iPSC ont montré une efficacité de différenciation comparable, voire supérieure, après optimisation (Schwartzentruber et al., 2019). Cette efficacité a également été démontrée dans des protocoles de différenciation pancréatique. Par exemple, Verhoeff et al. (2024), dans le cadre d'une collaboration dirigée par A. M. James Shapiro, ont utilisé une lignée iPSC humaine dans un protocole de différenciation en suspension à l'aide de bioréacteurs à roue verticale, atteignant 90,4 % de cellules PDX1+/NKX6.1+ et 100 % de cellules C-peptide+/NKX6.1+ à la fin de la différenciation. Les marqueurs PDX1 (Pancreatic and Duodenal Homeobox 1) et NKX6.1 sont deux facteurs de transcription essentiels exprimés par les progéniteurs pancréatiques. Leur co-expression est considérée comme un indicateur de l'engagement vers la lignée des cellules β , productrices d'insuline. Le C-peptide, quant à lui, est un peptide libéré lors de la maturation de la proinsuline et constitue un marqueur fonctionnel de la capacité des cellules différenciées à produire de l'insuline. Le protocole a permis une réduction des coûts de production de 88,8 % et a généré un rendement cellulaire élevé, illustrant le potentiel translationnel des iPSC pour des applications cliniques à grande échelle. Dans le cadre de ce projet, les deux types de cellules ont été envisagés. Toutefois, les iPSC ont été privilégiées pour les expériences principales en raison de leur accessibilité, de leur compatibilité avec des approches

autologues et de leur efficacité démontrée dans le protocole de différenciation pancréatique développé.

2.2 Culture en 3D : avantages et défis

2.2.1 Contexte général

La culture cellulaire en trois dimensions (3D) reproduit mieux l'environnement *in vivo* que les cultures bidimensionnelles (2D). Elle permet la formation d'agrégats cellulaires favorisant des interactions cellule-cellule plus naturelles, une polarisation partielle et des gradients de signaux biochimiques rappelant certaines conditions *in vivo*. Bien que ces agrégats ne reproduisent pas une organisation tissulaire complète, ils offrent un microenvironnement plus physiologiquement pertinent que les monocouches 2D (Yamanaka, 2020).

2.2.2 Avantages des cultures 3D

Les agrégats cellulaires ou sphéroïdes permettent une meilleure interaction cellule-cellule, ce qui influence positivement la viabilité, la différenciation et la fonctionnalité des cellules souches. En particulier, pour la différenciation pancréatique, plusieurs études ont montré une amélioration de l'expression des marqueurs endodermiques et une morphologie plus représentative des îlots pancréatiques (Verhoeff et al., 2024).

L'innovation principale introduite dans les travaux de ce mémoire est d'avoir initié la culture 3D directement à partir des cellules souches au stade 0, avant même le début de la différenciation. Cette stratégie permet de générer des agrégats homogènes sans avoir recours à des méthodes additionnelles comme l'utilisation de plaques AggreWell™, qui, bien que compatibles avec des environnements BPF, sont coûteuses, peu adaptées au changement d'échelle (scale-up), et requièrent des étapes supplémentaires.

2.2.3 Limites de la culture 2D

Les cultures 2D exigent un entretien quotidien méticuleux et ont un rendement cellulaire faible par heure de travail. Elles nécessitent souvent l'utilisation de Matrigel, un produit d'origine animale

incompatible avec les exigences réglementaires cliniques. Certaines études antérieures ont également rapporté une mortalité cellulaire importante au stade de l'induction endodermique en 2D (Pagliuca et al., 2014), phénomène observé lors des essais préliminaires de ce projet mais absent des cultures 3D. En outre, ce format ne permet qu'un contrôle limité des gradients de nutriments, de facteurs de croissance ou de déchets métaboliques, contrairement aux systèmes 3D qui offrent une meilleure homogénéité de l'environnement cellulaire (Velazco-Cruz et al., 2022). Les formats plats montrent également une faible compatibilité avec l'automatisation ou le criblage à haut débit, ce qui limite leur potentiel de transposition industrielle (Wang & Jeon, 2022). À l'opposé, les systèmes en suspension permettent une meilleure évolutivité et s'intègrent plus aisément aux contraintes des procédés de type BPF (Verhoeff et al., 2024).

2.2.4 Défis techniques en 3D

Malgré ses avantages, la culture 3D soulève plusieurs enjeux techniques :

- L'oxygénation au sein des agrégats pour éviter l'hypoxie
- L'élimination efficace des déchets métaboliques
- L'apport homogène de nutriments
- La forme de l'empilement cellulaire
- La vitesse et le type d'agitation à employer (e.g., RPM, orbital vs vertical)
- La géométrie du système de culture (puits, tubes, bioréacteurs)
- Le contrôle de la taille des agrégats

Ces paramètres doivent être rigoureusement optimisés pour éviter la nécrose centrale, garantir une différenciation uniforme et assurer une analyse fiable des populations cellulaires (Rodrigues et al., 2021).

2.2.5 Adaptabilité

La montée en échelle des cultures 3D passe par une adaptabilité croissante des plateformes, à la fois pour des contraintes industrielles et pour l'optimisation des performances biologiques. En plus de l'usage de bioréacteurs favorisant la conformité aux BPF et la standardisation des conditions expérimentales (Verhoeff et al., 2024), certaines équipes ont souligné l'importance d'adapter les protocoles de culture en fonction des variations interlignées et de la sensibilité cellulaire aux forces

mécaniques (Velazco-Cruz et al., 2022). Par ailleurs, les travaux de Wang et Jeon (2022) démontrent que l'intégration d'approches microfluidiques et d'automatisation dans les cultures 3D ouvre la voie à des plateformes adaptables, compatibles avec le criblage à haut débit et la personnalisation des conditions de différenciation.

2.3 Variabilité des protocoles de différenciation pancréatique

2.3.1 Protocoles 2D classiques

La différenciation pancréatique des cellules souches pluripotentes repose sur une séquence de signaux mimant le développement embryonnaire. Des protocoles classiques comme ceux de Pagliuca et al. (2014) ou Rezania et al. (2014) ont longtemps servi de références. Le laboratoire Hoesli, par exemple, a suivi un protocole interne en 2D jusqu'au stade 4, combinant Matrigel, un extrait de membrane basale riche en protéines favorisant l'adhérence cellulaire, le milieu mTeSR™ Plus (STEMCELL Technologies), un milieu spécifiquement conçu pour le maintien des cellules souches pluripotentes humaines, et TrypLE, une enzyme de dissociation sans origine animale utilisée pour le passage des cellules.

Le protocole 2D du laboratoire Hoesli inclut également des ajustements spécifiques avec des facteurs de croissance comme KGF, ITS-X, SANT-1, IWP-2, illustrant une adaptation visant à optimiser l'efficacité de la différenciation pancréatique. Ces ajouts représentent des efforts pour améliorer les rendements, bien que ces protocoles restent associés à une mortalité cellulaire marquée durant le stade 1 (induction endodermique), phénomène observé dans nos essais préliminaires et déjà rapporté dans des travaux antérieurs (Pagliuca et al., 2014). De plus, le ratio temps de travail par cellule obtenue est désavantageux, et la mise à niveau est contraignante, notamment en raison de la surface nécessaire, de la complexité des manipulations, et du recours à des dispositifs comme les plaques AggreWell™ pour la formation d'agrégats standardisés à un stade avancé de la différenciation.

Ce type de stratégie est illustré à la Figure 2.2, où la différenciation suit une séquence en culture adhérente jusqu'au stade S4, avant agrégation des cellules en structures tridimensionnelles pour les étapes endocriniennes. Cette approche séquentielle, bien que validée, présente plusieurs limitations logistiques et biologiques dans un contexte de mise à l'échelle.

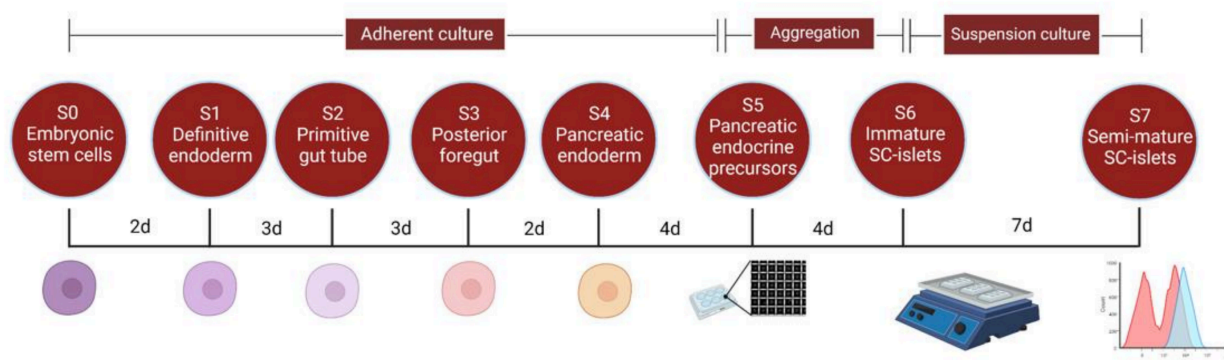


Figure 2.2 Exemple de protocole de différenciation pancréatique standard réalisé en 2D jusqu'au stade 4 (endoderme pancréatique). Illustration adaptée du matériel interne du laboratoire Hoesli.

2.3.2 Passage en 3D dès le stade 0

Contrairement aux approches conventionnelles où les cellules sont cultivées sur une surface plane (2D) pendant les premières étapes de différenciation, le protocole exploré dans cette étude amorce la culture en trois dimensions (3D) dès le stade initial (Figure 2.3). Cette stratégie repose sur plusieurs avantages majeurs.

D'une part, la culture 3D reproduit plus fidèlement l'environnement naturel des cellules dans l'organisme, où elles se développent en structures sphéroïdales organisées plutôt qu'isolées. Cette configuration favorise une meilleure réponse aux signaux de différenciation, en particulier au stade de l'endoderme définitif (stade 1), où la survie cellulaire est souvent compromise en 2D. D'autre part, débiter directement en 3D facilite la montée en échelle, en réduisant la dépendance à des surfaces adhésives, à des substrats biologiques comme le Matrigel, ou à des dispositifs spécialisés

tels que les plaques AggreWell^{MC}. Ces éléments sont non seulement coûteux, mais peuvent également poser problème dans le cadre des bonnes pratiques de fabrication (BPF).

La culture 3D permet donc une approche plus standardisée, reproductible et économiquement viable, tout en s'intégrant plus facilement dans des procédures compatibles avec les exigences réglementaires.

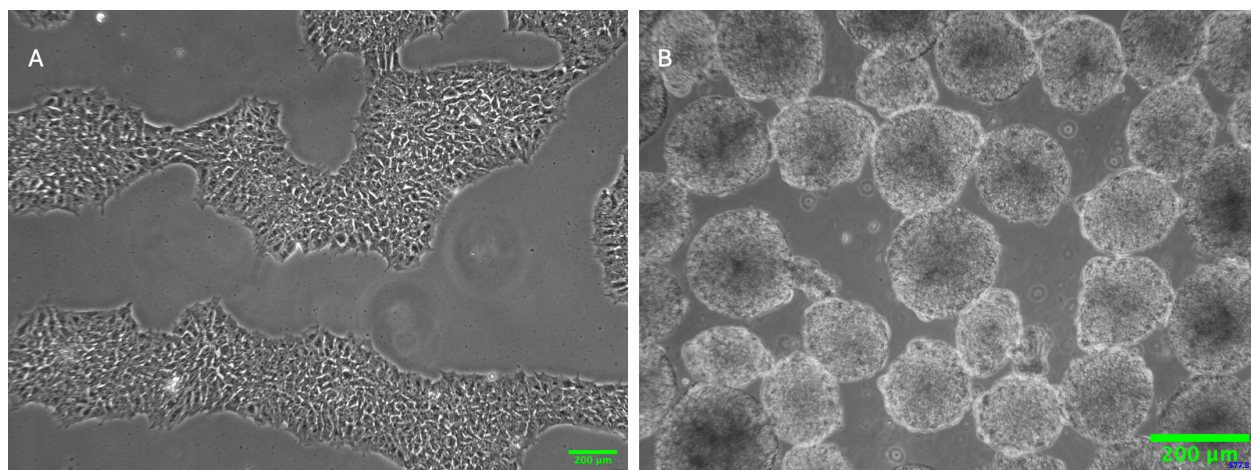


Figure 2.3 Comparaison morphologique entre la culture 2D et 3D de cellules souches pluripotentes humaines. L'échelle est de 200 µm.

A. Culture 2D conventionnelle montrant des colonies adhérentes de cellules H1 en monocouche.
B. Formation de sphéroïdes homogènes en culture 3D sans support artificiel, obtenus par agrégation spontanée sur plaque non adhérente.

2.3.3 Comparaison des approches

D'autres équipes de recherche ont également développé des protocoles entièrement en suspension dès les premières étapes de la différenciation. Par exemple, Verhoeff et al. (2024) ont utilisé des bioréacteurs à roue verticale (Vertical-Wheel) pour cultiver des cellules uniques dès le départ. Afin de favoriser leur survie, un inhibiteur de ROCK est ajouté immédiatement après l'ensemencement. Leurs milieux sont enrichis en acide rétinoïque dès les premiers jours pour guider la différenciation vers une lignée pancréatique, avec l'ajout simultané d'antioxydants pour limiter les effets toxiques. Ce protocole a permis d'obtenir jusqu'à 100 % de cellules exprimant les marqueurs C-peptide et NKX6. Le C-peptide est un indicateur indirect de la production d'insuline, tandis que NKX6.1 est un facteur de transcription essentiel à la maturation des cellules bêta pancréatiques. Ces résultats suggèrent une différenciation efficace vers un phénotype pancréatique. Toutefois, une proportion

notable de cellules restait polyhormonale, c'est-à-dire qu'elles exprimaient simultanément plusieurs hormones (comme l'insuline, le glucagon et la somatostatine), ce qui reflète un état de différenciation partiel ou immature. Ce phénomène est encore fréquent dans les protocoles actuels de différenciation et constitue un obstacle à l'obtention de cellules pleinement fonctionnelles pour des applications thérapeutiques.

Une autre approche 3D, publiée sous le nom de protocole STAR par Pollock et al. (2023), utilise quant à elle des petits amas cellulaires plutôt que des cellules individuelles. Ces agrégats sont cultivés en suspension dans des bioréacteurs de 30 à 300 mL. Pour limiter la fusion indésirable des agrégats, des ajouts ponctuels d'inhibiteur de ROCK sont effectués après certains passages. Le protocole STAR utilise aussi de l'acide rétinoïque, mais à des doses plus modérées, principalement pendant les stades intermédiaires (stade 2 et 3). Des antioxydants sont également présents, bien qu'en quantité moindre par rapport à Verhoeff.

Ces approches illustrent la diversité des méthodes employées dans les laboratoires, que ce soit en termes de format de culture (cellules uniques vs amas cellulaires), de type de bioréacteur, ou encore de la composition et du moment d'ajout des suppléments dans les milieux. Un tableau comparatif regroupant les protocoles Hoesli (2D), STAR (3D), Verhoeff (3D) et celui développé dans cette étude est présenté à l'annexe A.

Malgré les progrès réalisés, les protocoles de différenciation restent limités par la faible efficacité de maturation en cellules β pleinement fonctionnelles et le manque de standardisation inter-laboratoires (Silva et al., 2022)

2.4 Systèmes de culture 3D et bioréacteurs

Le passage de la culture 2D à des systèmes 3D a permis de surmonter plusieurs limites liées à la surface de culture, à la mortalité cellulaire au stade 1 et à la complexité de la mise à l'échelle (scale-up). Dans ce contexte, l'utilisation de bioréacteurs constitue une avancée majeure pour la culture et la différenciation des cellules souches pluripotentes.

2.4.1 Géométries et dynamiques des bioréacteurs

Les bioréacteurs à roue verticale (Vertical-Wheel®), tels que ceux développés par PBS Biotech, sont particulièrement adaptés à la culture en suspension de cellules souches humaines. Le protocole de Verhoeff et al. (2024) a démontré leur efficacité en atteignant un rendement de $1,1 \times 10^6$ cellules/mL. Une autre étude de Dadheech et al. (2025) a confirmé ces résultats en montrant que l'augmentation du volume de culture dans ce type de bioréacteur permettait une multiplication par ~ 12 du nombre d'équivalents îlots, tout en maintenant une qualité fonctionnelle élevée des îlots pancréatiques dans un modèle murin.

Des études récentes utilisant la dynamique des fluides numérique (CFD) ont également souligné l'impact de la géométrie du réacteur, de la forme des hélices, de la vitesse d'agitation et de la configuration des parois sur la viabilité et la taille des agrégats formés. Une hydrodynamique bien maîtrisée est essentielle pour maintenir l'intégrité des amas et éviter leur fusion excessive ou leur nécrose centrale (Borys et al., 2021).

Outre les systèmes à roue verticale et les bioréacteurs à hélice inférieure (*bottom-stirred*), plusieurs autres géométries sont explorées dans les recherches récentes :

- **Agitateurs orbitaux (orbital shakers)** : utilisés dans les incubateurs standard pour les suspensions en flacon ou en plaque, ils permettent une mise en œuvre simple et économique, mais offrent peu de contrôle sur les paramètres hydrodynamiques (Huang et al., 2022).
- **Bioréacteurs à lévitation magnétique** : exploitent des champs magnétiques pour maintenir les cellules en suspension, réduisant ainsi le cisaillement mécanique. Ils offrent un environnement homogène, mais sont encore peu répandus.
- **Chambres à flux oscillant** : ces systèmes simulent des mouvements péristaltiques ou vibratoires pour améliorer la diffusion des nutriments et réduire le stress mécanique.
- **Bioréacteurs à microporteurs (microcarriers)** : favorisent l'expansion des cellules adhérentes dans des milieux en suspension, en augmentant la surface utile de culture
- **Dispositifs microfluidiques et puces 3D** : intègrent des canaux et chambres pour créer des microenvironnements contrôlés, adaptés aux modèles in vitro personnalisés

Ces alternatives offrent des perspectives variées selon le type cellulaire, les objectifs de différenciation et les contraintes de mise à l'échelle. Une synthèse de ces options est présentée dans la revue de Huang et al. (2022), qui discute des avantages et inconvénients de chaque géométrie dans le contexte de la culture de cellules souches pluripotentes.

2.4.2 Technologies commerciales disponibles

Parmi les systèmes actuellement disponibles, plusieurs sont compatibles avec les exigences des bonnes pratiques de fabrication (BPF) :

- **PBS Biotech – Vertical-Wheel®** : bioréacteurs à usage unique de 0,1 à 80 L, adaptés à la culture de cellules souches, avec différents modèles pour la recherche, le préclinique et la production.
- **Sartorius – ambr® 15 et ambr® 250** : bioréacteurs automatisés à usage unique conçus pour les cultures de cellules souches et d'autres cellules sensibles, avec des volumes de travail allant de 10 à 250 mL. Adaptés aux phases de développement et à l'optimisation de protocole, ces systèmes permettent une montée en échelle progressive vers des bioréacteurs plus volumineux.
- **Eppendorf – DASGIP® et DASbox®** : bioréacteurs modulaires en verre ou à usage unique pour des volumes allant de 60 mL à 1,8 L. Ces systèmes permettent une culture contrôlée en petits volumes avec une géométrie adaptable, intégrant des capteurs pour le suivi du pH, de l'oxygène dissous et de l'agitation. Bien qu'ils aient été initialement envisagés dans ce projet, d'autres systèmes ont finalement été privilégiés.
- **ABLE Biott – 30 mL Disposable Bioreactor** : proposé par Reprocell, ce bioréacteur de type cuve agitée à hélice au fond (*bottom-stirred*) est destiné à la culture cellulaire à petite échelle en suspension, notamment pour la recherche appliquée.

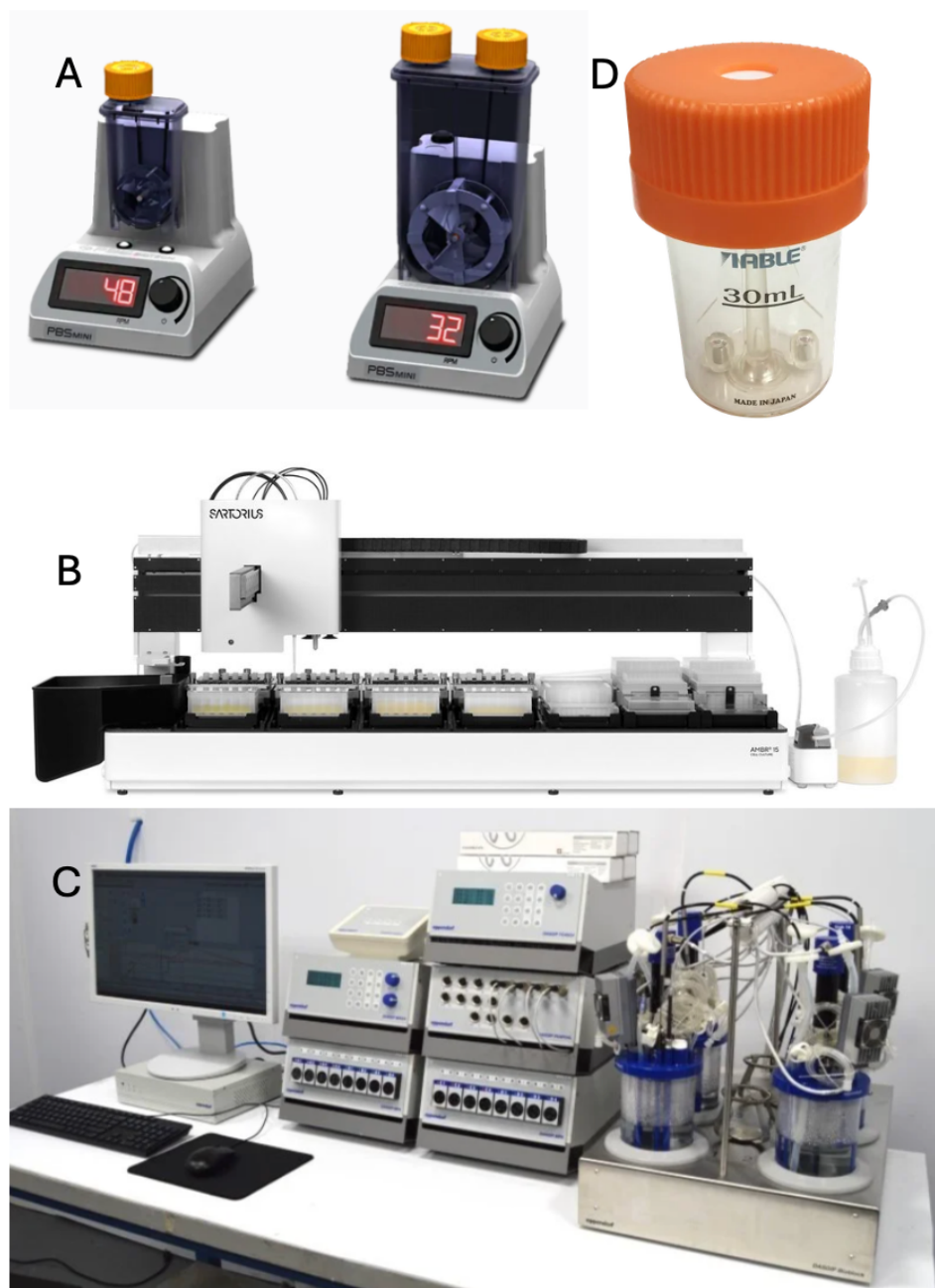


Figure 2.4 Exemples de bioréacteurs utilisés pour la culture cellulaire.

- (A) Agitateurs à palettes (PBS Mini) adaptés aux petits volumes en suspension.
- (B) Système automatisé à plaques (Ambr® 15, Sartorius), permettant des cultures parallèles à haut débit.
- (C) Bioréacteurs contrôlés multi-paramètres (DASGIP d'Eppendorf) avec régulation automatisée de l'oxygène, du pH, de la température et de l'agitation.
- (D) Mini-bioréacteur de 30 mL (ABLE Biott), utilisé dans cette étude.

Certaines de ces solutions permettent un contrôle précis des paramètres critiques tels que l'oxygénation, la nutrition, l'élimination des déchets, et offrent une plus grande reproductibilité, ce qui est indispensable pour des applications translationnelles.

2.4.3 Vers une standardisation des pratiques

Malgré ces avancées, la standardisation des protocoles de différenciation pancréatique en bioréacteur reste un défi. Le tableau en annexe A compare différentes approches, notamment celles de Verhoeff (2024), STAR (2023) et celle développée dans le cadre de ce projet. Des aspects comme la géométrie du réacteur, l'état initial des cellules (cellules uniques vs petits agrégats), l'ajout d'inhibiteur de ROCK, et les stratégies d'induction (usage d'acide rétinoïque et d'antioxydants) y sont détaillés pour illustrer la diversité des pratiques et guider le développement de solutions optimisées.

2.5 Paramètres critiques pour la différenciation pancréatique (stade 1)

Le succès de la différenciation des cellules souches humaines vers l'endoderme définitif au stade 1 repose sur un ajustement précis de plusieurs facteurs. Deux éléments majeurs, l'activine A et le CHIR99021, sont systématiquement utilisés dans les protocoles contemporains pour initier la voie de signalisation TGF- β /SMAD2-3 et moduler WNT/ β -caténine, respectivement. Ces molécules sont essentielles pour induire l'expression de SOX17, un marqueur clé de l'endoderme définitif. D'autres paramètres, notamment la composition du milieu de base, comme la teneur en glucose, en GlutaMAX™, en albumine sérique bovine (BSA) ou en bicarbonate de sodium, peuvent aussi moduler significativement la réponse cellulaire.

La concentration en glucose présente dans le milieu de différenciation peut également influencer significativement l'induction pancréatique. Wang et al. (2024) ont démontré que l'utilisation de concentrations physiologiques (5,5 mM) au lieu de concentrations élevées (20 mM) permettait une meilleure différenciation en cellules exprimant les marqueurs PDX1 et NKX6.1 dans certaines lignées iPSC. Une concentration élevée en glucose a été associée à une altération de la respiration mitochondriale, une réduction de l'expression des gènes pancréatiques clés, et une sécrétion d'insuline stimulée uniquement sous certaines conditions. Ces observations suggèrent que le glucose est un paramètre critique souvent négligé dans l'optimisation des protocoles de différenciation.

2.5.1 Activine A

L'activine A est reconnu comme un inducteur fondamental de la différenciation endodermique. Dès 2007, McLean et al. avaient démontré l'importance d'un dosage élevé pour spécifier efficacement l'endoderme définitif, un principe encore repris dans les protocoles récents comme ceux de Verhoeff (2024) ou Pollock (2023). Typiquement, une concentration autour de 100–150 ng/mL est utilisée, bien que la réponse puisse varier selon la lignée et les conditions de culture.

2.5.2 CHIR99021

CHIR99021, un inhibiteur sélectif de la glycogène synthase kinase 3 (GSK-3), active la voie de signalisation WNT, essentielle pour l'induction de l'endoderme antérieur. GSK-3 est une enzyme régulatrice intervenant dans de nombreux processus cellulaires, dont la prolifération, la différenciation et l'apoptose. En inhibant cette enzyme, CHIR99021 favorise l'accumulation de β -caténine et la transcription de gènes cibles impliqués dans la différenciation. Il est généralement ajouté en combinaison avec activine A durant les 24 premières heures du stade 1, suivi de son retrait afin d'éviter une différenciation non spécifique vers d'autres lignages (D'Amour KA, et al., 2006).

2.5.3 SOX17 comme biomarqueur

L'efficacité du protocole est principalement évaluée par le pourcentage de cellules exprimant SOX17. Ce facteur de transcription est un indicateur direct de l'engagement vers l'endoderme définitif. Dans le cadre de ce projet, des concentrations de 150 ng/mL d'activine A et 4.5 μ M de CHIR ont permis d'atteindre un pourcentage supérieur à 90 % de cellules SOX17 dans des conditions 3D en suspension. Ce résultat suggère que, malgré les défis, une induction efficace est possible en optimisant ces deux paramètres. (Velazco-Cruz et al., 2019)

2.6 Synthèse des approches d'évaluation de l'induction endodermique

2.6.1 Cytométrie en flux pour la quantification de SOX17

L'efficacité de l'induction endodermique est évaluée à la fin du stade 1 par cytométrie en flux, en quantifiant l'expression du marqueur SOX17. Ce facteur de transcription est un indicateur clé du destin endodermique, exprimé précocement après l'exposition aux inducteurs comme l'activine A et CHIR99021 (McLean et al., 2007).

L'analyse est effectuée après fixation des agrégats, perméabilisation et coloration intracellulaire. Un anticorps anti-SOX17 conjugué à l'Alexa Fluor® 647 (AF647) est utilisé, avec un anticorps isotypique IgG-AF647 en contrôle. Un puits supplémentaire est systématiquement coloré avec un kit de coloration de viabilité cellulaire afin d'évaluer la viabilité cellulaire avant fixation. Les échantillons sont ensuite analysés avec le logiciel FCS Express. L'approche consiste à exclure les débris et les doublets, puis à identifier la population SOX17 en comparant les profils de fluorescence à ceux des contrôles isotypiques. Le pourcentage de cellules exprimant SOX17 est alors déterminé parmi les cellules vivantes.

2.6.2 Analyse morphologique par imagerie automatisée

En complément, une analyse morphologique des agrégats peut être réalisée à partir des images acquises en microscopie à l'aide du logiciel CellProfiler. Ce type d'analyse permet de quantifier des paramètres tels que le diamètre, la circularité (FormFactor) et le nombre d'agrégats par condition. Les seuils de circularité sont ajustés pour exclure les objets non sphériques (FormFactor < 0.5), améliorant la robustesse de l'analyse (Lamprecht et al., 2007).

2.6.3 Traitement et visualisation des données par R et JupyterLab

Les résultats bruts issus de la cytométrie et de l'analyse d'images peuvent ensuite être traités avec des scripts R sous JupyterLab. Des visualisations graphiques (« violin plots », histogrammes, « heatmaps ») sont générées pour permettre une interprétation comparative des conditions expérimentales. Des analyses statistiques, notamment l'ANOVA, ont été utilisées pour évaluer l'effet significatif des variables expérimentales (concentrations d'inducteurs, temps d'induction, etc.) sur l'expression de SOX17 et les caractéristiques des agrégats (R Core Team, 2023).

2.6.4 Autres approches d'évaluation dans la littérature

Outre la cytométrie en flux, d'autres techniques sont utilisées dans la littérature pour évaluer l'induction, incluant l'immunofluorescence sur coupes ou cellules fixées (Rezania et al., 2014), la RT-qPCR pour mesurer l'expression de SOX17 et d'autres gènes associés à l'endoderme (Pagliuca et al., 2014), ainsi que des analyses transcriptomiques globales (Schwartzentruber et al., 2018). Toutefois, la cytométrie demeure la méthode privilégiée pour sa capacité à fournir une mesure quantitative rapide et reproductible sur une population cellulaire large. Cette approche multiparamétrique permet une évaluation complète de l'induction endodermique, combinant phénotypage moléculaire et caractéristiques morphologiques, et constitue un outil central pour l'optimisation des conditions expérimentales durant le stade 1.

De nouvelles approches exploratoires cherchent à développer des méthodes non destructives permettant de suivre la différenciation en temps réel. Par exemple, des biomatériaux dits « intelligents » intégrant des capteurs mécaniques, optiques ou métaboliques sont à l'étude pour détecter les signaux biochimiques ou biophysiques produits par les cellules différenciées. Ces technologies pourraient permettre de suivre l'induction endodermique sans fixation ni marquage, facilitant le criblage à haut débit et le monitoring en culture prolongée (Saydé et al., 2021). Bien que prometteuses, ces stratégies demeurent pour l'instant au stade exploratoire.

2.7 Défis de la différenciation pancréatique à partir de cellules souches pluripotentes

Malgré des avancées notables dans le développement de protocoles de différenciation pancréatique, plusieurs défis techniques et biologiques subsistent, limitant encore l'optimisation et la transposition clinique des approches à base de cellules souches pluripotentes humaines (hPSC).

2.7.1 Hétérogénéité cellulaire persistante

L'obtention de populations homogènes de cellules β matures reste difficile. Des travaux récents, incluant ceux de Verhoeff et al. (2024), rapportent la présence significative de cellules double positives ou partiellement différenciées au stade terminal (stade 7). Cette hétérogénéité suggère des

trajectoires de différenciation incomplètes et constitue un frein à la production de greffons de haute qualité (Sali et al., 2025).

2.7.2 Variabilité inter-lots et inter-lignées

La réponse aux inducteurs varie fortement selon la lignée cellulaire (iPSC vs ESC) et entre différents lots de différenciation. Cela complexifie la standardisation des procédés, même sous des conditions contrôlées. Des études de 2023 soulignent le besoin d'outils analytiques plus robustes et d'une automatisation accrue pour minimiser cette variabilité (Pollock et al., 2023) (Sali et al., 2025).

2.7.3 Limitations des systèmes de monitoring en temps réel

Les bioreacteurs modernes, comme les Vertical Wheel®, permettent un bon contrôle mécanique des paramètres (oxygénation, cisaillement, alimentation), mais les outils de suivi en ligne de la différenciation restent limités. La plupart des études reposent encore sur des analyses post-culture (cytométrie, immunofluorescence), empêchant un ajustement dynamique du protocole selon les besoins cellulaires.

2.7.4 Contraintes liées à la conformité BPF et au coût

Même dans des environnements BPF, les coûts associés à la production en grand volume de cellules différenciées restent très élevés. Une revue récente de Dadheech et al. (2025) met en évidence l'impact du coût des facteurs de croissance, de la complexité du contrôle qualité et de l'absence de milieux totalement définis sur la viabilité économique du modèle.

L'article de Silva et al. (2022) souligne également l'importance de mettre en œuvre des procédures respectant les exigences BPF, notamment via l'utilisation de SOPs, de systèmes fermés, et de contrôles qualité rigoureux, pour permettre une future transposition clinique.

2.7.5 Maturation fonctionnelle incomplète

La génération de cellules exprimant des marqueurs de β cellules (insuline+, C-peptide+) ne garantit pas leur fonctionnalité in vivo. Plusieurs études (Pollock et al., 2023; Velazco-Cruz et al., 2019;

Verhoeff et al., 2024) ont montré des réponses limitées au glucose ou une sécrétion d'insuline non régulée, révélant une maturation incomplète qui pourrait nuire à la transplantation thérapeutique. Ces défis récents justifient la poursuite d'efforts de recherche pour raffiner les protocoles, intégrer de nouvelles technologies de monitoring et développer des environnements de culture encore plus physiomimétiques.

Par ailleurs, les dispositifs d'encapsulation eux-mêmes peuvent contribuer à cette maturation incomplète. En effet, la réponse immunitaire chronique de l'hôte peut provoquer une fibrose péricapsulaire, limitant les échanges de nutriments et d'oxygène, et compromettant ainsi la viabilité et la fonctionnalité à long terme des cellules encapsulées. Krishnan, Langer et Anderson (2024) proposent une revue approfondie des approches matérielles émergentes pour surmonter ces obstacles, incluant l'usage de biomatériaux anti-inflammatoires, de membranes à perméabilité sélective et de structures tridimensionnelles biomimétiques. Leur analyse met en lumière le lien étroit entre le design des matériaux et le maintien de la fonctionnalité des cellules encapsulées dans des contextes cliniques.

2.8 Applications cliniques et perspectives en médecine régénérative

La différenciation pancréatique à partir de cellules souches pluripotentes humaines (hPSC) offre des perspectives majeures pour le traitement du diabète sucré, notamment le diabète de type 1 (DT1), caractérisé par la destruction auto-immune des cellules β pancréatiques. Alors que les options actuelles reposent sur l'insulinothérapie, elles ne permettent pas de restaurer une régulation physiologique de la glycémie, ni de prévenir les complications à long terme. Les thérapies cellulaires dérivées de hPSC visent à restaurer une sécrétion d'insuline glucose-dépendante, en remplaçant les cellules détruites chez les patients DT1. Plusieurs essais cliniques sont en cours, comme ceux menés par Vertex Pharmaceuticals (NCT04786262), évaluant la sécurité et l'efficacité de cellules souches différenciées en cellules β implantées chez l'humain (Krishnan, Langer, & Anderson, 2024) (Sali et al., 2025).

L'encapsulation des cellules souches différenciées offre une stratégie prometteuse pour traiter le diabète de type 1 sans recourir à l'immunosuppression systémique. En plus d'assurer la perméabilité aux nutriments et à l'insuline, elle protège les cellules implantées des attaques immunitaires.

Au laboratoire de Corrine Hoesli (Université McGill), un dispositif de macroencapsulation vascularisé a été développé pour améliorer le transport d'oxygène et limiter l'hypoxie — principal désavantage des systèmes classiques basés uniquement sur la diffusion (Fernandez et al., 2022). Ce système comprend un canal de perfusion central au sein d'un hydrogel d'alginate, permettant un apport en oxygène amélioré et démontrant, *in vitro*, une meilleure viabilité et répartition des cellules β dans les capsules. Ces avancées visent à renforcer la reproductibilité, la fonctionnalité et la compatibilité des capsules implantables. De plus, des approches intégrées sont étudiées pour augmenter la protection immunitaire:

- Édition génomique via CRISPR/Cas9 pour réduire l'expression des antigènes HLA, diminuant ainsi la visibilité des cellules par le système immunitaire de l'hôte (Tao et al., 2021).
- Co-transplantation avec des cellules mésenchymateuses (MSCs) pour moduler la réponse immunitaire et prévenir la fibrose péri capsulaire des implants (Wang et al., 2025).

Ces stratégies avancées renforcent le potentiel thérapeutique des cellules souches différenciées pour les patients atteints de diabète. Elles offrent des solutions innovantes à l'un des plus grands obstacles de la médecine régénérative : la compatibilité et la protection des cellules implantées contre les réponses immunitaires adverses, tout en maintenant leur fonctionnalité sur le long terme.

CHAPITRE 3 Matériels et méthodes

3.1 Cellules MIN6

Avant d'implémenter la culture tridimensionnelle (3D) pour des cellules souches pluripotentes humaines (hPSC), des études préliminaires ont été menées à l'aide de la lignée cellulaire MIN6. Cette lignée de cellules bêta pancréatiques murines est fréquemment utilisée comme modèle *in vitro* pour simuler certaines fonctions des cellules pancréatiques humaines, notamment la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. Bien qu'elles ne possèdent pas toutes les caractéristiques des cellules souches humaines, leur robustesse, leur facilité de culture et leur tolérance aux variations de conditions expérimentales en font un outil d'optimisation efficace pour les systèmes de culture 3D. Les cellules MIN6 présentent plusieurs différences notables par rapport aux cellules souches pluripotentes humaines (hPSC). Elles consomment davantage d'oxygène, utilisent des voies métaboliques distinctes pour produire de l'énergie, et possèdent une forte capacité d'adhésion leur permettant de croître sans recourir à des substrats comme le Matrigel. Elles démontrent également une grande robustesse en culture, étant capables de survivre plusieurs jours sans changement de milieu, ce qui en fait un modèle expérimental particulièrement résilient.

3.1.1 Culture 2D

Les cellules MIN6 ont été initialement cultivées en deux dimensions dans des flasques T75 non traitées (non-coated), dans un incubateur maintenu à 37 °C avec 5 % de CO₂. Les flasques étaientensemencées avec du milieu complet à base de DMEM (haute teneur en glucose et pyruvate), supplémenté avec 10 % de FBS, 1 % de Penicilline-Streptomycine, 1 % de L-glutamine, et 50 µM de β-mercaptoéthanol. Le changement de milieu était effectué tous les deux jours jusqu'à atteindre ~90 % de confluence.

3.1.2 Passage du 2D au 3D

Une fois la confluence atteinte, les cellules étaient détachées par un traitement enzymatique à l'aide de TrypLE (5 mL), incubé 5 minutes à 37 °C. L'action enzymatique était neutralisée par l'ajout de 10 mL de milieu complet. La suspension cellulaire était ensuite centrifugée (1200 RPM, 5 minutes), le surnageant était retiré, et les cellules étaient resuspendues dans du milieu frais. Une filtration à 0,2 µm était réalisée pour ne conserver que les cellules unitaires. La concentration était mesurée à

l'aide d'un compteur automatique. Un bioréacteur de 30 mL était ensuiteensemencé à une concentration de 3×10^5 cellules/mL. Le volume final était complété avec du milieu jusqu'à 30 mL.

3.1.3 Maintenance

La culture en suspension était maintenue sous agitation continue à 80 RPM dans un incubateur à 37 °C et 5 % de CO₂. Chaque jour, le bioréacteur était retiré de l'incubateur, laissé au repos pour permettre la sédimentation des agrégats (~10 min), puis 20 mL de surnageant étaient aspirés avec précaution. Le milieu était ensuite remplacé par un volume équivalent de milieu frais (20 mL).

Pour le suivi morphologique, une petite fraction de la culture (3–4 mL du fond du bioréacteur) était prélevée et transférée dans une plaque 6 puits pour imagerie microscopique standard et coloration de viabilité cellulaire. Concernant les analyses métaboliques, les 20 mL de surnageant retirés quotidiennement étaient centrifugés, puis le surnageant clarifié était aliquoté et congelé pour dosage du glucose, de la glutamine et du lactate. La taille des agrégats était également analysée à l'aide du logiciel CellProfiler. Le protocole complet est disponible en annexe C (SOP_MIN6).

3.2 Cellules H1

Suite aux résultats obtenus avec les cellules MIN6, le protocole de culture en suspension a été adapté aux cellules souches embryonnaires humaines H1, une lignée plus sensible, couramment utilisée pour la différenciation vers divers lignages cellulaires, y compris la lignée pancréatique. L'objectif était d'optimiser les conditions de culture 3D afin d'obtenir des agrégats homogènes, viables et compatibles avec l'induction vers l'endoderme définitif (stade 1).

3.2.1 Culture 2D

Les cellules H1 ont été cultivées en monocouche sur des plaques 6 puits préalablement enrobées de Matrigel. Le milieu utilisé pour la maintenance était le TeSR™-E8™ medium (Stemcell Technologies, Cat#05990). Les cellules étaient incubées à 37 °C dans une atmosphère contrôlée à 5 % de CO₂. Le changement de milieu était effectué tous les jours. Lorsque la confluence atteignait environ 90 %, les cellules étaient prêtes pour le passage en suspension 3D.

3.2.2 Passage du 2D au 3D

Avant le détachement, les cultures étaient lavées avec 1 mL de DPBS (Thermo Fisher Scientific, Cat#14190144) à température ambiante, puis incubées avec une solution d'EDTA préparée par dilution 1:1000 d'une solution mère à 0.5 M (Thermo Fisher Scientific, Cat#15400054), soit 1 μ L dans 1 mL de DPBS. Cette solution était ajoutée à raison de 1 mL par puits, suivie d'une incubation de 3 minutes à 37 °C. Après retrait de l'EDTA, 1 mL de milieu frais était ajouté, et les colonies étaient détachées doucement à l'aide d'un grattoir. Les agrégats récoltés étaient transférés dans un tube de 50 mL. Un échantillon (0,2 mL) était ensuite soumis à une dissociation secondaire avec TrypLE Express (Thermo Fisher Scientific, Cat#12604021) afin de produire des cellules unitaires, permettant ainsi la quantification via compteur cellulaire automatique (TC20). Chaque puits de la plaque 6 puits à fond non adhésif étaitensemencé avec 3×10^6 cellules dans un volume final de 5 mL de TeSR™-E8™ medium frais (Stemcell Technologies, Cat#05990). Un inhibiteur de ROCK (Y-27632, 5 μ L par puits) était ajouté pour les premières 24 heures afin de favoriser la survie cellulaire. La plaque était placée sur un mélangeur orbital à 90 RPM dans un incubateur à 37 °C, 5 % CO₂.

3.2.3 Maintenance stade 0

Après 24 heures de culture en suspension, les puits étaient transférés dans des tubes de 15 mL pour permettre la sédimentation des agrégats (5 minutes à température ambiante). Le surnageant était retiré autant que possible, puis remplacé par 5 mL de TeSR™-E8™ medium frais (Stemcell Technologies, Cat#05990). Les agrégats étaient ensuite remis en culture dans les plaques 6 puits. Les jours suivants, la maintenance était effectuée directement dans les plaques 6 puits en inclinant les plaques pour regrouper les agrégats. Environ 3 mL de milieu étaient prélevés en prenant soin d'éviter d'aspirer les agrégats, puis remplacés par un volume équivalent de TeSR™-E8™ medium frais (Stemcell Technologies, Cat#05990). Cette opération était répétée quotidiennement. Le suivi morphologique était réalisé par imagerie microscopique (contraste de phase), et la viabilité était vérifiée par coloration de viabilité cellulaire. Après quatre jours en suspension, la différenciation vers l'endoderme définitif était initiée.

3.2.4 Différenciation stade 1

Après quatre jours de culture en suspension (stade 0), la différenciation vers l'endoderme définitif (stade 1) était amorcée. Les agrégats étaient transférés dans des tubes de 15 mL, laissés au repos pendant 5 minutes pour permettre leur sédimentation, puis le surnageant était retiré autant que possible. Un total de 5 mL de milieu de différenciation (Stage 1 basal medium) contenant 3 μ M de CHIR-99021 et 100 ng/mL d'activine A était ajouté à chaque tube. Les agrégats étaient ensuite transférés dans les plaques 6 puits et remis en culture sur mélangeur orbital à 90 RPM.

Après 24 heures (jour 2), les agrégats étaient de nouveau transférés dans des tubes de 15 mL pour sédimentation. Le surnageant était retiré et remplacé par 5 mL de milieu contenant uniquement 100 ng/mL d'activine A.

Au jour 3, la maintenance était réalisée directement dans les plaques 6 puits en inclinant les puits, en retirant 3 mL de milieu avec précaution, puis en ajoutant 3 mL de milieu contenant encore 100 ng/mL d'activine A.

La progression de la différenciation était suivie par microscopie, coloration de viabilité cellulaire et cytométrie en flux ciblant le marqueur SOX17. Le protocole complet est fourni en annexe C (SOP_H1_3D).

3.3 Cellules iPSC

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) issues du Conseil national de recherches du Canada (CNRC) ont remplacé les cellules H1 dans les travaux expérimentaux principaux. Les cultures H1 ont servi de tests préliminaires afin de valider les conditions de base du protocole. Les iPSC ont ensuite été utilisées comme lignée principale pour la mise en œuvre du protocole de culture 3D et de différenciation en milieu mTeSR™1. Quelques ajustements spécifiques ont toutefois été apportés en raison de la sensibilité particulière de cette lignée et de ses besoins en adhérence et dissociation.

3.3.1 Culture 2D

La culture 2D des iPSC était réalisée sur des plaques 6 puits préalablement enrobées de Matrigel, avec une densité de recouvrement équivalente à 150 % de celle utilisée pour les cellules H1, afin d'assurer une meilleure adhésion cellulaire. Le milieu utilisé pour l'entretien était le mTeSR™ Plus medium (Stemcell Technologies, Cat#100-0276), remplacé quotidiennement. La culture était maintenue à 37 °C, 5 % CO₂.

3.3.2 Passage du 2D au 3D

Avant le détachement, les cultures 2D étaient lavées une fois avec 1 mL de DPBS (Thermo Fisher Scientific, Cat#14190144) à température ambiante. Le détachement s'effectuait ensuite à l'aide de ReLeSR (Stemcell Technologies, Cat#05872) selon une méthode sans action mécanique : 1 mL de ReLeSR était ajouté pendant 30 secondes, puis retiré complètement. La plaque était ensuite laissée à sec dans l'incubateur pendant 3 minutes. Après cette période, 1 mL de milieu frais était ajouté, et les colonies étaient récupérées doucement à l'aide d'une pipette de 1 mL ; les cellules se détachaient alors spontanément sans agitation.

Le comptage cellulaire était effectué après dissociation d'un échantillon. La suspension obtenue était ensuiteensemencée dans des plaques 6 puits de culture non adhésif à une densité équivalente à celle des cellules H1, avec addition de ROCK inhibitor pendant les 24 premières heures. Les paramètres de culture (RPM, volume, température) étaient conservés constants.

3.3.3 Maintenance

Après ensemencement, les plaques 6 puits étaient placées sur un mélangeur orbital à 90 RPM dans un incubateur à 37 °C et 5 % de CO₂. Après les premières 24 heures de culture, les contenus des puits étaient transférés dans des tubes de 15 mL pour permettre la sédimentation des agrégats pendant 5 minutes. Le surnageant était retiré autant que possible, puis 5 mL de milieu mTeSR™ Plus frais (Stemcell Technologies, Cat#100-0276) étaient ajoutés dans chaque tube. Les agrégats étaient ensuite remis dans les puits d'origine.

Les jours suivants, le changement de milieu était effectué directement dans les plaques. Chaque puits était incliné pour regrouper les agrégats, puis 3 mL de milieu étaient retirés avec précaution

pour éviter d'aspirer les agrégats, et remplacés par 3 mL de milieu mTeSR™ Plus frais (Stemcell Technologies, Cat#100-0276). Cette méthode permettait de préserver la structure des amas tout en assurant leur entretien.

3.3.4 Différenciation stade 1

La différenciation des iPSC a été initiée après seulement deux jours de culture en suspension (stade 0), afin d'optimiser la viabilité cellulaire et la compaction des agrégats. Elle a été testée dans le cadre d'un plan d'expérience de type Taguchi utilisant 9 conditions réparties sur une plaque 6 puits.

Le protocole de différenciation suivait ensuite les mêmes étapes que pour les cellules H1, avec remplacement du milieu au jour 2 (activine A seule), puis remplacement partiel au jour 3. L'analyse était effectuée par microscopie, coloration de viabilité cellulaire et cytométrie en flux.

3.4 Caractérisation des cultures

3.4.1 Cytométrie en flux

Les analyses de cytométrie en flux ont été réalisées sur les agrégats cellulaires issus des cultures 3D, à différents stades de différenciation. La procédure débute par la récolte complète du contenu des puits dans un tube de 15 mL, suivie d'une décantation passive permettant de laisser sédimenter les agrégats pendant environ 5 minutes à température ambiante. Le surnageant est retiré avec précaution, puis les agrégats sont lavés avec 3 mL de DPBS. Après une seconde sédimentation, le DPBS est retiré, et 1 mL de TrypLE est ajouté. Les tubes sont ensuite placés au bain-marie à 37 °C pendant 4 minutes. Une première resuspension est effectuée par pipetage avec une pipette de 1 mL, avant de replacer les échantillons au bain-marie pour 4 minutes supplémentaires. À l'issue de cette incubation, 2,5 mL de milieu complet sont ajoutés pour inhiber l'action du TrypLE. L'échantillon est centrifugé à 300 g pendant 5 minutes, puis le surnageant est retiré. Les cellules sont ensuite resuspendues dans un volume de milieu frais adapté à la confluence estimée (entre 1 et 5 mL). La suspension est filtrée à l'aide d'un filtre de 27 µm afin d'éliminer les agrégats et d'obtenir une population de cellules uniques. Le comptage cellulaire est ensuite réalisé à l'aide d'un compteur automatisé.

Après comptage, les concentrations sont notées et les cellules sont de nouveau centrifugées à 300 g pendant 5 minutes. Le culot est ensuite resuspendu dans du FBS pour réaliser un premier lavage, suivi d'une nouvelle centrifugation. Après un second lavage au FBS, les cellules sont resuspendues et réparties en deux fractions : une pour la coloration de viabilité cellulaire, l'autre non marquée. Pour les conditions destinées à la différenciation en stade 1, 200 000 cellules sont marquées et 600 000 non marquées ; pour les analyses en fin de stade 0 ou stade 4, 200 000 cellules sont colorées et 1 000 000 conservées non marquées. La coloration de viabilité cellulaire est ajoutée à la fraction concernée et incubée pendant 45 minutes à l'abri de la lumière. Les cellules sont ensuite lavées par centrifugation et resuspendues dans du FBS.

Toutes les fractions (marquées et non marquées) sont fixées par l'ajout d'un tampon de fixation (Fixation Buffer) et incubées 10 minutes dans le noir. Une nouvelle centrifugation est effectuée, puis les cellules sont resuspendues dans du FBS pour un lavage supplémentaire. À ce stade, le protocole peut être adapté avec une centrifugation accélérée (3 minutes à 500 g) puisque les cellules sont déjà fixées. Les échantillons sont ensuite perméabilisés à l'aide d'un tampon Perm/Wash, puis répartis dans une plaque 96 puits à fond en V à raison de 200 000 cellules par condition.

Les colorations intracellulaires sont réalisées à l'aide d'anticorps spécifiques : IgG isotypique (contrôle), SOX17, PDX1, NKX6.1 ou autres, selon le stade de différenciation. Les plaques sont incubées 1 heure dans le noir, puis centrifugées et lavées. Les cellules sont enfin resuspendues dans du FBS et transférées dans des tubes de 2 mL (FACS tubes) pour analyse sur un cytomètre de type BD FACSCanto II. Les données obtenues sont analysées à l'aide du logiciel FCS Express, en excluant les débris et les doublets, et en comparant les intensités de fluorescence aux contrôles isotypiques afin de quantifier les populations positives.

3.4.2 Coloration de viabilité cellulaire

L'évaluation de la viabilité cellulaire a été réalisée à l'aide d'une coloration de viabilité cellulaire adaptée à l'observation des agrégats en suspension. Un mélange de coloration a été préparé à l'abri de la lumière, en combinant 442 μ L de tampon HEPES, 50 μ L de milieu de culture, 7.5 μ L de propidium iodide (PI) et 0.5 μ L de Calcein AM. Ce mélange a été homogénéisé à l'aide d'un mélangeur à vortex, puis conservé sous protection aluminisée jusqu'à son utilisation.

Les agrégats ont été prélevés directement depuis la culture à l'aide d'une pipette de 200 μ L, puis transférés dans une plaque 6 puits non traitée (non-coated) afin de limiter leur adhérence. Le mélange de coloration a ensuite été ajouté aux puits contenant les agrégats, suivi d'une incubation de 20 minutes à température ambiante, dans l'obscurité.

L'imagerie a été effectuée par microscopie à fluorescence, en utilisant les filtres appropriés pour la détection du Calcein AM (canal FITC, signal vert pour les cellules vivantes) et du propidium iodide (canal TRITC, signal rouge pour les cellules mortes). Cette méthode a permis d'évaluer la viabilité globale des agrégats tout en préservant leur structure tridimensionnelle pour les analyses morphologiques complémentaires.

3.4.3 Analyse d'image (CellProfiler)

L'analyse de la taille et de la morphologie des amas de cellules MIN6, H1 et iPSC a été effectuée à l'aide du logiciel CellProfiler (version 4.2.8). Ces modules ont été conçus pour identifier automatiquement les agrégats dans des images en contraste de phase et en extraire les diamètres ainsi que des métriques de circularité, afin d'évaluer la qualité de la culture cellulaire en suspension 3D.

1. Conversion en niveaux de gris (Module : ColorToGray)

Cette étape permet de convertir les images RGB issues du microscope en images en niveaux de gris. Les trois canaux (rouge, vert, bleu) sont combinés avec un poids égal pour produire une image monochrome uniforme.

2. Inversion de contraste (Module : ImageMath)

Une opération d'inversion est appliquée aux images en niveaux de gris afin que les amas apparaissent plus brillants que le fond, ce qui améliore l'efficacité du seuillage adaptatif. Cette manipulation prépare les images à une meilleure détection par CellProfiler.

3. Correction de l'éclairage (Module : CorrectIlluminationCalculate & CorrectIlluminationApply)

Ces modules corrigent les hétérogénéités de l'éclairage sur les images. L'image d'éclairage est calculée (par méthode de filtre médian) pour chaque champ, puis appliquée en divisant l'image prétraitée. Cette étape est essentielle pour assurer une segmentation homogène des objets.

4. Ajustement des niveaux d'intensité (Module : RescaleIntensity)

Cette étape ajuste dynamiquement les niveaux d'intensité afin que la plage de pixels s'étende entre les valeurs minimales et maximales. Cela maximise le contraste entre les objets et le fond.

5. Segmentation des objets primaires (Module : IdentifyPrimaryObjects)

Cette étape est la plus critique du pipeline. Elle permet de segmenter les objets d'intérêt, ici les amas cellulaires. Les paramètres utilisés incluent :

- Algorithme de seuillage : Otsu adaptatif ou « Robust Background » selon l'image
- Diamètre minimal et maximal des objets : variable selon la résolution, typiquement entre 20 et 150 pixels
- Suppression des objets en contact avec les bords
- Application optionnelle d'un algorithme de « watershed » pour séparer les amas fusionnés

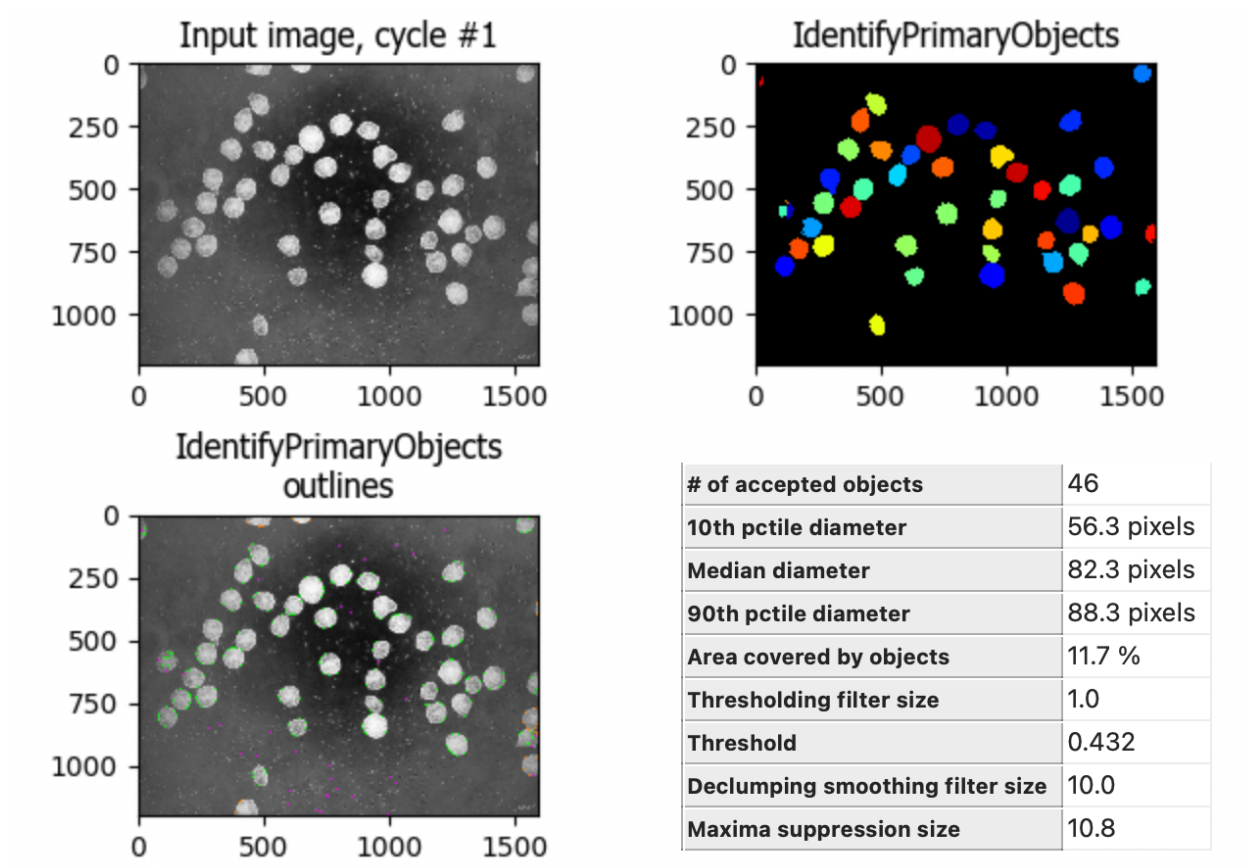


Figure 3.1 Exemple d'identification primaire pour les cellules H1

6. Mesure des caractéristiques morphologiques (Module : MeasureObjectSizeShape)

Cette étape mesure plusieurs caractéristiques morphologiques des objets segmentés, notamment :

- Aire (en pixels)
- Diamètre estimé (calculé à partir de l'aire)
- Circularité (FormFactor) : métrique allant de 0 (forme allongée) à 1 (cercle parfait)

7. Filtrage des objets (Module : FilterObjects)

Cette étape permet de conserver uniquement les objets ayant une circularité supérieure à un seuil donné (ex. : FormFactor ≥ 0.5). Cela permet d'éliminer les débris, objets flous ou partiellement segmentés.

8. Exportation des données (Module : ExportToSpreadsheet)

Les données obtenues sont exportées au format CSV pour analyse statistique. Une conversion de pixels en micromètres a été appliquée à partir de la calibration : 450 pixels = 1000 μm , soit un facteur de 2.22 $\mu\text{m}/\text{pixel}$. Les données ont ensuite été filtrées sous Python pour conserver uniquement les objets ayant :

- Un diamètre estimé compris entre 40 et 110 μm
- Une circularité (FormFactor) supérieure ou égale à 0.5

3.4.4 Analyse statistique

L'optimisation du protocole de différenciation au stade 1 a été réalisée à l'aide d'un plan d'expérience de type Taguchi L9, généré avec le logiciel Statistica 14. Trois facteurs ont été sélectionnés pour cette optimisation : la concentration en activine A (50, 100 ou 150 ng/mL), la concentration en CHIR-99021 (1.5, 3.0 ou 4.5 μM), et la durée du traitement (3, 4 ou 5 jours). Le tableau suivant présente les combinaisons testées ainsi que les pourcentages de cellules exprimant SOX17 pour chaque condition.

La méthode Taguchi repose sur l'utilisation de matrices orthogonales qui permettent d'évaluer l'effet principal de chaque facteur tout en minimisant le nombre d'essais requis. Cette approche est particulièrement avantageuse dans un contexte biologique où les expérimentations sont coûteuses, longues, et parfois sensibles à la variabilité. Elle permet d'identifier rapidement les variables influentes et de discriminer celles qui ont un effet négligeable. Toutefois, la méthode présente certaines limitations : elle n'intègre pas d'évaluation systématique des effets croisés entre facteurs, ce qui peut s'avérer restrictif dans des systèmes biologiques complexes où les interactions sont fréquentes. De plus, bien que plusieurs niveaux soient testés, la méthode ne cherche pas à modéliser des relations continues ou linéaires entre les niveaux des facteurs ; chaque niveau est traité comme une modalité catégorielle indépendante. L'analyse repose principalement sur la comparaison des moyennes observées, sans ajustement par régression ou interpolation. Si davantage de temps avaient été disponibles, un plan factoriel complet aurait pu

être envisagé en second temps, ciblant uniquement les facteurs identifiés comme significatifs par le plan Taguchi, afin d’approfondir l’analyse statistique, d’explorer d’éventuelles interactions, et de modéliser plus précisément la réponse biologique en fonction des combinaisons testées.

Tableau 1 Plan d’expérience Taguchi L9 utilisé pour l’optimisation du stade 1.

Puits	Activine A (ng/mL)	Durée (jours)	CHIR-99021 (μ M)
1	50	3	1.5
2	50	4	3.0
3	50	5	4.5
4	100	3	3.0
5	100	4	4.5
6	100	5	1.5
7	150	3	4.5
8	150	4	1.5
9	150	5	3.0

Les résultats expérimentaux ont ensuite été analysés dans un environnement Jupyter Notebook en utilisant le langage R. Les pourcentages de cellules SOX17, déterminés par cytométrie en flux via le logiciel FCS Express (après sélection des cellules simples et vivantes), ont servi de variable dépendante pour une analyse de variance (ANOVA univariée). L’objectif était d’identifier les effets significatifs des trois facteurs étudiés sur l’expression de SOX17. Les distributions des résultats ont été visualisées à l’aide de « boxplots » par facteur, générés dans R, permettant une lecture intuitive des tendances observées.

3.5 Méthodologie de mise à l’échelle des bioréacteurs

3.5.1 Introduction générale (contexte et objectifs)

La mise à l’échelle (scale-up) en bioréacteur vise à reproduire la performance obtenue à petite échelle (viabilité, distribution de tailles d’agrégats, marqueurs tels que SOX17 au stade 1, productivité/qualité) dans des volumes supérieurs, tout en maîtrisant l’hydrodynamique et le transfert d’oxygène. L’enjeu essentiel est d’éviter les dérives liées au changement d’échelle : gradients (O_2 , nutriments, pH), cisaillement excessif entraînant fragmentation ou nécrose, fusion d’agrégats par mélange insuffisant, et difficultés de contrôle (pH, DO, antifoam).

Philosophie générale :

Définir, à petite échelle, une fenêtre opératoire sûre (plages d'agitation et d'aération) qui préserve la morphologie/viabilité et assure l'approvisionnement en O₂.

Choisir un invariant de montée d'échelle pertinent (p. ex. vitesse en bout de pale, puissance volumique, débit de pompage ramené au volume, ou kLa/OTR) en fonction du facteur limitant (cisaillement, O₂, homogénéité).

Transposer cet invariant au volume supérieur, puis ajuster le gazage et les consignes de contrôle pour retrouver la même « signature de procédé » (même qualité cellulaire et mêmes indicateurs procédé).

Cette section présente d'abord les paramètres et relations utiles (Section 2), puis un plan d'étapes concis pour conduire la montée d'échelle (Section 3).

3.5.2 Paramètres et relations de mise à l'échelle

Régimes d'écoulement et nombres sans dimension :

Nombre de Reynolds (Re) — situe le régime d'écoulement et conditionne les corrélations d'agitation :

$$Re = \frac{\rho N D^2}{\mu}$$

Où ρ est la masse volumique (kg·m⁻³), μ la viscosité (Pa·s), N la vitesse d'agitation (s⁻¹) et D le diamètre de l'hélice (m).

Nombre de Froude (Fr) — important avec gazage et phénomènes gravitaires (remontée de bulles, puits de gaz) :

$$Fr = \frac{N^2 D}{g}$$

Où g est l'accélération de la pesanteur ($\text{m}\cdot\text{s}^{-2}$)

Ces nombres aident à interpréter les corrélations et à savoir si une relation (p. ex. puissance) est applicable au régime considéré.

Agitation, mélange et circulation :

Vitesse en bout de pale — indicateur simple du niveau de cisaillement typique près de l'impulseur :

$$V = \pi ND$$

Où N est en s^{-1}

Puissance volumique — relie l'agitation à l'énergie dissipée par unité de volume (clé pour mélange et kLa) :

$$\frac{P}{V} \propto N^3 D^2$$

À P/V constant, on retrouve souvent des kLa comparables si le gazage est ajusté à l'échelle.

Taux de pompage du liquide par l'agitateur — quantifie la recirculation induite par l'hélice (homogénéité, additions)

$$Q \propto ND^3$$

Garder Q constant est une stratégie de scale-up efficace pour conserver l'homogénéité et le profil de mélange.

Temps de mélange (t_{mix}) — doit rester court devant les constantes de temps biologiques

$$t_{\text{mix}} \propto \frac{1}{N} \left(\frac{D_{\text{cuve}}}{D_{\text{hélice}}} \right)^{\alpha} \quad (\alpha \approx 1 \text{ à } 2)$$

Cisaillement et micro-hydrodynamique :

Dissipation d'énergie spécifique — Elle représente l'énergie dissipée par unité de masse de fluide ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-3}$):

$$\varepsilon = \frac{P}{\rho V}$$

Où P est la puissance d'agitation fournie par l'impulseur (W), ρ la masse volumique du milieu ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$), V le volume de travail du bioréacteur (m^3).

Échelle de Kolmogorov (η) — compare l'échelle des tourbillons dissipatifs au diamètre d'agrégat. Déterminer la puissance requise pour que l'échelle de Kolmogorov demeure plus grande que 2/3 fois la taille moyenne des cellules.

$$\eta = \left(\frac{v^3}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{4}}$$

Où ν est la viscosité cinématique du fluide et ε la dissipation d'énergie spécifique.

Taux de cisaillement — permet d'estimer l'intensité des contraintes hydrodynamiques auxquelles les agrégats cellulaires sont exposés.

Le taux de cisaillement moyen peut être approché de deux façons. La première consiste à exprimer

$$\gamma \approx \frac{V}{j}$$

où V est la vitesse en bout de pale et le j correspond à la distance entre la pale et la paroi ou le fond de la cuve.

La seconde approche est donnée par

$$\gamma \approx \left(\frac{\varepsilon}{\nu}\right)^{\frac{1}{2}}$$

où ε est la dissipation spécifique et $\nu = \mu/\rho$ représente la viscosité cinématique du fluide, avec μ la viscosité dynamique.

3.5.3 Étapes de la mise à l'échelle

La première étape consiste à définir, à petite échelle, la fenêtre opératoire du procédé. Cela signifie préciser les critères de performance qui doivent être respectés, tels que la viabilité minimale des cellules, le pourcentage de différenciation attendu pour un marqueur comme SOX17 au stade 1, le diamètre cible des agrégats, ainsi que les seuils à respecter pour la concentration en oxygène dissous. Ces repères constituent la base de comparaison pour les volumes supérieurs.

Ensuite, il est nécessaire de choisir un invariant de mise à l'échelle en fonction du facteur limitant identifié. Si les cellules ou les agrégats sont sensibles aux contraintes mécaniques, on privilégiera un invariant basé sur la vitesse en bout de pale ou sur la dissipation d'énergie spécifique. Si l'enjeu principal est l'apport en oxygène, on choisira plutôt de maintenir constante la puissance volumique ou le coefficient global de transfert d'oxygène. Enfin, si la difficulté concerne l'homogénéité du milieu et l'évitement de gradients, il est alors pertinent de conserver constant le taux de circulation.

La troisième étape consiste à transposer l'invariant choisi au volume supérieur, en tenant compte de la géométrie réelle du bioréacteur. Le débit de gaz doit ensuite être ajusté de manière à retrouver le même coefficient global de transfert d'oxygène et donc la même capacité à répondre à la consommation des cellules.

Une fois les conditions transposées, il faut valider expérimentalement que la culture se comporte comme attendu. Cette validation passe par la mesure du temps de mélange, le suivi de la concentration en oxygène dissous, l'évaluation de la distribution de tailles des agrégats, ainsi que l'analyse de la viabilité cellulaire et des marqueurs de différenciation comme SOX17. Toute divergence par rapport à la fenêtre définie en petit volume doit être corrigée par un ajustement des paramètres opératoires.

Enfin, lorsque des conditions fiables sont établies, elles doivent être formalisées sous forme de procédures opératoires normalisées incluant des critères d'acceptation clairs. Ceux-ci peuvent porter sur la vitesse en bout de pale, la puissance volumique, le taux de circulation, le coefficient global de transfert d'oxygène ou la concentration minimale d'oxygène dissous acceptable. Ces mêmes étapes sont ensuite répétées à chaque nouveau palier de mise à l'échelle jusqu'au volume final.

CHAPITRE 4 Résultats

4.1 Culture des cellules MIN6

Les cellules MIN6, une lignée murine de cellules bêta pancréatiques, ont été utilisées pour valider les conditions expérimentales de culture en suspension 3D et pour tester les outils d'analyse d'agrégats. Ces essais préliminaires ont permis d'optimiser les paramètres de culture tels que le volume de milieu, la vitesse d'agitation et les méthodes d'analyse morphologique, tout en offrant un modèle simple pour observer l'évolution structurale des agrégats en conditions contrôlées. Les observations recueillies ont servi de base au développement des protocoles applicables aux cellules souches humaines.

4.1.1 Distribution de taille

L'évolution morphologique des agrégats MIN6 a été suivie sur une période de quatre jours en culture 3D dans un bioréacteur de 30 mL. Les images en contraste de phase présentées à la Figure 4.1 montrent une croissance continue des agrégats entre J1 et J3, accompagnée d'une augmentation visible de leur diamètre moyen et d'une meilleure compaction des structures sphéroïdales. À J4, une rupture de tendance est observée : plusieurs petits agrégats apparaissent, coexistant avec quelques gros restes compacts. Ce changement morphologique suggère une dissociation des structures initiales devenues trop grandes pour rester stables. Ce phénomène pourrait s'expliquer par des contraintes mécaniques accrues ou par des limitations en nutriments ou en oxygène au cœur des agrégats.

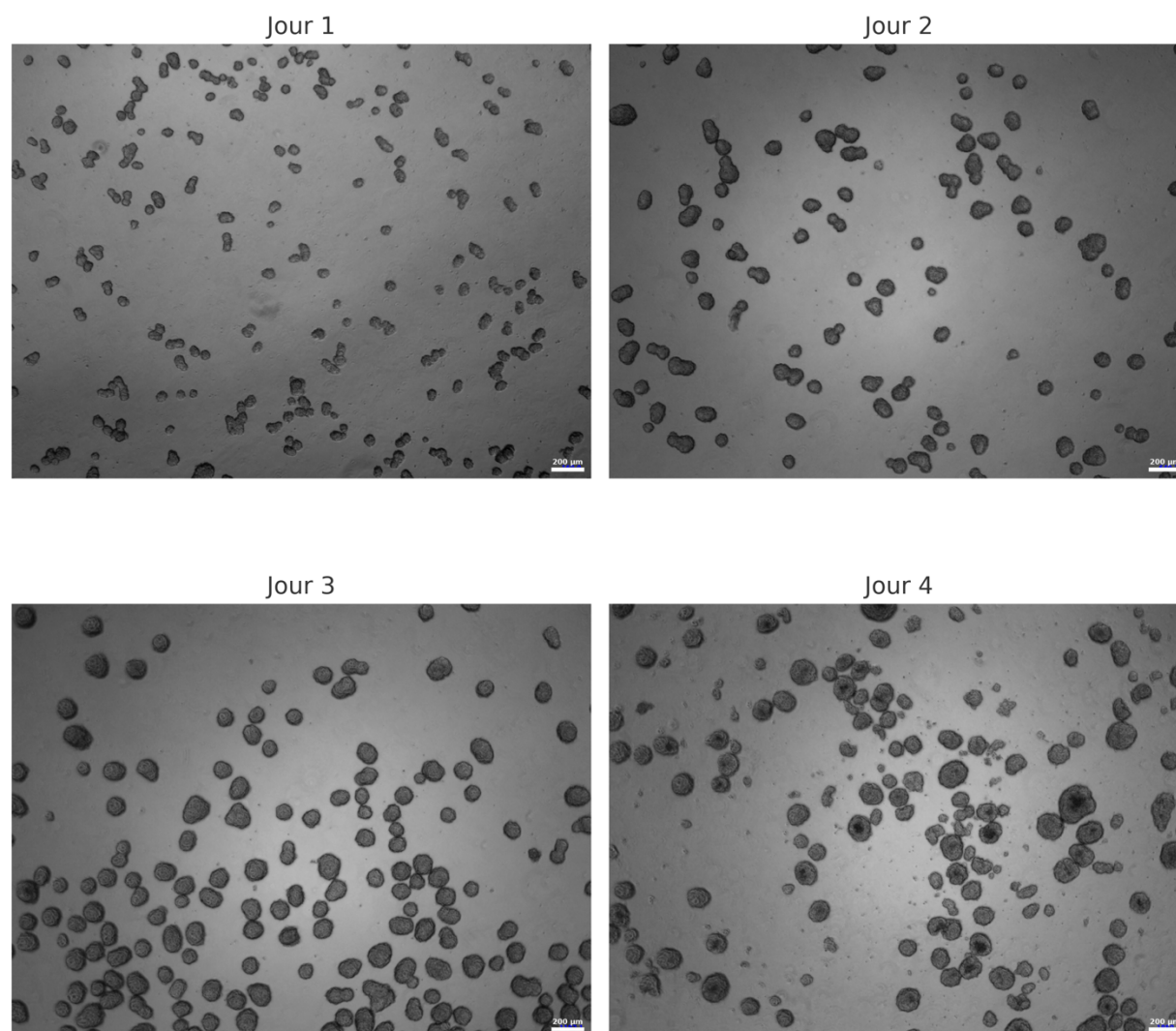


Figure 4.1 Observation des agrégats de cellules MIN6 (J1 à J4). Croissance visible jusqu'au Jour 3, suivie d'une fragmentation au jour 4 avec apparition de petits agrégats. Échelle : 200 µm.

La Figure 4.2 montre la distribution des diamètres mesurés (μm) sous forme de graphiques en violon pour les trois répétitions indépendantes. On y observe une augmentation progressive de la médiane et de la dispersion entre le Jour 1 et le jour 3. Au jour 4, la distribution devient asymétrique et parfois bimodale, avec l'émergence d'une population importante de petits agrégats. Cette dynamique confirme visuellement l'hypothèse d'une fragmentation partielle en fin de culture.

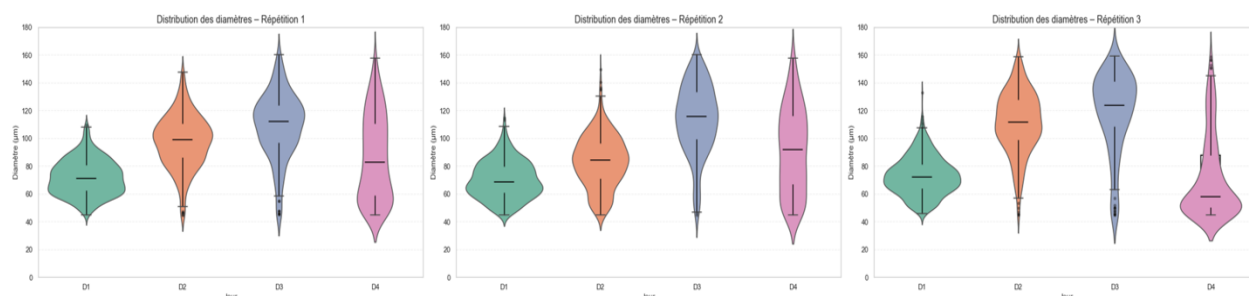


Figure 4.2 Distribution des diamètres des agrégats de cellules MIN6 du jour 1 à 4

Enfin, la Figure 4.3 présente les histogrammes de répartition des diamètres pour chaque répétition. Cette représentation permet de comparer la répartition des tailles de façon plus granulaire. Dans les trois cas, on note une nette augmentation de la proportion d'agrégats de petite taille au jour 4, renforçant l'observation d'une dissociation tardive. La tendance est constante d'une répétition à l'autre, ce qui confirme la robustesse du phénomène.

Histogrammes des diamètres pour chaque jour – Répétitions 1 à 3

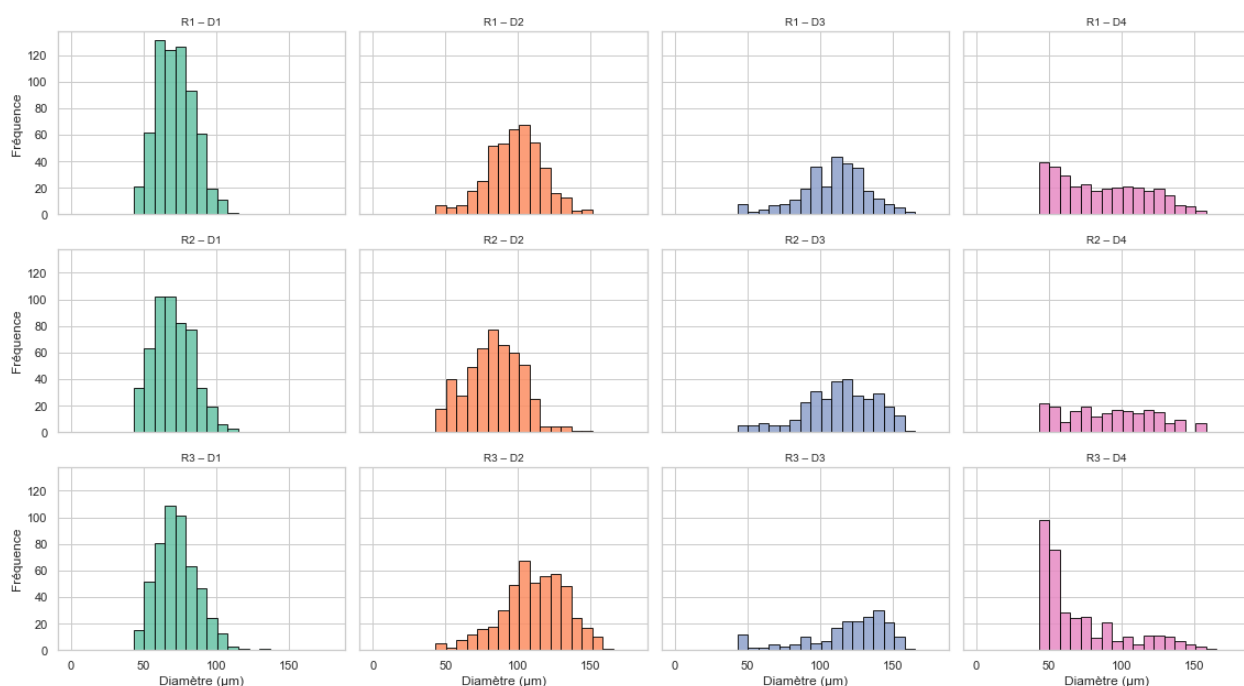


Figure 4.3 Histogrammes des diamètres des agrégats MIN6 de J1 à J4

4.1.2 Mesure de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été évaluée au jour 4 de la culture 3D des agrégats MIN6 à l'aide d'une coloration de viabilité cellulaire combinant Calcein AM (FITC) et PI (TRITC). Comme illustré à la Figure 4.4, la majorité des cellules présente une fluorescence verte, indiquant une membrane cellulaire intacte et donc une bonne viabilité. Quelques cellules mortes sont visibles en rouge, principalement en périphérie des agrégats. Deux champs visuels représentatifs ont été sélectionnés pour illustrer la distribution des cellules vivantes et mortes. Ces observations suggèrent que les conditions de culture permettent un maintien global de la viabilité cellulaire au jour 4, malgré la taille croissante des agrégats.

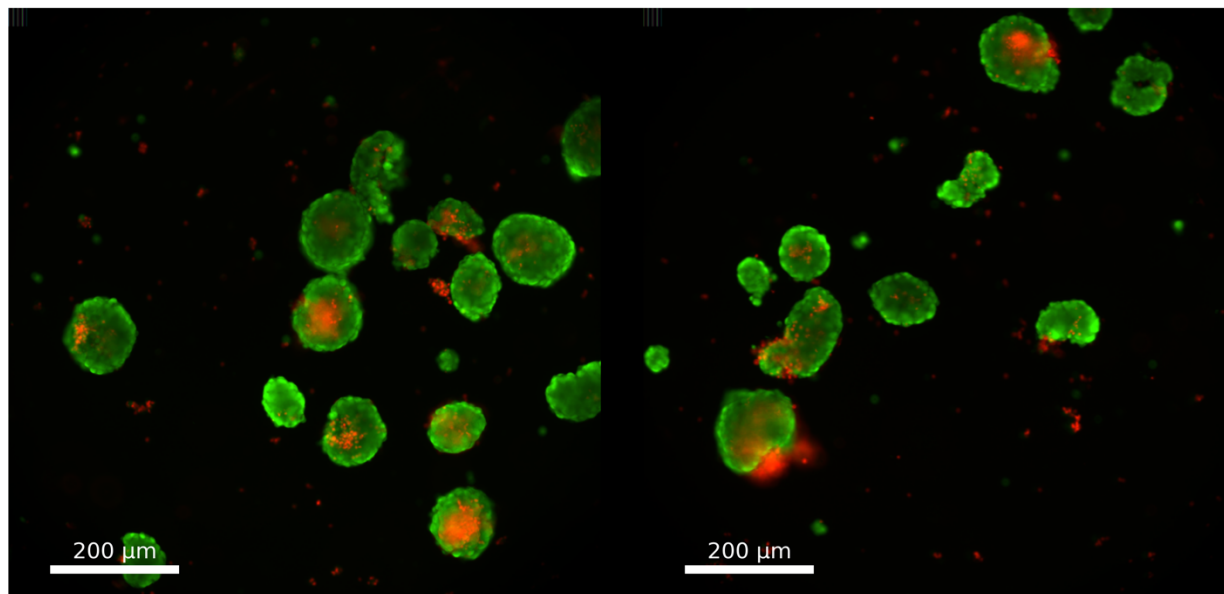


Figure 4.4 Coloration de viabilité cellulaire d'agrégats de cellules MIN6 au jour 4. Chaque image combine les signaux FITC (cellules vivantes, vert) et TRITC (cellules mortes, rouge). Barres d'échelle = 200 μm .

4.2 Culture des cellules H1

Les cellules souches embryonnaires humaines H1 ont été utilisées comme lignée de référence pour l'établissement d'un protocole de différenciation pancréatique en 3D. Les résultats présentés dans cette section visent à évaluer la capacité des H1 à former des agrégats viables, à survivre au passage en 3D et à répondre aux inducteurs du stade 1 (endoderme définitif). L'analyse de l'expression de marqueurs spécifiques tels que SOX17 a permis de caractériser l'efficacité des différentes conditions testées.

4.2.1 Distribution de taille

L'évolution morphologique des agrégats formés à partir des cellules H1 a été suivie par microscopie optique sur trois jours (Figure 4.5). Dès le jour 1, on observe des amas sphériques bien individualisés, d'un diamètre moyen avoisinant les 140 μm . Au jour 2, les agrégats apparaissent visiblement plus grands, confirmant une phase de croissance active. Le jour 3 poursuit cette tendance avec des diamètres plus élevés, sans signe évident de dissociation. La structure des agrégats reste homogène tout au long de la période observée. Les différences de densité apparente

entre les images résultent principalement de la sélection des champs de vision et non d'une variation du nombre total de amas.

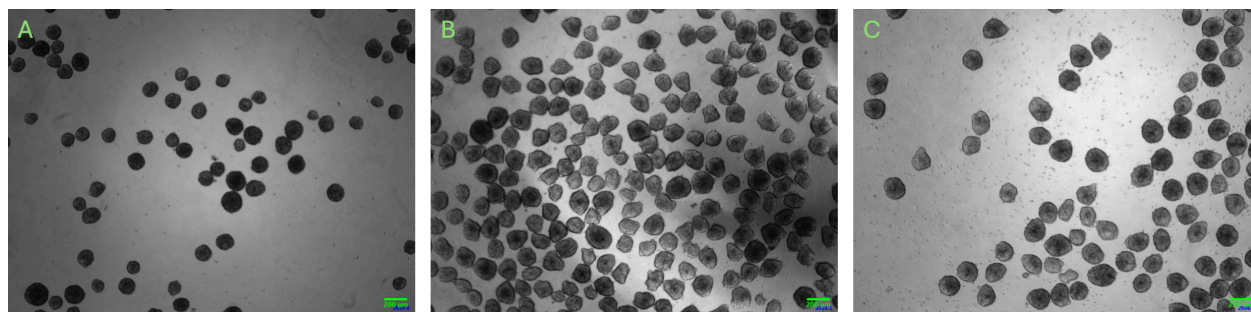


Figure 4.5 Images représentatives des agrégats cellulaires formés à partir des cellules H1 durant les trois premiers jours de culture en suspension 3D. **A.** Jour 1, **B.** Jour 2, **C.** Jour 3. Échelle : 200 μm .

La quantification des diamètres des agrégats sur trois jours de culture a permis d'évaluer leur dynamique de croissance (Figures 4.6 à 4.8). Les diagrammes en violon (Figure 4.6) montrent une augmentation nette et progressive de la taille des amas entre le jour 1 et le jour 3. Cette tendance est confirmée par les histogrammes de distribution (Figure 4.7), qui indiquent un déplacement des diamètres vers des valeurs plus élevées, avec une réduction notable des petits agrégats au fil du temps. L'évolution du diamètre moyen (Figure 4.8) souligne cette croissance soutenue, avec une augmentation d'environ 30 μm par jour. Malgré cette croissance, l'uniformité des diamètres est bien conservée d'un jour à l'autre, illustrant un processus de formation de sphéroïdes stable et reproductible dans les conditions de culture 3D utilisées.

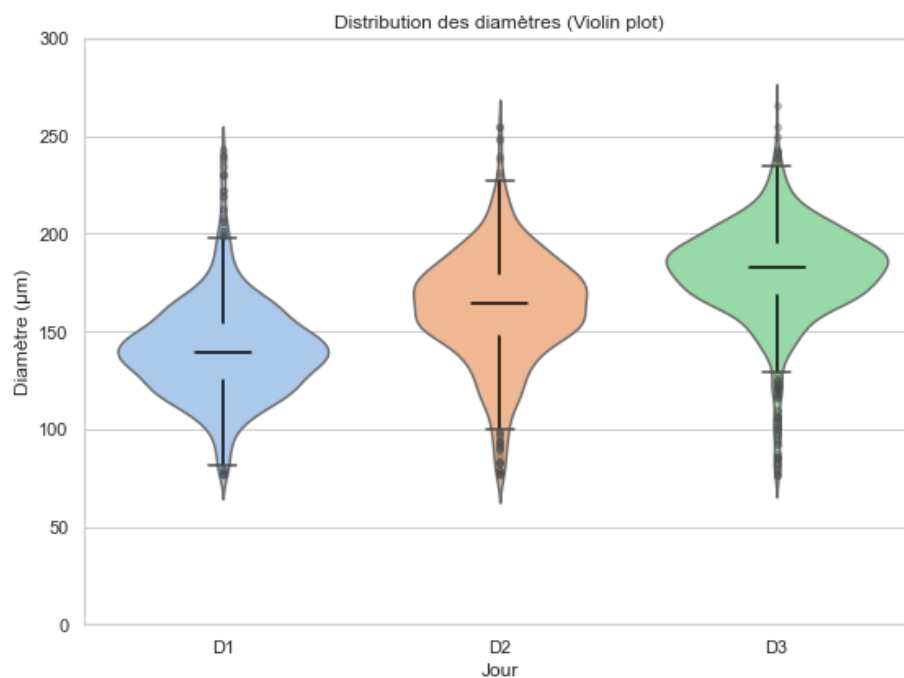


Figure 4.6 Diagrammes en violon illustrant la distribution des diamètres d'agrégats de cellules H1 aux jours 1, 2 et 3.

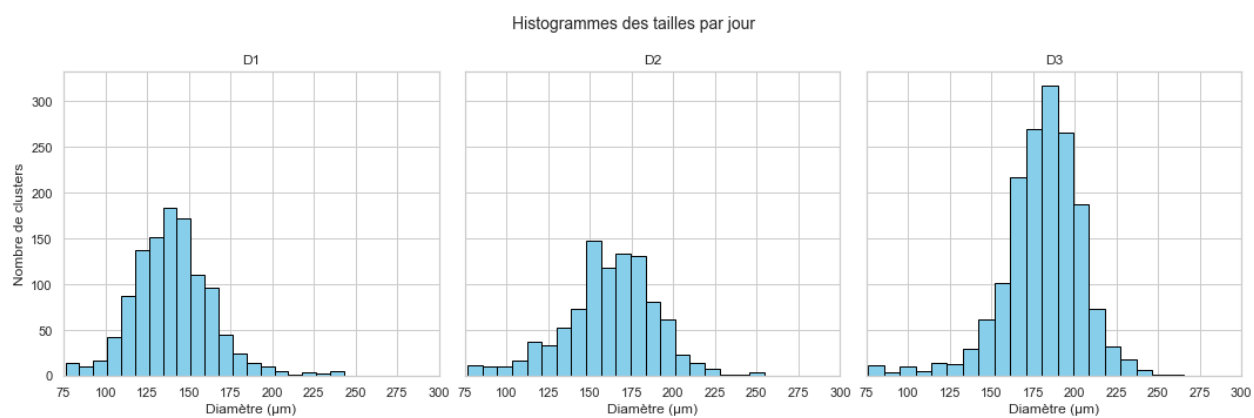


Figure 4.7 Histogrammes de fréquence des diamètres des agrégats de cellules H1 pour chaque jour.

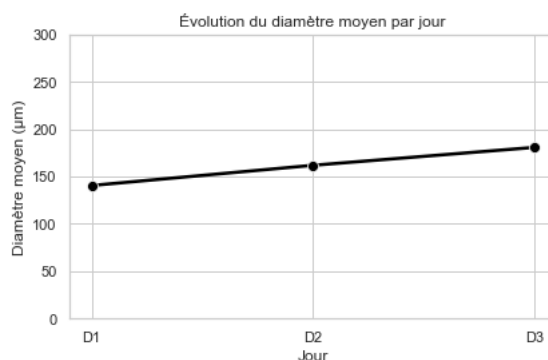


Figure 4.8 Évolution du diamètre moyen des agrégats H1 entre le jour 1 et le jour 3. La croissance est linéaire et soutenue.

4.2.2 Résultats de différenciation vers l'endoderme définitif

L'image présentée à la Figure 4.10 illustre l'aspect morphologique typique des agrégats au jour 3 du stade 1. Les agrégats sont globalement bien formés, mais certains présentent une forme légèrement irrégulière et des stries visibles en leur sein. Ces marques suggèrent une différenciation qui n'est pas parfaitement homogène à l'intérieur de chaque agrégat, possiblement en raison de gradients de diffusion des facteurs ou d'une organisation cellulaire interne en réarrangement. Malgré cela, aucun signe de nécrose ou de fragmentation n'a été observé, indiquant que les conditions de culture ont permis de maintenir la viabilité et l'intégrité structurale jusqu'à la fin du protocole différenciateur.

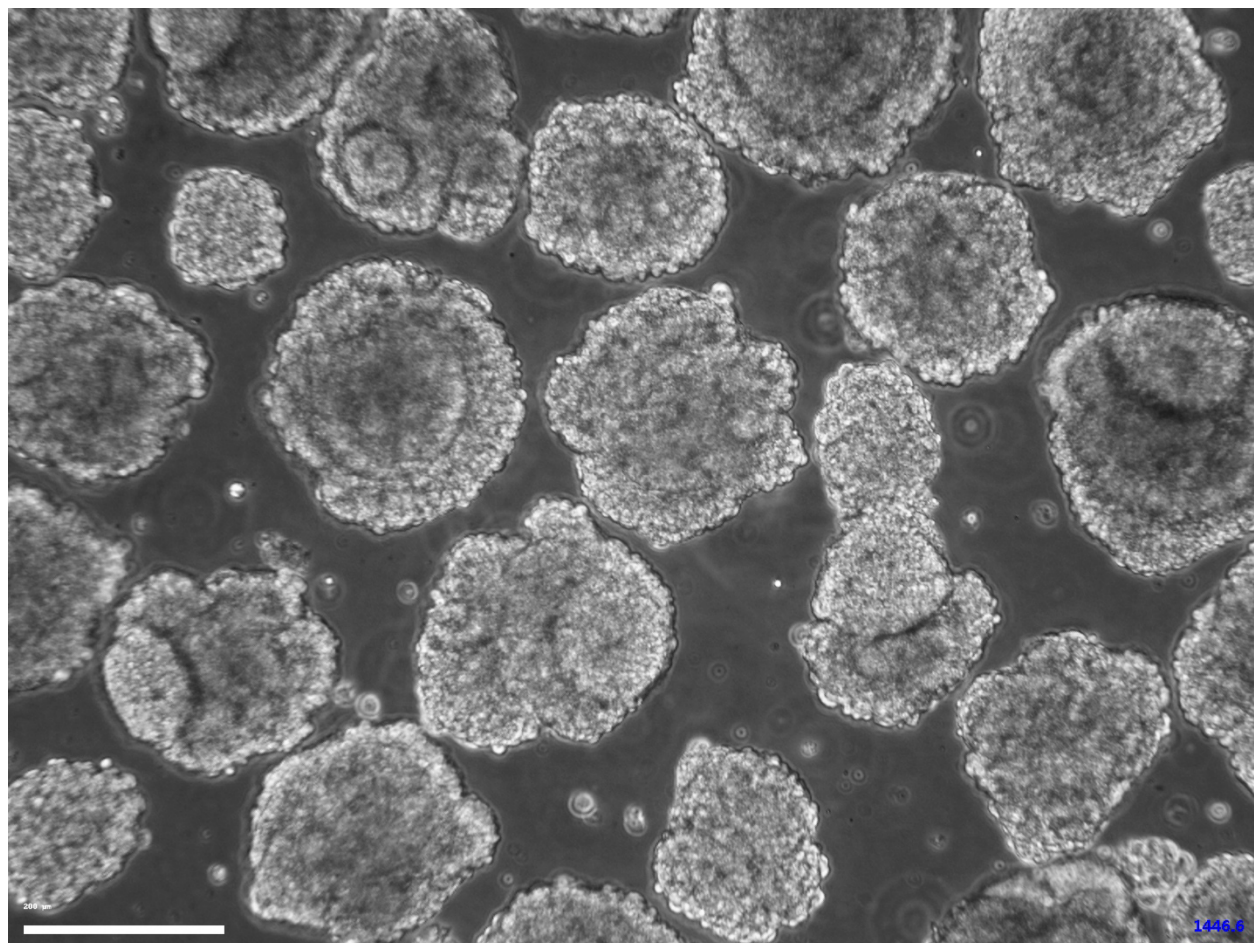


Figure 4.9 Image représentative d'agrégats de cellules H1 au jour 3 du stade 1 (objectif 10×). Barre d'échelle: 200 μm .

Afin de confirmer l'efficacité de la différenciation endodermique, les cellules issues de deux essais indépendants (H1-essai 1 et H1-essai 2) ont été analysées par cytométrie de flux à la fin du stade 1. Les cellules simples viables ont été sélectionnées à l'aide d'un marquage de viabilité cellulaire, suivi d'un marquage intracellulaire de SOX17.

Les deux essais montrent une induction robuste du marqueur SOX17, avec 86,89 % de cellules positives dans H1-essai 1 et 80,89 % dans H1-essai 2. Ces taux élevés confirment que le protocole appliqué favorise efficacement l'engagement des cellules vers la lignée endodermique. La viabilité élevée (96,00 % et 91,56 %) démontre aussi que les conditions de culture n'induisent pas de stress cellulaire majeur durant la transition.

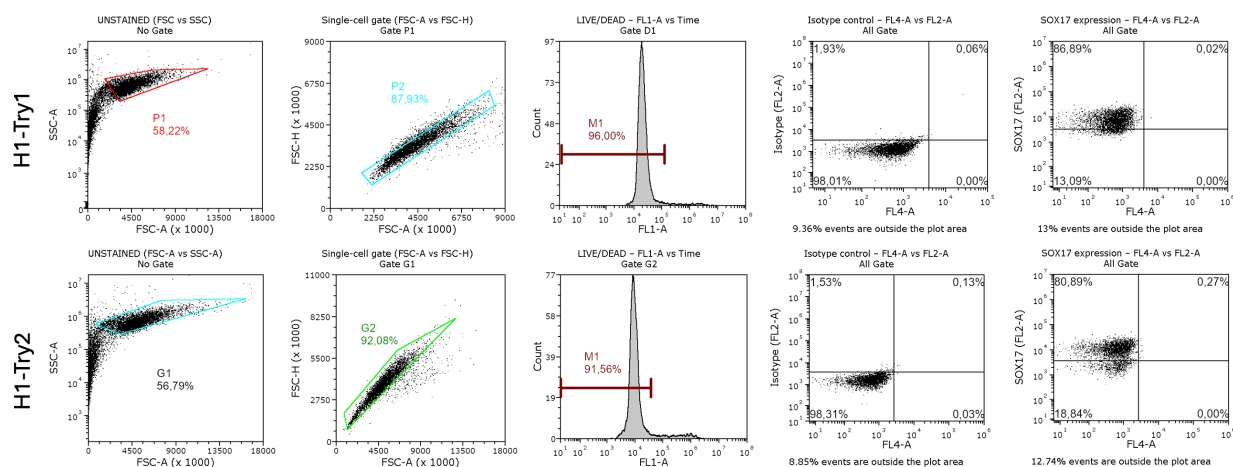


Figure 4.10 Analyse par cytométrie de flux de l'expression de SOX17 à la fin du stade 1 pour les essais H1-essai 1 et H1-essai 2.

4.2.3 Tentative de différenciation au stade 4

Au jour 4 du stade 4 de différenciation, l'observation morphologique des agrégats de cellules H1 révèle une organisation sous-optimale. Comme illustré à deux grossissements (4× à gauche, 10× à droite), les agrégats présentent des formes irrégulières, une compaction réduite et plusieurs signes de fusion inter-agrégats. Ces fusions compromettent la définition des structures sphéroïdales attendues à ce stade de la différenciation pancréatique.

Cette dégradation morphologique peut résulter de plusieurs facteurs, dont l'adaptation inadéquate du protocole 2D à un format 3D, une densité cellulaire excessive, ou encore l'absence d'inhibiteur de ROCK aux stades critiques. Ces résultats soulignent l'importance d'une optimisation spécifique aux conditions tridimensionnelles pour assurer le maintien de l'intégrité et la fonctionnalité des structures différenciées.

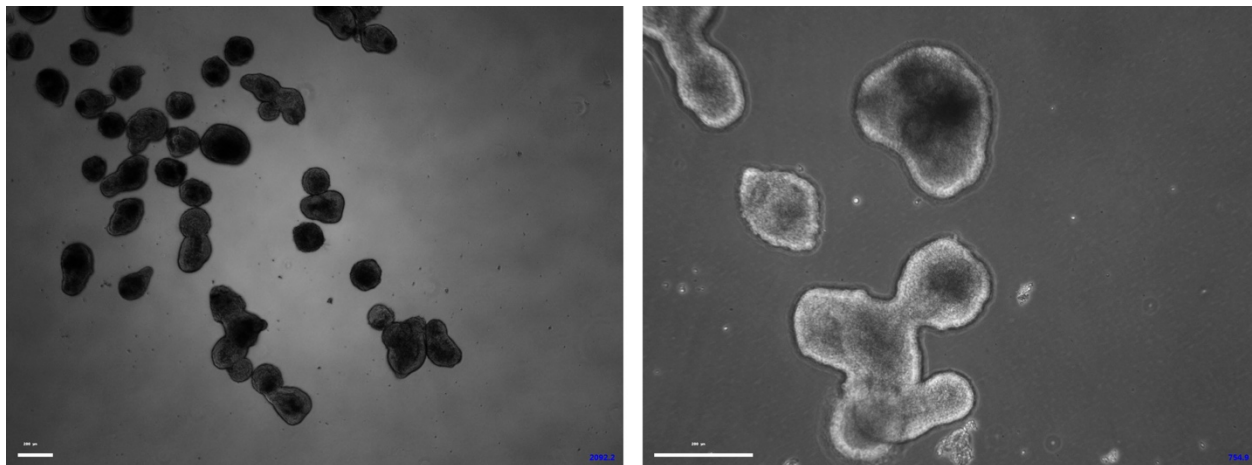


Figure 4.11 Agrégats de cellules H1 au jour 4 du stade 4, observés à 4× (gauche) et 10× (droite). Barre d'échelle : 200 μm .

4.2.4 Mesure de viabilité cellulaire

Afin d'évaluer la viabilité cellulaire durant la progression de la différenciation, des colorations de viabilité cellulaire ont été réalisées aux jours clés des stades 1 à 4 pour les cellules H1. Les images montrent une excellente viabilité tout au long du processus, avec une forte fluorescence verte (Calcein AM) indiquant la présence de cellules métaboliquement actives, et une quasi-absence de signal rouge (iodure de propidium, PI) signalant des cellules mortes. La densité cellulaire élevée visible à chaque stade reflète également la bonne adhérence et prolifération des agrégats dans les conditions expérimentales. Malgré l'absence d'un marqueur direct de différenciation sur ces images, les observations confirment que les conditions de culture n'ont pas compromis la survie des cellules, suggérant que la faible efficacité de différenciation observée dans d'autres analyses n'est pas attribuable à une mortalité cellulaire excessive.

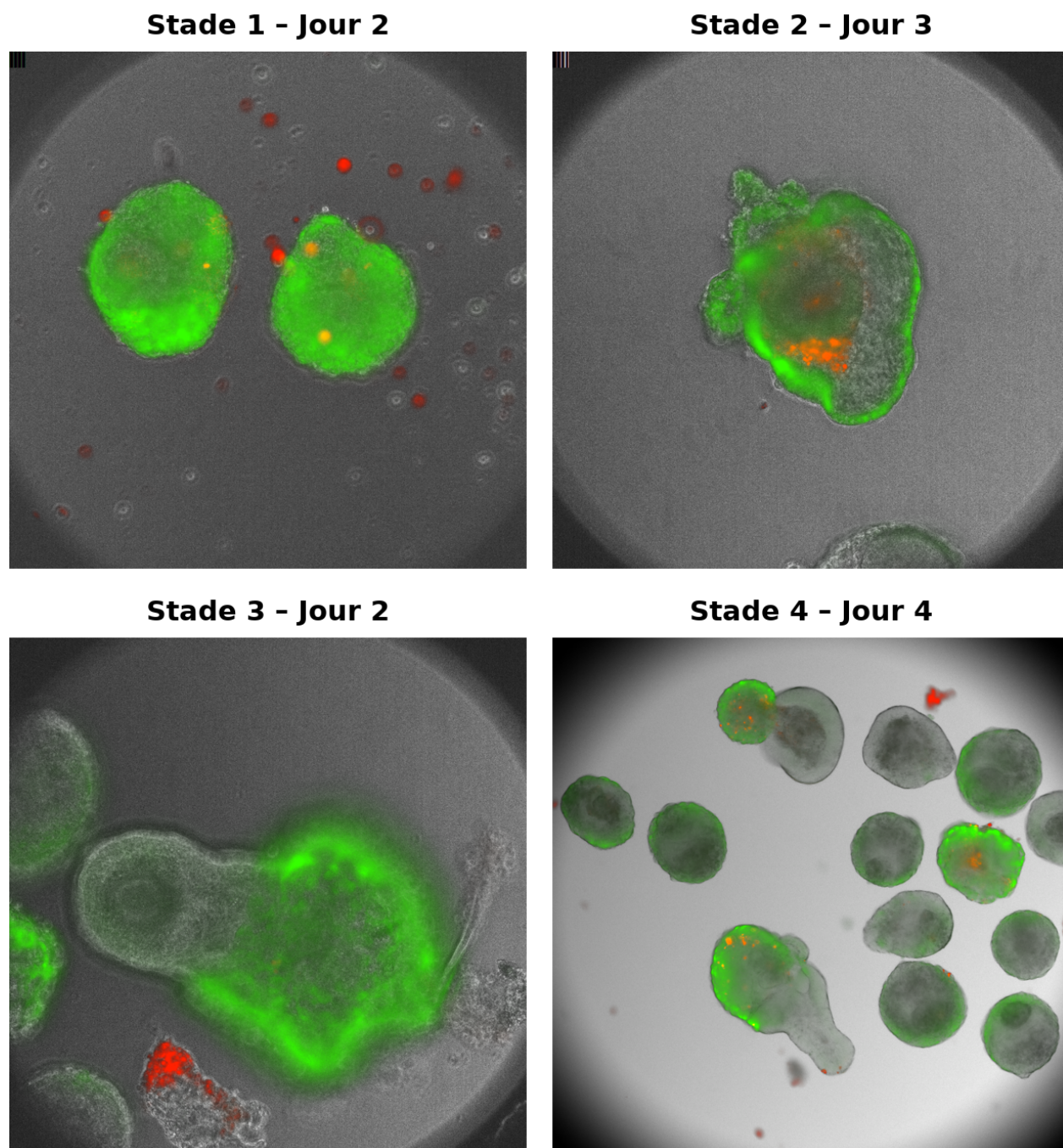


Figure 4.12 Coloration de viabilité cellulaire représentative des cellules H1 aux stades 1 à 4 de la différenciation.

4.3 Culture des cellules iPSC

Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) ont été intégrées dans les essais expérimentaux afin d'évaluer la transférabilité du protocole optimisé avec les H1. Cette section présente les

performances des iPSC en culture 3D, leur réponse aux conditions de différenciation, ainsi que les comparaisons avec les H1 en termes de formation d'agrégats et d'expression de marqueurs. Ces résultats sont essentiels pour juger du potentiel des iPSC dans une optique de production à grande échelle compatible avec des applications thérapeutiques.

4.3.1 Distribution de taille

La distribution des diamètres des agrégats iPSC cultivés en suspension au cours du stade 0 est présentée à la figure 4.13 pour deux essais indépendants. Dès l'essai 1, une augmentation rapide et significative de la taille des agrégats a été observée entre les jours 1 et 3, atteignant une majorité de diamètres supérieurs à 400 μm dès le jour 3. Cette croissance était nettement supérieure à celle observée avec les cellules H1 dans des conditions similaires (cf. figure 4.7), où les diamètres étaient principalement inférieurs à 250 μm à la fin du stage 0.

À la suite de ces observations, il a été décidé de limiter les essais subséquents à deux jours de culture au stade 0, afin de prévenir une croissance excessive des agrégats, qui pourrait nuire à l'homogénéité de la différenciation et poser des risques de nécrose au centre des agrégats. Cependant, l'essai 5 a été exceptionnellement prolongé jusqu'au jour 3 en raison d'une intervention de maintenance d'urgence du bâtiment, qui a empêché le début du stade 1 au jour 2. Cette contrainte logistique a forcé un report de la différenciation au jour 3, moment auquel les agrégats avaient déjà atteint une taille encore plus élevée, avec un pic de distribution centré autour de 370 à 390 μm .

Il convient de noter qu'au cours des essais 1 et 5, le mélangeur orbital était partagé avec d'autres membres du laboratoire, ce qui a occasionné des fluctuations de vitesse entre 90 et 100 RPM, contrairement à l'essai 2 (figure 4.15) où la vitesse est demeurée constante à 90 RPM. Ces variations de vitesse pourraient avoir contribué à la croissance accrue observée dans les essais 1 et 5, en modifiant les conditions de cisaillement et de sédimentation des agrégats. Ces résultats soulignent la propension des iPSC à croître plus rapidement que les H1 en suspension libre, ainsi que la sensibilité de la taille des agrégats aux délais expérimentaux. Cette observation justifie le besoin d'un contrôle strict de la durée du stade 0 et du moment de la transition vers le stade 1.

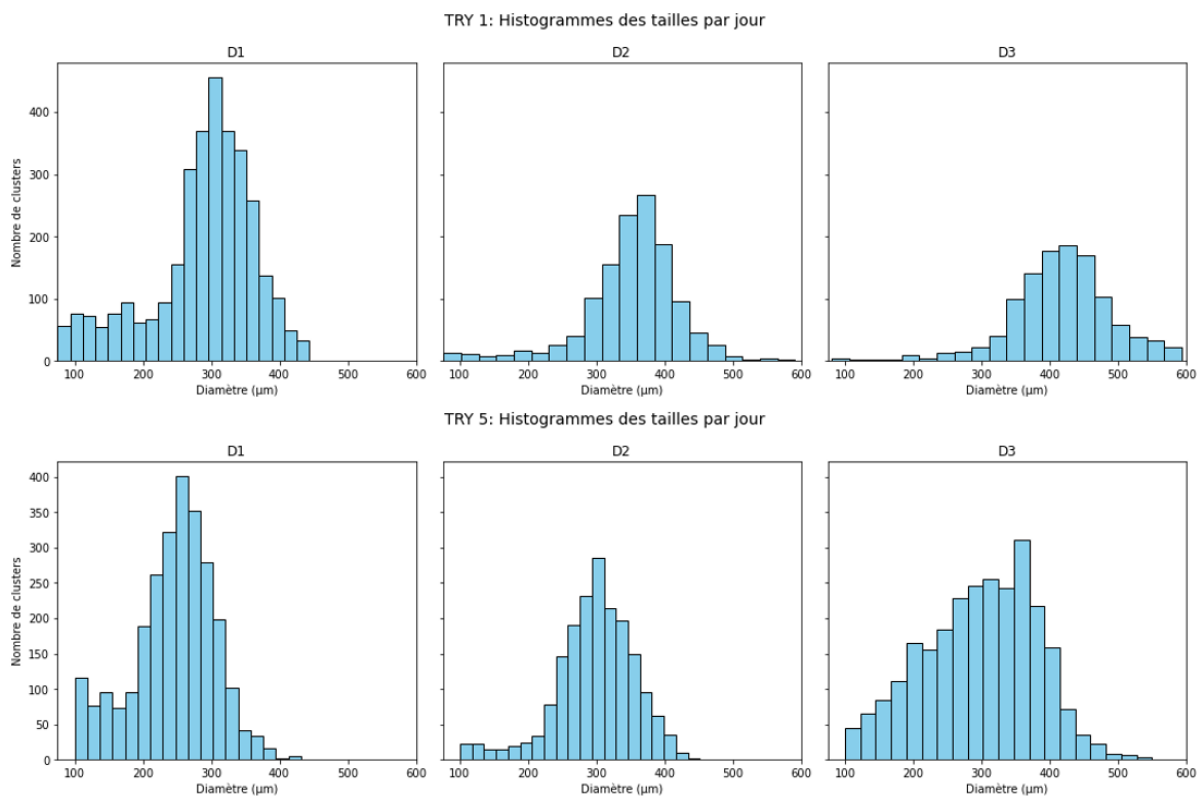


Figure 4.13 Histogrammes des tailles des agrégats de cellules iPSC au stage 0 pour les essais 1 et 5.

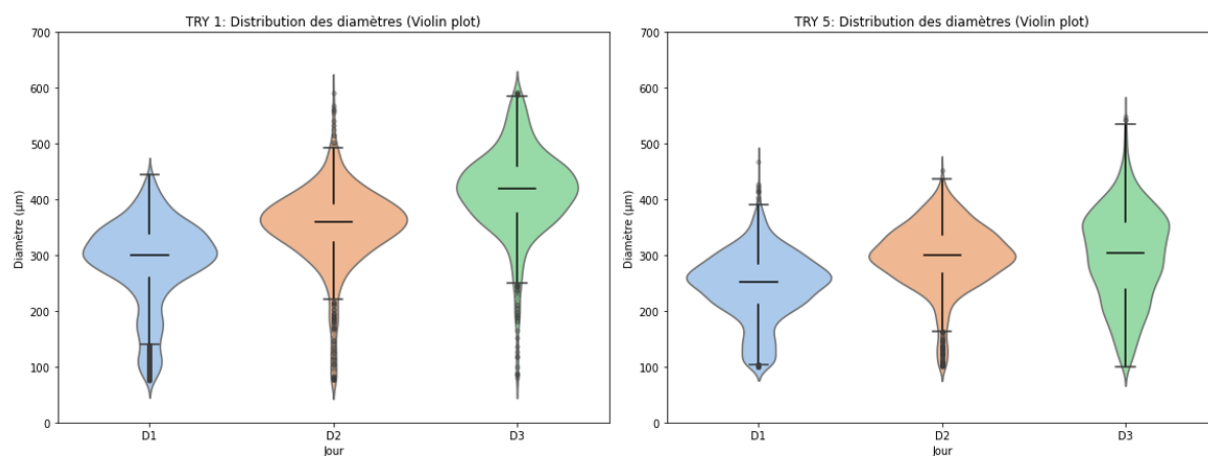


Figure 4.14 Représentation en violon de la distribution des diamètres pour les essais 1 et 5.

La figure 4.15 présente l'histogramme des diamètres d'agrégats iPSC au jour 2 de l'essai 2, qui correspond au moment de la transition vers le milieu de différenciation du stade 1. Ce test, basé sur

un plan expérimental de type Taguchi, visait à évaluer l'effet combiné de plusieurs variables sur l'induction de l'endoderme définitif à partir de la lignée iPSC.

La distribution observée montre un pic de fréquence autour de 280 à 300 μm , avec une majorité des agrégats compris entre 200 et 400 μm . Ces diamètres sont substantiellement plus élevés que ceux obtenus avec les cellules H1 dans des conditions similaires (cf. figure 4.7), confirmant une tendance des iPSC à former des agrégats plus volumineux en suspension 3D.

Le jour 1 n'a pas été retenu en raison d'une qualité d'image insuffisante pour une quantification fiable. Toutefois, les données du jour 2 offrent une image représentative de l'état des agrégats au début de la différenciation.

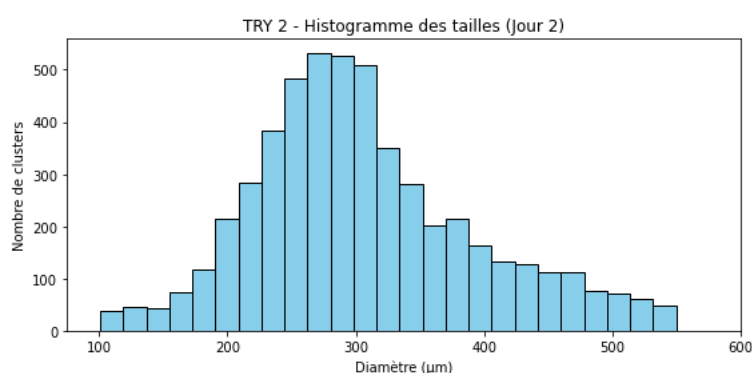


Figure 4.15 Histogramme des tailles des agrégats de cellules iPSC au jour 2 pour l'essai 2.

4.3.2 Analyse de coloration de viabilité cellulaire

Afin d'évaluer l'impact des conditions de culture sur la viabilité cellulaire à la fin du stade 1, une coloration de viabilité cellulaire a été réalisée pour trois conditions représentatives du plan factoriel de l'essai 5 (W1, W5, W9). Ces conditions correspondaient respectivement aux plus faibles concentrations (CHIR-99021 1.5 μM , activine A 50 ng/mL), à la condition centrale (CHIR-99021 3.0 μM , activine A 100 ng/mL) et aux plus fortes concentrations (CHIR-99021 4.5 μM , activine A 150 ng/mL) des facteurs testés.

Sur les images obtenues en microscopie à fluorescence, une même organisation cellulaire a été observée pour les trois conditions : une zone centrale rouge, indiquant la présence de cellules mortes, entourée d'une périphérie verte, correspondant à des cellules vivantes. Cette distribution suggère un phénomène de nécrose centrale probablement causé par un manque de diffusion des nutriments et d'oxygène au sein des agrégats.

Ces résultats concordent avec les données de taille obtenues précédemment (figure 4.13), qui ont montré une croissance marquée des diamètres moyens au fil des jours pour l'essai 5, avec une taille moyenne dépassant largement celle observée dans les essais antérieurs. L'apparition d'un cœur nécrotique est donc cohérente avec l'hypothèse d'un dépassement de la taille critique des agrégats à la fin du stade 1. Cette perte de viabilité a d'ailleurs été confirmée par cytométrie en flux et par le comptage cellulaire, qui ont révélé une diminution significative du nombre de cellules vivantes. L'essai a donc été classé comme non concluant sur le plan fonctionnel.

W1: CHIR-99021 et Activin A minimum

W5: CHIR-99021 et Activin A Centre

W9: CHIR-99021 et Activin A Maximum

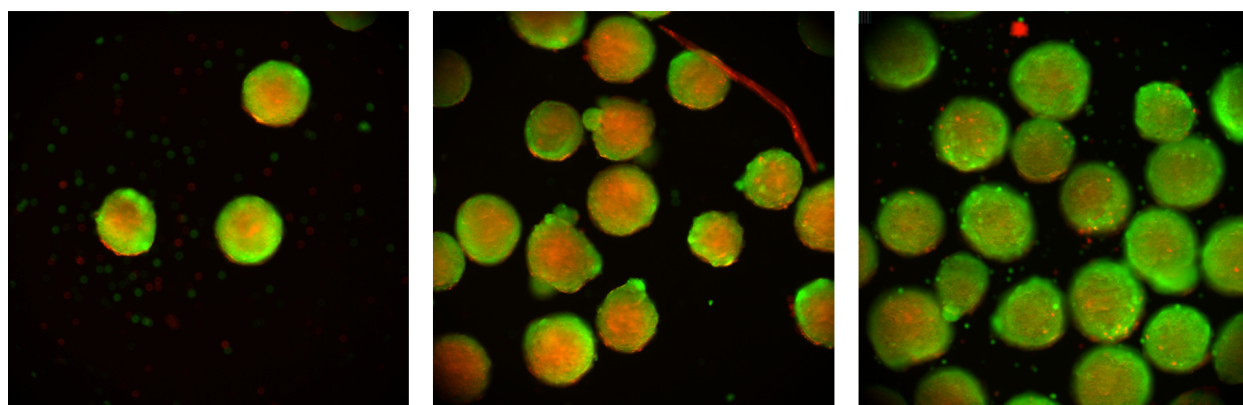


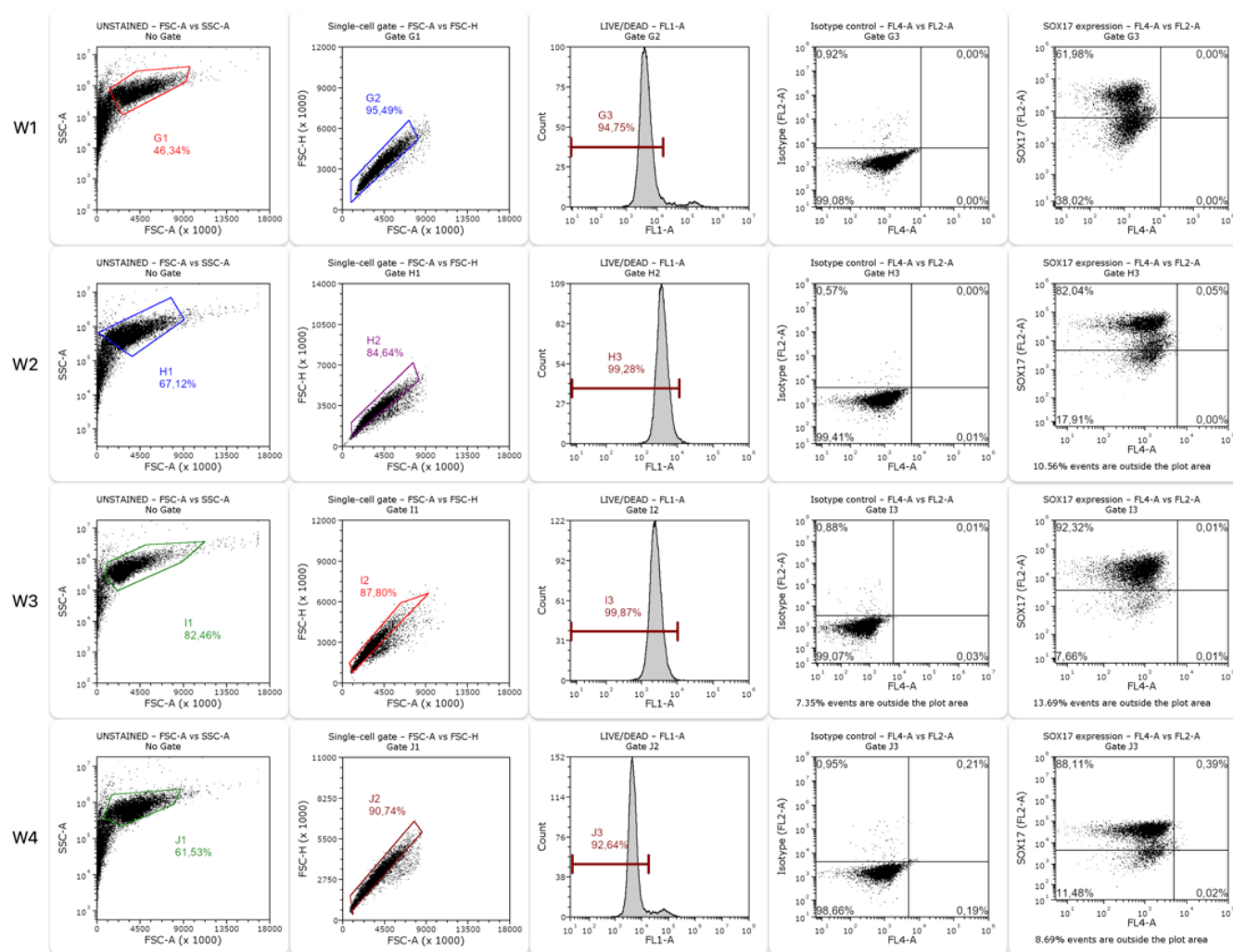
Figure 4.16 Évaluation de la viabilité cellulaire par coloration de viabilité cellulaire à la fin du stade 1 pour trois conditions du plan factoriel (essai 5).

4.3.3 Cytométrie de flux

L'analyse en cytométrie en flux effectuée à la fin du stade 1 pour les neuf conditions du plan factoriel essai 2 (Figure 4.17) a permis d'évaluer à la fois la viabilité cellulaire et l'expression du marqueur d'endoderme définitif SOX17. Toutes les conditions montraient une excellente viabilité,

avec plus de 95 % des événements situés dans la région viable définie par le marqueur de viabilité cellulaire, confirmant la qualité des cultures 3D dans ces conditions. Aucune population apoptotique ou nécrotique notable n'a été observée.

Concernant la différenciation, des proportions élevées de cellules exprimant SOX17 ont été observées dans la majorité des conditions. Le pourcentage maximal a été atteint dans la condition W7 (activine A 150 ng/mL, CHIR 4.5 μ M), avec 97.76 % de cellules SOX17. D'autres conditions ont aussi montré de très bons résultats, notamment W5 (condition centrale) avec 92.45 % et W3 avec 92.32 %. À l'opposé, les conditions W1 (61.98 %) et W6 (64.99 %) ont généré des niveaux plus faibles d'expression. L'ensemble des conditions testées a permis de valider la robustesse du protocole 3D utilisé dans l'essai 2 et a contribué à identifier les combinaisons de facteurs les plus efficaces pour induire une différenciation endodermique optimale.



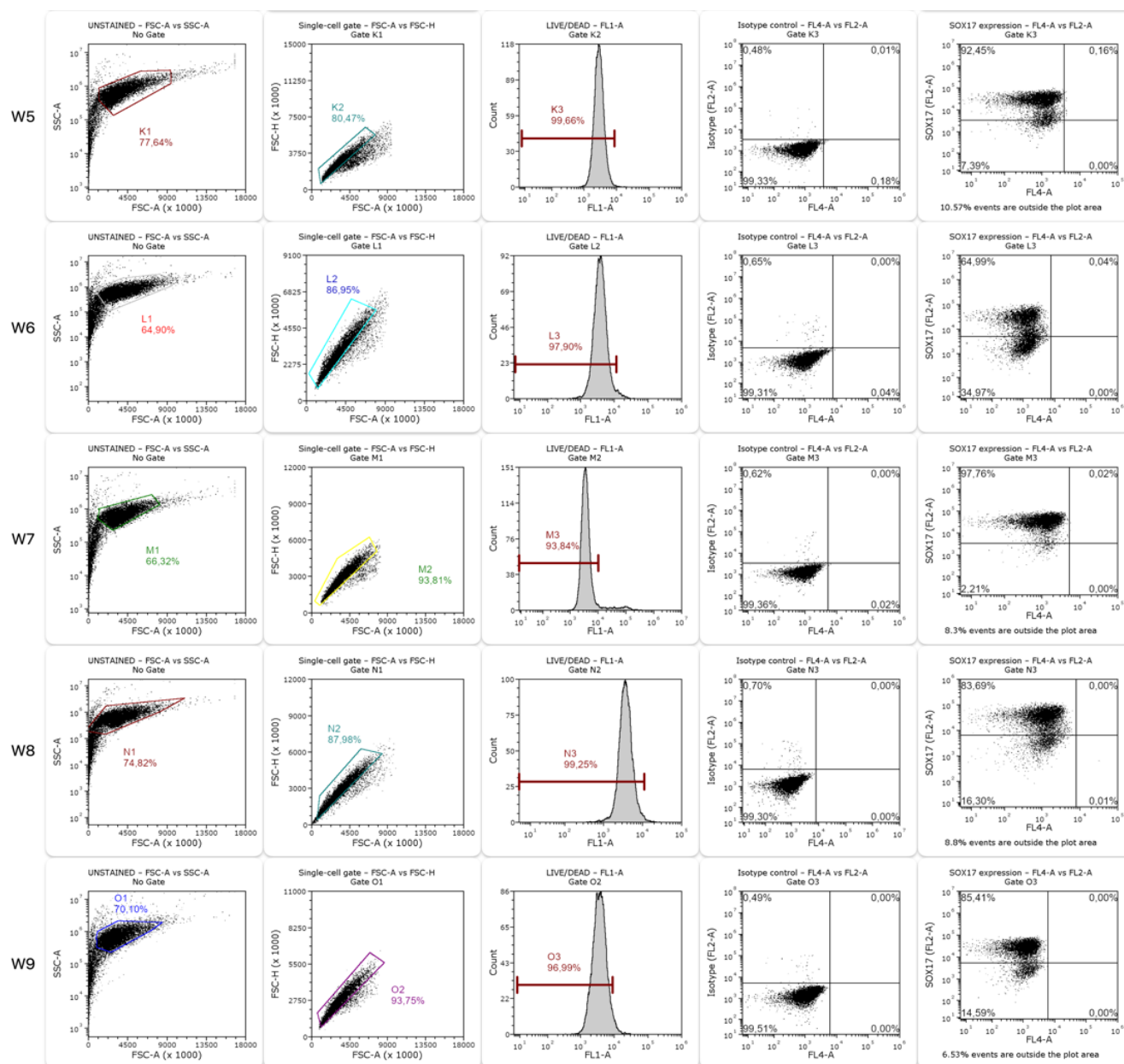


Figure 4.17 Analyse en cytométrie en flux pour les neuf conditions du plan factoriel pour l'essai 2

La figure 4.18 montre l'analyse de viabilité par cytométrie en flux pour une condition représentative de l'essai 5. Le panneau gauche montre le profil FSC-A/SSC-A sans coloration (« *unstain* ») et sans application de cadre (« *gate* »). On observe une distribution très diffuse, probablement causée par une forte présence de débris cellulaires, d'agrégats ou de cellules lysées. Le panneau droit correspond à la coloration de viabilité cellulaire effectuée sans cadrage(gating)

préalable, révélant un taux de viabilité extrêmement faible avec seulement 50,84 % des événements classés comme vivants (pic gauche). La séparation nette entre les deux populations confirme le bon fonctionnement du marquage, mais met en évidence une mortalité cellulaire importante. Cette condition illustre les problèmes de viabilité observés à la fin du stade 1 pour l'ensemble des conditions de l'essai 5, vraisemblablement liés à une taille moyenne excessive des amas.

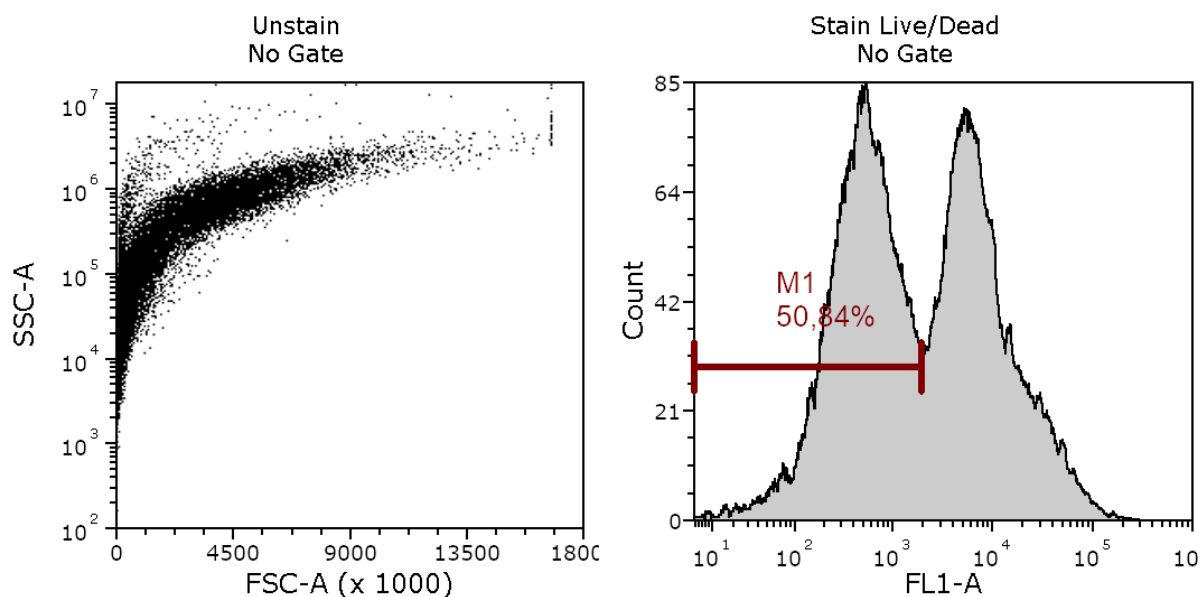


Figure 4.18 Analyse de viabilité par cytométrie pour une condition de l'essai 5

4.3.4 Analyse morphologique par microscopie optique

Dans le but de compléter les analyses quantitatives par cytométrie en flux, une observation morphologique des agrégats a été effectuée à l'aide de la microscopie optique. Pour chaque condition du plan d'expérience Taguchi (essai 2), une image représentative a été capturée au dernier jour de culture avant fixation, soit au jour 3, 4 ou 5 selon la durée planifiée pour chaque puits. Ces images (Figure 4.19) permettent de comparer l'effet des différentes combinaisons de concentrations en CHIR-99021 (1.5, 3 ou 4.5 μM) et activine A (50, 100 ou 150 ng/mL) sur la morphologie des structures 3D formées au cours du stade 1.

La disposition des images dans la figure suit une logique matricielle : chaque ligne correspond à un niveau croissant d'activine A, et chaque colonne à une concentration croissante de CHIR-99021.

Une tendance claire émerge quant à l'effet de l'activine A. À faible concentration (50 ng/mL), les agrégats apparaissent souvent de taille hétérogène, avec des contours irréguliers ou des fusions partielles. À mesure que la concentration augmente, la morphologie devient progressivement plus sphérique, compacte et uniforme. À 150 ng/mL, la plupart des agrégats montrent une structure bien délimitée, évoquant une meilleure auto-organisation cellulaire.

En revanche, aucune variation marquée n'a pu être associée de manière systématique à la concentration en CHIR-99021. Que la concentration soit minimale ou maximale, les différences observées entre les colonnes sont subtiles et ne semblent pas affecter de façon visible la forme, la compacité ou la clarté des contours des agrégats. Cela pourrait s'expliquer par un rôle plus fonctionnel que morphologique du CHIR, notamment dans l'induction des voies de signalisation impliquées dans la différenciation, plutôt que dans l'organisation physique des cellules au sein des agrégats.

Enfin, il est important de souligner que ces observations morphologiques restent qualitatives et n'offrent qu'un aperçu complémentaire de la qualité des agrégats produits. Elles servent à illustrer la cohérence entre l'apparence macroscopique des structures et les résultats de viabilité et de différenciation obtenus par la suite. En particulier, ces images suggèrent que certaines conditions – notamment celles riches en activine A – favorisent la formation de structures 3D mieux organisées, potentiellement plus aptes à une différenciation efficace au stade suivant.

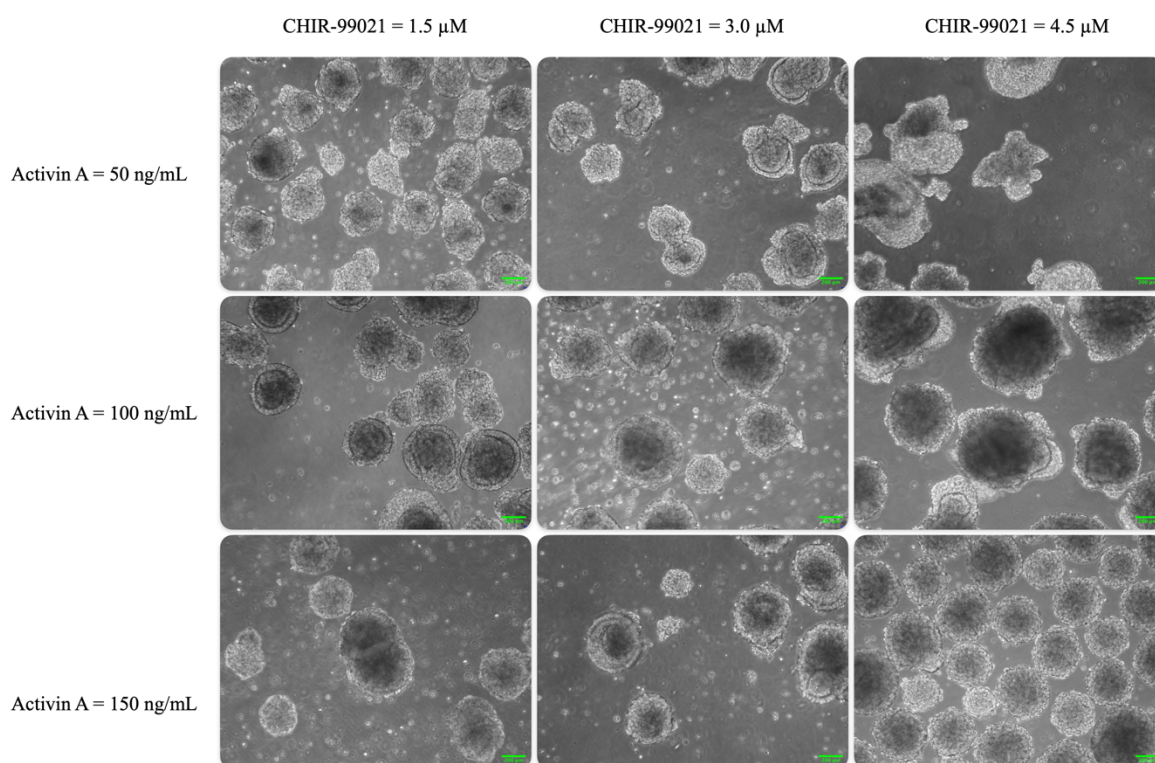


Figure 4.19 Morphologie des agrégats 3D d'iPSC à la fin du stade 1 selon les conditions du plan d'expérience. Images capturées en microscopie optique (objectif 10x)

4.3.5 Analyse Statistique

Les résultats de cytométrie en flux pour les neuf conditions de l'essai 2 sont présentés dans le tableau 4.1 ci-dessous. Ce tableau regroupe les pourcentages de cellules SOX17 obtenus pour chaque combinaison de facteurs expérimentaux définis dans le plan Taguchi (activine A, CHIR-99021, durée de différenciation). Il permet d'apprécier l'effet global de chaque condition avant toute analyse statistique approfondie.

Afin de visualiser l'influence individuelle de chaque facteur étudié, les valeurs de SOX17 ont ensuite été regroupées par catégorie de CHIR-99021, d'activine A et de durée, et représentées sous forme de diagrammes à moustaches en Figure 4.21. On observe une augmentation marquée du pourcentage de cellules SOX17 avec des concentrations croissantes de CHIR-99021. L'effet de

l'activine A semble également suivre une tendance positive, bien que plus modérée, tandis que les variations liées au temps de traitement paraissent moins prononcées.

Tableau 2 Résultats de l'expression de SOX17 (%) pour chacune des neuf conditions expérimentales du plan Taguchi (Essai 2).

Run	activine A (ng/mL)	Durée (jours)	CHIR-99021 (μ M)	SOX17 (%)
1	50	3	1.5	61.98
2	50	4	3.0	82.04
3	50	5	4.5	92.32
4	100	3	3.0	88.11
5	100	4	4.5	92.45
6	100	5	1.5	64.99
7	150	3	4.5	97.76
8	150	4	1.5	83.69
9	150	5	3.0	85.41

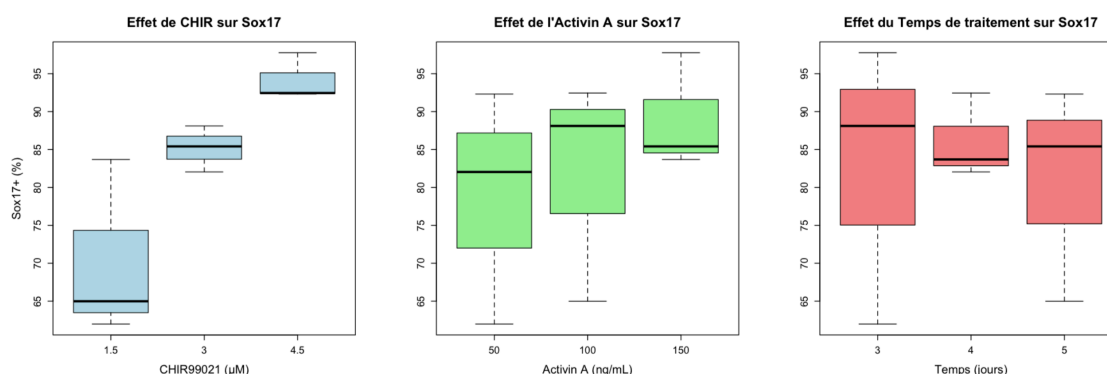


Figure 4.20 Effet des variables expérimentales sur l'expression de SOX17 (%)

L'analyse de variance (ANOVA) présentée en Figure 4.22 permet de quantifier statistiquement l'effet de chacun des trois facteurs sur l'expression de SOX17. Le facteur CHIR-99021 ressort comme étant significatif ($p = 0.00413$), avec une F-value de 24.926, indiquant une contribution majeure à la variation observée. L'activine A présente une tendance proche du seuil de significativité ($p = 0.08749$), tandis que le temps de différenciation ne montre aucun effet

significatif ($p = 0.73611$). Les résidus sont relativement faibles, confirmant la bonne qualité du modèle.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
ActivinA_ng	1	155.2	155.2	4.495	0.08749	.
Temps_jours	1	4.4	4.4	0.127	0.73611	
CHIR_uM	1	860.9	860.9	24.926	0.00413	**
Residuals	5	172.7	34.5			

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Figure 4.21 Analyse de variance (ANOVA) des facteurs influençant l'expression de SOX17

CHAPITRE 5 Discussion

5.1 Rétrospective sur l'utilisation des cellules MIN6

5.1.1 Rôle formateur et développement méthodologique

L'introduction des cellules MIN6 dans le projet a joué un rôle stratégique sur le plan méthodologique. Issues d'une lignée murine de cellules β pancréatiques, les MIN6 ont été choisies pour leur robustesse, leur capacité à former rapidement des agrégats en suspension et leur relative tolérance aux conditions de culture variées. Cela a permis d'explorer efficacement plusieurs aspects critiques du protocole expérimental, notamment la formation d'agrégats dans des conditions 3D, la gestion des vitesses d'agitation, les changements de milieu, et la manipulation cellulaire sans compromettre la viabilité.

Travailler avec cette lignée a offert un terrain d'entraînement pratique idéal pour maîtriser des techniques exigeantes telles que le passage 2D vers 3D, l'utilisation de l'agitateur orbital ou encore la fixation et l'analyse d'images. Bien qu'aucune cytométrie de flux n'ait été effectuée sur les MIN6, ces essais ont facilité la mise en place des outils analytiques d'imagerie : ils ont permis de tester les modules ImageJ pour la segmentation des amas, d'optimiser les critères de sélection comme la circularité ou le diamètre, et de construire les premiers scripts Python pour l'analyse automatisée de la morphologie.

5.1.2 Apports scientifiques et exploration des paramètres de culture

Les expériences menées avec les MIN6 ont permis d'explorer systématiquement plusieurs paramètres de culture : le volume de milieu, la concentration cellulaire initiale et la vitesse de rotation, autant dans les plaques 6 puits que dans le bioréacteur de 30 mL. Contrairement aux protocoles antérieurs du laboratoire qui utilisaient les plaques AggreWell pour forcer la formation de sphéroïdes, les essais MIN6 ont été réalisés sans matrice ni structure d'ancrage, dans un environnement totalement en suspension. Cette approche a démontré qu'il était possible d'obtenir

des agrégats stables, viables et analytiquement exploitables dans un système simplifié et adaptable à la montée en échelle.

L'évolution morphologique des agrégats MIN6 a été suivie sur plusieurs jours à l'aide d'analyses d'images permettant de quantifier la taille et la circularité. Ces données ont servi de référence interne pour calibrer les méthodes et comprendre la dynamique naturelle d'agrégation en 3D, facilitant ainsi la transition vers des lignées plus exigeantes.

5.1.3 Limites de la transposition aux cellules souches humaines

Malgré leurs avantages techniques, les cellules MIN6 ne peuvent pas être considérées comme des modèles représentatifs des cellules souches humaines (hPSC). Leurs caractéristiques biologiques et métaboliques diffèrent profondément : les cellules MIN6, en tant que lignée murine transformée, sont plus résistantes au stress mécanique et aux variations environnementales. Elles tolèrent des concentrations plus élevées de glucose, consomment davantage d'oxygène et prolifèrent plus rapidement, ce qui les rend moins sensibles aux paramètres de culture.

En revanche, les cellules souches humaines nécessitent des conditions précises et plus délicates à maintenir, notamment en ce qui concerne la composition du milieu, la concentration de départ et les manipulations mécaniques. De plus, les objectifs biologiques sont très différents : alors que les MIN6 ne subissent pas de processus de différenciation contrôlée, les hPSC doivent passer par plusieurs étapes délicates de spécialisation cellulaire. Cela limite fortement la transposabilité des conclusions obtenues avec les MIN6.

5.1.4 Transition vers les cellules souches humaines : H1 comme premier modèle

À la suite des essais sur les MIN6, le projet s'est orienté vers l'utilisation de la lignée humaine H1, un modèle de cellules souches embryonnaires. Cette transition a représenté un changement de paradigme important. Bien que les fondations techniques aient été solidement établies grâce aux MIN6, les essais H1 ont immédiatement mis en évidence la nécessité d'ajustements précis. Les paramètres optimisés avec les MIN6, comme le volume ou la vitesse d'agitation, n'étaient plus adéquats et ont dû être réévalués. De plus, la sensibilité accrue des H1 au stress, aux conditions de passage et à la qualité du milieu a exigé une rigueur supplémentaire à chaque étape.

Néanmoins, l'expérience accumulée avec les cellules MIN6 a permis d'aborder plus efficacement ces nouveaux défis. Les méthodes d'analyse d'image étaient déjà rodées, les procédures de passage en 3D étaient maîtrisées, et l'interprétation des mesures morphologiques était bien ancrée. Cela a permis de gagner un temps précieux et de minimiser les erreurs techniques lors des premières tentatives de culture et de différenciation en 3D des cellules souches humaines.

5.2 Développement des conditions de culture 3D pour les cellules souches embryonnaires H1

5.2.1 Retour à une approche exploratoire en plaque 6 puits

Le passage des cellules MIN6 aux cellules souches embryonnaires humaines H1 a nécessité un retour à une phase exploratoire complète. Contrairement aux MIN6, les H1 sont beaucoup plus sensibles aux conditions de culture et à la manipulation. Toutes les optimisations ont donc dû être reprises à la base, en utilisant des plaques 6 puits pour permettre des ajustements fins.

Plusieurs paramètres ont été testés systématiquement : la concentration initiale de cellules, le volume de milieu par puits, la vitesse de rotation sur l'agitateur orbital, ainsi que les techniques de changement de milieu. Ces expériences visaient à identifier les conditions idéales pour former des agrégats cellulaires homogènes, viables et adaptés à une différenciation subséquente.

5.2.2 Changement de stratégie d'ensemencement: passage des cellules uniques à petits amas

Les premières tentatives ont été réalisées à l'aide d'un passage par TrypLE pour obtenir des cellules uniques avant l'ensemencement en 3D. Toutefois, cette méthode s'est révélée peu efficace, entraînant une faible viabilité et une incapacité à former des agrégats stables. Ce n'est qu'après un changement de stratégie, remplaçant le TrypLE par l'EDTA, que des résultats probants ont été obtenus. L'EDTA a permis de détacher les cellules sous forme de petits amas plutôt que de cellules uniques, facilitant ainsi l'agrégation naturelle en suspension et menant à une meilleure survie post-passage.

Cette modification s'est avérée déterminante pour la réussite des cultures 3D, ouvrant la voie à une phase d'optimisation plus poussée sur les autres paramètres.

5.2.3 Optimisation de la formation des amas H1

Une série d'essais a ensuite permis de raffiner les conditions de culture, notamment la densité cellulaire optimale, le volume de milieu nécessaire par puits pour maintenir les agrégats en suspension sans collision avec le plastique, et la vitesse de rotation idéale sur l'agitateur orbital. Ces tests ont également été accompagnés d'expériences visant à déterminer la meilleure méthode de changement de milieu, afin de préserver l'intégrité des agrégats et d'éviter leur fusion. Finalement, un changement complet du milieu a été adopté après 24 heures, en transférant les agrégats dans des tubes coniques de 15 mL. Cette approche permettait d'éliminer efficacement les débris cellulaires et les cellules mortes n'ayant pas survécu au passage en 3D, qui compromettaient la viabilité et la formation homogène des agrégats.

Cette phase d'optimisation a permis d'obtenir des agrégats de forme régulière, avec une bonne circularité et des tailles compatibles avec une différenciation efficace. Ces résultats ont constitué une base solide pour initier les premières expériences de différenciation vers l'endoderme définitif.

5.2.4 Première différenciation réussie et expression de SOX17

Une fois les conditions de culture maîtrisées, des essais de différenciation ont été menés à l'aide d'un protocole simplifié, incluant l'ajout de CHIR99021 et d'activine A. Ces premiers tests ont permis d'atteindre une expression élevée du marqueur d'endoderme SOX17, avec un taux de positivité atteignant 87 % dans les conditions optimales. Ce succès a confirmé la viabilité du protocole 3D développé et validé la pertinence du modèle H1 pour les études futures en différenciation pancréatique.

5.3 Développement et évaluation du protocole 3D avec cellules iPSC

5.3.1 Justification du choix des iPSC pour une approche BPF

L'utilisation de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) représente une solution prometteuse pour le développement de thérapies cellulaires compatibles avec les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF). Contrairement aux lignées embryonnaires comme les H1, les iPSC peuvent être dérivées directement des patients, ce qui ouvre la voie à des traitements personnalisés avec un risque réduit de rejet immunitaire. Bien que cet avantage soit atténué dans certaines pathologies auto-immunes comme le diabète de type 1, l'intérêt réglementaire des iPSC demeure, notamment grâce à leur origine éthique et leur potentiel de bancarisation autologue.

Du point de vue procédural, les iPSC permettent également une culture en conditions exemptes de dérivés animaux. Dans ce projet, le milieu TeSR™-E8™ (Stemcell Technologies), entièrement dépourvu de produits d'origine animale, a été utilisé dans toutes les cultures en conditions optimales. Ce milieu a donné d'excellents résultats avec les H1 et au début des essais iPSC. Toutefois, des problèmes de stabilité ou de péremption prématurée d'un lot ont provoqué une série d'échecs inexplicables à l'automne 2024, entraînant une perte significative de temps. En raison de cette contrainte logistique et du calendrier du projet, un passage au milieu mTeSR™ Plus a été effectué en fin de parcours, notamment pour les essais 2 à 5.

Enfin, l'approche développée visait à éviter les plateformes comme AggreWell™, qui nécessitent l'utilisation combinée de TrypLE et d'agents antiadhésifs (Anti-Adherence Rinsing Solution™). Ces composés, bien que validés en recherche, posent un risque potentiel de résidus indésirables dans une optique BPF. Le protocole mis en place permet la formation spontanée de sphéroïdes en 3D dans des puits standards, sans recourir à ces produits, réduisant ainsi les risques de contamination et les coûts associés.

5.3.2 Passage au modèle iPSC et adaptations

La culture 3D sans support a d'abord été validée avec succès sur les cellules H1, ce qui a motivé son transfert vers les iPSC fournies par le Conseil National de Recherches du Canada (CNRC). Suivant leurs recommandations, le ReLeSR™ (Stemcell Technologies) a été utilisé pour les

passages cellulaires afin d'éviter le transfert de cellules partiellement différenciées. Hormis ce changement, toutes les autres conditions ont été conservées : concentration d'ensemencement, volumes de milieu, vitesse d'agitation et composition du milieu. L'objectif était d'évaluer si les conditions optimisées pour les H1 étaient directement transférables aux iPSC.

Les résultats ont montré une bonne agrégation et des niveaux de différenciation acceptables, avec des pourcentages élevés de cellules SOX17 dans la majorité des conditions. Cependant, des différences morphologiques notables ont été observées, notamment des agrégats iPSC nettement plus volumineux que ceux obtenus avec les H1.

5.3.3 Plan d'expérience et contraintes liées à la diffusion

Le plan expérimental Taguchi utilisé dans cette étude avait pour objectif de tester l'effet de trois facteurs : la concentration en activine A, la concentration en CHIR99021, et la durée d'exposition au milieu de différenciation (3, 4 ou 5 jours). Ce design a été motivé par une différence fondamentale entre les systèmes 2D et 3D : en 2D, toutes les cellules ont un accès direct au milieu de culture, tandis qu'en 3D, la diffusion des facteurs doit traverser plusieurs couches cellulaires, ce qui peut retarder ou limiter leur effet dans les cellules internes. Ce phénomène justifiait pleinement l'évaluation de différentes concentrations et durées pour s'assurer que toutes les cellules au sein des agrégats soient exposées efficacement aux signaux de différenciation.

Cette approche s'est révélée encore plus pertinente après observation de la taille excessive des agrégats iPSC, bien plus volumineux que ceux des H1. L'analyse de variance (ANOVA) réalisée à partir des résultats de cytométrie en flux a révélé un effet principal significatif pour le CHIR99021, suivi par un effet moins marqué de l'activine A. En revanche, l'extension de la durée d'exposition n'a pas amélioré la différenciation ; au contraire, une baisse du pourcentage de SOX17 a été observée dans les conditions les plus longues, suggérant une dérive ou une fragilisation cellulaire sous exposition prolongée.

5.3.4 Viabilité cellulaire et essais en bioréacteur

Une analyse complémentaire a été effectuée pour évaluer si la viabilité cellulaire pouvait influencer le taux de différenciation. Les données de l'essai 2 ont été intégrées dans une ANOVA, mais aucun

effet significatif n'a été détecté, probablement en raison d'une viabilité trop élevée et trop homogène dans toutes les conditions (94 à 99 %). À l'inverse, dans l'essai 5, une chute brutale de viabilité a été observée, accompagnée de signaux de mort cellulaire dans le cœur des agrégats (coloration de viabilité rouge). Tous les pourcentages de cellules SOX17 étaient inférieurs à 20 %, certains même en dessous de 10 %, indiquant un échec majeur probablement lié à une combinaison de mauvaise viabilité, de taille excessive des agrégats et d'autres facteurs environnementaux.

Parallèlement, des essais préliminaires ont été réalisés avec un mini-bioréacteur jetable de 30 mL (ABLE Biott). Les iPSC y ont été cultivées durant 24 heures avec succès, formant des agrégats viables. Toutefois, la combinaison d'une hélice de grande taille et d'un régime d'agitation minimal de 80 RPM imposé par la plaque magnétique d'agitation a généré un stress mécanique important. Ce stress est devenu problématique dès l'ajout des inducteurs de différenciation (CHIR99021, activine A), entraînant une désagrégation des amas. Ce phénomène n'a pas été observé avec les cellules MIN6, plus robustes et non soumises à une différenciation. Ces résultats suggèrent que l'utilisation du bioréacteur dans ce contexte nécessite des ajustements spécifiques, notamment au niveau de l'hydrodynamique.

CHAPITRE 6 Conclusion et Recommandations

Ce projet avait pour objectif de développer une approche de culture 3D sans support artificiel pour la différenciation de cellules souches pluripotentes humaines en organoïdes pancréatiques, en particulier à travers l'optimisation du stade d'induction de l'endoderme définitif. Une stratégie expérimentale rigoureuse a permis d'évaluer les effets de plusieurs facteurs clés, notamment la concentration en CHIR99021, en activine A, ainsi que la durée d'exposition, sur l'expression du marqueur SOX17. Les résultats ont démontré que le CHIR99021 joue un rôle déterminant dans la différenciation, tandis qu'un allongement de la durée peut nuire à l'efficacité du processus, surtout en culture 3D.

La méthodologie mise en place a d'abord été validée sur la lignée H1, avec des résultats atteignant jusqu'à 87 % de cellules SOX17, démontrant la robustesse du protocole. Son application aux iPSC, cellules plus compatibles avec une approche BPF et potentiellement autologues, a révélé de nouveaux défis, notamment une plus grande variabilité morphologique, des agrégats plus volumineux, et une sensibilité accrue aux contraintes environnementales. Malgré cela, de bons niveaux de différenciation ont été atteints dans plusieurs conditions, validant en partie la transférabilité du protocole H1 vers les iPSC.

Les essais en mini-bioréacteurs ont mis en lumière les limites de certaines plateformes dans le cadre de la différenciation cellulaire, en particulier en raison du stress hydrodynamique imposé à cette étape critique. Ces observations soulignent l'importance d'adapter les systèmes de culture aux caractéristiques biologiques des cellules souches, notamment leur fragilité et leur réponse aux inducteurs.

Les travaux réalisés ont donc permis de poser des bases solides pour une différenciation en 3D, sans support artificiel, dans un environnement sans composés d'origine animale et compatible avec les bonnes pratiques de fabrication (BPF). Le protocole optimisé pour le stade 1, validé sur deux lignées cellulaires, représente une avancée concrète vers la production évolutive d'organoïdes pancréatiques.

Les prochaines étapes recommandées incluent :

- L'élargissement du plan expérimental aux stades 2 à 4 afin d'optimiser les conditions propres à chaque phase de différenciation ;
- La réévaluation du rôle de l'acide rétinoïque (RA), très utilisé dans certains protocoles mais potentiellement toxique, ainsi que l'exploration de moyens de compenser ses effets indésirables (par exemple via l'ajout d'antioxydants) ;
- Une meilleure maîtrise de la taille des agrégats afin d'assurer une plus grande homogénéité et reproductibilité ;
- Et l'évaluation comparative de différentes plateformes de culture 3D pour identifier les plus adaptées à une mise à l'échelle (scale-up) clinique.

Ces pistes ouvrent la voie à une amélioration continue du protocole, en vue de produire des organoïdes pancréatiques plus matures, fonctionnels et standardisables, en cohérence avec les exigences de la médecine régénérative.

RÉFÉRENCES

- Abdelalim, E. M., Bonnefond, A., Bennaceur-Griscelli, A., & Froguel, P. (2014). *Pluripotent stem cells as a potential tool for disease modelling and cell therapy in diabetes*. *Stem Cell Reviews and Reports*, 10(3), 327–337. <https://doi.org/10.1007/s12015-014-9503-6>
- Borys, B. S., Dang, T., So, T., et al. (2021). *Overcoming bioprocess bottlenecks in the large-scale expansion of high-quality hiPSC aggregates in vertical-wheel stirred suspension bioreactors*. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(55). <https://doi.org/10.1186/s13287-020-02109-4>
- Dadheech, N., Bermúdez de León, M., Czarnecka, Z., et al. (2025). *Scale up manufacturing approach for production of human induced pluripotent stem cell-derived islets using Vertical Wheel® bioreactors*. *npj Regenerative Medicine*, 10(24). <https://doi.org/10.1038/s41536-025-00409-y>
- D'Amour KA, et al. *Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells*. *Nat Biotechnol*. 2006;24(11):1392–1401. <https://doi.org/10.1038/nbt1259>
- Eppendorf. (2025). *DASGIP® and DASbox® Bioreactor Systems*. <https://www.eppendorf.com>
- Huang, X., Zhang, X., & Zhang, S. (2022). *Hydrodynamic Strategies and Bioreactor Designs for Scalable Expansion of Human Pluripotent Stem Cells: A Review*. *Gels*, 8(12), 829. <https://doi.org/10.3390/gels8120829>
- International Diabetes Federation. (2021). *IDF Diabetes Atlas* (10th ed.). <https://diabetesatlas.org>
- Krishnan, S. R., Langer, R., & Anderson, D. G. (2025). Materials approaches for next-generation encapsulated cell therapies. *MRS Communications*, 15, 21–33. <https://doi.org/10.1557/s43579-024-00678-6>
- Lamprecht, M. R., Sabatini, D. M., & Carpenter, A. E. (2007). CellProfiler: free, versatile software for automated biological image analysis. *Biotechniques*, 42(1), 71–75. <https://doi.org/10.2144/000112257>

McLean, A. B., D'Amour, K. A., & Jones, K. L. (2007). Activin A efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed. *Stem Cells*, 25(1), 29–38. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0219>

Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hirami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., ... & Takahashi, M. (2021). *Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration*. New England Journal of Medicine, 376(11), 1038–1046. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1608368>

Pagliuca, F. W., et al. (2014). *Generation of functional human pancreatic β cells in vitro*. Cell, 159(2), 428–439. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.040>

PBS Biotech. (2023). *Vertical-Wheel® Bioreactors*. <https://www.pbsbiotech.com>

Pollock, S. D., Galicia-Silva, I. M., Liu, M., Gruskin, Z. L., & Alvarez-Dominguez, J. R. (2023). *Scalable generation of 3D pancreatic islet organoids from human pluripotent stem cells in suspension bioreactors*. STAR Protocols, 4(6), 102580. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102580>

R Core Team (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>

Reprocell. (2025). *ABLE Biott 30 mL Disposable Bioreactor*. <https://www.reprocell.com/product-catalog/able-biott-bioreactor-systems/able-biott-30-ml-disposable-bioreactor>

Rezania, A., Bruin, J. E., Arora, P., Rubin, A., Batushansky, I., Asadi, A., ... & Kieffer, T. J. (2014). *Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells*. Nature Biotechnology, 32(11), 1121–1133. <https://doi.org/10.1038/nbt.3033>

Rodrigues, C. A. V., Nogueira, D. E. S., & Cabral, J. M. S. (2021). Single-use bioreactors for human pluripotent and adult stem cells: Towards regenerative medicine applications. *Bioengineering*, 8(5), 68. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8050068>

Sali, S., Azzam, L., Jaro, T., Ali, A. A. G., Mardini, A., Al-Dajani, O., Khattak, S., Butler, A. E., Azeez, J. M., & Nandakumar, M. (2025). A perfect islet: Reviewing recent protocol

developments and proposing strategies for stem cell derived functional pancreatic islets. *Stem Cell Research & Therapy*, 16, Article 112. <https://doi.org/10.1186/s13287-025-04293-7>

Sartorius. (2025). *ambr® 15 and ambr® 250 Modular Bioreactors*. <https://www.sartorius.com>

Saydé, T., El Hamoui, O., Bassil, M., Hmadeh, M., & Mahfouz, R. A. R. (2021). Biomaterials for three-dimensional cell culture: From applications in oncology to nanotechnology. *Nanomaterials*, 11(2), 481. <https://doi.org/10.3390/nano11020481>

Schwartzentruber, J., Foskolou, S., Kilpinen, H., Rodrigues, J. N., Alasoo, K., Knights, A. J., ... & Gaffney, D. J. (2019). *Publisher Correction: Molecular and functional variation in iPSC-derived sensory neurons*. *Nature Genetics*, 51(7), 1190. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0445-4>

Silva, I. B. B., Kimura, C. H., Colantoni, V. P., & Sogayar, M. C. (2022). *Stem cells differentiation into insulin-producing cells (IPCs): Recent advances and current challenges*. *Stem Cell Research & Therapy*, 13, Article 309. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02977-y>

Velazco-Cruz, L., Song, J., Maxwell, K. G., Goedegebuure, M. M., Augsornworawat, P., Hoglebe, N. J., & Millman, J. R. (2019). *Acquisition of dynamic function in human stem cell-derived β cells*. *Stem Cell Reports*, 12(2), 351–365. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.12.012>

Verhoeff, K., Cuesta-Gomez, N., Maghera, J., Dadheech, N., Pawlick, R., Smith, N., ... & Shapiro, A. M. J. (2024). *Scalable bioreactor-based suspension approach to generate stem cell-derived islets from healthy donor-derived iPSCs*. *Transplantation*, 108(4), 898–910. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000005108>

Wang, C., Abadpour, S., Olsen, P. A., Wang, D., Stokowiec, J., Chera, S., Ghiță, L., Ræder, H., Krauss, S., Aizenshtadt, A., & Scholz, H. (2024). Glucose concentration in regulating induced pluripotent stem cells differentiation toward insulin-producing cells. *Transplant International*, 37, 11900. <https://doi.org/10.3389/ti.2024.11900>

Wang, Y., & Jeon, H. (2022). 3D cell cultures toward quantitative high-throughput drug screening. *Trends in Pharmacological Sciences*, 43(7), 569–581.

<https://doi.org/10.1016/j.tips.2022.03.014>

Yamanaka, S. (2020). *Pluripotent stem cell-based cell therapy—Promise and challenges*. *Cell Stem Cell*, 27(4), 523–531. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.09.014>

ANNEXE A Comparaison des Protocoles

STAR : Bioréacteur à usage unique Corning 3578 (300 mL), équipé d'un impulseur droit intégré (straight-blade paddle impeller), agité mécaniquement à 70 rpm. Le semis est effectué à une densité de 0.6×10^6 cellules/mL.

Shapiro : Le protocole de Shapiro utilise un bioréacteur PBS-MINI de 100 mL (PBS Biotech) à roue verticale, avec une vitesse d'agitation fixée à 60 rpm. Les cellules iPSC sontensemencées à une concentration de 0.5×10^6 cellules/mL après une phase initiale d'agrégation en plaque 6 puits pendant 24 heures.

Tableau 3 Comparaison des milieux et facteurs au stade 1 entre différents protocoles.

Ingrédient	Hoesli 2D	STAR	Shapiro	Protocol 3D optimale de ce projet
Temps	3 jours	3 jours, pas de changement de milieu (S1D3)	4 jours (ou 3 selon la lignée)	H1 : 3 à 4 jours iPSC : 2 jours
Milieu	MCDB 131	MCDB 131	MCDB 131	MCDB 131
BSA/HSA	0.5%	2%	0% (testé, retiré)	0.5%
GLUTAMAX	1X	1X	1X	1X
D-glucose	15.6 mM	2.442 mM	5 mM	15.6 mM
Bicarbonate de sodium	2.6 g/L	29.28 mM	0	2.6 g/L
ITS-X	0	0.002X	0 (testé, retiré)	0
CHIR99021	3 μ M	3 μ M	4.3 μ M	4.5 μ M
activine A	100 ng/mL (300 total)	100 ng/mL (200 total)	7.7 nM (200 total)	150 ng/mL (450 total)
Vitamine C / Acide ascorbique	0	0.25 mM	0	0
P/S (antibio)	0	1X	0	0

Tableau 4 Comparaison des milieux et facteurs au stade 2 entre différents protocoles.

Ingrédient	Hoesli 2D	STAR	Shapiro
Temps	3 jours	3 jours, pas de changement de milieu (S2D2)	2 jours
Milieu	MCDB 131	MCDB 131	RPMI
BSA/HSA	0.5%	2%	1%
GLUTAMAX	1X	1X	1X
D-glucose	15.6 mM	2.442 mM	0
Bicarbonate de sodium	2.6 g/L	14.64 mM	0
ITS-X	0	0.002X	1X
KGF	50 ng/mL	50 ng/mL	2.6 nM
IWP-2	1250 nM	0	0
Alpha-Tocophérol	0	0	4.5 μ M
Acide rétinoïque	0	0	27.9 μ M
Vitamine C / Acide ascorbique	250 μ M	0.25 mM	0
P/S (Penicillin/Streptomycin)		1X	

Tableau 5 Comparaison des milieux et facteurs au stade 3 entre différents protocoles.

Ingrédient	Hoesli 2D	STAR	Shapiro
Temps	2 jours	2 jours	2 jours
Milieu	MCDB 131	MCDB 131	DMEM
BSA/HSA	2%	2%	1%
GLUTAMAX	1X	1X	1X
D-glucose	21.6 mM	2.442 mM	0
Bicarbonate de sodium	2.6 g/L	14.64 mM	0
ITS-X	1X	0.5X	1X
TPB/TPPB	200 nM	0	1 μ M
LDN	100 nM	200 nM	0.25 μ M
KGF	50 ng/mL	50 ng/mL	1.3 nM
SANT-1	250 nM	0.25 μ M	0.25 μ M
Alpha-Tocophérol	0	0	4.5 μ M
PDBU	0	500 nM	0
Acide rétinoïque	1 μ M	2 μ M	29.9 μ M
Vitamine C / Acide ascorbique	0	0.25 mM	0
Rock inhibitor	0	10 μ M	10 μ M
P/S (Penicillin/Streptomycin)		1X	

Tableau 6 Comparaison des milieux et facteurs au stade 4 entre différents protocoles.

Ingrédient	Hoesli 2D	STAR	Shapiro
Temps	4 jours	5 jours (S4D2+S4D4)	4 jours
Milieu	MCDB 131	MCDB 131	DMEM
BSA/HSA	2%	2%	1%
GLUTAMAX	1X	1X	1X
D-glucose	21.6 mM	2.442 mM	0
Bicarbonate de sodium	2.6 g/L	14.64 mM	0
ITS-X	1X	0.5X	1X
TPB/TPPB	100 nM	0	0
LDN	200 nM	0	0.25 μ M
KGF	50 ng/mL	50 ng/mL	1.3 μ M
SANT-1	250 nM	0.25 μ M	0.25 μ M
EGF	0	0	8.33 μ M
Alpha-Tocophérol	0	0	4.5 μ M
Acide rétinoïque	0.1 μ M	0.1 μ M	29.9 μ M
activine A	0	5 ng/mL	0
Vitamine C / Acide ascorbique	0	0.25 mM	0
Rock inhibitor	0	10 μ M	0
P/S (Penicillin/Streptomycin)		1X	

ANNEXE B Codes R et Python

Code Graphiques Violon/Histogramme/Moyenne pour H1 et iPSC PYTHON :

```
#!/usr/bin/env python3

# -*- coding: utf-8 -*-

"""

Created on Tue Jun 24 22:46:39 2025

@author: alexandresimard

"""

import pandas as pd

import matplotlib.pyplot as plt

import seaborn as sns

# Charger les données

fichier = "/Users/alexandresimard/Desktop/cellpro/iPSC_Try2_Global.csv"

df = pd.read_csv(fichier)

# Filtrer circularité  $\geq 0.5$  et diamètre entre 75 et 300

df_filtre = df[(df["AreaShape_FormFactor"] >= 0.5) &

               (df["Diametre_um"] >= 75) &

               (df["Diametre_um"] <= 600)]

# Violin plot

plt.figure(figsize=(8, 6))

sns.violinplot(x="Jour", y="Diametre_um", data=df_filtre, palette="pastel", inner=None,
```

```

        order=["D1", "D2", "D3"])

sns.boxplot(x="Jour", y="Diametre_um", data=df_filtre, width=0.2, showcaps=True,

            boxprops={'facecolor':'white', 'edgecolor':'black'},

            whiskerprops={'color':'black'}, flierprops={'marker': 'o', 'markersize': 4, 'alpha': 0.3},

            medianprops={'color':'black'}, order=["D1", "D2", "D3"])

plt.ylim(0, 700)

plt.ylabel("Diamètre (µm)")

plt.title("TRY 2: Distribution des diamètres (Violin plot)")

plt.tight_layout()

plt.show()

jours = sorted(df_filtre["Jour"].unique())

fig, axes = plt.subplots(1, len(jours), figsize=(15, 5), sharey=True)

for i, jour in enumerate(jours):

    sous_df = df_filtre[df_filtre["Jour"] == jour]

    axes[i].hist(sous_df["Diametre_um"], bins=20, color="skyblue", edgecolor="black")

    axes[i].set_title(f'{jour}')

    axes[i].set_xlim(75, 600)

    axes[i].set_xlabel("Diamètre (µm)")

    if i == 0:

        axes[i].set_ylabel("Nombre de clusters")

plt.suptitle("TRY 2: Histogrammes des tailles par jour", fontsize=14)

plt.tight_layout()

plt.show()

```

```

# Calcul de la moyenne

moyennes = df_filtre.groupby("Jour")["Diametre_um"].mean().reindex(["D1", "D2",
"D3"]).reset_index()

# Ligne + point

plt.figure(figsize=(6, 4))

sns.lineplot(data=moyennes, x="Jour", y="Diametre_um", marker="o", linewidth=2.5,
markersize=8, color="black")

plt.ylabel("Diamètre moyen (µm)")

plt.ylim(0, 600)

plt.title("TRY 2: Évolution du diamètre moyen par jour")

plt.grid(True)

plt.tight_layout()

plt.show()

```

Code python pour filtrer circularité en bas de 0.5 et réunir les données ensemble

```

#!/usr/bin/env python3

# -*- coding: utf-8 -*-

"""

Created on Sun Jun 22 09:49:32 2025

@author: alexandresimard

"""

import pandas as pd

import os

import re

```

```

import math

# Paramètre d'échelle : 450 px = 1000 µm

px_to_um = 1000 / 450

# Répertoire contenant les fichiers CSV

dossier = "/Users/alexandresimard/Desktop/cellpro"

# Initialisation

donnees_globales = []

# Lecture de tous les fichiers correspondant au motif R*-D*-All.csv
for fichier in os.listdir(dossier):

    if re.match(r"R\d-D\d-All\.csv", fichier):

        # Extraction de la répétition et du jour

        match = re.match(r"R(\d)-D(\d)-All\.csv", fichier)

        rep = f"R{match.group(1)}"

        jour = f"D{match.group(2)}"

        # Lecture du fichier

        chemin_complet = os.path.join(dossier, fichier)

        df = pd.read_csv(chemin_complet)

        # Filtrage : circularité  $\geq 0.5$ 

        df_filtre = df[df["AreaShape_FormFactor"] >= 0.5].copy()

        # Conversion en diamètre (µm)

        df_filtre["Diametre_um"] = df_filtre["AreaShape_Area"].apply(

            lambda a: 2 * math.sqrt(a / math.pi) * px_to_um

        )

```

```

# Filtrage taille

df_filtre = df_filtre[(df_filtre["Diametre_um"] >= 20) & (df_filtre["Diametre_um"] <= 160)]

# Ajout colonnes Répétition et Jour

df_filtre["Repetition"] = rep

df_filtre["Jour"] = jour

donnees_globales.append(df_filtre[["Repetition", "Jour", "Diametre_um",
"AreaShape_FormFactor"]])

# Fusion

df_final = pd.concat(donnees_globales, ignore_index=True)

# Export dans le même dossier que les fichiers source

chemin_export = os.path.join(dossier, "resultats_global.csv")

df_final.to_csv(chemin_export, index=False)

print(f"Fichier exporté : {chemin_export}")

```

Code R d'analyse statistique:

Boxplot:

```

par(mfrow = c(1, 3), mar = c(5, 6, 4, 2), oma = c(0, 0, 0, 0))

options(repr.plot.width = 15, repr.plot.height = 5)

# CHIR

boxplot(Sox17 ~ CHIR_uM, data = data,

        main = "Effet de CHIR sur Sox17",

        xlab = "CHIR99021 (µM)",

        ylab = "Sox17+ (%)",

        col = "lightblue",

        cex.axis = 1.2, cex.lab = 1.4, cex.main = 1.6)

```



```
# activine A
```

```
boxplot(Sox17 ~ activineA_ng, data = data,  
        main = "Effet de l'activine A sur Sox17",  
        xlab = "activine A (ng/mL)",  
        ylab = "",  
        col = "lightgreen",  
        cex.axis = 1.2, cex.lab = 1.4, cex.main = 1.6)
```

```
# Temps
```

```
boxplot(Sox17 ~ Temps_jours, data = data,  
        main = "Effet du Temps de traitement sur Sox17",  
        xlab = "Temps (jours)",  
        ylab = "",  
        col = "lightcoral",  
        cex.axis = 1.2, cex.lab = 1.4, cex.main = 1.6)ANNOVA:
```

```
model <- aov(Sox17 ~ activineA_ng + Temps_jours + CHIR_uM, data = data)
```

```
# Résultat de l'ANOVA
```

```
summary(model)
```

ANNEXE C Protocoles développés au cours de l'étude

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



McGill

SOP details

Title	Passage and Maintenance of MIN6 Cells from 2D to 3D Suspension Culture
Description	Standard protocol to culture MIN6 mouse beta cells in 3D suspension using a 30 mL bioreactor. This SOP is designed for general use and serves as a foundational method for adapting 3D culture conditions to more sensitive lines such as human pluripotent stem cells (e.g., H1). Text e
Author	Alexandre Simard
SOP number	
Version number	1.0

	Name	Date	Signature
Prepared	Alexandre Simard		
Review			
Review			
Authorized			

Version changes

Version	Name	Date	Changes made
1			

Table of contents

1	Purpose.....	3
---	--------------	---

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



McGill

2	Principle	3
3	Expected results	3
4	Prerequisite training and SOPs	3
5	Required materials	3
5.1	Workplace	3
5.2	Equipment	4
5.3	Reagents	4
5.4	Preparation of working solutions	5
5.5	Calculations	6
6	Procedure	6
6.1	Safety Considerations.....	6
6.2	Working procedure.....	7
6.2.1	2D Cell Culture and Expansion.....	7
6.2.2	Passage from 2D to 3D Suspension	7
6.2.3	C. 3D Culture Maintenance.....	7
6.2.4	Live/Dead Staining.....	8
6.2.5	Metabolite Sampling	8
6.3	Waste handling	8
7	References	9
8	Annual Review.....	9

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 2 of 9

Standard Operating Procedure Hoesli Lab



1 Purpose

To provide a robust and reproducible method to culture MIN6 pancreatic beta cells in 3D suspension. This protocol may also serve as a baseline for adapting the 3D process to other cell lines, including human iPSCs and H1.

2 Principle

MIN6 cells are enzymatically detached from adherent culture, filtered into single-cell suspension, and seeded into a stirred suspension bioreactor where they spontaneously aggregate into spheroids.

3 Expected results

- Formation of homogeneous 3D aggregates of MIN6
- High cell viability
- Readable imaging for morphology and viability
- Usable spent media samples for metabolic profiling

4 Prerequisite training and SOPs

SOP_r001_MIN6 Cell Culture_SF_Val

5 Required materials

5.1 Workplace

- Biosafety cabinet (Class II)

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 3 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



McGill

- Incubator (37°C, 5% CO₂)
- Magnetic stirrer compatible with 30 mL bioreactor
- Inverted and fluorescence microscopes

5.2 Equipment

- T75 cell culture flasks
- 30 mL mini-bioreactor
- Centrifuge
- Automatic cell counter
- Serological pipettes (5, 10, 25 mL)
- Pipette controller
- Micropipettes (P200, P1000) and sterile tips
- Sterile 15 mL and 50 mL centrifuge tubes
- Sterile 0.2 µm cell strainer/filter
- 6-well plates (for imaging and viability staining)
- Kimwipes and absorbent paper towels
- Waste disposal containers

5.3 Reagents

Name	Company and Catalogue #	Location	Remarks
------	-------------------------	----------	---------

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 4 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



TrypLE	Life Technologies 12605010	Chemical Cabinet	
Phosphate Buffered Saline (PBS), 1X	Life Technologies 14190144	Chemical cabinet	
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Life Technologies 10313021	Leaks Lab 4°C Refrigerator	
Fetal Bovine Serum (FBS)	Fisher Scientific SH3039603	-20°C Freezer 7120	
Penicillin-Streptomycin (P/S)	Life Technologies 15140122	-20°C Freezer 7120	
L-Glutamine	Life Technologies 25030081	-20°C Freezer 7120	
β-Mercaptoethanol (β-ME)	Sigma-Aldrich M6250	4°C Refrigerator 7120	
HEPES Buffer			
Propidium Iodide (PI)			
Calcein AM			

5.4 Preparation of working solutions

Live/Dead staining mix (per assay):

Prepare freshly before use:

- 50 µL DMEM (without phenol red)
- 442 µL HEPES buffer
- 7.5 µL Propidium Iodide
- 0.5 µL Calcein AM

Protect from light. Discard unused solution after use.

Complete MIN6 Culture Medium

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 5 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



Prepare fresh or use pre-aliquoted sterile-filtered solution:

- **Base:** DMEM (high glucose, pyruvate, GlutaMAX™)
- **Supplements:**
 - 10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS)
 - 1% (v/v) Penicillin-Streptomycin
 - 1% (v/v) L-Glutamine
 - 50 µM β-Mercaptoethanol

Mix under sterile conditions and store at 4°C for up to 7 days.

5.5 Calculations

- **Cell seeding concentration:** 0.3×10^6 cells/mL
- **Bioreactor volume:** 30 mL → total of 9×10^6 cells required
- Use automatic counter to determine initial concentration
- Calculate resuspension volume accordingly:

$$\text{Volume to seed (mL)} = \frac{9 \times 10^6}{\text{cell concentration} \left(\frac{\text{cells}}{\text{mL}} \right)}$$

- Complete to 30 mL total with fresh media

6 Procedure

6.1 Safety Considerations

Required personnel training:

- a. Workplace Hazardous Materials Information System (WHMIS)
- b. Introduction to Biosafety
- c. Safe Use of Biological Safety Cabinets

Minimum personal protective equipment (PPE):

- a. Lab coat
- b. Safety glasses
- c. Long pants

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 6 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



- d. Closed shoes
- e. Hair tied back (if long)
- f. Nitrile gloves (unless otherwise specified according to the MSDS)

Refer to the MSDS of all chemicals/reagents used.

Concentrated β -mercaptoethanol is highly toxic. Handle stock solution in the fume hood and wear two layers of nitrile gloves.

6.2 Working procedure

6.2.1 2D Cell Culture and Expansion

1. Add 6 mL of complete MIN6 medium into a sterile T75 flask and pre-warm in incubator.
2. Thaw cryopreserved MIN6 vial in 37°C water bath.
3. Transfer thawed cells into flask under BSC.
4. Gently rock flask to distribute cells and incubate at 37°C, 5% CO₂.
5. Change media every 2 days until cells reach ~90% confluency.

6.2.2 Passage from 2D to 3D Suspension

1. Bring PBS, TrypLE, and medium to room temperature.
2. Aspirate old medium from flask.
3. Rinse with 5–10 mL PBS (avoid direct pipetting on cells); aspirate.
4. Add 5 mL TrypLE and incubate 5 minutes at 37°C.
5. Add 10 mL of medium to neutralize TrypLE; pipette to dissociate cells.
6. Transfer to 50 mL conical tube; centrifuge at 1200 rpm for 5 minutes.
7. Aspirate supernatant; resuspend pellet in fresh medium.
8. Filter through 0.2 μ m strainer to obtain single cells.
9. Count cells using automatic counter.
10. Calculate the volume needed to seed 9×10^6 cells (0.3×10^6 cells/mL in 30 mL).
11. Transfer the cell suspension into a 30 mL bioreactor and complete with medium to 30 mL.
12. Place on shaker inside incubator (37°C, 5% CO₂).

6.2.3 C. 3D Culture Maintenance

1. Remove bioreactor from incubator and allow clusters to settle in BSC for 10 minutes.
2. Aspirate 20 mL supernatant carefully.
3. Transfer 3–4 mL from the bottom (containing clusters) to a 6-well plate for microscopy.
4. After imaging, return clusters to bioreactor and rinse the well with medium.

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 7 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



5. Refill the bioreactor to 30 mL with fresh medium.
6. Gently resuspend clusters and return bioreactor to shaker in incubator.

6.2.4 Live/Dead Staining

1. Transfer a small volume of clusters to a 6-well plate.
2. Add 500 μ L of freshly prepared Live/Dead staining mix.
3. Incubate 20 minutes at 37°C.
4. Observe under fluorescence microscope (green = live, red = dead).

6.2.5 Metabolite Sampling

1. Centrifuge collected media from each bioreactor change.
2. Aliquot 1 mL of clarified supernatant into sterile tubes.
3. Freeze samples at -20°C.
4. Analyze for Glucose, Glutamine, Glutamate, and Lactate concentrations.

6.3 Waste handling

6.3.1 Liquid Waste

Liquid cell culture waste must be treated with 10% bleach and disposed of in a designated **cell culture waste receptacle (yellow plastic container)**.

6.3.2 Solid Waste

All disposable non-sharps items are discarded in a **single-walled non-sharps biohazard bin**.
E.g. Gloves, kimwipes, centrifuge tubes.

All disposable sharps items are discarded in a **double-walled sharps biohazard bin**. Spent micropipette tips must be contained in a box/bag prior to disposal (**NO loose tips**).
E.g. Serological pipettes, micropipette tips (contained).

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 8 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



McGill

7 References

8 Annual Review

Reviewer	Date	Changes made

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 9 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



McGill

SOP details

Title	Suspension Culture and Stage 1 Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells (H1) in 3D Clusters (6 wells plate)
Description	This SOP describes the optimized procedure for culturing H1 pluripotent stem cells as 3D aggregates in suspension and inducing definitive endoderm differentiation (Stage 1).
Author	Alexandre Simard
SOP number	
Version number	1.0

	Name	Date	Signature
Prepared	Alexandre Simard		
Review			
Review			
Authorized			

Version changes

Version	Name	Date	Changes made
1			

Table of contents

1	Purpose.....	3
---	--------------	---

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



McGill

2	Principle	3
3	Expected results.....	3
4	Prerequisite training and SOPs	3
5	Required materials.....	3
5.1	Workplace	3
5.2	Equipment.....	4
5.3	Reagents	4
5.4	Preparation of working solutions.....	5
5.5	Calculations	6
6	Procedure	6
6.1	Safety Considerations	6
6.2	Working procedure	6
6.3	Waste handling	8
7	References	9
8	Annual Review	9

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 2 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



1 Purpose

To provide a standardized and validated protocol for transitioning adherent H1 hPSC cultures to 3D suspension clusters, followed by induction of Stage 1 differentiation toward definitive endoderm.

2 Principle

Human pluripotent stem cells (H1 line) are gently dissociated into small clusters using EDTA and transferred to ultra-low attachment 6-well plates. In suspension, cells spontaneously form 3D aggregates under gentle agitation. ROCK inhibitor is added during the first 24 hours post-seeding to enhance viability. Differentiation is initiated using Stage 1 medium after 48 hours. No Matrigel coating or microwell aggregation is required.

3 Expected results

- Efficient aggregate formation without the use of Matrigel or AggreWell systems
- Stable cluster morphology maintained during Stage 1
- Consistent endpoint population of 90%+ SOX17 cells by flow cytometry at end of Stage 1

4 Prerequisite training and SOPs

- T001: Small lab equipment
- T002: Cell culture
- T007: Cell enumeration
- R021: Human pluripotent stem cell maintenance, freezing and thawing.
- Flow Cytometry

5 Required materials

5.1 Workplace

All work should be performed by a qualified person in Biosafety Level 2 facility. Aseptic technique should be applied, working in a Class II biosafety cabinet (laminar flow protecting both the worker and the sample). Work with sterile pippets and other plastics and glassware throughout the entire procedure.

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 3 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



McGill

5.2 Equipment

Class II biosafety cabinet (BSC) with laminar flow

Phase contrast inverted microscope

Swing-bucket centrifuge

Cell culture aspirator system for the BSC

CO₂ incubator at 37°C, 5% CO₂, ambient O₂

Automated cell counter (TC20)

Rotary shaking platform (incubator-safe)

5.3 Reagents

Name	Company and Catalogue #	Location	Remarks
Ethanol or Isopropanol		In large carboys in lab 7120	
Bleach		Under sink in lab 7120	
WA01 H1 embryonic stem cells	WiCell institute Order# Cell Bank Shipment 18-W0555 Lot WB67657, p22	Working cell bank cryostorage tank in Room 7150	The working cell bank should typically be at P28 to P35. If you extend beyond 20 passages from the original master bank (i.e. higher than P45), characterization of the cells is needed (karyotyping, mycoplasma testing, etc).
E8			
E8 Supplement			
TrypLE™ select enzyme (1X), contains phenol red	ThermoFisher, Catalog #12605010 (100ml)	R7120, chemicals cabinet	
DPBS (Ca ⁻ and Mg ⁻)	ThermoFisher Catalog #14190250 (10x500ml)	R7120, chemicals cabinet	
MCDB131 Media	ThermoFisher Catalog # 10372-019	R7050, 4°C	

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 4 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



McGill

Fatty acid-free Bovine Serum Albumin (FAF BSA)	Proliant Cat # 68700	R7120, chemicals cabinet	Refer to the Table Stem Cells Inventory and Aliquots V1 BR PR.xlsx
GlutaMAX™ Supplement	ThermoFisher Catalog # 35050061 (100ml)	R7120, chemicals cabinet	
D- (+) -Glucose solution	Sigma Catalog # G8769-100ML	R7120, 4°C (Fridge #1)	
Sodium bicarbonate	Fisher Chemicals Catalog # S233-00	R7120, chemicals cabinet	
CHIR 99021	Tocris (Cedarlane) Cat # 4423/10	Aliquots stored at bottom rack in the -80°C Freezer #1	Refer to the Table Stem Cells Inventory and Aliquots V1 BR PR.xlsx
Activin A	R&D systems (Cedarlane) Cat# 338-AC-50/CF	Aliquots stored at bottom rack in the -80°C Freezer #1	Refer to the Table Stem Cells Inventory and Aliquots V1 BR PR.xlsx

5.4 Preparation of working solutions

5.4.1 Stage 0 basal medium

Please refer to the hESC maintenance SOP for E8 complete medium preparation.

5.4.2 Stage 1 basal medium

- Add the following, in this order, to MCDB 131 medium, **500 mL bottle** (already contains 1.1 g/L Sodium bicarbonate & 5.6 mM glucose; **final volume will be 507 mL**):
 - FAF BSA (Fatty acid-free bovine serum albumin), 0.5% (2.535 g). Allow dissolution before adding other components. The BSA will adsorb to plastic walls and can alter how other components adsorb.
 - GlutaMAX supplement, 1X final concentration (5.08 mL of 100X solution)
 - D-glucose solution, 10 mM added concentration (2.03 mL of 2500 mM stock solution, i.e. final concentration is 15.6 mM)
 - Sodium bicarbonate (NaHCO_3), 1.5 g/L added concentration (0.76 g; this brings the total final concentration to 2.6 g/L sodium bicarbonate in the formulation)
- Filter sterilize (0.2 μm filter). Use an autoclaved cell culture only Pyrex bottle, autoclaved in the last 6 months, no condensation inside.

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 5 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



3. Wrap in aluminum foil – avoid exposure to light (e.g. handle in biosafety cabinet without light when aliquoting). If the volume reaches half the bottle height or if only small amounts will be used, it is preferable to prepare 50 to 100 mL aliquots to avoid pH changes.
4. Store at 4°C protected from light for up to 2 months.

Caution: bicarbonate equilibrates with air and the pH will change if there is too much headspace in the storage container.

5.5 Calculations

6 Procedure

6.1 Safety Considerations

Required personnel training:

- a. Workplace Hazardous Materials Information System (WHMIS)
- b. Introduction to Biosafety
- c. Safe Use of Biological Safety Cabinets

Minimum personal protective equipment (PPE):

- a. Lab coat
- b. Safety glasses
- c. Long pants
- d. Closed shoes
- e. Hair tied back (if long)
- f. Nitrile gloves (unless otherwise specified according to the MSDS)

Refer to the MSDS of all chemicals/reagents used.

Concentrated β -mercaptoethanol is highly toxic. Handle stock solution in the fume hood and wear two layers of nitrile gloves.

6.2 Working procedure

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 6 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



6.2.1 2D to 3D Transition – Stage 0

1. Bring EDTA, medium, and PBS to room temperature.
2. Place the 2D plate with cells in the biosafety cabinet (BSC). Aspirate the old medium.
3. Rinse each well with 1 mL PBS and remove.
4. Add 1 mL EDTA per well directly on adherent colonies. Incubate at 37 °C for 3 minutes.
5. Aspirate EDTA and add 1 mL of medium per well.
6. Gently dislodge cells using a cell scraper.
7. Collect cells into a 50 mL conical tube.
8. Take a 0.2 mL sample for counting:
 1. Centrifuge the sample at $300 \times g$ for 5 minutes.
 2. Resuspend the pellet in PBS and centrifuge again at $300 \times g$ for 5 minutes.
 3. Remove PBS, add 1 mL TrypLE, and incubate for 4 minutes in a 37 °C water bath. Gently resuspend, incubate for another 4 minutes, then neutralize with 2.5 mL of medium. Centrifuge at $300 \times g$ for 5 minutes.
 4. Resuspend the pellet in 0.2 mL of fresh medium. Count the cells using an automatic counter and/or manually.
9. Seed 3×10^6 cells per well into a 6-well ultra-low attachment plate.
10. Add medium to bring the final volume to 5 mL per well.
11. Add 5 μ L ROCK inhibitor (Y-27632) per well.
12. Place the plate on an orbital shaker set at 90 RPM, at 37 °C and 5% CO₂.

6.2.2 3D medium change stage 0 (each 24h)

1. Bring E8 medium to room temperature.
2. Using a 10 mL pipette, collect the medium and clusters from each well and transfer them to separate 15 mL conical tubes.
3. Add 2 mL of fresh E8 medium per well to preserve any clusters that remain in the wells.
4. Let the clusters sediment in the 15 mL tubes for 5 minutes. Carefully remove as much old medium as possible.
5. Resuspend the clusters in 3 mL of fresh E8 medium and transfer them back into their respective wells.
6. Return the plate to the orbital shaker.

6.2.3 Transition – Stage 0 to Stage 1

1. Bring Stage 1 medium, Activin A and CHIR-99021 to room temperature.

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 7 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



2. Using a 10 mL pipette, transfer the medium and clusters from each well into separate 15 mL tubes.
3. Add 2 mL of fresh Stage 1 medium per well to maintain the remaining clusters.
4. Let the clusters sediment in the tubes for 5 minutes. Remove as much of the old medium as possible.
5. Add 3 mL of fresh Stage 1 medium to each tube.
6. Add 5 μ L CHIR-99021 and 5 μ L Activin A to each 15 mL tube.
7. Resuspend the clusters and transfer them back to the ultra-low attachment plate. Return the plate to the orbital shaker.

6.2.4 Medium Change – Stage 1 (Days 2 and 3)

1. Bring Stage 1 medium and Activin A to room temperature.
2. Using a 10 mL pipette, transfer the medium and clusters from each well into separate 15 mL tubes.
3. Add 2 mL of fresh Stage 1 medium per well to preserve any remaining clusters.
4. Let clusters sediment in the tubes for 5 minutes. Remove as much of the old medium as possible.
5. Add 3 mL of fresh Stage 1 medium to each tube.
6. Add 5 μ L Activin A to each 15 mL tube. (*Note: CHIR-99021 is only added during the first 24 h.*)
7. Resuspend the clusters and transfer them back to the ultra-low attachment plate. Return the plate to the orbital shaker.

Additive	Time of addition	Stock concentration	Final concentration	Dilution factor
CHIR 99021	Stage 1 day 1	3 mM	3 μ M	1:1000
Activin A	Stage 1 day 1, 2 & 3	100 mg/mL	100 ng/mL	1:1000

6.3 Waste handling

6.3.1 Liquid Waste

Liquid cell culture waste must be treated with 10% bleach and disposed of in a designated **cell culture waste receptacle (yellow plastic container)**.

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 8 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



McGill

6.3.2 Solid Waste

All disposable non-sharps items are discarded in a **single-walled non-sharps biohazard bin**.
E.g. Gloves, kimwipes, centrifuge tubes.

All disposable sharps items are discarded in a **double-walled sharps biohazard bin**. Spent micropipette tips must be contained in a box/bag prior to disposal (**NO loose tips**).
E.g. Serological pipettes, micropipette tips (contained).

7 References

8 Annual Review

Reviewer	Date	Changes made

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 9 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



McGill

SOP details

Title	Suspension Culture and Stage 1 Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells (iPSC) in 3D Clusters (6 wells plate)
Description	This SOP describes the optimized procedure for culturing iPSC pluripotent stem cells as 3D aggregates in suspension and inducing definitive endoderm differentiation (Stage 1).
Author	Alexandre Simard
SOP number	
Version number	1.0

	Name	Date	Signature
Prepared	Alexandre Simard		
Review			
Review			
Authorized			

Version changes

Version	Name	Date	Changes made
1			

Table of contents

1	Purpose.....	3
---	--------------	---

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



McGill

2	Principle	3
3	Expected results.....	3
4	Prerequisite training and SOPs	3
5	Required materials.....	3
5.1	Workplace	3
5.2	Equipment.....	4
5.3	Reagents	4
5.4	Preparation of working solutions.....	5
5.5	Calculations	6
6	Procedure	6
6.1	Safety Considerations	6
6.2	Working procedure	6
6.3	Waste handling	8
7	References	9
8	Annual Review	9

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 2 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



1 Purpose

To provide a standardized and validated protocol for transitioning adherent iPSC cultures to 3D suspension clusters, followed by induction of Stage 1 differentiation toward definitive endoderm.

2 Principle

Human pluripotent stem cells (iPSC line) are gently dissociated into small clusters using ReLeSR and transferred to ultra-low attachment 6-well plates. In suspension, cells spontaneously form 3D aggregates under gentle agitation. ROCK inhibitor is added during the first 24 hours post-seeding to enhance viability. Differentiation is initiated using Stage 1 medium after 48 hours. No Matrigel coating or microwell aggregation is required.

3 Expected results

- Efficient aggregate formation without the use of Matrigel or AggreWell systems
- Stable cluster morphology maintained during Stage 1
- Consistent endpoint population of 90%+ SOX17 cells by flow cytometry at end of Stage 1

4 Prerequisite training and SOPs

- T001: Small lab equipment
- T002: Cell culture
- T007: Cell enumeration
- R021: Human pluripotent stem cell maintenance, freezing and thawing. (CAUTION: MATRIGEL coating for iPSC need 1.2 to 1.5 ml of MATRIGEL per well instead of 1 ml)
- Flow Cytometry

5 Required materials

5.1 Workplace

All work should be performed by a qualified person in Biosafety Level 2 facility. Aseptic technique should be applied, working in a Class II biosafety cabinet (laminar flow protecting both the worker and the sample). Work with sterile pippets and other plastics and glassware throughout the entire procedure.

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 3 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



McGill

5.2 Equipment

Class II biosafety cabinet (BSC) with laminar flow

Phase contrast inverted microscope

Swing-bucket centrifuge

Cell culture aspirator system for the BSC

CO₂ incubator at 37°C, 5% CO₂, ambient O₂

Automated cell counter (TC20)

Rotary shaking platform (incubator-safe)

5.3 Reagents

Name	Company and Catalogue #	Location	Remarks
Ethanol or Isopropanol		In large carboys in lab 7120	
Bleach		Under sink in lab 7120	
iPSC cell line	From NRC	Working cell bank cryostorage tank in Room 7150	The working cell bank should typically be at P28 to P35. If you extend beyond 20 passages from the original master bank (i.e. higher than P45), characterization of the cells is needed (karyotyping, mycoplasma testing, etc).
mTeSR			
mTeSR Supplement			
ReLeSR™	STEMCELL Tech, Catalog # 100-0483 (100ml)	R7120, chemicals cabinet	
DPBS (Ca ⁻ and Mg ⁻)	ThermoFisher Catalog #14190250 (10x500ml)	R7120, chemicals cabinet	

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 4 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



McGill

MCDB131 Media	ThermoFisher Catalog # 10372-019	R7050, 4°C	
Fatty acid-free Bovine Serum Albumin (FAF BSA)	Proliant Cat # 68700	R7120, chemicals cabinet	Refer to the Table Stem Cells Inventory and Aliquots V1 BR PR.xlsx
GlutaMAX™ Supplement	ThermoFisher Catalog # 35050061 (100ml)	R7120, chemicals cabinet	
D- (+) -Glucose solution	Sigma Catalog # G8769-100ML	R7120, 4°C (Fridge #1)	
Sodium bicarbonate	Fisher Chemicals Catalog # S233-00	R7120, chemicals cabinet	
CHIR 99021	Tocris (Cedarlane) Cat # 4423/10	Aliquots stored at bottom rack in the -80°C Freezer #1	Refer to the Table Stem Cells Inventory and Aliquots V1 BR PR.xlsx
Activin A	R&D systems (Cedarlane) Cat# 338-AC-50/CF	Aliquots stored at bottom rack in the -80°C Freezer #1	Refer to the Table Stem Cells Inventory and Aliquots V1 BR PR.xlsx

5.4 Preparation of working solutions

5.4.1 Stage 0 basal medium

Please refer to the hESC maintenance SOP for mTeSR complete medium preparation.

5.4.2 Stage 1 basal medium

1. Add the following, in this order, to MCDB 131 medium, **500 mL bottle** (already contains 1.1 g/L Sodium bicarbonate & 5.6 mM glucose; **final volume will be 507 mL**):
 - a. FAF BSA (Fatty acid-free bovine serum albumin), 0.5% (2.535 g). Allow dissolution before adding other components. The BSA will adsorb to plastic walls and can alter how other components adsorb.
 - b. GlutaMAX supplement, 1X final concentration (5.08 mL of 100X solution)
 - c. D-glucose solution, 10 mM added concentration (2.03 mL of 2500 mM stock solution, i.e. final concentration is 15.6 mM)
 - d. Sodium bicarbonate (NaHCO₃), 1.5 g/L added concentration (0.76 g; this brings the total final concentration to 2.6 g/L sodium bicarbonate in the formulation)

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 5 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



2. Filter sterilize (0.2 μm filter). Use an autoclaved cell culture only Pyrex bottle, autoclaved in the last 6 months, no condensation inside.
3. Wrap in aluminum foil – avoid exposure to light (e.g. handle in biosafety cabinet without light when aliquoting). If the volume reaches half the bottle height or if only small amounts will be used, it is preferable to prepare 50 to 100 mL aliquots to avoid pH changes.
4. Store at 4°C protected from light for up to 2 months.

Caution: bicarbonate equilibrates with air and the pH will change if there is too much headspace in the storage container.

5.5 Calculations

6 Procedure

6.1 Safety Considerations

Required personnel training:

- a. Workplace Hazardous Materials Information System (WHMIS)
- b. Introduction to Biosafety
- c. Safe Use of Biological Safety Cabinets

Minimum personal protective equipment (PPE):

- a. Lab coat
- b. Safety glasses
- c. Long pants
- d. Closed shoes
- e. Hair tied back (if long)
- f. Nitrile gloves (unless otherwise specified according to the MSDS)

Refer to the MSDS of all chemicals/reagents used.

Concentrated β -mercaptoethanol is highly toxic. Handle stock solution in the fume hood and wear two layers of nitrile gloves.

6.2 Working procedure

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 6 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



6.2.1 2D to 3D Transition – Stage 0

1. Bring ReLeSR™, culture medium, ROCK inhibitor (Y-27632), and PBS to room temperature.
2. Prepare the 3D culture medium by adding 1 μ L of ROCK inhibitor per mL. For every four fully confluent 2D wells, prepare enough medium to seed three 3D wells, each requiring 5 mL.
3. Place the 2D plate with cells into the biosafety cabinet (BSC) and aspirate the spent medium.
4. Rinse each well with 1 mL of PBS and aspirate.
5. Add 1 mL of ReLeSR™ directly to each well. Wait 30 seconds, then aspirate.
6. Incubate the wells dry (no liquid) at 37 °C for 3 minutes.
7. Remove the plate from the incubator and add 1 mL of medium containing ROCK inhibitor to each well.
8. Gently dislodge the colonies using a 1 mL pipette.
9. Collect the cells into a 15 mL conical tube.
10. For every set of four 2D wells $\geq 90\%$ confluent, distribute the cells into three 3D wells.
11. Adjust the volume in each 3D well to 5 mL using medium with ROCK inhibitor.
12. Place the 3D plate on an orbital shaker set to 90 rpm at 37 °C with 5% CO₂.

6.2.2 3D medium change stage 0 (each 24h)

1. Bring mTeSR medium to room temperature.
2. Using a 10 mL pipette, collect the medium and clusters from each well and transfer them to separate 15 mL conical tubes.
3. Add 2 mL of fresh mTeSR medium per well to preserve any clusters that remain in the wells.
4. Let the clusters sediment in the 15 mL tubes for 5 minutes. Carefully remove as much old medium as possible.
5. Resuspend the clusters in 3 mL of fresh mTeSR medium and transfer them back into their respective wells.
6. Return the plate to the orbital shaker.

6.2.3 Transition – Stage 0 to Stage 1

1. Bring Stage 1 medium, Activin A and CHIR-99021 to room temperature.
2. Using a 10 mL pipette, transfer the medium and clusters from each well into separate 15 mL tubes.
3. Add 2 mL of fresh Stage 1 medium per well to maintain the remaining clusters.

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 7 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



McGill

4. Let the clusters sediment in the tubes for 5 minutes. Remove as much of the old medium as possible.
5. Add 3 mL of fresh Stage 1 medium to each tube.
6. Add 5 μ L CHIR-99021 and 5 μ L Activin A to each 15 mL tube.
7. Resuspend the clusters and transfer them back to the ultra-low attachment plate. Return the plate to the orbital shaker.

6.2.4 Medium Change – Stage 1 (Days 2 and 3)

1. Bring Stage 1 medium and Activin A to room temperature.
2. Using a 10 mL pipette, transfer the medium and clusters from each well into separate 15 mL tubes.
3. Add 2 mL of fresh Stage 1 medium per well to preserve any remaining clusters.
4. Let clusters sediment in the tubes for 5 minutes. Remove as much of the old medium as possible.
5. Add 3 mL of fresh Stage 1 medium to each tube.

6.2.5 Add 5 μ L Activin A to each 15 mL tube. *(Note: CHIR-99021 is only added during the first 24 h.)*

6. Resuspend the clusters and transfer them back to the ultra-low attachment plate. Return the plate to the orbital shaker.

Additive	Time of addition	Stock concentration	Final concentration	Dilution factor
CHIR 99021	Stage 1 day 1	3 mM	3 μ M	1:1000
Activin A	Stage 1 day 1, 2 & 3	100 mg/mL	100 ng/mL	1:1000

6.3 Waste handling

6.3.1 Liquid Waste

Liquid cell culture waste must be treated with 10% bleach and disposed of in a designated **cell culture waste receptacle (yellow plastic container)**.

File name: SOP_TEMPLATE

Author: C. Hoesli

Version: 1

Page: 8 of 9

Standard Operating Procedure

Hoesli Lab



McGill

6.3.2 Solid Waste

All disposable non-sharps items are discarded in a **single-walled non-sharps biohazard bin**.
E.g. Gloves, kimwipes, centrifuge tubes.

All disposable sharps items are discarded in a **double-walled sharps biohazard bin**. Spent micropipette tips must be contained in a box/bag prior to disposal (**NO loose tips**).
E.g. Serological pipettes, micropipette tips (contained).

7 References

8 Annual Review

Reviewer	Date	Changes made