

UNIVERSITE DE NANTES

U.F.R SCIENCE

ECOLE DOCTORALE DE BIOLOGIE-SANTE

# POTENTIEL DES EXOPOLYSACCHARIDES MARINS EN INGENIERIE DES TISSUS SQUELETTIQUES

---

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Science de la vie et de la santé

Spécialité : Biologie Cellulaire et Ingénierie Tissulaire

*Présentée*

*et soutenue publiquement par*

**Emilie REDERSTORFF**

*Le 14 Février 2011, devant le jury ci-dessous*

**Rapporteurs :**

Mme Joëlle AMEEDÉ

Mme Ariane DEAGOSTINI

Directeur de recherche, INSERM, Bordeaux

Directeur de recherche, Hôpitaux universitaires, Genève

**Examineurs :**

M Jean-Marie DEVOISELLE

M Jérôme GUICHEUX

Professeur des Universités, Universités de Montpellier

Directeur de recherche, INSERM, Université de Nantes

**Membre invité :**

Mme Claire VINATIER

Ingénieur R&D, Société GRAFTYS, Aix en Provence

**Directeurs de thèse**

Mme Sylvia COLLIEC-JOUAULT

M Pierre WEISS

Cadre de recherche, IFREMER Nantes

Professeur des Universités, Université de Nantes



*A mes Grands Parents et Parents encore présents ou déjà loin*

*Pour leur affection et pour m'avoir donné les valeurs que je possède*

*A ma Sœur Lucie, A mes Amis de l'Est et de l'Ouest, ainsi qu'à ma Famille*

## Remerciements

*Je tiens à remercier chaleureusement les directeurs des laboratoires de l'INSERM UMRS\_U791 et de biotechnologie et molécules marines de l'Ifremer qui ont été les directeurs de ma thèse. Je remercie le Dr **Sylvia Collic-Jouault** pour m'avoir permis de réaliser cette thèse, pour l'autonomie qu'elle m'a laissée pendant ces trois ans et pour m'avoir fait confiance dans la conduite de ce projet. Je la remercie également de sa patience lors de la correction de ce manuscrit. Je remercie le professeur **Pierre Weiss** pour la confiance qu'il m'a accordée pendant ces trois ans. Je le remercie de sa gentillesse, de son soutien et de ces conseils. Je le remercie également de m'avoir fait découvrir un monde qui m'était encore inconnu, celui de la rhéologie.*

*Je tiens à remercier les personnes qui ont participé et contribué à l'avancée des travaux de cette thèse. Je remercie le Dr **Jérôme Guicheux** d'avoir accepté d'être membre du jury de cette thèse. Je le remercie pour ses nombreux conseils, le temps qu'il m'a accordé et pour son soutien scientifique durant ces années. Je remercie le Dr **Claire Vinatier** d'avoir accepté d'être membre invité du jury de cette thèse. Je la remercie pour m'avoir accordé du temps, pour m'avoir fait partager ses connaissances et son expérience. Je la remercie pour ces nombreux conseils qui ont permis aux travaux d'avancer. Je remercie le Dr **Samia Laïb**, qui a catalysé les travaux au début de cette thèse et qui a aidé à la caractérisation des matériaux. Je la remercie de m'avoir fait partager et entrevoir le monde de la chimie et je la remercie pour sa patience et sa tolérance envers mon raisonnement original.*

*Je tiens à remercier les membres de mon jury, qui me font l'honneur d'évaluer ce travail. Merci à Madame **Joëlle Amédée** et Madame **Ariane De Agostini** d'avoir accepté de juger ce travail et d'en être les rapporteurs. Je remercie le professeur **Jean-Marie Devoiselle** d'avoir accepté de juger ce travail et d'être membre du jury de cette thèse.*

*Je remercie l'Ifremer et la région Pays de la Loire pour le cofinancement de cette thèse*

*Un grand merci à tous les membres du laboratoire d'ingénierie ostéoarticulaire et dentaire de l'INSERM U\_791 qui m'ont aidé de près ou de loin dans ce travail. A **Sophie S.** pour les nombreuses heures passées à couper les blocs d'hydrogels. A **Martial** pour avoir passé du temps à faire fonctionner les PCRs sur des ARNs contenant des EPS. A **Paul** pour m'avoir converti au monde de l'analyse d'image. Même si dans un premier temps comprendre les alt sup ctrl, erode, dilate, smothing était pour moi une langue barbare venue d'ailleurs. A **Pierre C.** pour avoir passé du temps sur les modèles de rats qui ne voulaient pas s'endormir, qui se réveillaient dans le microscanner et qui par-dessus tout ne faisaient pas d'os. De la même façon je tiens à remercier tous mes collègues du laboratoire. A **Maité, Elise, Aurore, Pauline, Julie, Françoise, Ariane, Gildas, Caroline, Thomas, Laurent, Sarah...***

*Je remercie mes amis, autres doctorants et « collègues » qui ont partagé ces trois ans, pour nos petites pauses, pour avoir partagé mes hauts et bas professionnels et personnels. A **Annabelle** (Alias Shama) le soleil du bureau 114. Ton rire et ton sourire ont permis d'égayer ces journées Nantaise si pluvieuse. Merci pour ta bonne humeur, ton soutien et tes shamas conseils. A **Charlotte**, mon coach de présentation, ma colocatrice de chambre en Finlande et ma jumelle d'anniversaire. Merci pour toutes tes petites attentions. A **Jérôme S.**, l'ami qui devient vite indispensable pour une alsacienne dans l'ouest. Un coup de blues, besoin d'un conseil, besoin d'un téléphone, d'un vélo etc... Il est impossible de compter le nombre de services rendus, de parties de belottes (gagné avec Stéphanie), de défaites au badminton, de picon et de twist ingurgiter. De la même façon, je ne compte pas les familles d'huîtres décimées et le nombre de vaches passer sur le barbecue. Merci pour tous ces bons moments et tous ces services rendus. A **Christophe**, (collègue sous marin) merci de m'avoir fait découvrir la Vendée et sa richesse culinaire (champignons, huîtres, tellines, palourdes, crevettes, châtaignes). Mais également pour tous ces bons moments et soirées sur Nantes, bien souvent avec un dénominateur commun tournant autour du picon ou d'un bon repas. A **Thomas** : L'homme aux multiples facettes. Tu as été collègue de labo, de soirées, de bars, de vacances de ski, de vuik- end à la plage, de wii, de dance floor et j'en passe. Merci pour tous ces bons moments et ton soutien. Merci également à sa dulcinée **Julie** pour les virées piscines et soirées en tous genres bretonnes, nantaises ou parisiennes. A **Sophie P** (Alias Popy) pour ces petits cafés, certaines soirées inattendues et ta bonne humeur. A **Mélanie**, qui gère avec une grande efficacité les commandes et la gestion de nos soucis. Mais je pense aussi à notre*

*Mélanie alias mémé, pour ces soirées picons, tous ces chinois le midi et ce week end en bretagne où dixit le trampoline ça envoi trop du keusté. A **Eva**, jumelle de galère de thèse. Heureusement St Bernard est venu à notre secours. Pour la rencontre improbable un samedi soir Nantais ou les anniversaires à la Vendéenne. A **Johan**, collègue de bureau mais également de congrès. Après quelques joggings dans les prairies irlandaises c'est dans les pubs que tu nous as montré ton vrai visage. Parfois il réapparaît de façon inattendue le samedi soir au vestiaire. A **Nicolas** (Nicoco) pour ton humour et ta bonne humeur quotidienne qui ont participé à la dynamique et la bonne marche du bureau. A **Lydie**, capable de traiter des missions de congrès aussi vite que son ombre. Mais qui s'est aussi révélée être une adepte des bo buhn, des barbecues et des weeks end camping en Bretagne. A **Serge**, compagnon de badminton et de course à pied pendant un temps, mais aussi capable de nous préparer de succulents barbecues et repas maison, voui voui. A **Jean-Michel** pour m'avoir fait découvrir les fruits de mer avec les soirées à Préfailles et aussi pour avoir revisité la chanson de Pierre Perret ouvrez ouvrez la cage aux oiseaux.*

*Je remercie mes collègues de l'IFREMER **Corine S.** et **Jacqueline R.**. Je remercie mes collègues doctorants **Karine, Christelle, Anaïs, Vincent, Papa** pour l'apéro du lundi soir et le délicieux repas de Noël! Mais également un grand merci à **Sarah, Raul, Clément** et **Ludo**. Pour toutes ces soirées, ces repas et ces apéros qui m'ont permis de m'intégrer.*

*A **Anne Freeda**, coloc d'un temps et désormais partenaire de bons repas.*

*Je remercie la petite famille de Léo : **Clem, Lisou, Cha, So, Juju, Marine, Léa** and the **coach**. Les deux entraînements par semaine ainsi que les matchs les week end m'on permit de découvrir que le volley ne s'arrêtait pas sur un terrain. J'ai ainsi pu découvrir la Vendée, (magnifique région avec ces salles sans chauffage), Londres mais surtout Nantes, ou plutôt Nantes by night! Merci pour tous ces bons moments.*

*A mes amis de l'EST dont j'ai été géographiquement séparé. A **Paulette** et **Laurence** qui par bonheur ont décidé de poursuivre leur internat en Bretagne. A leurs accompagnateurs notre ardéchois **Gaylord** et notre populaire strasbourgeois **Jean-luc**. Merci pour ces week end bol d'air en Bretagne. Merci également à la hot line téléphonique de l'EST, tenue 24h/24 par **Bobby, Julien** et **Adrien**. Merci de vous être rendu disponibles pour mes coups de fils lamentation et pour m'avoir remonté le moral. Merci également à **Mélo, Nhan, Vir, Tam-tri, DT, Chulie, Babe, Beb, les Mignons, Flo, Gillesss** etc... Pour tous ces bons moments pendant*

*mes retours furtifs en Alsace, nos expéditions à Chamonix, notre périple avec Michael à Annecy, votre visite à Nantes pour un nouvel an avec des airs de Sibérie, les parties de foots, le ski etc...etc...*

*« Tout ce qui est dans la limite du possible doit être et sera accompli »*

*Jules Verne*

*« La source de tout progrès technique réside dans la divine curiosité et l'esprit ludique du  
chercheur qui cogite et expérimente, tout autant que dans l'imagination  
créatrice de l'inventeur »*

*Albert Einstein*



## Liste des Publications et Brevets

### • Publications

E. REDERSTORFF, A. FATIMI, C. SINGUIN, J. RATISKOL, C. VINATIER, P. WEISS, S. COLLIEC-JOUAULT. Sterilization of exopolysaccharides produced by deep-sea bacteria: impact on their stability and degradation, *Marin Drugs*, accepted 2011

E. REDERSTORFF, P. WEISS, S. SOURICE, P. PILET, X. FAN, C. SINGUIN, S. COLLIEC-JOUAULT, J. GUICHEUX, S. LAIB. An *in vitro* study of two GAG-like Marine Polysaccharides as Compounds of injectable hydrogel for bone and cartilage tissue engineering. *Acta biomateriala*, accepted 2011

E. REDERSTORFF, P. WEISS, S. SOURICE, M. MASSON, S. COLLIEC-JOUAULT, B. FELLAH, J. GUICHEUX, C. VINATIER. A sel-setting hydrogel mechanically reinforced with a marine exopolysaccharide as a scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 2011 submitted

F. XIE, E. REDERSTORFF, J. GUICHEUX, J-F. TASSIN, P. WEISS. Study a novel silanized cellulose/laponite composite hydrogel for tissue engineering. *Royal society and interface*, 2010 submitted.

E. MATHIEU, E. REDERSTORFF, C. VINATIER, V. FOREST, P. WEISS, J. GUICHEUX, P. LEMARCHAND. Three-dimensional culture of cardiomyocytes beating in an injectable hydrogel. En cours de rédaction

### ✓ Brevets :

Deux brevets en cours de préparation

S. LAIB, E. REDERSTORFF, J. GUICHEUX, P. WEISS.

E. MATHIEU, E. REDERSTORFF, P. WEISS, P. LEMARCHAND, J. GUICHEUX.

## Liste des Congrès

### ✓ Présentations orales :

E. REDERSTORFF, P. WEISS, S. SOURICE, P. PILET, F. XIE, C. SINQUIN, S. COLLIEC-JOUAULT, J. GUICHEUX, S. LAIB. Hydrogels containing marine polysaccharides for bone and cartilage tissue engineering. *ESB: European conference on biomaterials (Tampere) Finland, Septembre 2010.*

E. REDERSTORFF, P. WEISS, S. SOURICE, P. PILET, F. XIES, C. SINQUIN, S. COLLIEC-JOUAULT, J. GUICHEUX, S. LAIB. Hydrogels containing marine polysaccharides for bone and cartilage tissue engineering” *TERMIS: Tissue Engineering and Regenerative Medical International Society (Galway) Ireland, Juin 2010. Prix “50 Best Abstracts Awards” of TERMIS-EU 2010 Meeting in Galway.*

E. REDERSTORFF, P. WEISS, S. SOURICE, P. PILET, F. XIES, C. SINQUIN, S. COLLIEC-JOUAULT, J. GUICHEUX, S. LAIB. Etude in vitro de deux polysaccharides marins comme compose d’un hydrogel injectable pour l’ingénierie tissulaire de l’os et du cartilage. *JFBTM : Journée Française Biomatériaux et Tissues Minéralisés, juin 2010 (St Etienne), France. Prix de la meilleure présentation orale.*

E. REDERSTORFF, P. WEISS, S. SOURICE, P. PILET, F. XIES, C. SINQUIN, S. COLLIEC-JOUAULT, J. GUICHEUX, S. LAIB. Nouveaux polysaccharides marins pour la réalisation de matrices en ingénierie tissulaire de l’os et du cartilage”. *JDI: Journée des doctorants IFREMER (Brest), septembre 2009.*

### ✓ Présentations Posters :

E. REDERSTORFF, S. LAIB, C. SINQUIN, J. RATISKOL, J. GUICHEUX, P. WEISS, S. COLLIEC-JOUAULT. Novel marine carbohydrate-based biomaterials with potential “GAG-like” biological properties. 6<sup>ème</sup> congrès international des protéoglycanes, France, (Aix les bains), Septembre 2008

E. REDERSTORFF, S. COLLIEC-JOUAULT, C. SINQUIN, J. RATISKOL, A. FATIMI, C. MERCERON, J. GUICHEUX, P. WEISS. Polysaccharides marins et ingénierie tissulaire. *Les journées scientifiques de l’université de Nantes, France, Juin 2008.*

E. REDERSTORFF, S. COLLIEC-JOUAULT, C. SINQUIN, J. RATISKOL, A. FATIMI, C. MERCERON, J. GUICHEUX, P. WEISS. Polysaccharides marins et ingénierie tissulaire. *XXII G.F.G : Groupe Français des Glucides (Axe-les-thermes), France, Mai 2008.*

## Liste des abréviations

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>BMP</b>	Bone morphogenetic protein
<b>2 D</b>	bidimensionnel
<b>ColI</b>	Collagène de type I
<b>ColIII</b>	Collagène de type II
<b>CP</b>	Plasma froid
<b>CSM</b>	Cellule souche mesenchymateuse
<b>CS</b>	Chondroïtine sulfate
<b>Da</b>	Dalton
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified eagle medium
<b>DS</b>	Dematane sulfate
<b>EPS</b>	Exopolysaccharide
<b>EtO</b>	Oxyde d'éthylène
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factor
<b>FTIR</b>	Infra rouge à transformée de fourier
<b>GAG</b>	Glycosaminoglycane
<b>GY785</b>	EPS GY785 natif
<b>GY785 DR</b>	Dérivé de faible masse de l'EPS GY785
<b>GY785 DRS</b>	EPS GY785 DR sur-sulfaté
<b>HA</b>	Acide hyaluronique
<b>HPMC-Si</b>	Hydroxypropyl méthyl cellulose silanisé
<b>HS</b>	Héparane sulfate
<b>HSPG</b>	Protéoglycane à héparane sulfate
<b>Ifremer</b>	Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer
<b>IGF</b>	Insuline like growth factor
<b>K<sub>D</sub></b>	Constante de dissociation
<b>MEC</b>	Matrice extracellulaire
<b><math>\alpha</math>-MEM</b>	<i>Alpha</i> -modified eagle's medium
<b>MTS</b>	Methyl tetrazolium salt
<b>hsNC</b>	Chondrocyte nasaux de cheval
<b>Pa</b>	Pascal
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>PG</b>	Protéoglycane
<b>RAC</b>	Chondrocyte articulaire de lapin
<b>RGD</b>	Arginine-Glycine-Acide aspartique
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Transforming growth factor beta
<b>3D</b>	Tridimensionnel
<b>VEGF</b>	Vascular endothelium growth factor



# **TABLE DES MATIERES**

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>6</b>
<b>PARTIE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>12</b>
<b>I. La matrice extracellulaire .....</b>	<b>13</b>
I.1. Protéines structurales de la matrice extracellulaire .....	15
I.1.1. Les collagènes.....	15
I.1.2. La fibronectine et les laminines .....	17
I.2. Composants fonctionnels.....	18
I.2.1. Les Protéoglycanes .....	18
I.2.2. Les Glycosaminoglycanes .....	19
I.3. La matrice extracellulaire du cartilage et de l'os.....	22
I.3.1. La matrice extracellulaire du cartilage .....	23
I.3.2. La matrice extracellulaire de l'os .....	29
<b>II. Interactions des composants de la matrice avec les protéines.....</b>	<b>32</b>
II.1. Interactions glycosaminoglycanes-protéines et fonctions associées .....	32
II.1.2. Les glycosaminoglycanes permettent le stockage et la libération de protéines .....	33
II.1.3. Les glycosaminoglycanes augmentent la concentration locale en protéines.....	34
II.1.4. Les glycosaminoglycanes protègent les protéines de la protéolyse .....	35
II.1.5. Les glycosaminoglycanes comme co-récepteur.....	35
II.1.6. Les glycosaminoglycanes participent à l'organisation de la matrice et à l'adhésion cellulaire.....	36
II.7. Un exemple : Interaction héparine/héparane sulfate-protéines.....	36
II.1.8 Interactions glycosaminoglycanes – molécules d'eau.....	39
II.2. Adhésion cellulaire.....	39
<b>III. Traitements actuels des pertes de substances ostéo-articulaires .....</b>	<b>41</b>
III.1. Traitements actuels des pertes de substances du cartilage articulaire.....	42
III.1.1. Autogreffes de cartilage articulaire .....	42
III.1.2. Allogreffes de cartilage articulaire .....	44

III.2. Traitements actuels des pertes de substances osseuses .....	44
III.2.1. Autogreffes osseuse .....	44
III.2.2. Allogreffes osseuse .....	45
<b>IV. L'ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage .....</b>	<b>46</b>
IV.1. Généralités .....	46
IV.2. Les matrices en ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage .....	48
IV.3.1. Critères requis pour la réalisation de matrices .....	48
IV.3.2. Exemple d'un type de matrice : les hydrogels.....	50
IV.3.3. Les matrices à base de polymères naturels en ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage .....	52
<b>V. Les polysaccharides d'origines marines .....</b>	<b>58</b>
V.1. Les sources hydrothermales .....	59
V.2. Les bactéries des sources hydrothermales.....	60
V.3. Les exopolysaccharides des sources hydrothermales .....	61
V.4. Production des exopolysaccharides marins.....	62
V.5. Modification des exopolysaccharides marins .....	63
V.6. L'exopolysaccharide HE800.....	64
V.6.1. Activités biologiques de l'exopolysaccharide HE800 natif.....	65
V.6.2. Activités biologiques de l'exopolysaccharide HE800 modifiés.....	66
V.7. L'exopolysaccharide GY785 .....	67
V.7.1. Activité biologique de l'EPS GY785 natif.....	68
V.7.2. Activité biologique du GY785 modifié.....	68
V.8. Conclusion sur les exopolysaccharides marins.....	69
<b>PARTIE II : STERILISATION DES POLYSACCHARIDES MARINS DE HAUTE MASSE .....</b>	<b>70</b>
<b>I. Problématique .....</b>	<b>71</b>
<b>II. Résumé.....</b>	<b>74</b>
<b>III. Résultats, discussion .....</b>	<b>75</b>

<b>PARTIE III : LES EXOPOLYSACCHARIDES HE800 ET GY785 POUR LA REALISATION DE MATRICES .....</b>	<b>78</b>
<b>I. Problématique .....</b>	<b>79</b>
<b>II. Résumé.....</b>	<b>82</b>
<b>III. Résultats, discussion .....</b>	<b>84</b>
<b>PARTIE IV : EXOPOLYSACCHARIDE GY785 ET INGENIERIE TISSULAIRE DU CARTILAGE.....</b>	<b>89</b>
I. Problématique .....	90
II. Résumé .....	93
III. Résultats, Discussion .....	94
<b>CONCLUSIONS - PERSPECTIVES.....</b>	<b>98</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>103</b>



## Liste des figures et des tableaux

Figure 1 : Résumé des fonctions associées à la matrice extracellulaire.....	14
Figure 2 : Schématisation de l'interaction cellules-matrice extracellulaire / matrice extracellulaire-cellules .....	15
Figure 3: Biosynthèse du collagène fibrillaire. ....	16
Figure 4 : Agrégats de proteoglycanes liés par une molécule d'acide hyaluronique.....	18
Figure 5 : Sous-unités disaccharidiques des différentes familles de GAGs.....	22
Figure 6 : Matrice extracellulaire du cartilage. ....	24
Figure 7 : agrégats de molécules d'agrécanes. ....	26
Figure 8: Structure histologique du cartilage articulaire .....	27
Figure 9 : Constitution d'un os long.....	30
Figure 10 : Phase organique de la matrice extracellulaire osseuse. ....	31
Figure 11 : Activités biologiques modulées par l'interaction héparanes sulfates/protéines. ..	38
Figure 12 : Récepteurs de la surface cellulaire.....	41
Figure 13 : Principe de l'ingénierie tissulaire .....	48
Figure 14 : Schématisation du principe des hydrogels.....	52
Figure 15 : Caractère multipotent des cellules souches mésenchymateuses adultes de la moelle .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
Figure 16 : A) Fumeurs des sources hydrothermales. B) Organismes rencontrés dans les écosystèmes hydrothermaux.....	60
Figure 17 : Schéma de production d'un EPS marin en conditions de laboratoire.....	63
Figure 18 : Structures de l'EPS HE800 et de l'acide hyaluronique .....	65
Figure 19: Structure de l'EPS GY785 .....	67
Tableau 1 : Principaux constituants de la matrice extracellulaire de l'os et du cartilage.....	23
Tableau 2 : Protéines capables de lier les héparanes sulfate .....	37
Tableau 3 : Critères d'une matrice idéale en ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage .....	50
Tableau 4 : Comparaison de la composition de l'EPS HE800 avec un acide hyaluronique bactérien .....	65
Tableau 5 : Composition de l'EPS GY785 .....	68
Tableau 6 : Valeurs de la constante de dissociation entre l'EPS GY785 natifs et ses dérivés GY785 DR et GY785 DRS avec le TGF- $\beta$ et la BMP-2. ....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>

# **INTRODUCTION GENERALE**

La perte ou le dysfonctionnement d'un tissu suite à une blessure, une maladie ou une malformation, constitue l'un des problèmes les plus coûteux et les plus dévastateurs pour les systèmes de santé. A ces pathologies viennent s'ajouter les conséquences d'une augmentation de l'espérance de vie. En effet, le vieillissement progressif de la population engendre une émergence des affections des tissus squelettiques. En conséquence, il existe un besoin considérable et grandissant de solutions thérapeutiques capables de régénérer ou de remplacer des tissus lésés. A titre d'exemple, plus de trois millions de procédures visant à remplacer les tissus musculosquelettiques sont réalisées chaque année aux Etats-Unis (1)

Les approches thérapeutiques classiquement utilisées pour soulager l'invalidité liée à la perte d'os et de cartilage sont les greffes de tissus osseux et cartilagineux, ainsi que la pose de prothèses articulaires. Bien que ces thérapies aient montré leur efficacité, elles souffrent de nombreuses limites telles que le manque de tissu donneur, le rejet et le risque d'infection dans le cas de greffes allogéniques et de prothèses (2,3). De plus, les tissus squelettiques, comme par exemple l'os, sont en perpétuel remodelage et répondent aux changements physico-chimiques, bio-chimiques et mécaniques de l'organisme. Des rôles que des prothèses purement non-biologiques sont incapables d'accomplir. Ces limitations combinées au manque de tissus donneurs et d'organes disponibles pour la transplantation ont conduit à un effort pluridisciplinaire pour développer des solutions thérapeutiques alternatives. Parmi celles-ci, le champ émergent de l'ingénierie tissulaire promet une amélioration des thérapies des tissus squelettiques, en développant des substituts biologiques aux tissus osseux et cartilagineux. Cette nouvelle approche est basée sur un concept relativement récent situé au carrefour des sciences du vivant (thérapie cellulaire) et des sciences de l'ingénieur (développement de biomatériaux) avec pour objectif le maintien, l'amélioration ou le remplacement de tissus fonctionnels (4). Dans son approche la plus classique, l'ingénierie tissulaire combine des cellules avec des matrices artificielles de soutien, d'origines naturelles et/ou synthétiques.

Diverses constructions à base de polymères naturels sont étudiées pour la réalisation de matrices extracellulaires artificielles en ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage, parmi lesquels les alginates (5,6), les collagènes, les dérivés cellulose (7), le dextrane (8). Mais également des composés appartenant à la famille des glycosaminoglycanes mimétiques comme l'acide hyaluronique (9-11) et la chondroïtine sulfate (12). Les polymères naturels sont des composés très attractifs car ils possèdent une structure proche des composants de la matrice extracellulaire. Ils sont ainsi biocompatibles et biodégradables. Cependant, une matrice idéale doit répondre à un cahier des charges strict avec des caractéristiques mécaniques, biologiques et structurales proches du tissu natif. La matrice doit également pouvoir être stérilisée, sans que ses propriétés ne soient altérées. Actuellement, aucune matrice à base de ces polymères ou par la combinaison d'entre eux ne réunit ces caractéristiques. Dans ce contexte, il est donc intéressant d'explorer d'autres polymères d'origines naturelles. Ils sont susceptibles d'apporter de nouvelles propriétés, pour créer de nouvelles matrices, ou pour les combiner à des matrices existantes.

En ce sens, ces 40 dernières années, les plantes et les organismes marins ont été le centre d'intérêt des industries pharmaceutiques pour le développement de molécules bioactives. Des polysaccharides extraits d'algues comme les alginates, les carraghénanes, l'agarose et l'agar ainsi que ceux dérivés des exosquelettes d'animaux comme la chitine et son dérivé, le chitosane, sont largement étudiés pour la réalisation de matrice artificielle en ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage (13,14). A cela s'ajoute la découverte des sources hydrothermales profondes, qui ont permis de mettre en évidence la présence de microorganismes parfaitement adaptés à cet environnement et capables de produire des polysaccharides extracellulaires atypiques. L'Ifremer (Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer) a isolé à partir de différents prélèvements lors de campagnes océanographiques, des bactéries à coloration gram négatif. Une bactérie mésophile nommée

*Vibrio diabolicus* issue du prélèvement HE800, est capable de sécréter un exopolysaccharide (EPS) en condition de laboratoire. La séquence répétitive de cet EPS est un tétrasaccharide qui présente une homologie de structure avec l'acide hyaluronique (15,16). Ce polysaccharide de haute masse ( $7,4 \cdot 10^5$  g/mol), a été étudié sous sa forme native dans une étude *in vitro*. Cette étude a montré qu'un matériau recouvert d'EPS HE800 favorise l'adhésion d'ostéoblastes. Une autre étude *in vivo* a montré après implantation de ce polysaccharide dans des défauts de calvarias de rats, que l'os était réparé dans son intégrité, sans induire de réaction inflammatoire (17). Une autre bactérie mésophile isolée du prélèvement GY785, appartenant au genre *Alteromonas* et à une nouvelle espèce *infernus* est aussi capable de sécréter un EPS. Cet EPS est légèrement sulfaté et sa séquence répétitive est un nonasaccharide branché de haute masse ( $1,5 \cdot 10^6$  g/mol) (15,18). Des dérivés de faible masse molaire issus de ce polysaccharide ont montré des propriétés anticoagulantes (19) et des propriétés proangiogéniques. Les EPS HE800 et GY785 sont par la nature de leurs unités osidiques des glycosaminoglycanes mimétiques. En effet, ils possèdent des groupements anioniques de type carboxylate et/ou sulfate pouvant interagir avec les groupements cationiques de protéines telles que des facteurs de croissance, des cytokines et des molécules d'adhésion cellulaire (20). De cette façon, ces molécules sont susceptibles de générer un réservoir de protéines au sein de la matrice avec un rôle clé dans les mécanismes d'adhésion, de croissance et de différenciation cellulaire. Pour finir, ces deux EPS sont hydrophiles, de masse moléculaire élevée et dotés de hautes propriétés rhéoépaississantes (21).

Par ailleurs, un hydrogel injectable auto-réticulant en fonction du pH et à base d'éther de cellulose (HPMC-Si) a fait l'objet de nombreuses études pour des applications en ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage (22-24). En effet, des études antérieures ont montré la biocompatibilité et la capacité de cet hydrogel d'HPMC-Si à maintenir le phénotype de chondrocytes cultivés en trois dimensions et à maintenir des granules de phosphate de calcium

dans un défaut osseux. Toutefois, les propriétés mécaniques et la bioactivité de cet hydrogel composé à 90% d'eau restent faibles pour les applications visées.

L'objectif principal de la thèse était d'évaluer le bénéfice des EPS d'origine marine HE800 et GY785 du point de vue mécanique et biologique, en les associant à un hydrogel de cellulose.

Dans une première partie bibliographique, la composition de la matrice extracellulaire ainsi que le rôle attribué aux glycosaminoglycanes seront décrits, de façon à présenter les bases nécessaires aux différentes approches de ce travail. Ensuite, les méthodes actuellement employées pour réparer une lésion du tissu osseux et cartilagineux ainsi que leurs limites seront présentées, amenant au développement de l'ingénierie tissulaire. Les principes de l'ingénierie tissulaire seront exposés pour ensuite focaliser sur le composant biomatériau. Les critères requis pour la réalisation d'une matrice idéale seront décrits. Les matrices les plus étudiées en ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage seront ensuite exposées. Cette partie se terminera par la présentation des polysaccharides marins, leur origine, leur mode d'obtention ainsi que les activités biologiques qui leur sont attribuées à ce jour.

La deuxième partie présentera les travaux portant sur l'impact de différents modes de stérilisation sur les EPS HE800 et GY785 de haute masse. En effet les polysaccharides de faible masse peuvent aisément être débarrassés d'agents contaminants par filtration, ce qui n'est pas applicable dans le cas des polysaccharides de haute masse. De plus, du fait de leurs applications à visés médicales, il nous est apparu primordial de définir un mode de stérilisation de ces polysaccharides n'altérant pas ou peu leur structure avant de débiter notre étude. Déterminer un mode de stérilisation adéquat s'avère complexe du fait de la sensibilité des polysaccharides à la chaleur et à l'humidité. L'objectif de cette étude était de comparer quatre modes de stérilisation : (i) oxyde d'éthylène, (ii) rayons  $\alpha$ , (iii)  $\beta$  ainsi qu'une

stérilisation au (iv) plasma froid et de définir celui ou ceux engendrant les plus faibles modifications. Les résultats de ce chapitre seront présentés sous la forme d'un article intitulé « Sterilization of exopolysaccharides produced by deep-sea bacteria : impact on their stability and degradation » soumis à « Marine drugs » dans lequel les résultats seront discutés.

La troisième partie décrira les travaux réalisés sur la préparation d'une matrice innovante associant les EPS marins HE800 et GY785 avec une matrice d'hydroxypropylméthyl cellulose sur laquelle sont greffés des groupements silanes (HPMC-Si). Les caractéristiques physico-chimiques des matrices générées ont été évaluées, ainsi que leurs caractéristiques biologiques à l'aide de lignées ostéoblastique et chondrogénique. Les résultats de ce travail seront présentés sous la forme d'un article intitulé « An *in vitro* study of two GAG-like polysaccharides as compounds of injectable hydrogel for bone and cartilage tissue engineering » soumis au journal « acta biomaterialia ». Ce travail a permis de générer deux matrices, l'une supplémentée avec le polysaccharide marin HE800 et une seconde supplémentée avec le polysaccharide marin GY785.

La quatrième partie de cette thèse portera sur l'étude plus approfondie de la matrice composée d'HPMC-Si et de l'EPS GY785 natif de haute masse pour la culture tridimensionnelle de chondrocytes. Les résultats présentés porteront sur le comportement de chondrocytes articulaires primaires de lapin cultivés en trois dimensions dans cette matrice dans un modèle *in vitro* puis un modèle *in vivo*. Les résultats de ce travail sont présentés sous la forme d'un article intitulé « A self-setting hydrogel mechanically reinforced with a marine exopolysaccharide as a scaffold for cartilage tissue engineering » soumis au journal biomaterials.

Une conclusion générale sur les travaux réalisés au cours de cette thèse et les perspectives de ce travail termineront ce manuscrit.

**PARTIE I : ETUDE  
BIBLIOGRAPHIQUE**



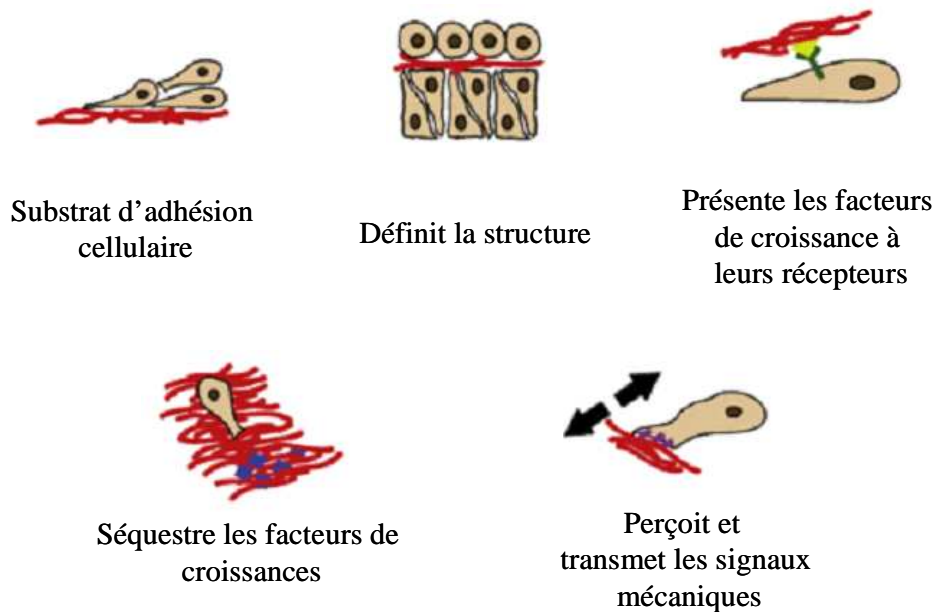
## I. La matrice extracellulaire

Les cellules de tous les tissus de l'organisme requièrent la présence d'un environnement extracellulaire précis pour leur support, leur survie et leur régulation. Cet environnement nommé matrice extracellulaire (MEC) est constitué d'un entrelacement complexe de molécules, agencées de façon précise pour générer un réseau tridimensionnel unique à chaque tissu.

Au départ la MEC était considérée comme un substrat inerte, jouant le rôle de support des cellules, avec pour seule fonction de donner au tissu son architecture. Par la suite, avec l'évolution des techniques et des recherches, il a été montré que la MEC joue un rôle beaucoup plus complexe avec une fonction instructive en plus des fonctions structurales qui lui était attribuées (25). En effet, les cellules contenues dans la MEC sont capables de percevoir des facteurs cellulaires intrinsèques capables de réguler leur devenir, mais également des signaux extrinsèques au contact de la MEC environnante, capables de les guider vers des voies de développement bien définies (26,27).

La MEC peut être découpée en deux parties, une partie structurale et une partie fonctionnelle. La partie structurale assurant la charpente de la matrice extracellulaire est composée de protéines fibreuses (collagènes, fibronectine, laminines, vitronectine et élastine) responsables de la structure et des propriétés mécaniques de celle-ci. Les interstices de cette structure primaire sont enchâssés dans une matrice fondamentale constituée de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes (GAG), qui constituent la partie fonctionnelle. Cet environnement complexe est capable de transmettre des signaux biochimiques aux cellules (28) mais également de séquestrer des facteurs morphogènes comme des facteurs de croissance, de petites intégrines liant des glycoprotéines et des protéines matricellulaires. Ces protéines ont des rôles dans la modulation des processus cellulaires d'adhésion, de migration, de prolifération et de différenciation, mais également d'expression de gènes impliqués dans la

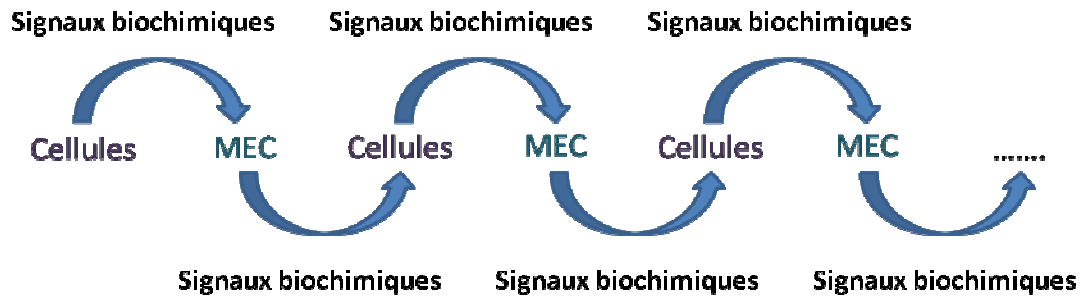
cicatrisation(29). En réponse à ces signaux, s'ajoute un remodelage constant de la MEC par les cellules qu'elle contient, assurant un équilibre entre anabolisme et catabolisme. Les principales fonctions attribuées à la MEC sont résumées sur la Figure 1.



**Figure 1 : Résumé des fonctions associées à la matrice extracellulaire.**

**Modifié d'après (30)**

La MEC doit être vue comme une structure complexe et dynamique remplie de signaux qui peuvent agir dans l'espace et le temps sur le devenir cellulaire. La MEC peut ainsi influencer le remodelage du tissu (31). Il existe un dialogue constant entre la MEC et les cellules (Figure2).



**Figure 2 : Schématisation de l'interaction cellules-matrice extracellulaire / matrice extracellulaire-cellules**

Les sous chapitres suivants décrivent en détail les principaux constituants de la MEC. Nous verrons ensuite de quelles façons cet environnement complexe peut influencer le devenir cellulaire.

## **I.1. Protéines structurales de la matrice extracellulaire**

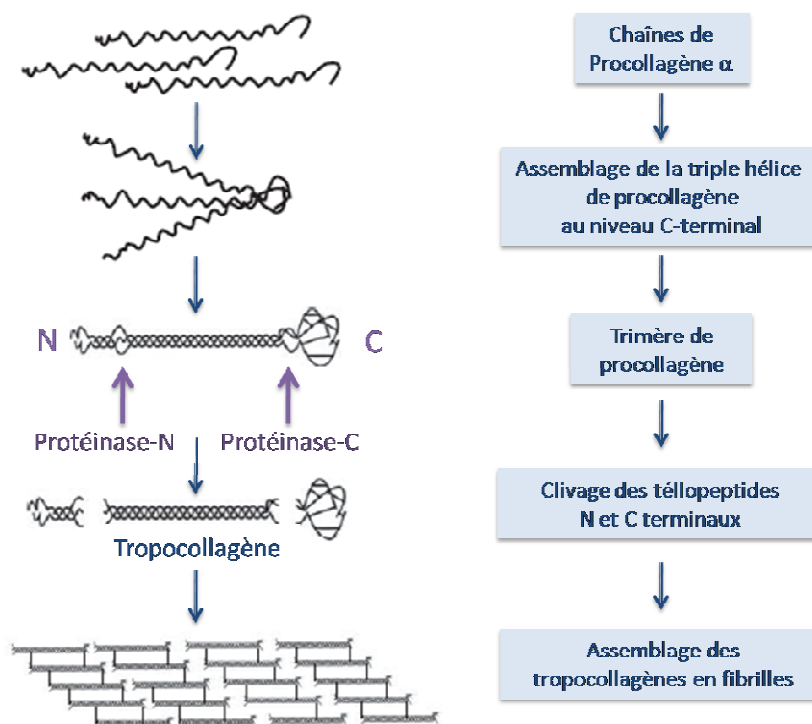
### **I.1.1. Les collagènes**

- ✓ Synthèses et fibrillogenèses

Le collagène constitue la protéine la plus importante de par son abondance dans l'organisme, sa capacité à absorber les forces de tensions dans les tissus et à en définir leur forme. Actuellement on dénombre 28 types de collagènes différents pouvant être impliqués dans l'adhésion et la migration cellulaires, le cancer, l'angiogenèse ainsi que la morphogénèse tissulaire et sa réparation (32).

Il est constitué d'une structure primaire composé de la succession d'un triplet d'acide aminé  $(\text{Gly-X-Y})_n$  où X est le plus souvent une proline et Y une hydroxyproline (33). Il en résulte une hélice  $\alpha$  de procollagène de pas gauche qui en interagissant avec deux autres hélices de procollagène au niveau C-terminal forme une triple hélice de pas droit. Cette

structure primaire se replie pour donner naissance à une structure secondaire puis tertiaire donnant naissance à un trimère de procollagène. Ce procollagène est caractérisé par un domaine N et C terminal globulaire n'exhibant pas les structures répétitives Gly-X-Y. Le clivage des domaines N et C par des protéinases permettent la libération de la molécule de tropocollagène, capable de s'associer en fibrilles (Figure 3). L'agrégation des molécules de tropocollagènes ou fibrillogenèse se réalise spontanément dans l'espace extracellulaire.



**Figure 3: Biosynthèse du collagène fibrillaire.**

**Modifié d'après (34)**

✓ Rôle des collagènes

La structure créée par le collagène est responsable de la résistance mécanique à l'étirement de la MEC. En plus de son rôle structural, le collagène joue des rôles dans l'adhésion cellules-MEC et la migration cellulaire. Bien que ces rôles soient surtout remplis

par d'autres glycoprotéines de la MEC (par exemple la fibronectine) dans le tissu sain, ces rôles deviennent beaucoup plus critiques lors de la réparation tissulaire. En effet, la dégradation des fibres de collagènes, causée par des protéases (collagénases, gélatinases) ou par la chaleur, rend disponible des sites de reconnaissance pour les intégrines précédemment inaccessibles ou inefficaces pour l'interaction avec celles-ci. Le collagène dénaturé est donc un signal important de dommage cellulaire(35). La structure du collagène permet de lier des récepteurs, d'autres protéines, des glycosaminoglycanes et des acides nucléiques (36).

### **I.1.2. La fibronectine et les laminines**

**La fibronectine** (FN) joue un rôle important dans l'attachement des cellules à leurs substrats ainsi que dans leurs mouvements et leur différenciation (37,38). Il existe différentes formes de fibronectine, correspondant aux différentes formes d'épissage alternatif du précurseur d'ARN messager. On trouve le long de la molécule de fibronectine différentes séquences pouvant être reconnues par les intégrines cellulaires et responsables de l'adhésion. Il s'agit de motifs RGD (Arg-Gly-Asp), RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser), LDV (Leu-Asp-Val) and REDV (Arg-Glu-Asp-Val) (39). Il existe d'autres domaines à la surface de la fibronectine capable d'interagir avec des molécules de la MEC comme les collagènes, la fibrine, l'héparine etc. En conséquence, la fibronectine peut simultanément se lier à la cellule et à d'autres molécules de la MEC.

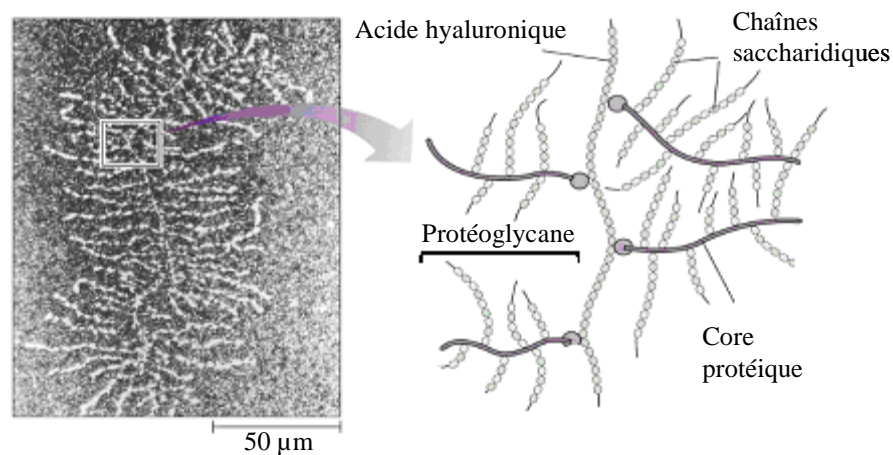
**La laminine** est une famille de glycoprotéines qui constitue après le collagène, le composant majeur de la lame basale. Comme la fibronectine, la laminine peut exister sous différentes formes, qui sont toutes le produit de gènes étroitement liés. Cette protéine est caractérisée par une haute affinité de liaison pour la surface cellulaire, ainsi que pour l'héparine et le collagène de type IV. De la même façon, la molécule de laminine présente des motifs d'adhésion RGD spécifiques avec d'autres séquences PDSGR, YIGSR et IKAV qui

sont des séquences capables de reconnaître et de lier des récepteurs de la surface cellulaire (40). De façon intéressante, la laminine possède des sites de reconnaissance pour certains facteurs de croissance, qui sont disponibles pour la cellule seulement au moment de leur dégradation. Ces domaines sont des peptides EGF-like et peuvent stimuler la prolifération et la différenciation cellulaire (41).

## I.2. Composants fonctionnels

### I.2.1. Les Protéoglycans

Les protéoglycans (PGs) sont des glycoprotéines hydrophiles à localisation extracellulaire, membranaire ou intracellulaire, constituées d'une protéine appelée « core protein » sur laquelle sont greffées des chaînes polyosidiques dénommées glycosaminoglycans (GAGs) (Figure 4). Les protéoglycans sont généralement nommés d'après le GAG le plus abondant (Figure 5).



**Figure 4 : Agrégats de protéoglycans liés par une molécule d'acide hyaluronique.**

**D'après (42)**

### ✓ **Fonction des protéoglycanes**

Les protéoglycanes peuvent interagir aussi bien via la protéine axiale que par les chaînes polysaccharidiques. La protéine axiale est principalement responsable de la localisation du protéoglycane dans la matrice, alors que les GAGs sont capables d'agir via leurs interactions avec des facteurs de croissances (43,44). Ils règlent ainsi de nombreuses activités cellulaires (prolifération, différenciation, adhérence, migration) et participent au contrôle de l'activité, de la biodisponibilité et de la stabilité des facteurs de croissances par des mécanismes qui régissent leur biodisponibilité (crinopexie) (45,46). Ces multiples fonctions peuvent être exploitées à des fins thérapeutiques. Ainsi, l'activité anticoagulante de l'héparine est depuis longtemps utilisée. En outre la participation à l'assemblage et la disponibilité de molécules dans la matrice extracellulaire, les protéoglycanes possèdent des propriétés hautement hydrophiles qui confèrent une hydratation et une résistance aux forces compressives de la MEC.

### **I.2.2. Les Glycosaminoglycanes**

Les GAGs sont des molécules linéaires, chargées négativement avec un poids moléculaire pouvant aller de 10 à 100 kDa. La structure des GAGs est basée sur la répétition d'unités disaccharidiques dont l'un des sucres est un acide uronique (acide D-glucuronique ou son épimère l'acide L-iduronique) et l'autre un sucre aminé (glucosamine qui est soit N-acétylée ou N-sulfatée ou galactosamine qui est toujours N-acétylée) (20). De là, les GAGs diffèrent selon le type d'hexose, d'hexosamine, ou d'unité hexuronique qu'ils contiennent ainsi que par la nature de la liaison glycosidique qui lie ces unités. Selon la nature des oses et la façon dont les disaccharides sont reliés entre eux, les GAGs peuvent être classés en cinq familles qui vont être détaillées.

✓ **L'acide hyaluronique (AH)**

L'AH est le seul GAG non sulfaté. Il est constitué de la répétition d'un disaccharide composé d'un acide D-glucuronique et d'une D-glucosamine N-acétylée. Il est synthétisé sous la forme d'une longue chaîne linéaire chargée négativement et de longueur variable. Malgré sa composition chimique relativement simple, on lui attribue un rôle fonctionnel important pendant la morphogenèse embryonnaire, la régénération cellulaire et la cicatrisation (47-50). L'AH est un polysaccharide hautement hydrophile qui possède une viscosité élevée et est capable de retenir de grandes quantités d'eau. De par ce fait, il joue un rôle important dans l'homéostasie et l'intégrité tissulaire (51). L'AH interagit avec les PGs dans le cartilage articulaire, mais également avec d'autres molécules importantes pour l'assemblage de la matrice extracellulaire (49).

✓ ***Les chondroïtines sulfates (CS)***

L'unité disaccharidique de base des chondroïtines sulfates est constitué d'un acide D-glucuronique et d'une D galactosamine N-acétylée sulfatée en C4 et/ou C6. Les chondroïtines sulfates sont des composants de la matrice du cartilage. Elles ont pour objectif de maintenir la pression osmotique en absorbant l'eau afin de maintenir une hydratation constante de ce tissu. De plus, elles protègent le tissu cartilagineux contre les réactions enzymatiques et contre les dommages dus aux radicaux libres. Dans le cartilage les chondroïtines sulfates contribuent à la flexibilité et à l'élasticité du tissu.

✓ ***Les dermatanes sulfates (DS)***

Les dermatanes sulfates (DS) sont des polyisomères de la chondroïtine-4-sulfate. On peut ainsi les trouver sous le nom de chondroïtine sulfate B. Ils divergent par l'épimérisation de l'acide D-glucuronique en acide L-iduronique. Cette épimérisation permet d'apporter une



spécificité de reconnaissance des DS avec leurs acteurs protéiques. Certaines interactions sont possibles avec les DS alors qu'elles sont impossibles avec les CS (52,53).

✓ *Les kératanes sulfates (KS)*

Les kératanes sulfates se distinguent des autres GAGs par une unité disaccharidique répétitive constituée d'un D-galactose parfois sulfaté en C6 et d'une D-glucosamine N-acétylée et sulfatée en C6. Ils sont classés en trois classes selon la nature de leur acide aminé de liaison au niveau du core protéique (une asparagine, une sérine ou une thréonine) (54) et noté KS de type I, II ou III. Les KSI sont retrouvés en majorité dans la cornée et les KSII et III sont en majorité retrouvés dans les tissus conjonctifs lâches.

✓ *Les héparines et héparanes sulfates (HS)*

Les héparines et héparanes sulfates sont ubiquitaires dans ou à la surface des cellules de l'organisme (55). La principale différence entre les héparines et les héparanes sulfates est la nature de leur core protéique. L'héparane sulfate est extracellulaire alors que l'héparine est uniquement intracellulaire. Les héparines et héparanes sulfates présentent des rapports en groupements N-acétylés/groupements O-sulfatés différents. En effet les héparanes sulfates contiennent un taux plus élevé de glucosamines N-acétylés et sont plus sulfatés que l'héparine (56). L'héparine quant à elle est stockée exclusivement dans des mastocytes, tandis que les HS sont exprimés à la surfaces des cellules et dans la MEC, comme une partie des PG (57). Les HS sont rarement sous forme libre, mais en liaison avec divers cores protéiques pour former les protéoglycanes à héparanes sulfates (HSPGs). Les protéoglycanes présentant des chaînes HSPGs sont de trois types. Les deux groupes principaux d'HSPGs à la surface cellulaire inclus les syndécanes et les glypicanes. Ils fournissent une partie importante des sucres présents à la surface cellulaire et sont impliqués dans la signalisation des cellules au niveau de

l'interface cellule-MEC. Les perlécans quant à eux constituent le troisième groupe de protéoglycanes à HS et sont principalement sécrétés dans la MEC (58). Les héparanes sulfates sont les membres de la famille des GAGs possédant la plus grande diversité structurale, due à la nature polymorphe des séquences hautement sulfatés de leurs chaînes.

1	2	Unité disaccharidique	Position des sulfatations	Poids moléculaire approximatif (Da)
		<b>Héparine et héparane sulfate</b> 1) Acide glucuronique/ iduronique 2) N-acétylglucosamine	IdoA-2SO <sub>4</sub> GlcA-2SO <sub>4</sub> GlcNac-3,6SO <sub>4</sub>	15.000
		<b>Chondroïtine sulfate</b> 1) Acide glucuronique 2) N-acétylgalactosamine	GalNac-4SO <sub>4</sub> GalNac-6SO <sub>4</sub> GalNac-4,6SO <sub>4</sub>	25.000
		<b>Dermatane sulfate</b> 1) Acide glucuronique/ iduronique 2) N-acétylgalactosamine	IdoA-2SO <sub>4</sub> GalNac-4SO <sub>4</sub> GalNac-6SO <sub>4</sub>	35.000
		<b>Kératane sulfate</b> 1) Galactose 2) N-acétylglucosamine	Gal-6SO <sub>4</sub> GalNac-6SO <sub>4</sub>	10.000
		<b>Acide hyaluronique</b> 1) Acide glucuronique 2) N-acétylglucosamine	Pas de sulfatation	1.000.000

**Figure 5 : Sous-unités disaccharidiques des différentes familles de GAGs.**

**D'après (59)**

### I.3. La matrice extracellulaire du cartilage et de l'os

Les tissus cartilagineux et osseux sont deux types de tissus conjonctifs formant la charpente du squelette. Ces deux tissus conjonctifs présentent une structure histologique similaire. En effet, le développement des tissus cartilagineux et osseux est lié, car la plupart du tissu osseux du squelette dérive du cartilage par des mécanismes d'ossification. La

substance fondamentale de ces deux tissus comprend des protéoglycanes, des glycoprotéines de structure ainsi que des substances synthétisées par les cellules. Les cellules sont propres à chaque tissu conjonctif. Les chondrocytes et les ostéoblastes, respectivement pour le cartilage et l'os, produisent et sécrètent la substance fondamentale et les fibres de collagènes formant ainsi la matrice extracellulaire (MEC). Dans le tableau 1 sont regroupées les molécules majoritairement présentes au sein de l'os et du cartilage articulaire. Les composants principaux de la MEC du cartilage et de l'os seront ensuite détaillés.

	<b>PGs</b>	<b>GAGs</b>	<b>Collagènes</b>	<b>Protéines non-collageniques</b>	<b>Cellules</b>
<b>MEC du cartilage</b>	Aggrecane	AH CS KS	Types II, IX and XI	COMP (cartilage oligomeric protein) CMP (cartilage matrix protein) Fibronectine Decorin (PG-S2) Biglycan (PG-S1) Link protein	Chondrocytes
<b>MEC de l'os</b>		CS HA Heparane sulfate	Type I, III, V and XII	OCN (Osteocalcin), OPN (Osteopontine) BSP (bone sialoproteins) Osteonectin	Osteoblastes, Osteocytes, Osteoclastes

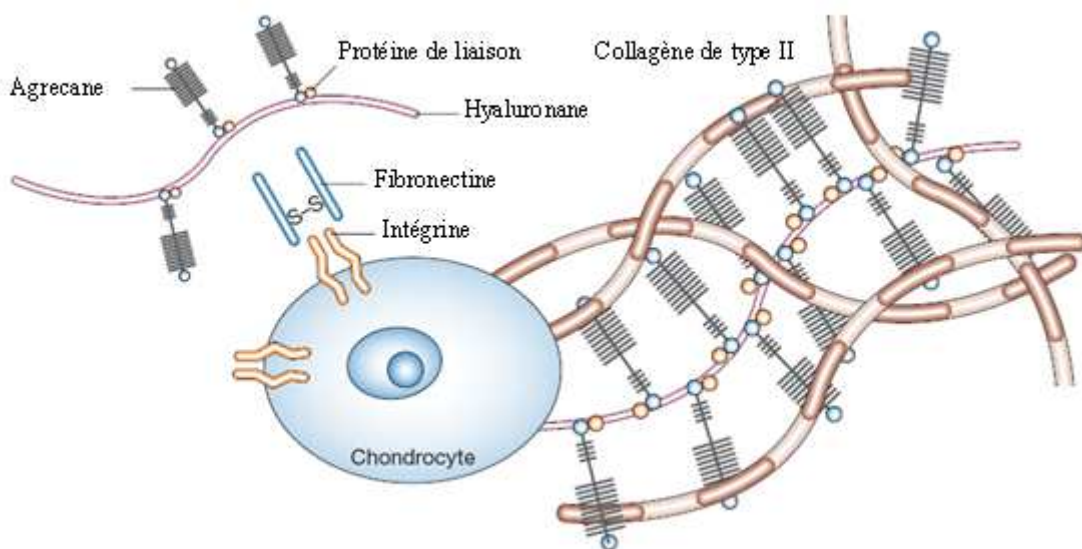
**Tableau 1 : Principaux constituants de la matrice extracellulaire de l'os et du cartilage**

### **I.3.1. La matrice extracellulaire du cartilage**

Le cartilage articulaire, tissu conjonctif de soutien, est non vascularisé et non innervé. Il est composé d'une matrice extracellulaire (MEC) abondante contenant des fibres de collagènes et des protéoglycanes entourant un seul type de cellules, les chondrocytes. Le cartilage articulaire, de par sa composition et sa structure, est capable de transmettre, de

distribuer et d'amortir les charges importantes transmises lors de la mobilisation des articulations.

La MEC du cartilage articulaire se compose d'un réseau de fibres de collagène, qui constitue la trame fibrillaire, baignant dans une substance fondamentale composée essentiellement de protéoglycanes et d'eau. La MEC du cartilage est donc principalement constituée de fibres de collagènes, hétérotrimère de collagène de type II, IX et XI, dans lesquelles sont enchâssés des protéoglycanes comme l'agrécan (Figure 6).



**Figure 6 : Matrice extracellulaire du cartilage.**

**Modifié d'après (60)**

### Les collagènes :

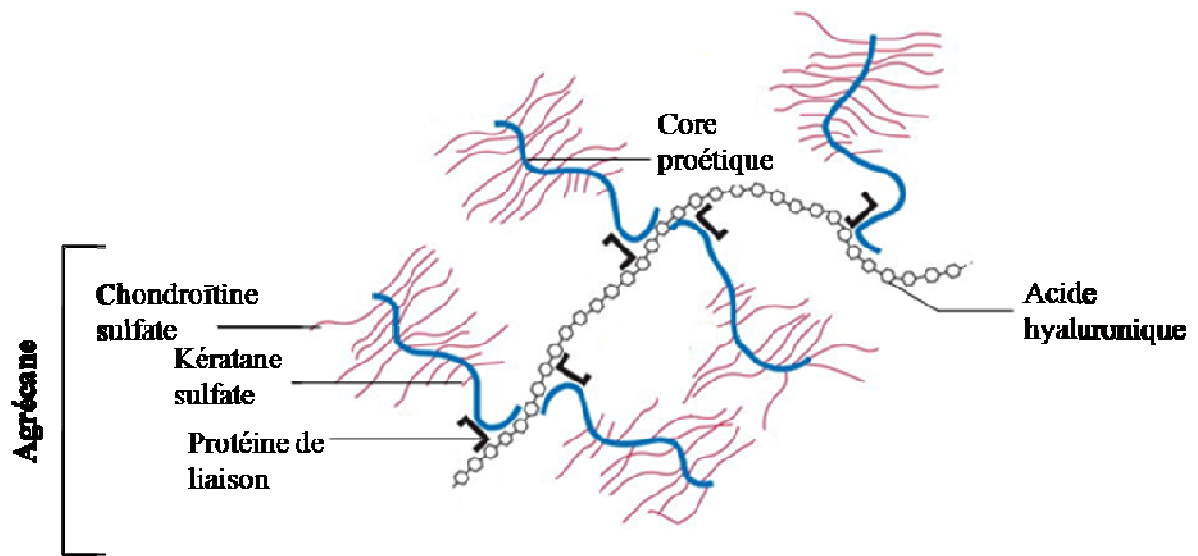
Les fibres de collagènes composant le cartilage articulaire sont un hétérotrimère de collagène II, IX et XI. Au sein de cet hétérotrimère, le collagène de type II est majoritaire, faisant de ce collagène un marqueur phénotypique du cartilage articulaire. Le cartilage articulaire contient également d'autres types de collagènes mais en quantités moins importantes. Il s'agit des collagènes collagènes I, III, VI, X, XIII et XIV (61).

### Les protéoglycanes

Les protéoglycanes (PG), macromolécules dont le poids moléculaire est compris entre  $6 \times 10^4$  et  $4 \times 10^6$  Da, représentent 22 à 28 % du poids sec du cartilage articulaire adulte. Dans la MEC du cartilage articulaire, les GAGs, à l'exception de l'acide hyaluronique (AH), sont souvent substitués par des groupements sulfates.

L'agrécan est le PG majeur du cartilage articulaire, il représente 90% des PGs du cartilage. L'agrécan est un large agrégat moléculaire contenant plus d'une centaine de chaînes de CS et 50 chaînes de KS liées de façon covalente à la protéine axiale (62). Dans le cartilage, l'agrécan est associé à l'acide hyaluronique (AH) et à une petite glycoprotéine de liaison ou "link protein" pour former de larges agrégats (63). (Figure 7)

La présence de fortes concentrations de GAG polyanioniques, entraîne la formation d'une pression osmotique élevée, ce qui permet de retenir de grandes quantités d'eau dans le cartilage articulaire (64). L'acide hyaluronique possède également des caractéristiques hydrodynamiques importantes. Il participe ainsi à l'établissement d'une viscosité élevée et est capable de retenir de grandes quantités d'eau. L'AH joue un rôle important dans l'homéostasie et l'intégrité tissulaire (51). L'AH interagit avec les PG dans le cartilage articulaire, mais également avec d'autres molécules importantes pour l'assemblage des MEC (49).



**Figure 7 : agrégats de molécules d'agrécanes.**

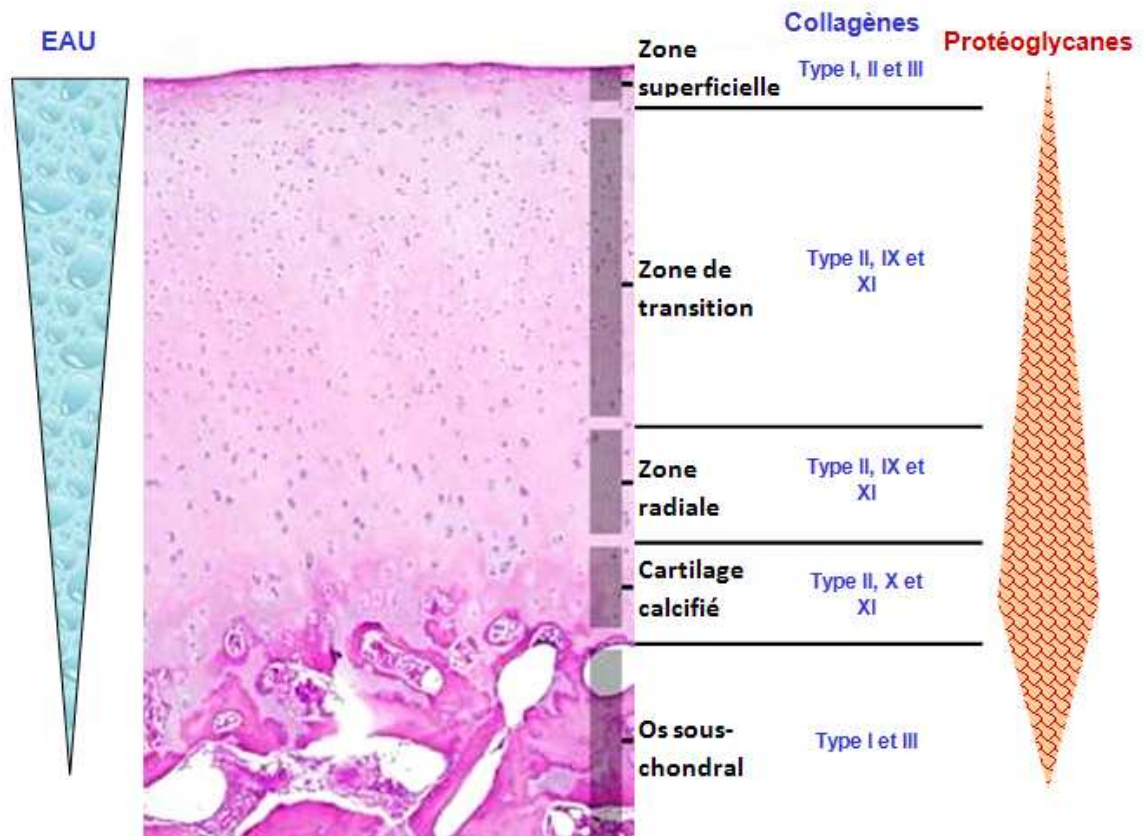
**Modifié d'après (65)**

Le cartilage est, de par sa constitution, considéré comme un matériau visco-élastique et perméable qui consiste en 3 phases :

- une phase solide, composée du réseau fibrillaire dense de collagène et d'une haute concentration de protéoglycanes.
- une phase d'eau fluide.
- une phase contenant des électrolytes dissout ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  etc..) neutralisant les charges fixées à la matrice solide (66).

Le cartilage articulaire est capable de se déformer afin d'assurer sa fonction d'amortissement et de distribution des charges et des pressions. Pour cela, il doit être capable de résister à des forces de compression, de tension et de cisaillement (67). Afin de résister aux différentes forces mais également en conséquences de l'application de ces forces, la composition et l'organisation histologique du cartilage articulaire varie en fonction de sa

position par rapport à la surface articulaire (68). En effet, l'ensemble des constituants du cartilage articulaire sont organisés dans un ordre défini qui permet de distinguer 4 zones dans le cartilage articulaire (Figure 8).



**Figure 8: Structure histologique du cartilage articulaire**

**Modifié d'après (69)**

### **La zone superficielle**

La zone superficielle est en regard du liquide synovial. Elle constitue la surface de glissement du cartilage, et représente 5 à 10 % de l'épaisseur du cartilage. Cette zone superficielle peut être divisée en deux sous-couches :

Une première couche constituée d'une matrice acellulaire, contenant de fines fibrilles de collagène I, II et III et contenant peu de protéoglycanes. Une couche plus profonde, cellularisée, contenant des chondrocytes plats et ellipsoïdaux orientés parallèlement à la surface articulaire. Les fibres de collagène présentes sont disposées parallèlement à la surface articulaire. Cette zone contient moins de protéoglycanes que les autres zones. Les chaînes de CS y sont majoritaires par rapport aux chaînes de KS ce qui constitue une barrière imperméable à la diffusion d'hormones et de nutriments mais perméable à l'eau et à l'oxygène. L'orientation des fibres de collagène ainsi qu'une association collagène-PG plus forte permet à la zone superficielle de protéger le cartilage sous-jacent des forces de déchirements ou de cisaillements générées lors de l'activité articulaire (70).

### **La zone de transition**

La zone de transition est la zone la plus épaisse du cartilage articulaire. Les chondrocytes de cette zone sont de forme arrondie et sont disposés de façon anarchique dans la MEC. Les chondrocytes de la zone de transition sont métaboliquement actifs et ont une forte activité de synthèse de protéoglycanes et de collagènes. Les collagènes synthétisés sont les collagènes de type II, IX et XI. Ces fibres s'entrecroisent obliquement et forment un réseau non orienté moins dense que dans la couche superficielle.

### **La zone radiale**

La couche radiale tire son nom de l'orientation radiale des cellules et des fibres de collagène qui la constituent. Les chondrocytes sont sphériques et disposés en colonnes perpendiculaires à la surface articulaire. Le contenu en protéoglycanes est important, alors que le contenu en eau y est le plus faible de tout le cartilage articulaire. Les fibres de collagène, toujours composées des collagènes II, IX et XI sont orientées verticalement par



rapport à la surface articulaire et cette orientation confère au cartilage ses propriétés de résistance aux forces de compression.

### **La couche de cartilage calcifiée**

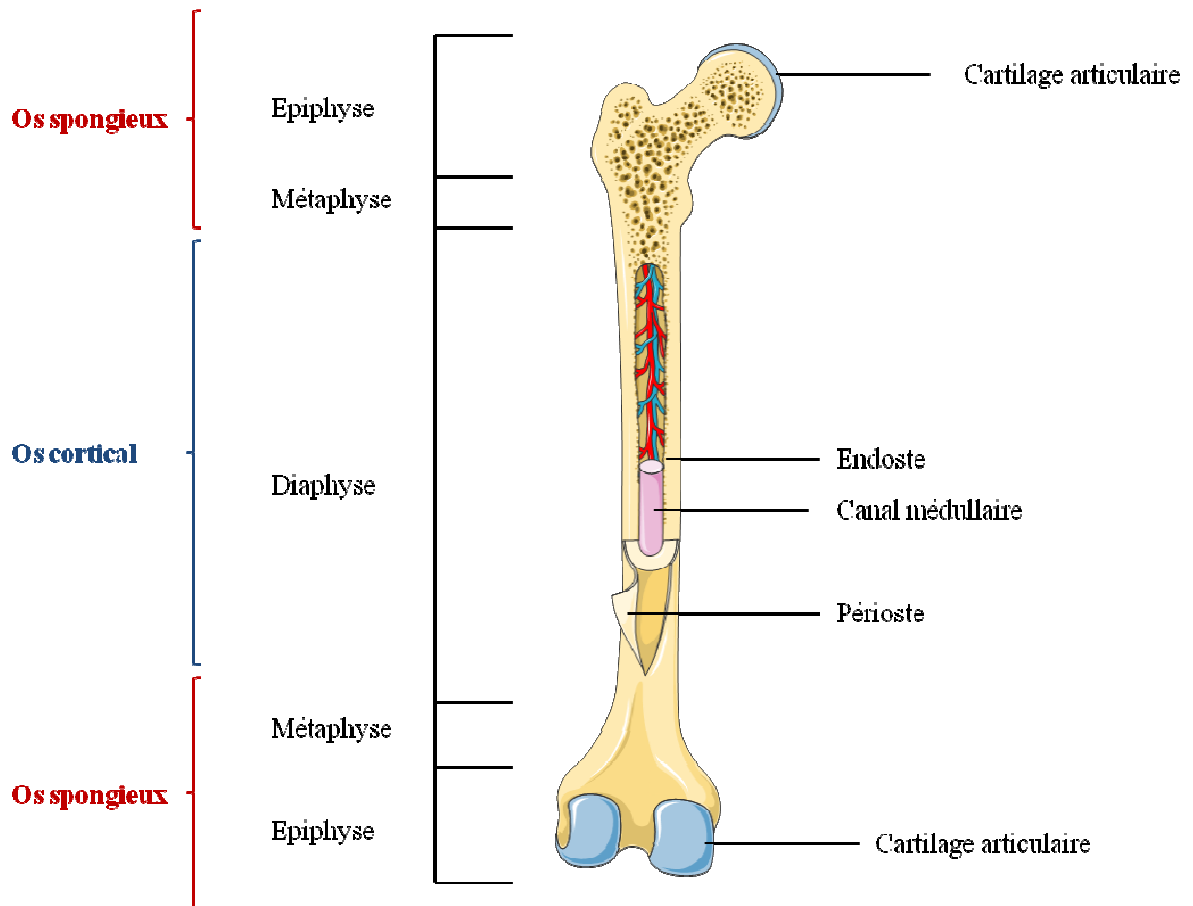
La couche calcifiée, sépare le cartilage articulaire de l'os sous-chondral. L'agencement des protéines de la MEC dans cette zone est très proche de celle observée dans la zone radiale. Les chondrocytes moins nombreux sont hypertrophiques et synthétisent du collagène de type X en plus des collagènes II et XI. Une apatite biologique carbonatée se dépose sur les fibres de collagène qui pénètrent directement dans l'os épiphysaire permettant ainsi l'ancrage du cartilage. La couche de cartilage calcifié est séparée des couches de cartilage non minéralisé par une ligne dense appelée "tidemark"(71).

### **I.3.2. La matrice extracellulaire de l'os**

Le squelette constitue à la fois le support rigide de l'organisme et protège les organes vitaux. L'os est un tissu conjonctif spécialisé composé de plusieurs types cellulaires et d'une MEC minéralisé qui lui confère élasticité et résistance. Il existe 2 types d'os : l'os spongieux et l'os cortical.

- L'os spongieux constitue l'épiphyse des os long et l'intérieur des os plats et court

- L'os cortical ou compact constitue la diaphyse des os long et l'enveloppe des os plat et court.

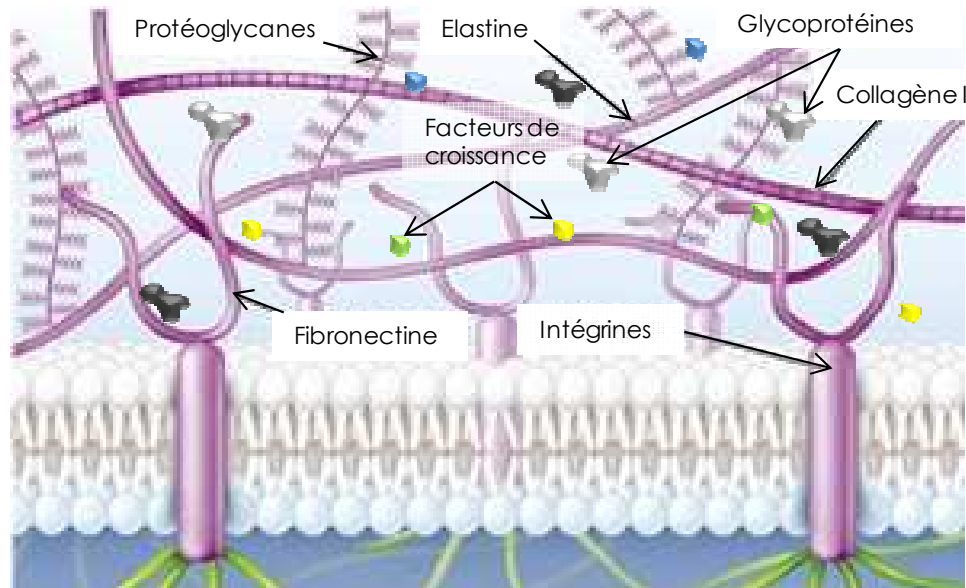


**Figure 9 : Constitution d'un os long**

La MEC de l'os est constituée de deux phases, une phase organique qui représente un peu plus de 20 % et une phase minérale représentant environ 70 % (72).

✓ Phase organique

La phase organique est une matrice de collagène de type I comprenant également des protéines non collagéniques telles que les protéoglycanes, des glycoprotéines (73), l'ostéopontine, l'ostéonectine, l'ostéocalcine (74,75) et les sialoprotéines osseuse (76). Cette phase organique, via ses différentes protéines, joue un rôle important dans la minéralisation de la MEC et le cycle de remodelage osseux (77) (Figure 10).



**Figure 10 : Phase organique de la matrice extracellulaire osseuse.**

✓ Phase inorganique

La phase inorganique ou minérale est composée de cristaux d'hydroxyapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) et de carbonate de calcium en association avec des fibres de collagènes (78). C'est cette phase minérale qui permet à l'os d'être à la fois rigide, léger et résistant.

Les différents types cellulaires contenu dans l'os sont, les ostéoblastes, les ostéocytes, les cellules bordantes et les ostéoclastes.

- Les ostéoblastes dérivent des cellules souches de la moelle osseuse, de l'endoste et du périoste. Situé à la surface de l'os, l'ostéoblaste est responsable de la synthèse de la MEC et de sa minéralisation. Ces cellules en sécrétant des cytokines agissent également sur la différenciation des ostéoclastes. Les ostéoblastes peuvent soit se différencier en ostéocytes ou en cellules bordantes soit mourir par apoptose (79).

- Les ostéocytes correspondent aux ostéoblastes matures, enchâssés dans la MEC minéralisée. Les ostéocytes sont en contact les uns avec les autres ainsi qu'avec les

ostéoblastes en surface grâce aux canalicules contenant les prolongements cytoplasmiques. Les ostéocytes participent au remodelage osseux par des phénomènes de mécanotransduction en détectant des variations de contraintes mécaniques (80).

- Les cellules bordantes sont des ostéoblastes à l'état quiescent, mais capables d'être réactivées en ostéoblaste sous l'action de différents facteurs. Elles sont situées à la surface des os au niveau de l'endoste et du périoste. Les cellules bordantes participent à l'activation du remodelage osseux grâce à leur propriété de mécanotransduction.

- Les ostéoclastes sont des cellules multinucléées, d'origine hématopoïétique, responsables de la résorption osseuse. Ce sont des cellules bipolaires qui présentent un pôle apical, au contact de la matrice osseuse, une bordure en brosse où siège la résorption osseuse. Cette zone correspond aux lacunes de résorption ou lacunes de Howship (81). L'ostéoclaste résorbe l'os via des phénomènes d'acidification et libération d'enzymes lysosomiales (phosphatase acide et cathepsine K) et de metalloprotéases (MMP).

Le tissu osseux, contrairement au cartilage articulaire, possède des capacités de réparation spontanée. En effet, l'os est un tissu dynamique en renouvellement constant. Le cycle du remodelage osseux consiste en une étape de résorption de la MEC par les ostéoclastes suivi d'une formation par les ostéoblastes.

## **II. Interactions des composants de la matrice avec les protéines**

### **II.1. Interactions glycosaminoglycanes-protéines et fonctions associées**

Les interactions GAGs-protéines sont principalement de nature ionique. En effet, les acides aminés cationiques de protéines (groupements ammonium des lysines ou des arginines,  $(\text{NH}_3^+)$ ) sont capables d'interagir avec les régions anioniques dues à la présence de groupements carboxyles  $(-\text{COO}^-)$  et sulfates  $(-\text{SO}_3^-)$  des chaînes polysaccharidiques. Les

liaisons électrostatiques entre GAGs et protéines sont dépendantes de la présence de cations et du pH de l'environnement. Effectivement, les cations peuvent agir sur les protéines en favorisant leur oligomérisation (82) et en induisant un changement de leur conformation (83). De ce fait, les cations sont capables de favoriser une conformation plutôt qu'une autre, avec une répercussion évidente au niveau des interactions avec la protéine. Pour illustrer cela, *in vivo*, le pH peut localement varier et s'acidifier lors de la réaction inflammatoire. En conséquence, l'affinité pour certaines protéines peut ainsi être baissée voire au contraire augmentée (84). Ceci indique que selon l'état physiologique du tissu, les GAGs sont capables de sélectionner dans le milieu extracellulaire, la molécule la plus adaptée, en réponse à un événement précis.

Dans la littérature une partie des interactions GAGs-protéines sont décrites comme peu spécifiques (85,86) cependant, certains articles tendent à mettre en évidence une organisation de certaines séquences polysaccharidiques pour interagir de manière spécifique avec des domaines protéiques. Ces interactions spécifiques peuvent ainsi contrôler l'activité protéique de façon bien spécifique (87,88).

### **II.1.2. Les glycosaminoglycanes permettent le stockage et la libération de protéines**

Les GAGs sont présents sur toutes les surfaces cellulaires animales, et sont capables de lier et de réguler un certain nombre de protéines ; comme des cytokines, des chimiokines, des facteurs de croissance, des morphogènes, des enzymes (sérine-protéases du système de la coagulation, métalloprotéases...) et des molécules d'adhésion (CAM ou Cell Adhesion Molecules, sélectines...) (89). De ce fait, les GAGs ont une fonction primordiale sur l'adhésion et la croissance de la cellule, ainsi que sur différents systèmes biologiques (20). Prenons par exemple le FGF et le VEGF qui sont stockés, stabilisés et protégés grâce aux

interactions avec les chaînes de GAGs des membranes basales. En conséquence, lors de l'angiogenèse, sous l'action de stimulus tel que l'hypoxie et les héparanases, ces facteurs sont libérés et exercent à leur tour leurs fonctions angiogéniques (90).

### **II.1.3. Les glycosaminoglycanes augmentent la concentration locale en protéines**

Les GAGs sont impliqués dans les processus de signalisation cellulaire en modulant la biodisponibilité de messagers intercellulaires tels que les cytokines (facteurs de croissance, chimiokines, interleukines, interféron ...). Les messages transmis par ces protéines sont locaux et très souvent temporaires.

Les chimiokines sont des petites cytokines responsables du chimiotactisme. Elles possèdent des régions riches en acides aminés basiques leur permettant d'interagir avec les GAGs (91). Les chimiokines sont captées par les GAGs dès leur sécrétion afin d'éviter leur diffusion dans le milieu extracellulaire et sont de ce fait concentrées à l'endroit de leur sécrétion. Du fait d'interactions réversibles entre les chimiokines et les GAGs, la cinétique d'association/dissociation permet un déplacement de GAGs en GAGs dans le but de créer un gradient. Les cellules circulantes sont ainsi capables de suivre le gradient chimioattractant dans la MEC et de remonter jusqu'au site de l'inflammation (92-94).

Basé sur le même principe, les cellules progénitrices hématopoïétiques (HP) sont guidées par des gradients de SDF-1 créés par les PGs (95). En effet, les expériences de Sweeney *et al.* (96) ont montré que l'injection de polysaccharides sulfatés (fucoïdane) à des souris et des singes permet le déplacement du SDF-1 $\alpha$  de la moelle osseuse vers le plasma. Les cellules HP initialement confinées dans la moelle où se trouvait le SDF-1 $\alpha$  présenté par les PGs, se retrouvent ainsi dans le sang. Un autre exemple, les interactions du FGF avec les HS. Ces

interactions permettent d'augmenter la concentration locale en protéine et induisent ainsi une réponse au niveau cellulaire (31).

#### **II.1.4. Les glycosaminoglycanes protègent les protéines de la protéolyse**

Le temps de demi-vie des cytokines et des facteurs de croissances sont relativement courts. Ces protéines sont extrêmement sensibles à la protéolyse (97). En effet elles sont rapidement éliminées de l'organisme une fois que le besoin n'existe plus. Les HS, protègent certaines molécules comme le FGF-2 ou le TGF- $\beta$  de la dégradation (31,98,99). De la même manière, l'interaction du FGF avec les domaines héparanes sulfates permet de protéger la protéine de la dégradation par les protéases extracellulaires.

#### **II.1.5. Les glycosaminoglycanes comme co-récepteur**

Les GAGs sont définis comme des récepteurs de faible affinité en opposition aux récepteurs de haute affinité de type tyrosine kinase. Les GAGs peuvent être directement impliqués dans la transduction du signal d'un messenger en coordination avec son récepteur. Les interactions FGFs/héparanes sulfates sont les plus étudiées. La liaison de nombreuses molécules de FGF sur le même héparane sulfate, permet de faciliter la dimérisation du récepteur et la transduction du signal. Un autre exemple, constitué par les travaux de l'équipe de Yayon *et al.* (100) ont démontré que l'héparine était nécessaire pour que le FGF-2 se fixe à son récepteur le FGFR1. Le polysaccharide agit en induisant un changement de conformation du facteur de croissance nécessaire pour qu'il soit reconnu par son récepteur. Le FGF est capable de transmettre son signal via son récepteur FGFR et cela uniquement en présence du co-récepteur de type héparine/héparane sulfate (101). La présence de GAGs renforce ainsi l'interaction FGF/FGFR, la dimérisation du récepteur et ainsi la transduction du signal par autophosphorylation du récepteur.

## **II.1.6. Les glycosaminoglycanes participent à l'organisation de la matrice et à l'adhésion cellulaire**

La localisation des GAGs et leurs caractéristiques physico-chimiques, leurs permettent d'exercer des fonctions dans l'organisation de la MEC et dans l'adhésion cellulaire. En effet, les cellules forment des contacts stables avec la MEC via des interactions entre des composants de la MEC et différents éléments du cytosquelette cellulaire (102). Ces contacts cellules-ECM doivent pouvoir se faire et se défaire pour permettre la migration et la prolifération cellulaire. Cela est possible par l'intermédiaire des GAGs qui composent les PGs. Les GAGs facilitent l'adhésion des cellules à des composants spécifiques de la MEC (103). Les GAGs tels que les CS, DS et l'AH, jouent un rôle très important dans l'organisation des tissus cartilagineux (62). En effet, ils offrent une résistance mécanique face aux forces de compression, grâce à leurs organisations et aux interactions qu'ils créent avec de nombreux partenaires de la MEC (104). Si l'on regarde à l'échelle moléculaire, l'interaction entre les chaînes d'HS portées par les PG de la surface cellulaire et la fibronectine est très importante dans les adhésions cellules-matrices (105). Ces interactions sont renforcées par l'interaction des GAGs avec le collagène (106-108).

## **II.7. Un exemple : Interaction héparine/héparane sulfate-protéines**

Les interactions HS et protéines sont dictées à la fois par la structure du polysaccharide et par les motifs protéiques spécifiques. Le *tableau 2* présente une partie des protéines de la surface cellulaire, de la MEC ainsi qu'une partie des morphogènes capables d'interagir avec les HS.

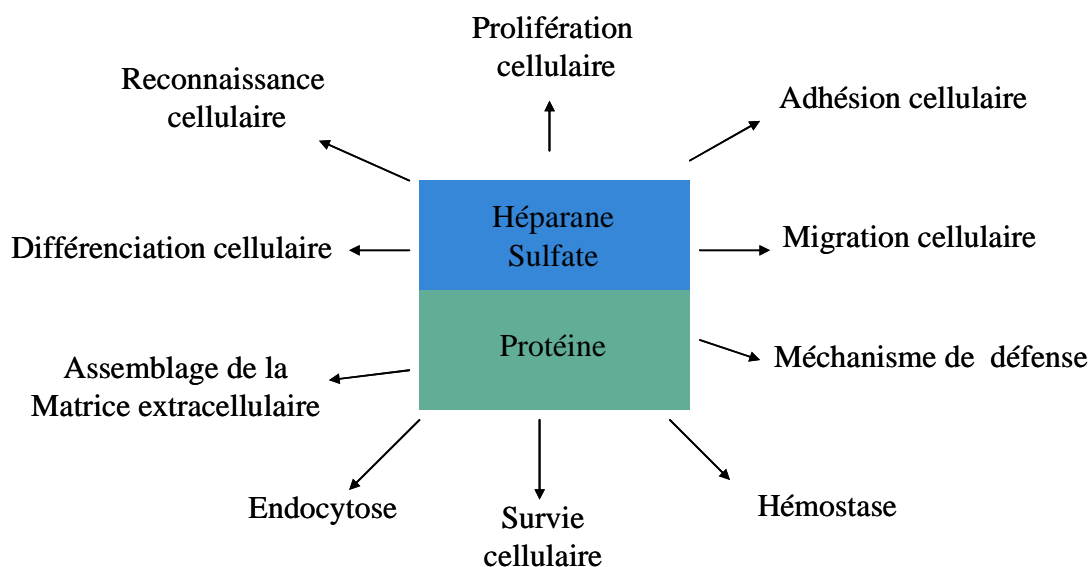


<b>Surface cellulaire</b>	<b>Références</b>
Selectine-L et -P	(109)
N-CAM	(110)
Récepteur au FGF	(111)
CD44	(112)
<b>Matrice extracellulaire</b>	
Collagènes	(58)
Fibronectines	(113)
Laminines	(114)
Vitronectines	(115)
<b>Facteurs de croissances</b>	
Famille du FGF	(116)
VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire)	(117)
PDGF (facteur de croissance dérivé des plaquettes)	(58)
TGF- $\beta$	(58)
<b>Cytokines, chemokines, morphogènes</b>	
BMP (protéine morphogénique de l'os)	(118)
IL-1, -2, -3, -4, -5, -7, -8, -10, -12 (interleukines)	(119)
Wnt	(118)

**Tableau 2 : Protéines capables de lier les héparanes sulfate .**

**D'après (120)**

Les nombreux partenaires protéiques que peuvent avoir les héparanes sulfates donnent lieu à de nombreuses activités biologiques qui sont présentées Figure 11.



**Figure 11 : Activités biologiques modulées par l'interaction héparanes sulfates/protéines. D'après (120)**

Les chaînes HS sont localisées au niveau du compartiment extracellulaire. Elles ont un rôle dans l'assemblage de la matrice extracellulaire (121,122), dans la modulation d'activités enzymatiques ou de leurs inhibiteurs (123), dans la création d'un gradient extracellulaire de facteurs de croissances et de chemokines (5,84,118,124,125) et prévient également de leurs dégradations (126). Les protéoglycanes à HS peuvent être responsables de la réponse cellulaire en inhibant ou en activant des voies de transduction cellulaire. En effet, une translocation du signal au compartiment intracellulaire via l'interaction des chaînes ou du core protéique du protéoglycane avec ces ligands spécifiques est capable d'engendrer une cascade de signalisation cellulaire. Les HS ont la capacité de jouer le rôle de récepteur ou de co-récepteur pour différents ligands. L'activation des voies de signalisation cellulaire s'opère par une phosphorylation de différentes protéines cytosoliques soit directement, soit par l'intermédiaire de protéines du cytosquelette aboutissant à une régulation des gènes cibles. Les systèmes de signalisation cellulaire impliqués suite à l'interaction des protéoglycanes à héparanes sulfates avec des ligands extracellulaires et/ou des récepteurs incluent des voies

comme Ras/Raf/MAPK (127), PIP3/Akt (128), PLC/PKC (129), cAMP/PKA (130). Ces voies sont d'un grand intérêt et jouent un rôle clé dans le comportement d'une cellule normale et dans des maladies comme l'arthrose.

### **II.1.8 Interactions glycosaminoglycanes – molécules d'eau**

En solution aqueuse, les GAGs sont entourés d'une enveloppe de molécules d'eau, leur conférant un volume hydrodynamique conséquent. Quand une solution de GAGs est compressée, l'eau est extraite et les GAGs sont forcés d'occuper un volume plus petit. Quand la compression est levée, les GAGs regagnent leur volume original et hydraté dû aux répulsions de leurs charges négatives.

## **II.2. Adhésion cellulaire**

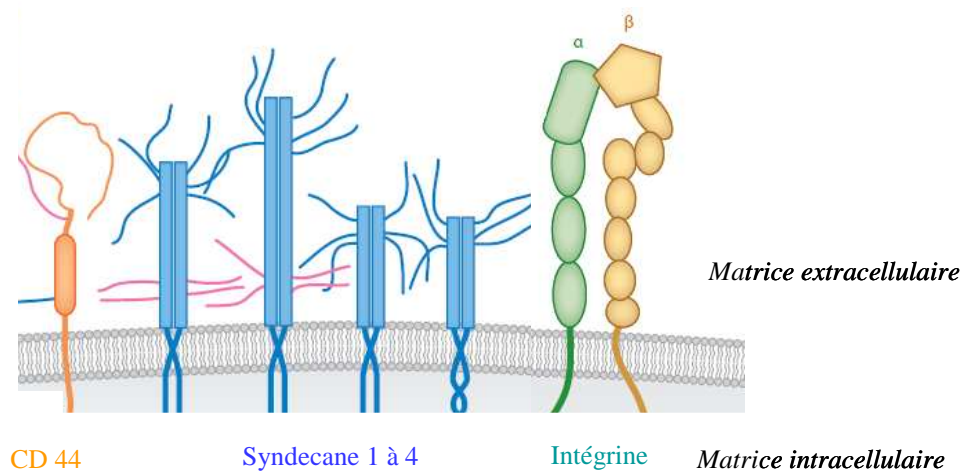
L'interaction des cellules avec leur environnement joue un rôle clé pour la migration cellulaire, l'organisation tissulaire, le remodelage et l'homéostasie des tissus (28). L'adhésion des cellules à la MEC fait appel à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules. L'adhésion est un mécanisme complexe qui implique la présence de structure spécifique à la surface cellulaire et des sites de reconnaissance dans la MEC. Nous avons décrit précédemment les protéines majoritaires de la MEC impliquées dans l'adhésion. Il s'agit de la fibronectine, la laminine, les collagènes et les protéoglycanes. Des protéines à la surface des cellules interviennent dans la reconnaissance de ces protéines. Ces protéines de surface cellulaire sont regroupées en deux types. Les récepteurs à intégrines et les récepteurs n'appartenant pas à la famille des intégrines.

### ✓ **Les récepteurs cellulaires autres que les intégrines**

Les syndécanes et un protéoglycane de surface le CD44 (131) sont une classe de récepteur différent des intégrines. Le syndécane est une protéine transmembranaire comprenant un domaine cytoplasmique, une région membranaire hydrophobe et un domaine extracellulaire. Les chaînes de GAGs associées à ce protéoglycane sont constituées de chondroïtine sulfate et d'héparane sulfate. Ces récepteurs de surface cellulaire sont capables de lier les collagènes et la fibronectine. Le CD44 est une glycoprotéine de la surface cellulaire, qui porte des sucres et des chaînes de GAGs. L'épissage alternatif et les modifications post-traductionnelles des héparanes sulfates permettent d'obtenir différentes formes de CD44. Le CD44 est capable de lier le collagène de type I et IV ainsi que le hyaluronane. Le CD44 assure un rôle important dans l'adhésion cellulaire (132). (Figure 12)

### ✓ **Intégrines**

La désignation intégrine a été attribuée à ce type de récepteur pour souligner sa capacité à maintenir l'intégrité de la liaison entre le cytosquelette et la MEC (133). Les intégrines appartiennent à un groupe de la famille des glycoprotéines. Leur structure dérive de l'association non covalente de deux sous-unités hétérotrimériques  $\alpha$  et  $\beta$  pouvant chacune exister sous différentes formes (134). La combinaison de différentes sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  entre elles, permet de générer un grand nombre de récepteurs de surface cellulaire (131,135,136). Chez les vertébrés, la famille des intégrines contient 24 hétérodimères différents, pouvant être des récepteurs capables de reconnaître le collagène, les leucocytes, la laminine et les motifs RGD (RGD : arginine-glycine-acide aspartique) présents sur la fibronectine, la vitronectine et le fibrinogène 5 (135,137) La sous-unité  $\beta$  liée au cytosquelette est responsable de l'activation de multiples voies cellulaires, alors que la sous-unité  $\alpha$  détermine la spécificité de liaison de l'intégrine (137) (Figure 12).



**Figure 12 : Récepteurs de la surface cellulaire**

**Adapté d'après (131)**

### **III. Traitements actuels des pertes de substances ostéo-articulaires**

Le cartilage articulaire est un tissu non vascularisé doté d'un très faible pouvoir de régénération. Une lésion ou une atteinte de ce tissu est ainsi irréversible. Les lésions du cartilage résultent de traumatisme, affectant en majorité le sujet jeune, souvent suite à une activité sportive. Les lésions peuvent être d'origine chondrale ou ostéochondrale. Les lésions chondrales concernent uniquement le cartilage et ne pénètrent pas dans l'os sous-chondral. Les vaisseaux qui composent l'os sous-chondral n'étant pas affectés, cette lésion ne cicatrise pas spontanément. Les lésions ostéochondrales quant à elles pénètrent la zone vascularisée de l'os sous-chondral. Une réparation spontanée s'opère suite à l'invasion de cellules chondroprogénitrices mésenchymateuses dans la lésion. Le tissu néo-formé résultant est fibreux et ne possède pas les propriétés fonctionnelles du cartilage hyalin natif. A l'opposé, du cartilage, l'os est un tissu en continuel remodelage. Des défauts ou des lésions de l'os arrivent suite à une large variété de situations cliniques. La reconstruction de ce tissu, afin de fournir

une intégrité mécanique et fonctionnelle, est une étape nécessaire pour la réhabilitation du patient. L'os possède une capacité de régénération spontanée, la majorité des lésions comme les fractures cicatrise bien avec les thérapies et la chirurgie actuelle. Néanmoins, un greffon osseux ou un substitut est bien souvent nécessaire en chirurgie orthopédique et maxillo-faciale pour aider la cicatrisation de larges défauts traumatiques ou post-chirurgicaux ainsi que pour les déformations d'origine congénitale.

### **III.1. Traitements actuels des pertes de substances du cartilage articulaire**

Différentes techniques chirurgicales ont été mises en place pour stimuler la régénération du cartilage ou pour obtenir des greffons de cartilage articulaire sain (auto et allogreffe)

#### **III.1.1. Autogreffes de cartilage articulaire**

Les greffes autologues consistent à prélever du cartilage sain au niveau d'un second site opératoire afin de constituer un greffon. Ce greffon sera ensuite placé au niveau du défaut cartilagineux à traiter. Trois greffons de provenances différentes peuvent être utilisés.

Le péricondre est un tissu conjonctif qui entoure la surface de tous les tissus cartilagineux (hormis le cartilage articulaire). On le trouve au niveau de l'oreille, de la trachée et des côtes chez l'adulte. Il peut être prélevé au niveau de ces zones et fixé au niveau du défaut cartilagineux à l'aide d'une colle biologique (138). Les résultats un an après l'intervention sont excellents, mais sont décevants à long terme avec pour certains sujets une calcification du tissu de réparation.

Le périoste, qui revêt les os longs, conserve une activité chondrogénique tout au long de la vie. Il contient un pool de cellules souches qui auront pour objectif de réactiver la néoformation du cartilage endommagé. Après microfractures, un lambeau de périoste est déposé sur la zone à régénérer et maintenu sur le site grâce à une colle biologique. Les

résultats cliniques sont faibles, montrant une réparation maigre et instable dans le temps avec une apparition de calcifications (139).

Au début des années 1990, la technique de greffe ostéocondrale multiple ou encore appelée mosaïcplastie a vu le jour. Elle consiste à prélever des greffons ostéocondraux cylindriques sur des zones faiblement portantes de l'articulation. Les greffons sont transférés dans des cavités préalablement forées au niveau de la lésion. Cette technique est réservée à des sujets de moins de 50 ans remplissant des caractéristiques lésionnelles bien définies. Malgré des résultats encourageants, cette technique ne permet pas de couvrir de large perte de substance et peut être associée à une morbidité du site donneur.

Une dernière voie de recherche développée par Brittberg (140,141), consiste à transplanter des chondrocytes autologues amplifiés *ex vivo* au niveau de la zone lésée du cartilage articulaire. Cette technique est applicable mais dans des cas cliniques restreints. Elle est réservée à des patients d'âge inférieur à 50 ans, présentant une perte de substance chondrale inférieure à 8cm<sup>2</sup> et ne présentant pas de pathologies inflammatoires comme l'arthrose. L'inconvénient majeur tout comme la mosaïcplastie est la morbidité importante au niveau du site donneur. Les cellules du greffon prélevé sont amplifiées *ex vivo* en monocouche. L'amplification en deux dimensions provoque une dédifférenciation, c'est-à-dire une perte du phénotype chondrocytaire ainsi que de ces fonctions associées. L'implantation de chondrocytes dédifférenciés entraîne la formation d'un cartilage fibreux dont les propriétés mécaniques et biologiques sont inférieures à celles du cartilage articulaire normal. Malgré ces inconvénients, cette technique a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives de recherche thérapeutique. En effet, cela marque les premiers pas des thérapies cellulaires du cartilage faisant appel au principe de l'ingénierie tissulaire.

### **III.1.2. Allogreffes de cartilage articulaire**

Les allogreffes ont pour objectif de combler le défaut cartilagineux avec du cartilage articulaire sain provenant de cadavre (142). Un des problèmes majeurs de cette technique résulte de l'incompatibilité du donneur, engendrant une réaction immunologique de rejet du greffon. Malgré un taux de succès assez élevé (de 63 à 75%) cette technique reste peu employée suite à l'éventualité de transmission de maladies virales ou d'agents transmissibles non conventionnels (prions).

### **III.2. Traitements actuels des pertes de substances osseuses**

L'os est un tissu vascularisé doté de processus d'auto-réparation. Néanmoins, des pertes importantes de substance osseuse ne peuvent être régénérées par les processus naturels de réparation et nécessitent une intervention chirurgicale. Les techniques actuelles utilisées consistent à apporter du matériel au niveau du défaut osseux avec pour rôle de consolider la partie défailante et de guider la régénération osseuse. Les matériaux utilisés peuvent se présenter sous la forme de greffons d'origine biologique ou de substituts osseux synthétiques. Actuellement, en clinique la technique la plus employée est la greffe de tissu osseux autologue. Face aux limites de cette technique, d'autres approches innovantes basées sur l'utilisation de matériaux synthétiques ont émergé ces dernières années.

#### **III.2.1. Autogreffes osseuse**

La greffe osseuse autologue constitue la méthode actuelle de référence pour la reconstruction et le comblement de défauts osseux. Du tissu osseux (os trabéculaire ou os cortical) est prélevé au niveau d'un second site opératoire, choisi par le chirurgien en fonction des besoins requis pour le site receveur. L'os trabéculaire offre une porosité plus élevée que



l'os cortical. Sa revascularisation plus rapide permet ainsi une intégration plus rapide du greffon mais, avec une résistance mécanique faible. Les auto-greffes présentent l'avantage d'utiliser un tissu proche de celui que l'on souhaite remplacer en termes de composition, de propriétés mécaniques et de structure. Elles ont de par ce fait des capacités ostéogéniques car elles apportent des éléments intrinsèques tels que des cellules ostéoprogénitrices et des facteurs de croissances, mais également des propriétés ostéoconductrices, car capables de guider et de supporter la déposition d'un nouveau tissu osseux. Pour terminer, les greffons possèdent des propriétés ostéoinductrices, la présence de facteurs de croissance et de protéines apportés par le greffon sont susceptibles d'induire la différenciation des cellules souches de l'hôte en cellules ostéoprogénitrices formant un nouveau tissu osseux. Cependant, cette technique de greffe autologue se trouve confrontée à de nombreuses limites. La principale étant la nécessité d'une intervention chirurgicale sur un second site opératoire, entraînant des complications dans 10 à 30% des cas. De plus la quantité d'os à prélever étant limitée, le comblement de défauts de grandes tailles nécessite plusieurs sites donneurs. Il est facilement compréhensible que le nombre multiple de sites de prélèvement augmente les risques de l'intervention.

### **III.2.2. Allogreffes osseuse**

Certaines conditions rendent l'utilisation de greffe osseuse impossible. Les chirurgiens peuvent avoir recours à l'allogreffe osseuse provenant de donneurs, suite à une opération chirurgicale ou être obtenue lors de prélèvements multi-organes. L'avantage étant la disponibilité d'une quantité osseuse plus importante avec l'absence d'un second site opératoire. Cependant les risques de réactions immunogènes et de transfert d'agents non-conventionnels rendent l'utilisation des allogreffes peu courante. Des stratégies thermiques, chimiques et de stérilisation ont été développées pour passer outre les inconvénients de

transmission virale. Ces techniques efficaces permettent la conservation des greffons et la mise en place de banque osseuse. Toutefois, les traitements infligés altèrent les propriétés ostéoconductrices et ostéoinductives du greffon (143,144). Les greffons peuvent être utilisés d'une autre manière sous la forme de matrices osseuses déminéralisées (145). La partie minérale du greffon est éliminée afin de conserver uniquement la charpente protéique constituée essentiellement de collagène et de facteurs de croissance comme les BMPs (Bone morphogenic Proteins). Cette composition confère des propriétés ostéoinductives au greffon déminéralisé mais avec de faibles propriétés mécaniques. Le caractère acellulaire du greffon autologue lui confère de faibles propriétés biologiques, il sera ainsi plus rapidement résorbé que les greffons autologues. Malgré ces inconvénients, les allogreffes présentent une alternative intéressante aux autos greffes (146,147). Qu'ils s'agissent d'allo ou d'auto greffes, elles constituent le matériau de référence pour les interventions chirurgicales humaines (80 à 90% des interventions).

Les techniques utilisées en clinique pour traiter des pertes de cartilage articulaire et d'os montrent leurs limites. Elles ont poussé à identifier des procédures alternatives pour réparer de manière permanente le cartilage et des défauts osseux de grandes tailles, donnant naissance à une nouvelle discipline de recherche: l'ingénierie tissulaire.

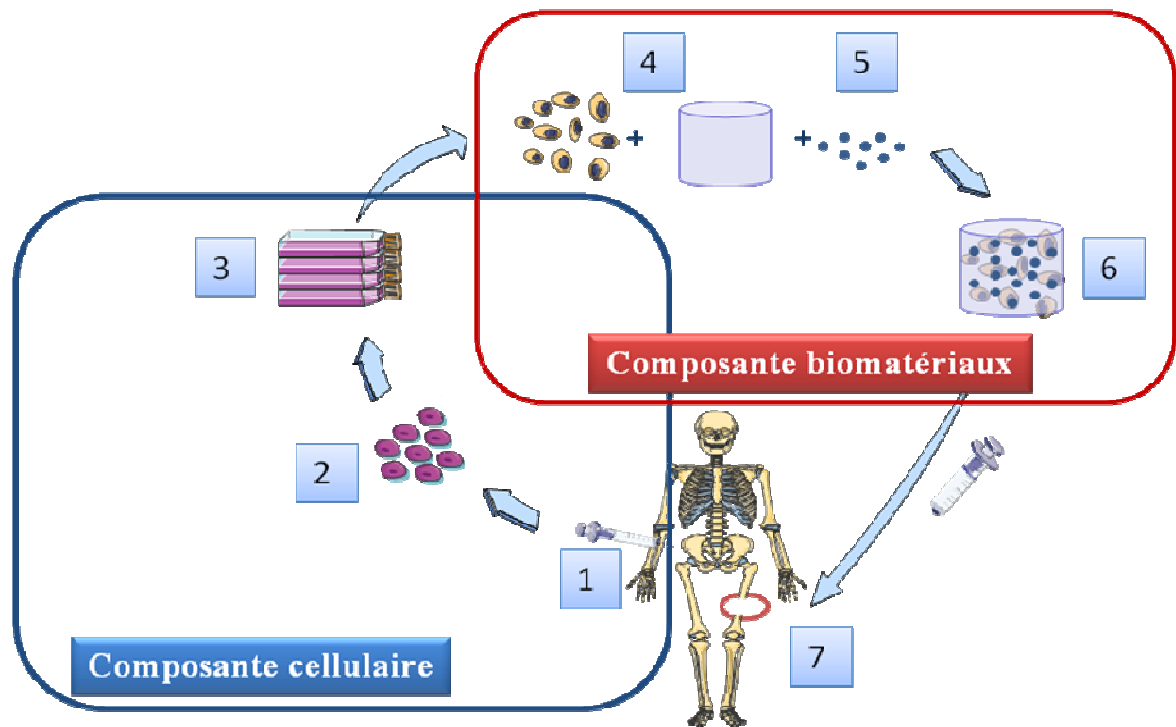
## **IV. L'ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage**

### **IV.1. Généralités**

Les lésions, pertes d'organes, ou de tissus constituent l'un des problèmes les plus fréquents, les plus dévastateurs et les plus coûteux des systèmes de santé. Les thérapies existantes pour traiter les pertes de tissus ou d'organes consistent en la pose de prothèses pour remplacer, dans certaines limites, la structure et la fonction du tissu ou de l'organe lésé.

Actuellement, la régénération de l'os et du cartilage par la transplantation de cellules ou de tissus autologues constitue une des techniques les plus prometteuses en chirurgie orthopédique et en ingénierie biomédicale. Les concepts de traitement basés sur ces techniques esquiveraient les problèmes de pénurie de site donneur, de rejet immunitaire et de transfert de pathogènes. Dans ce contexte, une discipline appliquant les principes de la biologie, de l'ingénierie, de la biochimie et de la médecine nommée ingénierie tissulaire a vu le jour (148). Elle se donne pour objectif de développer des substituts biologiques pouvant restaurer, maintenir ou améliorer la fonction des tissus. La stratégie de cette discipline consiste à élaborer des guides de reconstructions à partir (i) d'une composante matériau biocompatible contenant un ou plusieurs matériaux d'origine synthétique et/ou naturelle et (ii) une composante cellulaire capable de participer à la néoformation du tissu à remplacer ou à réparer (Figure 13). La matrice biocompatible peut être chargée avec des molécules biologiquement actives (facteurs de croissances, ADN ...), pour influencer le comportement des cellules contenues dans la matrice, et améliorer la production tissulaire. Le domaine de l'ingénierie tissulaire peut ainsi être découpé en deux champs d'investigations différents. Le premier concerne le développement de matrices capables de répondre biologiquement et physiquement aux attentes de l'ingénierie des tissus osseux et cartilagineux. Le deuxième champ d'investigation s'intéresse quant à lui aux cellules, en étudiant les sources de cellules possibles, et les conditions de culture permettant de stimuler la chondrogenèse et l'ostéogenèse.

Ce chapitre discute des bases et des défis de l'ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage. Nous développerons en détails les matrices élaborées à partir de polysaccharides naturels actuellement étudiés en ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage. Nous verrons ensuite brièvement les sources de cellules pouvant être utilisées ainsi que les facteurs de croissance pouvant être ajoutés pour optimiser la formation d'un nouveau tissu cartilagineux ou osseux.



**Figure 13 : Principe de l'ingénierie tissulaire**

## IV.2. Les matrices en ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage

### IV.3.1. Critères requis pour la réalisation de matrices

Une des fonctions que l'on attribue de façon intuitive à la matrice est celle de vecteur et de support des cellules au niveau du tissu à remplacer. En réalité, la matrice joue un rôle clé beaucoup plus complexe dont dépend le succès du tissu à remplacer. L'objectif est de recréer artificiellement un microenvironnement présent *in vivo* (149). Ainsi en plus de sa fonction de soutien et de vecteur des cellules, la composition et la structure de la matrice doit influencer et persuader les cellules qui la composent de fonctionner de façon idéale, en favorisant la production d'un nouveau tissu (150). Une matrice idéale en ingénierie tissulaire de l'os et du

cartilage doit mimer le tissu à remplacer de façon structurale, mécanique et bio-fonctionnelle et être techniquement applicable (151-153). Ces exigences sont illustrées dans le *tableau 3*. Pour résumer brièvement, la matrice doit fournir un environnement poreux tridimensionnel, biocompatible permettant une adhésion cellulaire pour retenir les cellules dans la matrice (154). L'environnement fourni par la matrice doit favoriser la prolifération et la différenciation cellulaire. De ce fait, des molécules bioactives (facteurs de croissance, cytokines...) peuvent être additionnées à la matrice (155,156). La matrice doit également adhérer au tissu environnant et posséder une résistance mécanique. En effet, elle devra supporter la fonction du tissu endommagé et ce pendant toute la durée de la nouvelle croissance tissulaire (157). Par la suite la matrice doit être capable de se dégrader dans le temps pour être peu à peu remplacée par le tissu néoformé (149). Un des critères importants de la matrice est sa capacité à être stérilisée afin d'éviter des sources de contaminations par des agents pathogènes et cela sans subir de modification de ses propriétés physiques, chimiques et biologiques. Pour finir, elle doit être applicable de préférence par chirurgie mini-invasive (produit injectable) ou dans le cas contraire être adaptée à la forme et la taille du tissu à remplacer.

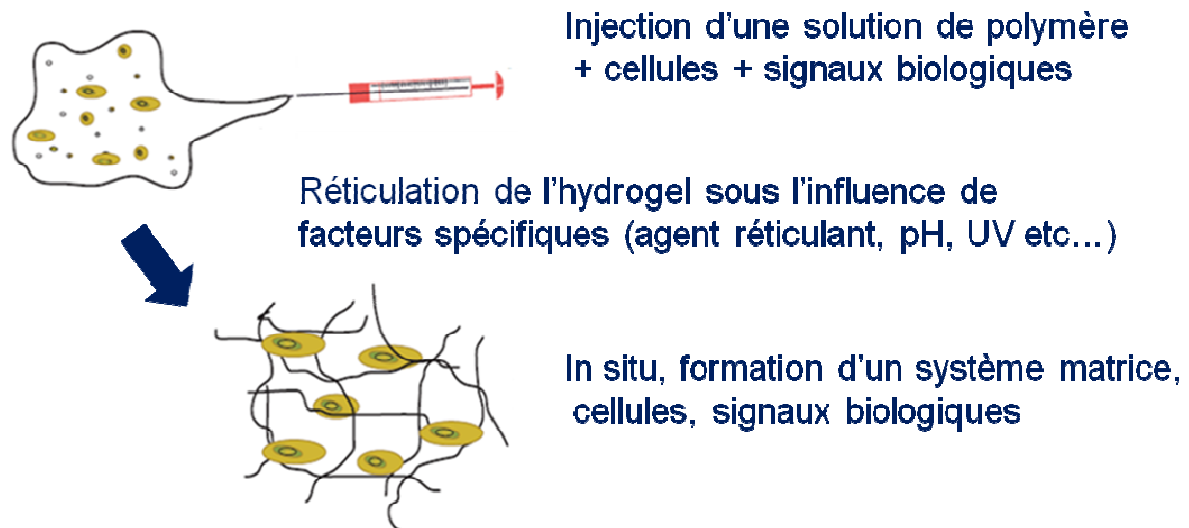
EXIGENCES DE LA MATRICE		CARACTERISTIQUES BIOLOGIQUES DE LA MATRICE
<b>STRUCTURALE</b>	<i>Porosité</i>	- La matrice doit être microporeuse pour permettre son ensemencement par des cellules. L'espace des pores doit être suffisant pour le développement et le remodelage du tissu à régénérer. (>100µm)
	<i>Interconnectivité Nanoporosité</i>	- La diffusion des gazs, des substances nutritives et des métabolites doit être possible dans toute la matrice afin de permettre des échanges avec les cellules.
	<i>Intégration</i>	- La matrice, doit s'intégrer au tissu situé en périphérie du tissu à régénérer.
<b>MECANIQUE</b>	<i>Support physique et mécanique</i>	- La matrice doit fournir un support mécanique et physique au moment de l'implantation pour supporter les fonctions natives du tissu. - La matrice doit avoir une valeur de résistance mécanique proche du tissu à remplacer pour la transmettre aux cellules - La matrice doit garder son rôle de support mécanique pendant la croissance du nouveau tissu et le remodelage de celui-ci
<b>BIO-FONCTIONNEL</b>	<i>Biocompatibilité</i>	- La matrice doit maintenir la viabilité cellulaire et prévenir d'une réaction inflammation et immunitaire
	<i>Bioactivité</i>	- La matrice doit contenir les informations codées par la matrice extracellulaire (sites d'adhésions, facteurs de croissances, etc...) - La matrice doit permettre le maintien du phénotype des cellules - La matrice peut favoriser la différenciation de cellules souches ou de cellules progénitrice en ostéoblastes ou en chondrocytes.
	<i>Interaction avec les cellules</i>	- La matrice doit permettre l'adhésion des cellules cible en imitant les caractéristiques de la MEC. Elle peut ainsi intégrer des constituants présents dans la MEC. - La matrice doit faciliter la libération de signaux morphogéniques (facteurs de croissances) afin d'orienter la croissance, la différenciation et la prolifération cellulaire.
	<i>Dégradable</i>	- La matrice doit être dégradable par les cellules dans une cinétique de temps appropriée, de façon à laisser place progressivement au nouveau tissu néoformé.
<b>TECHNIQUE</b>		- La matrice doit pouvoir être stérilisée pour éviter d'éventuelles contaminations par des agents pathogènes et cela sans engendrer de modification de ses propriétés physiques, chimiques et biologiques. - La matrice doit être délivrée par chirurgie mini invasive, c'est-à-dire via une solution injectable capable de se solidifier <i>in situ</i> . Dans le cas contraire, la matrice doit pouvoir être facilement adaptable à la forme du défaut à combler et doit dans tous les cas être facilement utilisable par les chirurgiens.

**Tableau 3 : Critères d'une matrice idéale en ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage**

Selon le polymère de départ et la stratégie d'ingénierie tissulaire visée, la matrice peut être de différente nature (protéique, polysaccharidique, synthétique ou naturelle) et se présenter sous

différentes formes (solide, poreuse, liquide, éponge, hydrogel, fibres, micro ou nanoparticules....).

Aujourd'hui la médecine s'oriente vers des procédures chirurgicales moins invasives pour diminuer le temps d'hospitalisation et favoriser un retour rapide à une activité normale. Dans cette optique, l'ingénierie tissulaire s'oriente à développer des matériaux injectables, c'est-à-dire étant capables de passer par l'aiguille d'une seringue, d'un cathéter ou par des dispositifs d'arthroscopie. Dans ce contexte, les hydrogels représentent des matériaux attractifs en ingénierie tissulaire. Les hydrogels forment un réseau de chaînes de polymères hautement hydratées avec une élasticité similaire au tissu naturel (158). Une solution visqueuse réalisée à partir d'un polymère hydrophile peut contenir les cellules ainsi que des principes actifs (facteurs de croissances, cytokines, ADN etc...). Une fois injectée cette solution aura la capacité de se durcir *in situ* sous l'influence de différents facteurs (physique, chimique, ionique) pour former un réseau tridimensionnel encapsulant cellules et principes actifs. Ce principe est illustré sur la Figure 14. Le matériau injectable peut ainsi prendre sa forme *in vivo* et s'adapter parfaitement aux irrégularités et à la taille du défaut (159).



**Figure 14 : Schématisation du principe des hydrogels.**

**D'après (160)**

### **IV.3.3. Les matrices à base de polymères naturels en ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage**

De nombreuses matrices à base de polymères naturels sont étudiées et proposées pour l'élaboration de matrices en ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage (127,161,162). L'intérêt croissant de ces polymères est dû à leur biodégradabilité, leur faible toxicité, leur faible coût de fabrication ainsi que leur grande disponibilité (163). De plus, leur similarité de structure avec certains composants de la matrice extracellulaire en fait des composants attractifs pour la réalisation de matrices. Dans la partie suivante, nous allons décrire les polymères d'origines protéiques et polysaccharidiques naturels majoritairement utilisés pour la réalisation de matrices et étudier pour une application en ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage.



### IV.3.3.1. Les matrices à base de polymères naturels protéiques

#### ✓ *Le collagène*

Le collagène est une protéine biologique abondante dans les matrices extracellulaire des tissus (os, cartilage, peau, tendons, vaisseaux sanguins..) (c.f chapitre 1). Son faible pouvoir antigénique et ses capacités à être reconnu par les cellules en font un matériau de choix pour l'élaboration de matrice (164). Le collagène sous la forme d'éponges a par exemple montré une capacité à promouvoir l'attachement cellulaire et à favoriser la formation d'un tissu osseux (165). Un autre exemple, le collagène mis sous la forme de gel et associé à des cellules souches mesenchymateuses, favorise la formation d'os et de cartilage hyalin après implantation au niveau de défaut ostéochondral chez le lapin. Cependant, l'une des limites à l'utilisation du collagène pour la réalisation de matrice sont ses faibles propriétés mécaniques (166). De nombreuses recherches sont réalisées dans le but de pallier à ce problème. L'augmentation des propriétés mécaniques peut être obtenue par le crosslinking des chaînes de collagène par du glutaraldéhyde (groupements amines, lysines et hydroxylisine) (167). Cependant les nombreux traitements chimiques visant à augmenter le degré de crosslinking s'avèrent bien souvent cytotoxiques (168). Un autre désavantage est la rapide dégradation des matrices à base de collagène une fois implanté *in vivo* (169). La matrice va ainsi rapidement perdre ses fonctions de soutien mécanique. La combinaison des collagènes avec des matrices à base d'élastine ou de glycosaminoglycanes permet de ralentir sa dégradation (170). Les matrices de collagènes peuvent également être combinées avec d'autres GAG pour augmenter ses propriétés. Par exemple, une matrice de collagène sous la forme de fibres associée à de l'acide hyaluronique permet une augmentation de l'ostéoinductivité du matériau, c'est-à-dire sa capacité à induire la différenciation ostéoblastique. (171).

### ✓ *La fibrine*

La fibrine est une protéine biocompatible et biodégradable qui apparaît dans le sang au moment de la coagulation sous l'action de la thrombine. Il s'agit d'une protéine impliquée dans la cicatrisation et la réparation tissulaire. La fibrine, peut être préparée à partir du plasma du patient et peut être disponible sous la forme de gel (colle de fibrine) ou de microparticules (172,173). La fibrine montre un large potentiel en régénération tissulaire et en cicatrisation (174). La colle de fibrine non-toxique et non-immunogénique possède des propriétés biodégradables, ne requérant aucun agent stabilisant. Ces caractéristiques permettent l'utilisation de cette protéine sous sa forme native pour la réalisation de matrices et la culture de cellules en 3 dimensions (102,173,175,176). Différentes études ont été menées sur l'utilisation de la colle de fibrine pour la réparation du cartilage (177-179). Cependant, l'utilisation de fibrine comme unique composé pour la réalisation de matrices est délicate. En effet la matrice est rapidement dégradée par les mécanismes de fibrinolyse une fois introduite dans un tissu. Une approche vise à associer des microparticules de fibrine composées d'alginate pour ralentir la dégradation du matériau. Ces microparticules associées à des cellules de la moelle osseuse permettent la réparation partielle de défauts osseux de taille critique chez le lapin (172,180).

### ✓ **Les fibres de soie**

Les fibres de soie sont des protéines fibreuses obtenues des vers à soie, avec des propriétés physiques et chimiques uniques (181,182). Les fibres de soie ont été utilisées en biomédical pour la réalisation de fils de sutures. Depuis quelques années, les protéines de soie suscitent un grand intérêt pour la réalisation de matrices en ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage. Les fibres de soie présentent une faible dégradabilité, une haute résistance, ainsi qu'une

séquence qui peut être génétiquement modifiées. Les matrices à base de fibre de soie peuvent être sous la forme de gels, d'éponges, de poudres et de membranes. Un exemple de matrices à base de protéine de soie sous la forme d'éponge, permet une ostéogenèse et une chondrogenèse des cellules souches mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse (183).

#### **IV.3.3.2. Les matrices à base de polymères naturels polysaccharidiques**

##### **✓ *Le Chitosane et ses dérivés***

Le chitosane est un amino polysaccharide cationique biodégradable dérivé de la chitine avec de nombreuses applications en ingénierie tissulaire (5). Il possède une surface hydrophile qui permet l'adhésion, la prolifération et la différenciation cellulaire. Il est également doté d'une activité antimicrobienne et d'un faible pouvoir antigénique. Il peut être façonné sous la forme de matrice poreuse avec des propriétés ostéoinductives (13), c'est-à-dire une capacité à induire une formation osseuse. Le chitosane encourage la croissance et la déposition de matrice minérale par les ostéoblastes en culture *in vitro* et *in vivo* (184,185). Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire osseuse, il est souvent utilisé en association avec d'autres composés comme les phosphates tri-calciques ( $\beta$ -TCP), l'hydroxyapatite et les céramiques en phosphate de calcium. En effet, ces composés sont d'excellents candidats pour la réparation et la régénération osseuse grâce à leur composition proche de la matrice inorganique de l'os (186). Des matrices de chitosane sous la forme d'éponges associant des biocéramiques, possèdent des propriétés mécaniques plus élevées. Le chitosane peut également être associé à d'autres polymères pour augmenter ces propriétés mécaniques. Par exemple, l'association de chitosane et d'alginate permet de générer des matrices avec des propriétés mécaniques élevées associées à une ostéoconductivité (5). Le chitosane est également étudié pour la réalisation de matrice pour la réparation du cartilage (14,187). La culture de chondrocytes *in vitro* sur du chitosane permet de maintenir la morphologie ronde des chondrocytes et la synthèse de

composants spécifiques de la MEC. Le chitosane peut également être associé à d'autres GAG comme l'acide hyaluronique pour augmenter ses propriétés et la réparation du cartilage (188).

### ✓ *Acide hyaluronique*

L'acide hyaluronique (AH) est l'un des composants majeurs de la matrice extracellulaire. Il est obtenu à partir de différents tissus d'animaux (cordon ombilical humain, liquide synovial, cartilage nasal de bovin, humeur vitrée, crête de coqs etc...) (189). Il peut également être produit par des bactéries génétiquement modifiées (*Bacillus subtilis*, *Streptococcus equisimilis*...) (190) par fermentation microbienne, permettant d'éviter les problèmes de contamination par les agents de transmission non conventionnels (191). Les propriétés viscoélastiques, de l'acide hyaluronique, ainsi que la possibilité de modifier la taille des chaînes polysaccharidiques, donnent lieu à de nombreuses applications en biomédical (190,192,193). Pour la réparation du cartilage, une matrice d'AH en association avec des chondrocytes permet une augmentation de la formation de MEC cartilagineuse *in vivo* et *in vitro* (194,195). Un autre exemple, l'association d'une matrice d'AH avec des cellules souches embryonnaires humaines, implantées au niveau d'un défaut ostéocondral chez le lapin, permet la formation d'un tissu cartilagineux après 12 semaines d'implantation (196). Cependant, les caractéristiques physiques et biologiques de l'acide hyaluronique natif présentent certaines limites. Sa rapide résorption une fois implanté présente un inconvénient majeur. Différentes approches de modifications de la structure moléculaire de l'acide hyaluronique sont possibles afin de faire face à ces problèmes. Des liaisons covalentes entre les chaînes de l'acide hyaluronique peuvent augmenter sa stabilité, tout en augmentant ces propriétés mécaniques (197).

### ✓ *Alginates*

Les alginates commerciaux proviennent de trois souches d'algues brunes différentes (*Laminaria hyperbora*, *Ascophyllum nodosum* et *Macrocystis pyrifera*) (198). Ils sont dérivés d'un polysaccharide non branché constitué d'acide mannuronique (M) et d'acide guluronique (G). La biocompatibilité de ce polysaccharide lui confère de nombreuses applications pour la libération de facteurs bioactifs, pour l'encapsulation de cellules et sous la forme de matrice en ingénierie tissulaire (111,199,200). Les propriétés physico-chimiques de l'alginate sont dépendantes de son poids moléculaire, de sa composition et de sa séquence. Les alginates natifs sont sous forme  $\text{Ca}^{2+}$  ce qui permet de travailler ces polysaccharides sous la forme de gel. En présence de cations multivalents (Sr, Ba), il est possible d'obtenir des hydrogels stables. Les hydrogels à base d'alginate sont réalisés à faible température et en absence de solvant organique. Ils ont été étudiés en ingénierie tissulaire osseuse et cartilagineuse pour le piégeage et la libération de molécules bioactives ou de cellules (109,201). Un exemple d'hydrogel d'alginate combiné avec des chondrocytes, montre *in vivo* la production de MEC correspondante au cartilage (202,203). Un autre exemple, des hydrogels d'alginate ont été étudiés dans des zones non portantes et permettent l'orientation de cellules de la moelle osseuse vers une lignée ostéoblastique (204).

### ✓ *Cellulose*

La cellulose constitue le polymère le plus abondant dans le monde et forme le principal constituant du bois et des parois cellulaires de plantes. La cellulose peut également être obtenue à partir d'algue ou par biosynthèse bactérienne. Il s'agit d'un homopolymère linéaire de glucose  $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n$  ou  $n$  peu varier de 500 à 5000. La cellulose est dégradable par des enzymes (205) et sa solubilité dans l'eau est dépendante de la longueur des chaînes. Elle est facilement manipulable et disponible sous différentes formes : sous formes d'éponges

membranaires, de microsphères, d'hydrogels etc.. La biocompatibilité de la cellulose et de ses dérivés est largement établie (206-209). La cellulose a été employée sous la forme de membranes et de gels pour l'ingénierie tissulaire osseuse (22,23,210) et du cartilage (24,211).

## V. Les polysaccharides d'origines marines

En recouvrant 70% de la surface de la terre, les océans offrent la plus grande biodiversité dans le monde, avec plus de 300 000 espèces décrites. L'environnement marin constitue ainsi une source de nouveaux composés et a été identifié comme le plus grand réservoir de molécules naturelles, restant à être évaluées pour leurs activités biologiques. Les molécules obtenues à partir d'organismes marins, divergent de celles obtenues à partir des organismes terrestres. En effet, les plantes, les animaux macroscopiques et les bactéries nécessitent une adaptation aux habitats marins extrêmement divers (sources hydrothermales, sources chaudes côtières, régions polaires, étangs hypersalins, aires tropicales et tempérées). Cette adaptation nécessite la production de molécules spécifiques et variées.

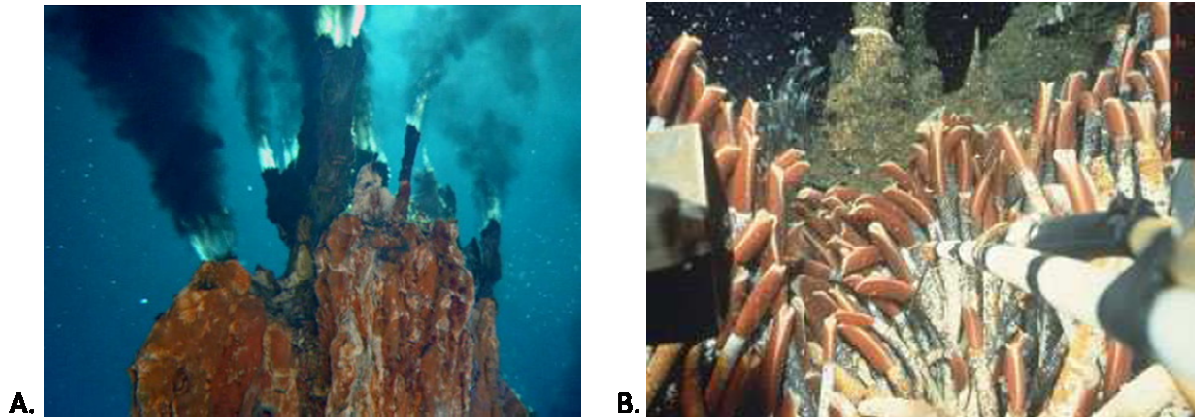
C'est à partir des années 1950 que naît l'engouement pour les organismes d'origine marine avec la première substance biologiquement active d'origine marine à être isolé; une toxine nommée holothurine extraite d'un organisme marin *Actinopyga agassizi* avec des propriétés anti-tumorales chez la souris. Durant ces 40 dernières années, les plantes et les organismes marins ont été le centre d'intérêt des industries pharmaceutiques pour le développement de molécules bioactives (246,247). Un grand panel d'activités est décrit pour ces molécules, comme des activités antifongique, antituberculeuse, antiprotozoaire, antibactérienne, antivirale (248) et anti-tumorale (249,250). D'autres parts les polysaccharides issus de l'environnement marin comme les polysaccharides d'algues tels que les alginates, l'agar, l'agarose et les carraghénanes ou encore ceux isolés de l'exosquelette de crustacés

marins, comme la chitine et son dérivé chimique le chitosane, sont étudiés pour la réalisation de matrices en ingénierie tissulaire.

La biodiversité de l'environnement marin et la diversité chimique qui lui est associée, constitue ainsi une ressource pratiquement illimitée de nouvelles substances actives pour le développement de produits bioactifs. Cet environnement, représente également une source de molécules bioactives attendant d'être découvertes.

### **V.1. Les sources hydrothermales**

En 1977 une équipe de géologues américains, embarquée à bord du sous-marin « Alvin », découvre les sources hydrothermales profondes au large de l'équateur à plus de 2500 mètres de profondeur (251). Ces sites hydrothermaux (Figure 16) sont caractérisés par des conditions de vie atypiques: hautes pressions, forts gradients de température (2°C à 400°C), forte teneur en éléments toxiques (métaux lourds, méthane, sulfures) et une absence totale de lumière. Des conditions que l'on imagine incompatibles avec la présence d'organismes vivants. Pourtant, l'exploration de ces fonds marins a permis de mettre en évidence une population d'organismes vivants divers. Leur existence et leur survie, reposent essentiellement sur la présence de bactéries chimiolithoautotrophes, capables de produire de la matière organique pour les organismes qui vivent en association avec ces bactéries. Les organismes de ces écosystèmes ont développé différentes stratégies d'adaptation. Ils présentent un répertoire de voies métaboliques et de biomolécules originales leur permettant de survivre dans des conditions extrêmes. La biotechnologie des extrémophiles a pour objectif de rechercher et d'exploiter cette nouvelle ressource en biomolécules, notamment en enzymes, biopolymères et métabolites secondaires (252) .



**Figure 16 : A) Fumeurs des sources hydrothermales. B) Organismes rencontrés dans les écosystèmes hydrothermaux**

## **V.2. Les bactéries des sources hydrothermales**

Les sources hydrothermales sont localisées majoritairement au niveau des endroits tectoniquement actifs du fond de l'Atlantique et du Pacifique. Les nombreuses campagnes et l'exploration des fonds marins hydrothermaux ont permis la construction d'une souchothèque. Elle a été réalisée à partir de différents prélèvements, effectués sur les substrats naturels comme les roches, les sédiments, des fragments de cheminées, les fluides et sur les tissus d'organismes invertébrés. Les souches bactériennes isolées à partir de ces sources sont capables de produire des enzymes ainsi que des polysaccharides avec des applications dans différents secteurs industriels tels que l'agro-alimentaire, la cosmétique, l'environnement (253) mais également dans le domaine de la santé (254,255). Un premier *screening* des bactéries capables de produire des exopolysaccharides (EPS) en condition de laboratoire (à température ambiante et pression atmosphérique) a été réalisé à partir des 1100 isolats collectés (21,256). Les résultats ont montré 70 souches hétérotrophes, Gram négatif capables de produire des EPS. Actuellement, 20 polymères possédant des caractéristiques physico-



chimiques innovantes ont été décrits (guezenec, 2002). Ils sont caractérisés par la présence d'acides uroniques et une masse moléculaire élevée ( $10^6$ g/mol).

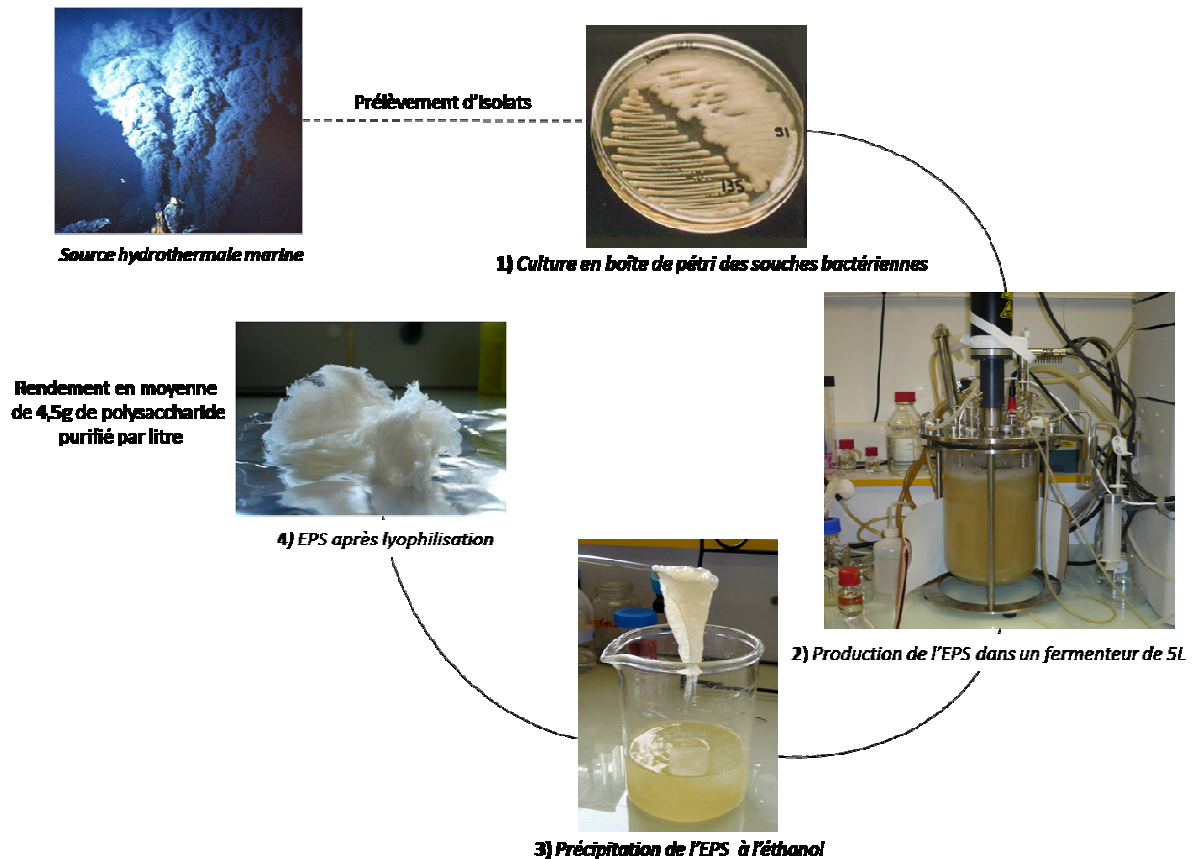
### **V.3. Les exopolysaccharides des sources hydrothermales**

La plupart des microorganismes synthétise plusieurs types de polysaccharides classés selon leur localisation dans la cellule. Les polysaccharides excrétés par la cellule sont appelés "exopolysaccharide" (EPS), ils sont soit libérés dans le milieu environnant, soit liés à la surface de la cellule formant un micro-environnement autour de celle-ci. Leur production peut avoir des intérêts multiples pour la bactérie. Ils peuvent jouer un rôle dans l'adhésion et la colonisation de certaines surfaces ou encore faciliter les interactions biochimiques entre les microorganismes et les cellules et tissus qui l'entourent. Les EPS peuvent également créer une barrière de protection pour la bactérie et piéger certains nutriments. L'utilisation des EPS bactériens en biotechnologie présente quelques avantages comparés aux EPS extraits d'animaux ou de plantes. Ces avantages sont essentiellement dus à leur production réalisable et contrôlable en laboratoire. Ils ne sont pas affectés par les aléas climatiques, écologiques et politiques pouvant modifier la qualité, le coût et l'approvisionnement de leurs homologues extraits d'algues ou de plantes. La préparation de produits à visée thérapeutique d'origines non animale permettrait ainsi d'éviter la présence d'éventuels agents de transmission non conventionnels (prions, virus) potentiellement présents dans les tissus de mammifères. Ils peuvent ainsi présenter une alternative à des produits déjà développés sur le marché pharmaceutique comme l'héparine, un agent anti-coagulant ou l'acide hyaluronique utilisé dans l'élaboration de biomatériaux ou directement injecté en viscosupplémentation dans le traitement de l'arthrose (ostenil<sup>®</sup>, Sinovial<sup>®</sup>, Structoviral<sup>®</sup>, Arthrum<sup>®</sup>,...). Le mode de production des EPS peut être optimisé en agissant sur les conditions de production en fermenteur (source de carbone, température, pH..). Pour finir, ces EPS ont une originalité, une

diversité de structure et une bio-activité qui leur sont propres. Ils ne ressemblent à aucune molécule commercialement disponible, laissant présager la découverte de nouvelles molécules thérapeutiques encore inexistantes, voir plus efficaces que celles actuellement disponibles.

#### **V.4. Production des exopolysaccharides marins**

La production d'un EPS débute par la mise en culture de la souche productrice de l'EPS d'intérêt sur milieu spécifique, suivi d'une mise en culture en fermenteur pendant 24 à 48h. Une centrifugation permet d'isoler les cellules bactériennes du milieu de culture contenant l'EPS. Il sera ensuite récupéré par précipitation à l'éthanol ou par ultrafiltration. L'EPS sera ensuite lyophilisée et caractérisé. Le rendement moyen d'une production d'EPS est de 4,5 g de produit par litre de culture. (Figure 17)



**Figure 17 : Schéma de production d'un EPS marin en conditions de laboratoire**

## V.5. Modification des exopolysaccharides marins

Les EPS marins peuvent avoir de nombreuses applications dans le domaine biomédical et en pharmacie. Néanmoins, les propriétés qui en découlent nécessitent des modifications physico-chimiques de ces derniers afin de répondre à des applications et des besoins bien spécifiques. De nombreuses stratégies de modification gagnent d'intérêt pour la transformation de polysaccharides d'origines marines. Au laboratoire de Biotechnologie et Molécules marine de l'Ifremer, trois types de modifications sont actuellement appliqués sur les EPS. Tout d'abord, la dépolymérisation, par voie radicalaire. Elle permet la coupure des chaînes polysaccharidiques et réduit ainsi la masse molaire. La dépolymérisation radicalaire permet d'obtenir des dérivés des EPS de faible masse molaire (<20 000 g/mol) (257). La

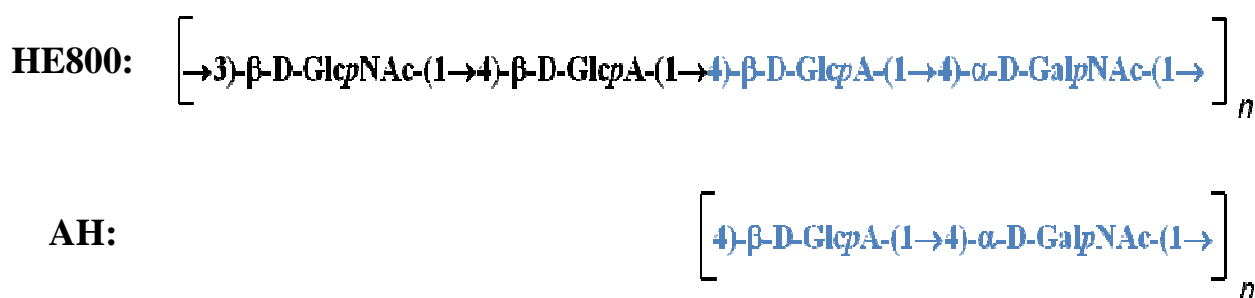
défonctionnalisation, est une méthode permettant d'éliminer des groupements fonctionnels (par exemple la N-désacétylation permettant d'obtenir un groupement NH<sub>2</sub>). Enfin pour terminer, la fonctionnalisation permet l'ajout de groupements fonctionnels sur les positions libres de la structure du polysaccharide comme les hydroxyles ou les amines. La fonctionnalisation par des groupements sulfates (sulfatations) est ainsi une des modifications d'un intérêt majeur apportant de nouvelles propriétés biologiques (GAGs mimétiques ou encore héparinomimétiques) (19,258). Les différentes réactions décrites peuvent être réalisées de façons indépendantes ou couplées. Les différentes réactions permettent d'obtenir toute une gamme de dérivés d'EPS, présentant des masses molaires et des taux de sulfatation différents et cela à partir d'un EPS de haute masse moléculaire. La taille ainsi que le taux de sulfate de chaque molécule peuvent ainsi être adaptés et permettent de cibler différentes applications en thérapeutiques.

## V.6. L'exopolysaccharide HE800

L'EPS HE800 est synthétisé par la souche *Vibrio diabolicus* (Ragueneas et al. 1997) découverte lors de la campagne HERO réalisée en 1991 au niveau d'une faille de la côte Pacifique Est. Il s'agit d'un polysaccharide linéaire constitué de la répétition de 4 résidus osidiques: un résidu N-acétyl-glucosamine, un résidu N-acétyl-galactosamine et deux résidus d'acide glucuronique. Cet EPS de haute masse moléculaire de  $1,4 \times 10^5$  g/mol. Cette composition lui confère une analogie structurale avec un GAG non sulfaté connu, l'acide hyaluronique (Tableau 4 et Figure 18).

	HE800	Acide Hyaluronique
<b>Soufre (g/100g)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Sucres acides (g/100g)</b>	<b>32</b>	<b>30</b>
<b>Osamines (g/100g)</b>	<b>30</b>	<b>30</b>
<b>polydispersité (Mw/Mn)</b>	<b>1,098</b>	<b>1,18</b>
<b>Masse moléculaire (g/mol)</b>	<b>7,4x10<sup>5</sup></b>	<b>1,4x10<sup>6</sup></b>
<b>Rayon de giration (nm)</b>	<b>70</b>	<b>117</b>

**Tableau 4 : Comparaison de la composition de l'EPS HE800 avec un acide hyaluronique bactérien**



**Figure 18 : Structures de l'EPS HE800 et de l'acide hyaluronique**

### V.6.1. Activités biologiques de l'exopolysaccharide HE800 natif

L'EPS HE800 présente une similarité de structure avec l'acide hyaluronique. L'acide hyaluronique est un GAG présent dans la matrice extracellulaire. Il contribue de façon significative à la prolifération et à la migration des cellules. Du fait de sa similarité de structure avec l'acide hyaluronique, les propriétés de l'EPS HE800 natif ont été examinées pour des applications en ingénierie tissulaire.

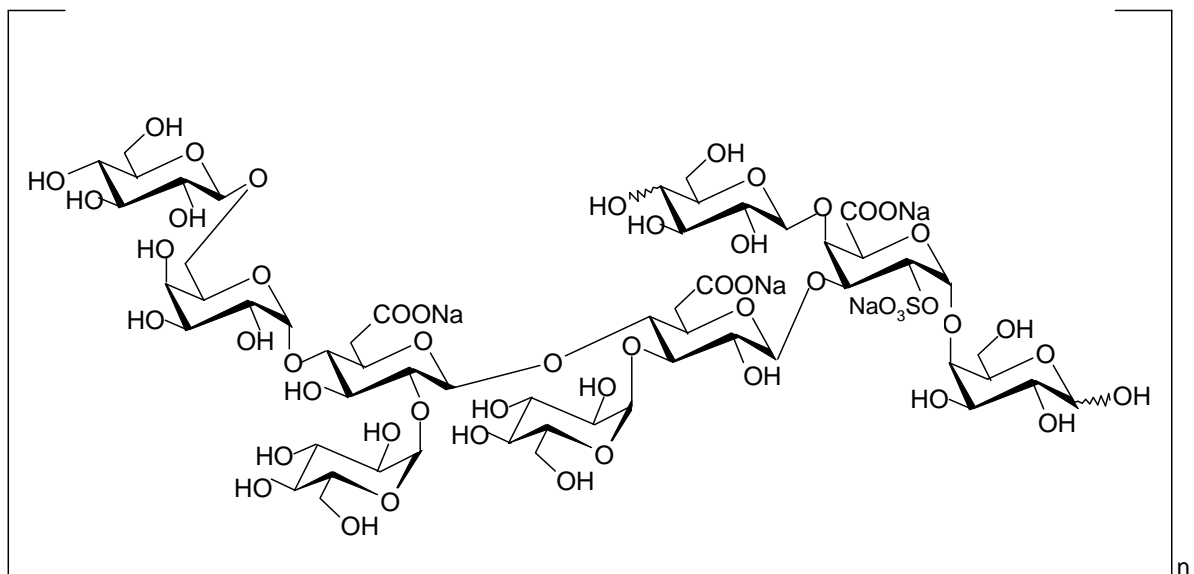
Une première étude a permis d'évaluer l'effet de l'EPS HE800 comme biomatériaux sous sa forme native à des fins de reconstruction osseuse. Des défauts de taille critique au niveau de calvaria de rat ont été comblés avec l'EPS HE800 sous sa forme native, sans modification préalable. Les résultats de cette étude montrent une cicatrisation osseuse après 15 jours avec un os reformé ainsi qu'une résorption de l'EPS par les tissus environnants (Zanchetta et al. 2003). L'acide hyaluronique est l'un des glycosaminoglycanes principaux de la matrice extracellulaire. Dans ce contexte, l'effet de l'EPS HE800 sur des fibroblastes dermiques et sa capacité à favoriser la reconstruction d'une matrice extracellulaire ont été explorés. L'EPS HE800 permet une stimulation et une mobilisation des fibroblastes dermiques avec une accélération de la fibrillation collagénique, ceci favorisant la reconstruction de la matrice extracellulaire du tissu conjonctif (Senni et al., Brevet FR2894146-A1, 2007). Une troisième étude présente l'EPS HE800 comme un produit de régénération pour l'ensemble des tissus qui constituent la dent (le parodonte). De façon similaire à l'étude précédente, l'EPS HE800 permet une stimulation de la prolifération et une mobilisation des fibroblastes, accélérant de ce fait la restructuration des tissus conjonctifs (Senni et al., Brevet FR2894147-A1, 2007).

### **V.6.2. Activités biologiques de l'exopolysaccharide HE800 modifiés**

Les EPS HE800 de bas poids moléculaire (dépolymérisés) et sulfatés (fonctionnalisation) est capable de stimuler la prolifération des fibroblastes, d'inhiber la sécrétion des médiateurs solubles ou cytokines ainsi que des métalloprotéases matricielles proinflammatoires par les fibroblastes. A cela s'ajoute une capacité de stimulation de la prolifération des fibroblastes au détriment des myofibroblastes, à inhiber la voie classique du complément et à stimuler sélectivement la prolifération des cellules médullaires à vocation mésenchymateuse au détriment d'autres sous populations dans une population hétérogène de cellules. (Brevet N°0505740 Senni K et al, 2005).

## V.7. L'exopolysaccharide GY785

L'EPS GY785 est synthétisé par la souche *Alteromonas infernus* (Raguenes et al. 1997), isolée lors de la campagne Guaynaut en 1991. Contrairement à l'EPS HE800, l'EPS GY185 est plus complexe et ramifié, sa séquence répétitive est un nonasaccharide (Roger et al. 2004) (Figure 19). Il est composé d'oses neutres et d'oses acides et présente la particularité de contenir 3% de soufre à l'état natif. Sa masse moléculaire de  $1,4 \times 10^7$  g/mol est légèrement plus élevée comparée à celle de l'EPS HE800 (Tableau 5). A ce jour, il n'existe aucun analogue structural connu à cette EPS.



**Figure 19: Structure de l'EPS GY785**

	<b>GY785</b>
<b>Soufre (g/100g)</b>	3,2
<b>Sucres acides (g/100g)</b>	22
<b>Sucres neutres (g/100g)</b>	45
<b>Polydispersité (Mw/Mn)</b>	1,18
<b>Masse molaire (g/mol)</b>	1,4 x 10 <sup>6</sup>
<b>Rayon de giration (nm)</b>	117

**Tableau 5 : Composition de l'EPS GY785**

### **V.7.1. Activité biologique de l'EPS GY785 natif**

Aucune étude sur les propriétés biologiques de l'EPS GY785 sous sa forme native n'a été réalisée avant cette thèse, contrairement aux EPS de bas poids dérivés de celui-ci.

### **V.7.2. Activité biologique du GY785 modifié**

Des dérivés de faible masse molaire (25 000 g/mol) ont été réalisés à partir du polysaccharide GY785 natif puis resulfatés (20-40%). Les EPS GY785 modifiés ont montré les mêmes activités impliquées dans les processus de régénération tissulaire que l'EPS HE800 modifiés. (Senni et al., Brevet FR2871476-A1, 2005).

D'autre part, l'activité anticoagulante de ces EPS GY785 modifiés a été étudiée et met en évidence une capacité de l'EPS sulfaté à 40% à inhiber la coagulation sanguine en agissant principalement sur la thrombine, enzyme clé de la coagulation par l'intermédiaire de ses deux inhibiteurs naturels présents dans le plasma humain. L'activité anticoagulante est inférieure à celle des héparines non fractionnées et de bas poids moléculaire (Colliec-Jouault et al., 2001).



Par ailleurs, ces dérivés de l'EPS GY785 hautement sulfatés et de faible masse molaire modulent l'angiogenèse. Les études menées par Matou et al. en 1995 montrent qu'un dérivé de l'EPS GY785 a la capacité de moduler *in vitro* l'angiogenèse en favorisant la formation de tubes vasculaires en matrigel par la potentialisation de l'effet des facteurs proangiogènes FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) et VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Matou et al, 2004 ; Matou et al., Brevet FR2871379-A1, 2004). Les dérivés de faible masse molaire sulfatés de l'EPS GY785 sont ainsi assimilés à des héparino-mimétiques. L'héparine est un polysaccharide sulfaté extrait de la muqueuse de mammifères avec la capacité de se lier à des facteurs de croissances (HBGF : Heparine-binding growth factor) cependant cette molécule présente de nombreuses limites pour une utilisation en thérapeutique (origine animale, allergie, complication hémorragique).

## **V.8. Conclusion sur les exopolysaccharides marins**

La diversité structurale des EPS GY785 et HE800 leur confère de nombreuses activités biologiques allant du domaine de l'ingénierie tissulaire aux mécanismes de la coagulation sanguine. Ces deux EPS à l'état natif de par leur structure et leur composition peuvent être assimilés à des GAGs mimétiques. L'ensemble des résultats obtenus lors des premières études menées sur les EPS marins HE800 et GY785, ainsi que leurs structures en font de bons candidats pour contrôler l'activité cellulaire (prolifération, différenciation et migration). Ces EPS marins, produits par des bactéries issues de milieux extrêmes, présentent des structures originales et pourraient être exploités directement ou en association avec des biomatériaux en régénération tissulaire.

**PARTIE II : STERILISATION DES  
POLYSACCHARIDES MARINS DE  
HAUTE MASSE**

## I. Problématique

Tout matériau destiné à être implanté dans le corps humain ou à être en contact avec des fluides biologiques doit répondre à des normes de stérilisation spécifiques aux produits médicaux. Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire, le développement de matrices extracellulaires artificielles doit répondre à un cahier des charges strict dont la stérilisation constitue une étape clé. En effet, les méthodes de stérilisation doivent être sélectionnées scrupuleusement pour ne pas affecter les propriétés physiques, mécaniques et biologiques des matrices et des molécules les composants.

La stérilisation consiste à soumettre un produit à un traitement approprié de façon à détruire tous les microorganismes qu'il contient. Dans le cas des matrices destinées à être implantées, la stérilisation peut s'opérer de deux manières :

- soit avant la réalisation de la matrice, c'est-à-dire que chaque composé entrant dans la construction de la matrice sera stérile au moment de son utilisation,

- soit après sa réalisation, c'est-à-dire lorsque la matrice sera sous sa forme solide finale.

Dans le cadre de nos travaux, nous disposons d'un hydrogel constitué d'un dérivé de la cellulose, l'hydroxylpropyl méthylcellulose silanisée (HPMC-Si) au sein duquel nous souhaitons insérer des polysaccharides marins de haute masse, afin d'augmenter les propriétés mécaniques et biologiques de la matrice initiale. L'hydrogel d'HPMC-Si est obtenu par l'association de deux solutions : une solution basique visqueuse contenant l'HPMC-Si, avec une solution tampon acide. Le mélange des deux solutions permet d'obtenir une solution injectable qui gélifiera *in situ*. La stérilisation de la matrice ne peut donc s'effectuer qu'avant sa réalisation, car elle aura atteint son état final rigide une fois implantée.

Les polysaccharides sont des molécules dont les propriétés biologiques sont directement liées à leur structure moléculaire, c'est-à-dire leur taille moléculaire, leur polydispersité ainsi que leur composition osidique. La structure osidique des polysaccharides se présente sous la forme d'une séquence répétitive plus ou moins complexe (différents types de liaisons osidiques, présence de substituants, existence de ramifications...). Chaque polysaccharide présente ainsi une composition osidique caractéristique. Certains polysaccharides, comme les alginates et les dérivés de la pectine, sont sensibles à la chaleur et l'humidité qui peuvent modifier leurs propriétés physiques et plus rarement leurs propriétés chimiques (259,260). Pour les alginates, une hausse de la température peut induire une dégradation acide intramoléculaire, ce qui conduit à la réduction significative de leurs poids moléculaire (261). D'autres polysaccharides comme les dérivés de cellulose restent stables après chauffage et peuvent former des gels physiques thermoréversibles grâce à la formation d'interactions hydrophobes entre les groupes de méthyl. Des études antérieures menées au laboratoire ont permis de déterminer que les deux solutions entrant dans la composition de l'hydrogel d'HPMC-Si pouvaient être stérilisées par une méthode conventionnelle à la vapeur d'eau (121°C, 20mn) sans entraîner de modification de leur propriété physico-chimique (262). Cependant, le même traitement appliqué aux polysaccharides marins suspectés thermosensibles, engendre des changements physico-chimiques importants, comme un jaunissement des produits et des modifications au niveau de leur poids moléculaire et de leur viscosité. Les polysaccharides marins ne peuvent donc pas être stérilisés par des méthodes conventionnelles. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à d'autres méthodes de stérilisation comme l'oxyde d'éthylène, le plasma froid et les rayonnements gamma et béta. Cette étude a pour objectif de sélectionner la méthode de stérilisation la plus appropriée pour les polysaccharides marins de haute masse. En ce sens nous avons évalué différents

paramètres physiques (propriétés rhéologiques, masse moléculaire, polydispersité) et chimique (structure) des polysaccharides après stérilisation.

## II. Résumé

### Stérilisation d'exopolysaccharides produits par des bactéries des fonds marins : impact sur leur stabilité et leur dégradation

Les polysaccharides sont des macromolécules thermosensibles. Les modifications induites peuvent être réversibles pour certains polysaccharides et irréversibles pour d'autres, provoquant pour ces derniers une dépolymérisation due à une hydrolyse acide intramoléculaire. Les propriétés physiques du polysaccharide sont ainsi modifiées. La faisabilité de production des exopolysaccharides par des bactéries marines *Vibrio diabolicus* et *Alteromonas infernus* a été démontrée précédemment, par la production de lots pilotes de plusieurs centaines de grammes. L'objectif de cette étude a été de déterminer une méthode de stérilisation autre que la chaleur, la plus appropriée pour ces polysaccharides et en accord avec les exigences des procédés de fabrication. Des méthodes chimiques utilisant des gaz à température modérée comme l'oxyde d'éthylène à 45°C et les plasmas froids ont été comparées aux méthodes de stérilisation utilisant des radiations comme les rayons gamma et beta. Les changements des propriétés à la fois chimiques et physiques des exopolysaccharides stérilisés ont été analysés. L'utilisation de l'oxyde d'éthylène peut être recommandée pour la stérilisation de ces polysaccharides, avec un faible impact sur leurs propriétés rhéologiques et physico-chimiques. Ce procédé de stérilisation à faible température est efficace et répond aux exigences des normes de stérilité, en ayant l'avantage d'être applicable au processus de fabrication de l'industrie pharmaceutique.

# Sterilization of Exopolysaccharides Produced by Deep-Sea Bacteria: Impact on Their Stability and Degradation

Emilie Rederstorff <sup>1,2</sup>, Ahmed Fatimi <sup>2</sup>, Corinne Siquin <sup>1</sup>, Jacqueline Ratiskol <sup>1</sup>,  
Christophe Merceron <sup>2</sup>, Claire Vinatier <sup>2</sup>, Pierre Weiss <sup>2</sup>, Sylvia Collic-Jouault <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> IFREMER, French Research Institute for Exploitation of the Sea, Laboratory of Biotechnology and Marine Molecules, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes Cedex 03, France;

E-Mails: Emilie.Rederstorff@ifremer.fr (E.R.); Corinne.Siquin@ifremer.fr (C.S.);

Jacqueline.Ratiskol@ifremer.fr (J.R.); Sylvia.Collic.Jouault@ifremer.fr (S.C.J.)

<sup>2</sup> INSERM UMRS 791, University of Nantes, Laboratory of Osteo-Articular and Dental Tissue Engineering, School of Dental Surgery, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes Cedex 1, France; E-Mails: ahmed.fatimi@univ-nantes.fr (A.F.);

christophe.merceron@univ-nantes.fr (C.M.); claire.vinatier@sante.univ-nantes.fr (C.V.);

pweiss@sante.univ-nantes.fr (P.W.)

**Keywords:** marine biotechnology; polysaccharides; sterilization procedures; characterization; molecular weight distribution; rheology

\* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail:  
Sylvia.Colliec.Jouault@ifremer.fr; Tel.: +33-2-4037-4093; Fax: +33-2-4037-4071.

**Abstract:**

Polysaccharides are highly heat-sensitive macromolecules, so high temperature treatments are greatly destructive and cause considerable damage such as a great decrease in both viscosity and molecular weight of the polymer. The technical feasibility of the production of exopolysaccharides by deep-sea bacteria *Vibrio diabolicus* and *Alteromonas infernus* was previously demonstrated using a bioproduct manufacturing process. The objective of this study was to determine which sterilization method, other than heat sterilization, was the most appropriate for these marine exopolysaccharides and was in accordance to bioprocess engineering requirements. Chemical sterilization using low-temperature ethylene oxide and a mixture of ionised gases (plasmas) was compared to the sterilization methods using gamma and beta radiations. The changes to both the physical and chemical properties of the sterilized exopolysaccharides were analysed. The use of ethylene oxide can be recommended for the sterilization of polysaccharides as a weak effect on both rheological and structural properties was observed. This low-temperature gas sterilizing process is very efficient giving a good Sterility Assurance Level (SAL) and is also well suited to large-scale compound manufacturing in the pharmaceutical industry.



## **1. Introduction**

Carbohydrates, particularly those found on cell surfaces, play critical biological roles such as glycoconjugates or proteoglycans and especially their polysaccharidic chains called glycosaminoglycans. The discovery of the biological importance of these carbohydrates marked the beginning of glycobiology, glycomics, carbohydrate-based drug discovery and glycomimetic drug development [1,2]. Bacterial exopolysaccharides (EPS) serve distinct biological functions, one of the more important functions of EPS involves adhesion of cells to natural and artificial surfaces. EPS immobilize biofilm cells and keep them in close proximity, thus allowing for intense interactions, including cell-cell communication [3-5].

The recent development of powerful bacterial engineering tools, such as large-scale fermenters, allows the production of bacterial polysaccharides at a viable economic cost. Consequently the replacement of polysaccharides of mammalian or plant origin by microbial polysaccharides produced by biotechnological processes (such as alginate, heparin precursor, hyaluronic acid...) is possible [6-8]. The marine realm is a rich and largely untapped resource of products that are of potential interest for drug discovery [9-13]. Biopolymers from marine prokaryotes offer significant structural diversity with novel material and biological properties. Biologically active glycopolymers derive their action from their molecular structure; including molecular size, polydispersity and repeating unit features varying in size, structure, linkages, and carried substituents. When sulphated, carbohydrates may be glycosaminoglycan-like components that exhibit many interesting properties with potential medical applications [14,15].

Deep-sea hydrothermal vents discovered 30 years ago are a new source of a wide variety of fascinating microorganisms that are well-adapted to these extreme environments, [16]. The screening of a large number of isolates obtained from different oceanographic cruises led to the discovery of new species able to produce unusual EPS [17]. Among them, the first species

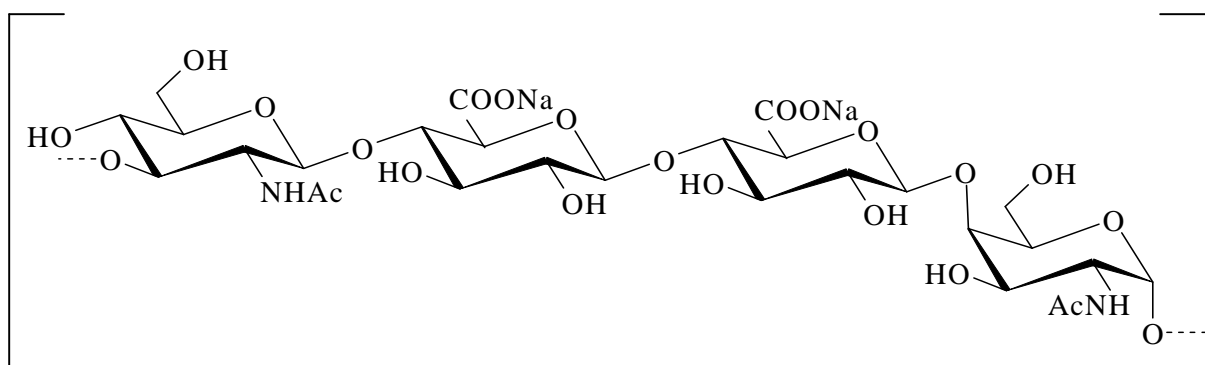
of *Vibrio* to be isolated from such an extreme environment was a mesophile *Vibrio diabolicus* that secretes a linear EPS with a tetrasaccharide repeating unit showing some resemblance to hyaluronic acid (Figure 1) [18,19]. This high-molecular-weight HE800 EPS ( $8 \times 10^5$  g/mol) secreted by *Vibrio diabolicus* exhibits interesting biological activities useful for increasing bone formation. HE800 EPS was evaluated on the restoration of bone integrity in an experimental animal model and was demonstrated to be a strong bone-healing substance without inducing any inflammatory reaction [20]. Another new mesophilic species, *Alteromonas infernus*, produces a branched high-molecular-weight GY785 EPS ( $1.5 \times 10^6$  g/mol) with a nonasaccharide repeating unit (Figure 1) [21,22]. Low-molecular-weight oversulphated derivatives from GY785 EPS were isolated in order to obtain heparin-like compounds. These derivatives had anticoagulant [23] and proangiogenic properties [24].

The aim of this study is to select an appropriate sterilization method, which is a crucial step for biomedical purposes, to improve the biotechnological processing of these two marine bacterial EPSs. For many natural products, downstream processing involves several critical steps such as isolation, purification, sterilization and drying, etc. The yields of these two EPSs are relatively high, ranging from 1 to 6 g/l of culture medium. They both can be produced on an industrial scale with very good yields and competitive total costs. As the sterilization process may affect the physical and chemical properties of the product and also induce loss of biological activity, finding suitable sterilization methods remains a challenge, especially for both heat and moisture sensitive molecules such as polysaccharides. The destructive effect of heating on polysaccharides is well described [25,26]. Therefore in this study, we selected other sterilization methods such as ethylene oxide or EO, radiation by gamma and beta rays and cold plasmas in order to evaluate the most appropriate sterilization procedure for the linear HE800 and branched GY785 EPSs.

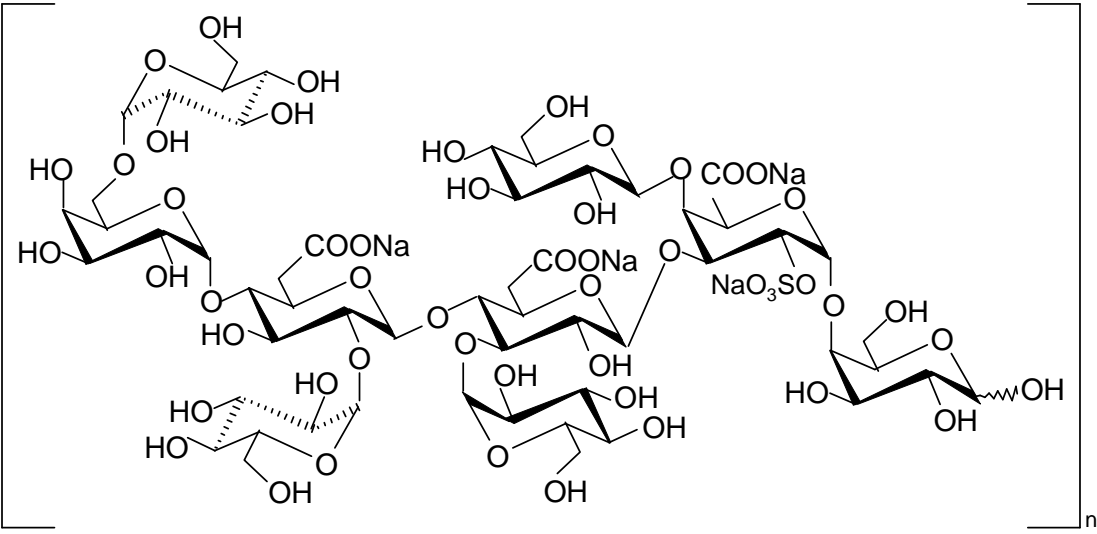
Chemical sterilization by EO or cold plasma is effective in killing or eliminating a wide range of pathogens (such as fungi, bacteria, viruses, spore forms, etc) and provides a good sterility assurance level (SAL set at  $10^{-6}$  means there is a one-in-a-million chance that a live microbe is in the sterilized material). The use of gas or liquid chemical sterilizers avoids the problem of heat damage but often this can present some health and environmental risks [27]. Sterilization methods using radiation, such as gamma and beta rays, are very good methods for achieving a high SAL. In many cases, the required SAL can be achieved by using a uniform treatment dose of 25 kgy (2.5 Mrad), as recommended by pharmacopoeia [28]. The moderate use of EO is due to its well-known health effects. Strict regulations have been established concerning EO sterilization. Hospitals nevertheless choose this method because they can get the best possible SAL with EO and high throughput.

**Figure 1.** Repeating units of marine bacterial polysaccharides produced by *Vibrio diabolicus* (HE800 EPS) and *Alteromonas infernus* (GY785 EPS) as previously described by Rougeaux *et al*, 1999 and Roger *et al*, 2004 , respectively.

### HE800 EPS



GY785 EPS



## 2. Results and Discussion

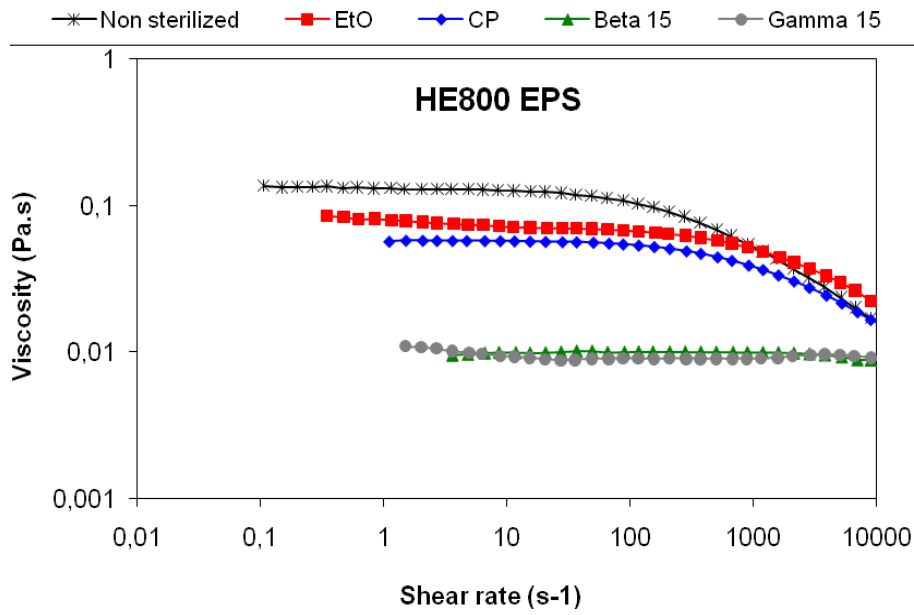
### 2.1. The rheological and viscous properties of polysaccharides

The rheological measurements show non Newtonian pseudoplastic behaviour of both non sterilized HE800 and GY785 polymer solutions (Figure 2). The EO sterilization decreased slightly the HE800 EPS viscosity and did not affect the rheological properties of the GY785 EPS. For the untreated HE800 EPS solution, the limiting Newtonian viscosity  $\eta_0$  was 0.14 and after sterilization treatments 0.08, 0.06, 0.01 and 0.01 Pa.s for the EO, cold plasma (CP), beta and gamma sterilizations, respectively. The limiting Newtonian viscosity  $\eta_0$  calculated with the cross equation showed 8 Pa.s for the non sterilized GY785 EPS, 15 Pa.s after EO sterilization, 0.2, 0.04 and 0.03 Pa.s after beta, gamma and CP sterilizations, respectively.

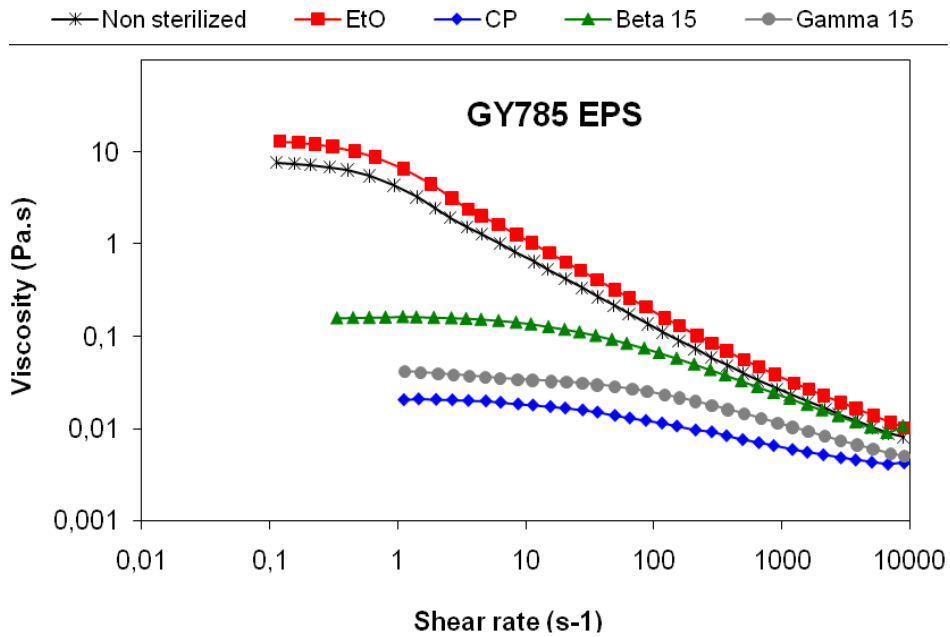
For the HE800 EPS solution, EO and CP sterilizations decreased the viscosity from about one order of magnitude and maintained the pseudoplastic typical shape of polymer curves. With beta and gamma irradiations at the dose of 15 kGy (1.5 Mrad), the viscosity decreased dramatically with a Newtonian behavior characteristic of water or small molecules in water solution.

**Figure 2.** Flow curves of the untreated (control) and treated EPS in water solutions at 25°C. **(a)** HE800 EPS produced by *Vibrio diabolicus* (1.5% w/w). **(b)** GY785 EPS produced by *Alteromonas infernus* (1.25% w/w).

(a)



(b)



The EO sterilization of GY785 EPS increased the  $\eta_0$  twofold but it remained with the same order of magnitude. EO probably interacts with the branched macromolecule even if the residual amount of EO after desorption is very low (10 ppm), but the curve was the same as that obtained for untreated EPS and in a logarithmic scale both untreated and treated EPSs showed very similar behavior. Surprisingly, no increase was observed for the linear HE800

EPS whereas the residual amount of EO after desorption was higher (30 ppm). No data were found in literature to explain this unpredictable effect on the viscosity. Clearly, a Newtonian plateau observed at low shear rates is followed by a shear-thinning behavior for the non sterilized macromolecules [29]. At high shear rate the viscosity shows a power-law dependence with the shear rate. After beta sterilization at the dose of 15 kGy (1.5 Mrad), GY785 EPS is always a macromolecule because the curve shows 2 parts. For first one, under  $10 \text{ s}^{-1}$ , the viscosity stay constant with increase of the shear rate. After a critical shear rate, we have always a decrease of the viscosity due to alignment of the macromolecules in the flow. The slope of this second part of the curve is less pronounced than the second part of the other curves obtained for non sterilized GY785 EPS and EO sterilized GY785 EPS (Fig. 2b). This pseudoplastic behaviour is very common in case of macromolecular solutions [30-31]. It is less pronounced after beta sterilization than the non-sterilized or EO sterilized macromolecules with a decrease of the value and the extent of the Newtonian plate, under  $10 \text{ s}^{-1}$ . These flow modifications suggest a degradation of the macromolecules, but not complete [32]. In the cases of CP and gamma sterilizations,  $\eta_0$  were very low with a decrease of about three orders of magnitude for GY785 EPS and showed a linear curve of Newtonian solution characteristic of small molecules in solution. GY785 EPS was highly degraded by these two sterilization procedures.

This rheological data suggests that irradiation, even at the dose of 15 kGy (1.5 Mrad), is not a good method for the sterilization of HE800 and GY785 polysaccharides tested. CP can be used for sterilization of HE800 EPS based on its slight loss of viscosity in comparison to the large loss of viscosity for GY785 EPS.

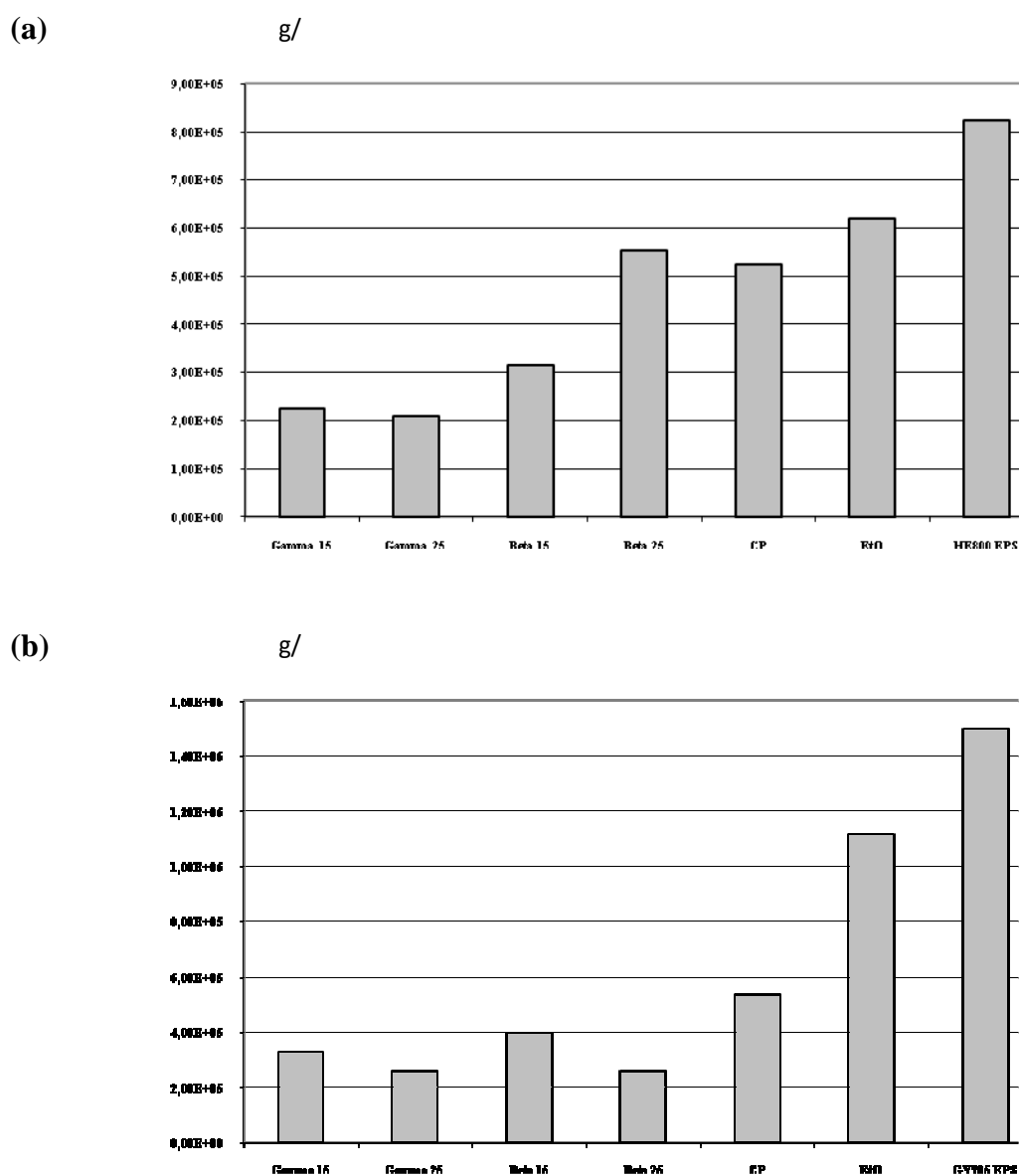
## *2.2. Molecular weight and polydispersity of polysaccharides*

The weight-average molecular weight ( $M_w$ ) was determined for each treated EPS sample and compared to untreated (or native) EPSs ( $8 \times 10^5$  and  $1.5 \times 10^6$  g/mol for HE800 and GY785 EPSs, respectively). All sterilization methods induced a decrease in the weight-average molecular weight compared to native products (Figure 3). Irradiation methods and especially gamma rays induced the highest decrease in both EPSs ( $< 2.5 \times 10^5$  g/mol). A less decrease was observed for cold plasma treatment, but the weakest impact on molecular weight was obtained when the EPSs were treated by EO. In the case of the linear HE800 EPS, a molecular weight of  $6.5 \times 10^5$  compared to  $8 \times 10^5$  was obtained and with the highly branched GY785 EPS,  $1.1 \times 10^6$  compared to  $1.5 \times 10^6$  g/mol. The advantage of a multi-angle laser light scattering (MALLS) detection consists in an additional possibility to determine dimensions of dissolved polymer in terms of gyration radius  $R_g$  from the angular dependence of scattered light. A decrease of the radius of gyration  $R_g$  was also obtained in treated EPSs, irradiation treatment gave the greatest decrease ( $< 40$  nm compared to 55 and 112 nm for native HE800 and GY785 EPSs, respectively). This data could suggest a discrepancy between the weak effect observed on rheological properties and the reduction in molecular weights for both EPSs, especially in the case of the EO treatment. This discrepancy could be explained by the concentrations of the EPSs in the rheological measurement and molecular weight determination methods ( $>1\%$  w/w and  $0.2\%$  w/w, respectively) as they are not of the same range. In a concentrated polymer solution, both intra- and intermolecular interactions are higher than in diluted polymer solution [32]. EO sterilization had a weaker impact than the other sterilization methods on the radius of gyration  $R_g$ , 44 and 86 nm for the treated HE800 and GY785 EPSs, respectively. Our data show that there is a molecular weight dependence of the radius of gyration. Because the  $R_g$  is related to the volume occupied by the molecule in a



solution, the relationship between  $R_g$  and  $M_w$  suggests that the untreated and treated polysaccharides have similar structures or patterns [33].

**Figure 3.** Weight-average molecular weight ( $M_w$ ) of the untreated (control) and treated EPSs. **(a)** HE800 EPS produced by *Vibrio diabolicus*. **(b)** GY785 EPS produced by *Alteromonas infernus*.



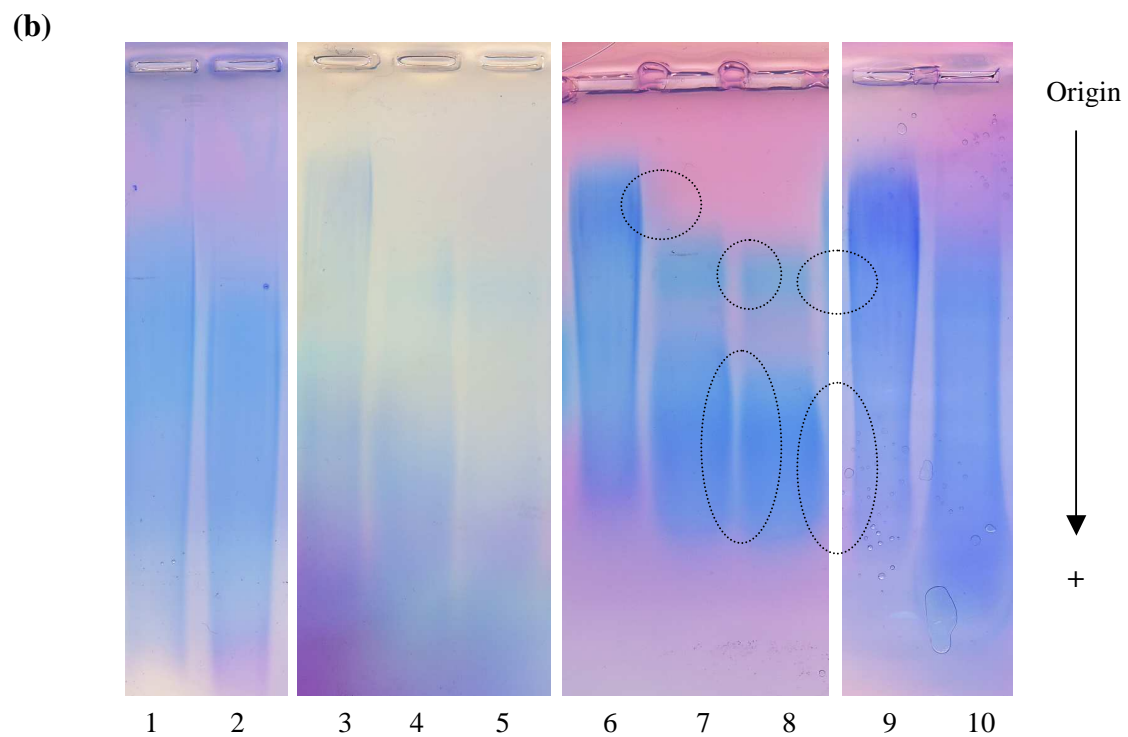
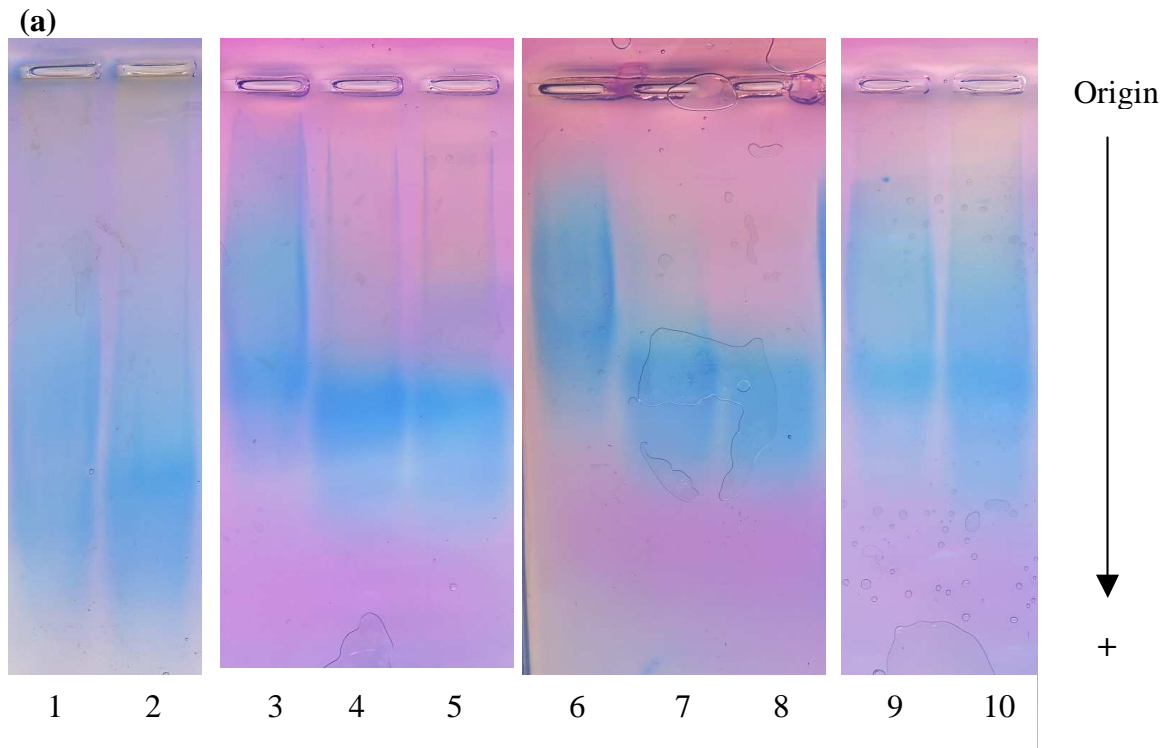
These results were confirmed by the electrophoretic patterns of treated EPSs (Figure 4). This methodology was not used to determine the molecular weight of the polysaccharides but to observe the changes in the dispersity of chain sizes for the treated polysaccharides compared to the untreated ones. The molecular weight was previously determined by SEC/MALLS analyses. As often observed for high molecular weight polysaccharides, contrary to proteins for which distinct bands are obtained, the polysaccharides separate into smears and consequently it is difficult to obtain a good staining intensity. All EPSs treated with gamma and beta rays presented a narrower pattern with greater mobility than the native product, and especially for linear HE800 EPS. GY785 EPS treated with beta rays presented two distinct spots with different mobilities. The spot with greater mobility represented the majority of the polysaccharidic chains. The migration patterns of EPSs treated with EO were very similar to their respective native EPSs, showing a broad smear suggesting a polydisperse EPSs.

The decrease in the molecular weight of some polymers and polysaccharides is well described. At increased temperature even in the absence of water, polymer degradation occurred [34]. Water soluble polysaccharides are very sensitive to chemical and physical parameters. Degradation mechanisms include acidic hydrolysis, oxidative reductive depolymerisation (ORD) and  $\beta$ -elimination. Only at room temperature and in a dry place, polysaccharides are stable and preserved against depolymerisation and storage [26,34]. Contrary to the conventional methods such as dry or moist heat sterilization that cause degradation and hydrolysis, radiation sterilization such as beta and gamma rays have become a very popular procedure. Nevertheless, if irradiation sterilization has been the method of choice for medical devices and gives very good results for food applications (spices, ground meats, etc), this recent method has some limitations especially on therapeutic agents and polymers. The radiation generally interacts with polymers. Two major mechanisms of

degradation occur: chain scission which reduces the molecular weight and some rearrangement of network structure or cross-linking which results in the formation of large three-dimensional networks. In the case of the bacterial EPSs examined in this study, the first mechanism occurs in the same way as described for hyaluronic acid in which glycosidic cleavage is the most widely observed consequence of radiation action on it [35-37].

Gas plasma technology is an alternative sterilization method to circumvent the limitations of traditional instruments. It is a new method for the sterilization of heat-sensitive substances. The plasmas used for sterilization are ionised gases ( $O_2$ ,  $N_2$ ,  $H_2$ , air...). UV photons emitted by excited species produce the direct destruction of a wide range of microorganisms by UV irradiation and reactive species but they can induce chemical reactions [27-38]. Some recent studies describe the effect of gas plasma sterilization on polymers. In the case of polyethylene, no changes in chemical composition of the polymer due to the hydrogen peroxide sterilization process was observed [39]. On the other hand, exposure to a gas plasma sterilization process using hydrogen peroxide resulted in significant degradation in based polyurethane elastomer [40]. In our experiment, a mixture of gases composed of  $O_2$  and  $N_2$  was used to sterilize EPSs. Both EPSs were severely depolymerised by this cold plasma treatment.

**Figure 4.** Electrophoretic migration of the untreated (control) and treated EPSs: 1- Control; 2- EO; 3-Control; 4- Gamma 15; 5- Gamma 25; 6- Control; 7- Beta 15; 8- Beta 25; 9- Control; 10 CP. **(a)** HE800 EPS produced by *Vibrio diabolicus*. **(b)** GY785 EPS produced by *Alteromonas infernus*.



Like gas plasma, EO gas is commonly used to sterilize objects sensitive to temperatures greater than 60 °C, such as plastics. EO treatment is generally carried out between 30-60 °C with relative humidity above 30%. This is a simple method and is very convenient for sterilization on an industrial scale. Marreco et al. [41] compared different sterilization methods and showed that EO can be considered the most adequate sterilizing agent for chitosan membranes as it preserves morphology, mechanical properties and cytotoxicity of this kind of membrane. In 2002, Barbucci et al [42] also evaluated different sterilization methods for hyaluronic acid hydrogel used in the treatment of osteoarthritis. They noted that EO and gamma rays do not modify the characteristics of the hydrogel, in terms of swellability nor they destroy the network structure of the hydrogel. On the contrary, gamma ray sterilization induces breakage of this linear polysaccharide. The glycosidic cleavage described for hyaluronic acid is also observed for both HE800 and GY785 EPSs. The most appropriate method in this study seems to be EO sterilization which causes less damage in terms of molecular weight reduction than the other methods tested.

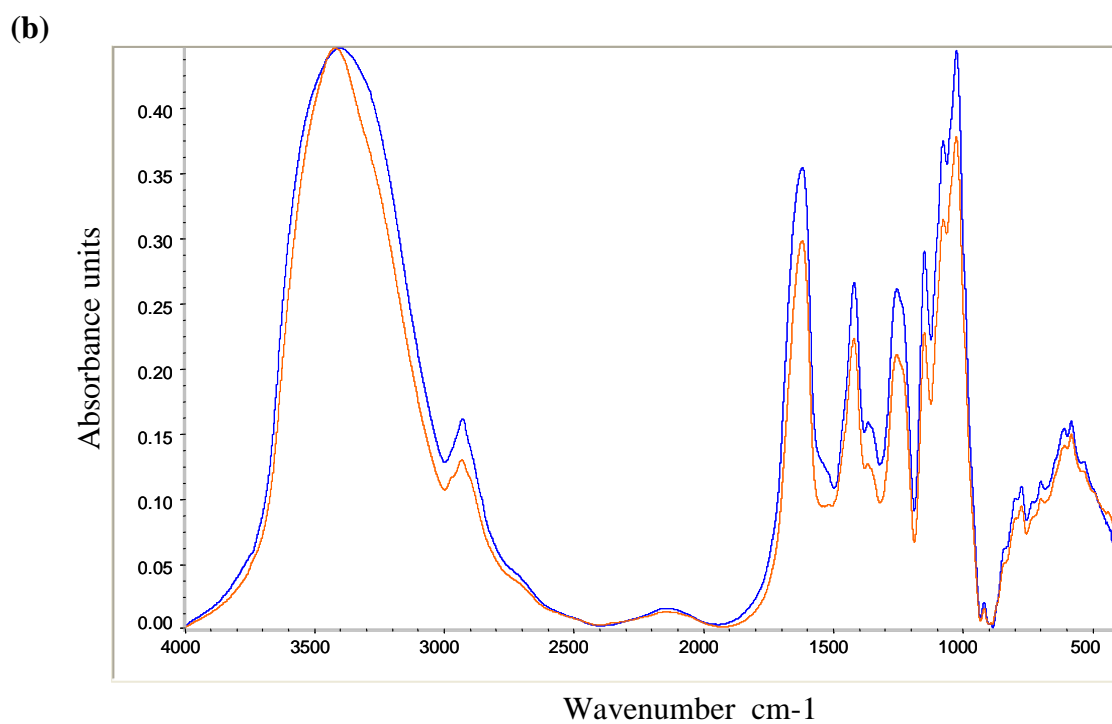
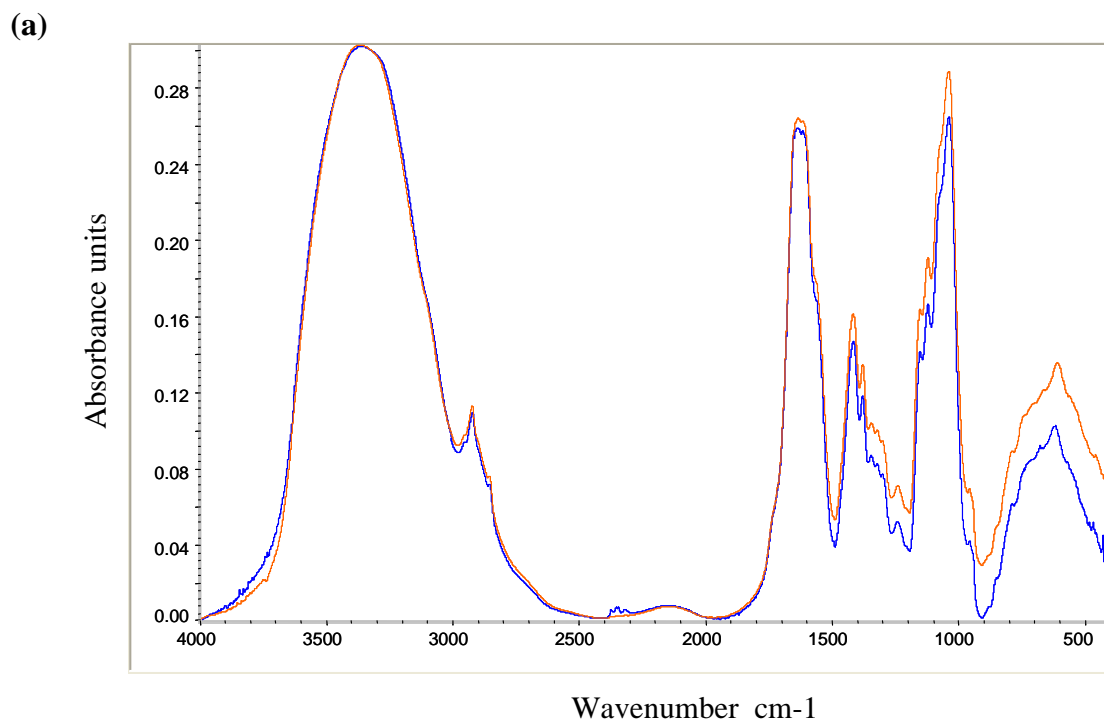
### *2.3. Chemical characterization*

The Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis was applied to detect chemical modifications on treated samples. The FTIR spectra did not show important chemical modifications on all treated samples, even on irradiated samples (Figure 5). In figure 5(a), the FTIR spectra of the native and gamma ray treated HE800 EPS were very similar and no difference was observed in the most representative signals. Both spectra exhibited a broad O-H stretching band at 3400-3200  $\text{cm}^{-1}$ , a minor C-H stretching band at 2900  $\text{cm}^{-1}$ , a large absorption band at 1630-1650  $\text{cm}^{-1}$ , an intensive absorption band at 1050  $\text{cm}^{-1}$  assigned to the C-O and C-O-H vibrations and a specific broad absorption band at 1550  $\text{cm}^{-1}$  associated with N-H stretching vibration. In figure 5(b), a few differences were observed between the native

and gamma ray treated GY785 EPS. The spectrum of the treated EPS exhibited an O-H stretching band less broad than the native EPS, a weak shoulder observed at  $1550\text{ cm}^{-1}$  for the native EPS was not present in the irradiated EPS. The well-known carbohydrate bands between  $1000$  and  $1200\text{ cm}^{-1}$  were found in both spectra as well as the ester sulphate bands at  $1250\text{ cm}^{-1}$  and carboxylate bands at  $1450$  and  $1610\text{ cm}^{-1}$ .

Using this spectroscopic technique, no significant chemical modifications were observed in all treated samples. Very little data was found in the literature on FTIR analysis used to detect chemical modifications to products after sterilization, especially in polysaccharides. This analysis can be applied to detect oxidation or crosslinking processes [43]. The oxidation of ultra-high molecular weight polyethylene after supercritical  $\text{CO}_2$  sterilization was analysed by this spectroscopic technique, and no effect on the chemical integrity of this material was detected [44]. In our study none of these processes seems to have occurred, suggesting only a structural modification to the size or molecular weight of the polysaccharidic chains.

**Figure 5.** FTIR spectra of the untreated (control) and treated EPSs by gamma rays at the dose of 15 kGy: control (—) and gamma (—). **(a)** HE800 EPS produced by *Vibrio diabolicus*; **(b)** GY785 EPS produced by *Alteromonas infernus*.



#### *2.4. Sterility of polysaccharides*

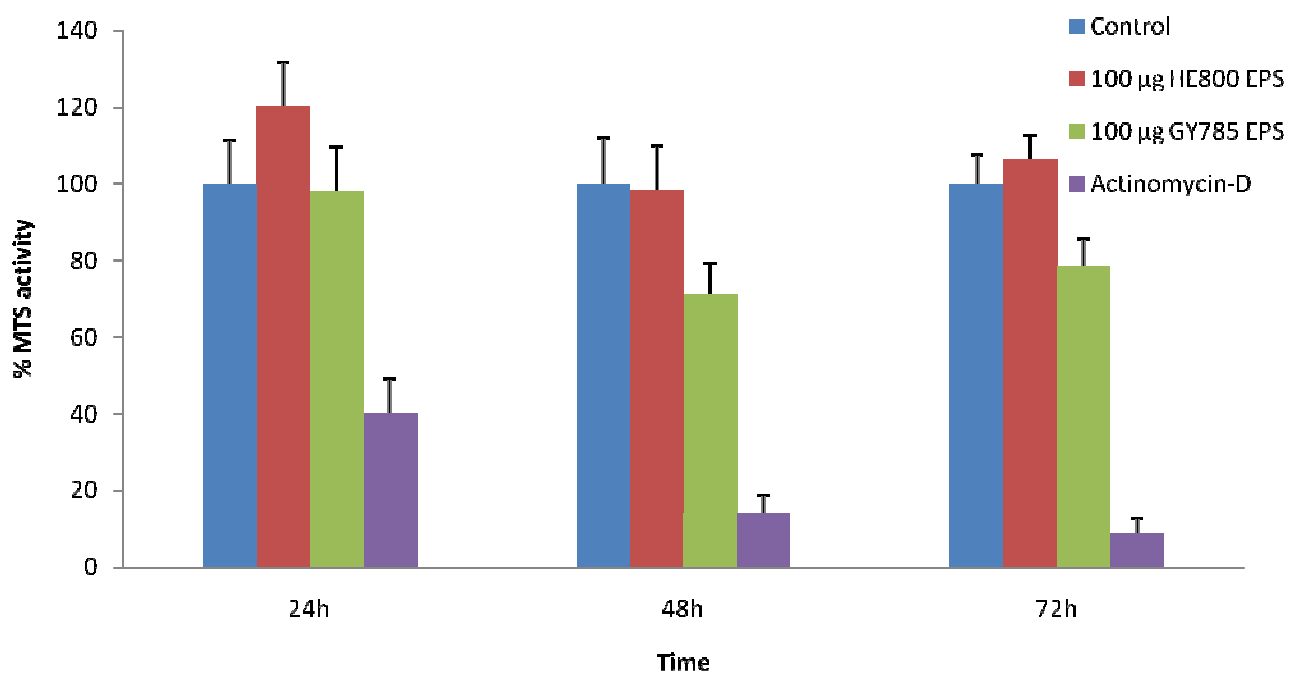
For all the different types of sterilization methods tested, after 48 hours of incubation on PCA medium at 37 °C, the number of total bacteria/gram of treated EPS was zero, compared to  $2 \times 10^6$  and  $10^3$  total bacteria/gram for untreated HE800 and GY785 EPSs, respectively (data not shown). According to the results obtained, the two treated EPSs were effectively sterilized by all sterilization methods used (ethylene oxide, radiation by gamma and beta rays and cold plasma).

#### *2.5. Toxicity of polysaccharides*

The Immediately Dangerous to Life and Health level (IDLH) for EO is 800 ppm. The concentration found in both HE800 and GY785 EPSs was below 30 ppm. This concentration can be further reduced by increasing the desorption time or the period of post-sterilization aeration to remove toxic residues. The cytotoxicity of the EPSs treated with EO was evaluated on primary articular cartilage cells (Figure 6). In our experiment, neither EPSs treated with EO showed any cytotoxicity to the cells at the concentration used.



**Figure 6.** Cytotoxicity of the HE800 and GY785 EPSs treated by ethylene oxide. Cells were cultured during 24, 48 and 72 hours without (control) or with 100  $\mu\text{g}$  of treated EPS or with Actinomycin-D (control for cytotoxicity) per well. Values are mean $\pm$ SD of 4 experiments.



### 3. Experimental

#### 3.1. Materials

HE800 and GY785 exopolysaccharides (EPS) were purchased from Seadev-FermenSys SAS (France). HE800 and GY785 EPSs were obtained from the deep-sea, mesophilic, aerobic, and heterotrophic bacteria *Vibrio diabolicus*, *Alteromonas infernus*, respectively. For the meaning of the EPS names, the letters HE and GY are the abbreviation of the name of the oceanic cruises: HERO and GUAYNAUT, respectively. The meaning of the numbers is the sample number given during the cruise. The isolation procedure and characteristics of the HE800 *Vibrio diabolicus* and GY785 *Alteromonas infernus* strains and also the production,

purification and characterization of the HE800 and GY785 EPSs were previously described [18-21]. The purities of the final products (HE800 EPS and GY785 EPS) were estimated to be > 80%, they are hygroscopic so they may contain in dry state from 10 to 20% of water (w/w) and are mainly in sodium salt form (Na: 4%;Ca: 1%) [45-46].

### 3.2. Sterilization procedures

Different types of sterilization methods were tested for polysaccharides. These include widely-used sterilization methods, such as radiation and ethylene oxide, as well as less conventional methods, such as gas plasmas.

#### 3.2.1. Ethylene oxide

Ethylene oxide sterilization was performed by Stérylène, Groupe IONISOS (Gien, France) on lyophilized polysaccharides. The samples were exposed to ethylene oxide with a concentration of 700 mg/l for 250 min at 50 mbar pressure and a temperature of 45 °C with a relative humidity of 45% followed by desorption treatment in order to remove the residual ethylene oxide. After treatment, the amount of residual ethylene oxide was quantified for each polysaccharide by Stérylène.

#### 3.2.2. Radiation

Sterilization using radiation by gamma rays (with cobalt-60 as source) and beta rays (by electron beam) was performed at different doses (15 and 25 kGy) on lyophilized polysaccharides by Groupe IONISOS, Sablé-sur-Sarthe and Orsay (France), respectively. The dose of 25 kGy (2.5 Mrad) is usually recommended by pharmacopoeia and the dose of 15 kGy (1.5 Mrad) was tested to check whether the sterilization was sufficient without inducing important degradation of the EPSs.

### 3.2.3. Cold plasmas

The cold plasma sterilization was done by CRITT MDTS, Charleville-Mézières (France). The lyophilized polysaccharides were sterilized using a mixture of ionised gases (plasmas) composed of O<sub>2</sub> (20%) and N<sub>2</sub> (80%) during 1 hour.

## 3.3. Characterization of marine polysaccharides

### 3.3.1. Steady shear and dynamic oscillatory measurements

Rheological measurements were performed using the Rheo Stress 300 rheometer (ThermoHaake<sup>®</sup>, Germany) with titanium cone-plate geometry (60 mm diameter, 1° cone angle, 52 μm gap). Steady shear tests were carried out at 25 °C on different polymer solutions according the studied polymer (1.5% w/v for HE800 EPS and 1.25% w/v for GY785 EPS) before and after sterilization. The operating shear rate ranged from 0.1 to 9000 s<sup>-1</sup>. Different flow curves were fitted and extrapolated to lower shear rates by the Cross equation, [47].

$$\eta = \frac{\eta_0}{1 + (\lambda\dot{\gamma})^n} \quad (1)$$

where  $\eta$  (Pa.s) is the viscosity at a given shear rate  $\dot{\gamma}$  (s<sup>-1</sup>);  $\lambda$  is the structural relaxation time (s);  $n$  is the exponent in the power law regime and  $\eta_0$  (Pa.s) is the zero shear viscosity (*i.e.* limiting Newtonian viscosity).

### 3.3.2. Molecular weight by SEC/MALLS analyses

Polysaccharides were dissolved in distilled water at a concentration of 2 mg/ml (0.2% w/v) and filtered on 0.45 μm cellulose acetate syringe filter. The weight-average molecular weight (M<sub>w</sub>), number-average molecular weight (M<sub>n</sub>), radius of gyration (R<sub>g</sub>) and the polydispersity (I=M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub>) of the samples were determined using high performance size exclusion

chromatography (HPSEC) combined with a multi-angle laser light scattering detector (MALLS). The system was composed of an HPLC system Prominence Shimadzu<sup>™</sup>, a PL aquagel-OH mixte, 8 μm (Varian) guard column (U 7.5 mm x L 50mm), and a PL aquagel-OH mixte (Varian) separation column (U 7.5 mm x L 300 mm, operating range 10<sup>2</sup>-10<sup>7</sup> g/mol). Elution was performed at 1 ml/min with 0.1 M ammonium acetate containing 0.03% (w/v) NaN<sub>3</sub>, filtrated on 0.1 μm membrane (Durapore Membrane, PVDF, Hydrophilic type VVLP, Millipore). A differential refractive index (RI) detector (Hitachi L2490) and a multi-angle light scattering detector (Dawn Heleos II <sup>™</sup>, Wyatt) were coupled on-line and data computed with Astra software for absolute molar mass determination.

### 3.3.3. Electrophoretic mobility

Electrophoresis was performed in agarose gel: 0.7% (w/v) agarose gel was prepared in TAE buffer (0.04 M Tris acetate; 0.01 M EDTA, pH 8.5) and 30 μl of samples in native electrophoresis buffer (Bio-rad) were loaded and electrophoresis was run in TAE buffer for 2 h in a Maxi cuve (20 cm x 10 cm gel, Fisher Bioblock Scientific). Gels were fixed for 4 h in 25 % (v/v) isopropanol and then colored over night by “Stains All” solution (1-Ethyl-2-[3-(1-ethylnaphtho[1,2-d]thiazolin-2-ylidene)-2-methylpropenyl]naphtho[1,2-d]thiazolium (Sigma)) prepared as follows: 5 ml of 0.001 % (w/v) Stains All solution in dimethylformamide; 5 ml of 300 mM Tris-HCl pH 8.8; 5 ml of dimethylformamide; 25 ml of isopropanol, and 60 ml of H<sub>2</sub>O [48].

### 3.3.4. Fourier transform infrared (FTIR) analyses

Pellets were obtained by careful grinding of a mixture of 2 mg of polysaccharide with 200 mg of dry KBr. Infrared spectra were recorded with a Magna IR 550 Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (Nicolet) equipped with a DTGS detector with a resolution of 4

cm<sup>-1</sup>. All the spectra were corrected from H<sub>2</sub>O and CO<sub>2</sub> absorptions, using OMNIC software (Thermofischer Scientific).

### 3.3.5. Microbiology

Sterilization efficiency was evaluated using a pour plate method. Every polysaccharide (0.2-0.4g) was aseptically weighted, dissolved with 20 ml of sterile water and left at room temperature for 24 h for resuscitation and solubilization of polymers. The solutions were then serially diluted and 0.1 ml of each appropriate dilution was placed in an empty sterile Petri dish followed by the addition of molten agar tempered to 45 °C. For total flora (marine and non marine flora) 15 ml of PCA (Plate Count Agar) medium (Biokar Diagnostics, Beauvais France) was used. For marine flora, 15 ml of ZoBell medium (2216E medium) composed of sea-salts (Sigma, France), yeast extract and tryptone (Organotechnie, France) were added. After swirling and solidification of the agar plates, the latter were incubated aerobically for 48 h at 37 °C to develop colonies. Colonies were then counted and the data recorded.

### 3.3.6. Cytotoxicity of ethylene oxide residues

To evaluate whether the level of ethylene oxide residue in treated polysaccharides was toxic, cellular viability of primary articular cartilage cells from rabbits (RAC) was measured using an MTS assay. RAC were isolated from five-week-old New Zealand white rabbits (Grimaud) as previously described by [49] . RAC were cultured in DMEM F-12 medium (Invitrogen corporation, France) supplemented with 10% (v/v) of foetal bovine (FBS) serum, 1% (w/v) of penicillin/streptomycin and 1% (w/v) of L-glutamine. RAC were allowed to attach in 24-well plates at a final density of 20,000 cells per well. After 24 h, the culture medium was removed and 1 ml of complete medium containing either HE800 EPS or GY785EPS at 100 µg/ml was added per well (corresponding to an amount of EO below 3 x 10<sup>-3</sup> µg in 100 µg of EPS or <30 ppm). As positive and negative controls, RAC were also

cultured in absence of polysaccharides or in the presence of actinomycin-D (5 µg/ml), an inhibitor of RNA polymerase, which was used as a potent inducer of cell death. Samples were incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. After 24 h, 48 h or 72 h of culture, culture media were removed. A Tetrazolium Salt (MTS) test (Promega, USA) to evaluate their mitochondrial activity was carried out. For the latter, a MTS solution was added in each well for 1 to 3 h according to the manufacturer's instructions. The optical density of formazan dye was measured on a spectrophotometer at 490 nm. Each condition was tested in quadruplicate and the results were expressed as relative MTS activities as compared to the positive control.

### 3.3.7. Statistical analysis

Results are expressed as mean ± of quadruplicate determinations. Comparative studies of means were performed by using one-way ANOVA followed by post-hoc test (Fisher's projected least significant difference) with a statistical significances at P<0.05.

## 4. Conclusions

In our study, the results show that gamma or beta irradiation is completely unsuitable for the sterilization of the polysaccharides examined. For both EPSs, radiation induces great alterations in their physical structure with a loss of their rheological polymer properties and morphological structure, as demonstrated by a considerable decrease in their viscosity and molecular weight respectively. Surprisingly, radiation did not alter the chemical properties of the EPSs studied. The results obtained with cold plasma treatment was disappointing. This method is often described as a novel alternative for the sterilization of heat-sensitive substances. Our results showed that cold plasma treatment induces changes in both rheological and structural properties of the EPSs, with a decrease in their viscosity and molecular weight respectively. Our results also showed that the most adequate sterilization method for the sterilization of polysaccharides is EO treatment. This method provides both a

good SAL and the lowest physical and chemical damage to the EPSs. The results obtained with EO are acceptable and compatible with subsequent use of these EPSs to investigate their therapeutic potential in animal models. Currently this treatment enables: (i) preservation of the non-Newtonian pseudo plastic behavior characteristic of both treated EPSs and also (ii) retention of a high molecular weight close to the untreated EPSs. This study highlights the importance of the choice of the sterilization method, as an important part of any product development.

### Acknowledgements

We acknowledge IFREMER and the Pays de la Loire council for their financial support through a Bioregos grant and a PhD studentship (Emilie Rederstorff). We also thank Christophe Brandily for the polysaccharide chemical structure representation.

### References

1. Shriver, Z.; Raguram, S.; Sasisekharan, R. Glycomics: A pathway to a class of new and improved therapeutics. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2004**, *3*, 863-873.
2. Ernst, B.; Magnani, J.L. From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **2009**, *8*, 661-677.
3. Flemming, H.-C.; Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Micro.*, *8*, 623-633.
4. Ryder, C.; Byrd, M.; Wozniak, D.J. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr. Opin. Microbiol.* **2007**, *10*, 644-648.
5. Saravanan, P.; Jayachandran, S. Preliminary characterization of exopolysaccharides produced by a marine biofilm-forming bacterium *Pseudoalteromonas ruthenica* (SBT 033). *Lett. Appl. Microbiol.* **2008**, *46*, 1-6.
6. Sutherland, I.W. Extracellular Polysaccharides. In: Rehm HJ; Reed G, editors. *Biotechnology*. 2<sup>nd</sup> ed. Weinheim, Federal Republic of Germany: VCH, 1996. p. 613-657.
7. Sutherland, I.W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol.* **1998**, *16*, 41-46.
8. Rehm, B.H.A. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 578-592.
9. Bhaskar, P.V.; Bhosle, N.B. Microbial extracellular polymeric substances in marine biogeochemical processes. *Curr. Sci.* **2005**, *88*, 45-53.

10. Laurienzo, P. Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: an overview. *Mar. Drugs* **2010**, *8*, 2435-2465.
11. d'Ayala, G.G.; Malinconico, M.; Laurienzo, P. Marine derived polysaccharides for biomedical applications: Chemical modification approaches. *Molecules* **2008**, *13*, 2069-2106.
12. Nichols Mancuso, C.A.; Garon, S.; Bowman, J.P.; Raguenes, G.; Guezennec, J. Production of exopolysaccharides by Antarctic marine bacterial isolates. *J. Appl. Microbiol.* **2004**, *96*, 1057-1066.
13. Nichols Mancuso, C.A.; Guezennec, J.; Bowman, J.P. Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: a review. *Mar. Biotechnol.* **2005**, *7*, 253-271.
14. Arena, A.; Gugliandolo, C.; Stassi, G.; Pavone, B.; Iannello, D.; Bisignano, G.; Maugeri, T.L. An exopolysaccharide produced by *Geobacillus thermodenitrificans* strain B3-72: Antiviral activity on immunocompetent cells. *Immunology Letters* **2009**, *123*, 132-137.
15. Yim, J.H.; Son, E.; Pyo, S.; Lee, H.K. Novel sulfated polysaccharide derived from red-tide microalga *Gyrodinium impudicum* strain KG03 with immunostimulating activity in vivo. *Mar. Biotech.* **2005**, *7*, 331-338.
16. Deming, J.W. Deep ocean environmental biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1998**, *9*, 283-287.
17. Guezennec, J. Deep-sea hydrothermal vents: A new source of innovative bacterial exopolysaccharides of biotechnological interest? *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *29*, 204-208.
18. Raguenes, G.; Christen, R.; Guezennec, J.; Pignet, P.; Barbier, G. *Vibrio diabolicus* sp. nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **1997**, *47*, 989-995.
19. Rougeaux, H.; Kervarec, N.; Pichon, R.; Guezennec, J. Structure of the exopolysaccharide of *Vibrio diabolicus* isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydr. Res.* **1999**, *322*, 40-45.
20. Zanchetta, P.; Lagarde, N.; Guezennec, J. A new bone-healing material: a hyaluronic acid-like bacterial exopolysaccharide. *Calcif. Tissue Int.* **2003**, *72*, 74-79.
21. Raguenes, G.H.; Peres, A.; Ruimy, R.; Pignet, P.; Christen, R.; Loaec, M.; Rougeaux, H.; Barbier, G.; Guezennec, J.G. *Alteromonas infernus* sp. nov., a new polysaccharide-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *J. Appl. Microbiol.* **1997**, *82*, 422-430.
22. Roger, O.; Kervarec, N.; Ratiskol, J.; Collic-Jouault, S.; Chevlot, L. Structural studies of the main exopolysaccharide produced by the deep-sea bacterium *Alteromonas infernus*. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 2371-2380.
23. Collic-Jouault, S.; Chevlot, L.; Helley, D.; Ratiskol, J.; Bros, A.; Sinquin, C.; Roger, O.; Fischer, A.M. Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas infernus*. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1528*, 141-151.



24. Matou, S.; Collic-Jouault, S.; Galy-Fauroux, I.; Ratiskol, J.; Siquin, C.; Guezennec, J.; Fischer, A.-M.; Helley, D. Effect of an oversulfated exopolysaccharide on angiogenesis induced by fibroblast growth factor-2 or vascular endothelial growth factor *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69*, 751-759.
25. Bindal, A.; Narsimhan, G.; Hem, S.L.; Kulshreshtha, A. Structural Changes in Xanthan Gum Solutions During Steam Sterilization for Sterile Preparations. *Pharm. Dev. Technol.* **2007**, *12*, 159-167.
26. K ok, M.S.; Hill, S.E.; Mitchell, J.R. Viscosity of galactomannans during high temperature processing: influence of degradation and solubilisation. *Food Hydrocoll.* **1999**, *13*, 535-542.
27. Moisan, M.; Barbeau, J.; Moreau, S.; Pelletier, J.; Tabrizian, M.; Yahia, L.H. Low-temperature sterilization using gas plasmas: a review of the experiments and an analysis of the inactivation mechanisms. *Int. J. Pharm.* **2001**, *226*, 1-21.
28. Matthews, K.H.; Stevens, H.N.E.; Auffret, A.D.; Humphrey, M.J.; Eccleston, G.M. Gamma-irradiation of lyophilised wound healing wafers. *Int. J. Pharm.* **2006**, *313*, 78-86.
29. Fatimi, A.; François Tassin, J.; Quillard, S.; Axelos, M.A.V.; Weiss, P. The rheological properties of silated hydroxypropylmethylcellulose tissue engineering matrices. *Biomaterials* **2008**, *29*, 533-543.
30. Chauvelon, G.; Doublier, J.-L.; Bul on, A.; Thibault, J.-F.; Saulnier, L. Rheological properties of sulfoacetate derivatives of cellulose. *Carbohydr. Res.* **2003**, *338*, 751-759.
31. Kapoor, V.P.; Taravel, F.R.; Joseleau, J.-P.; Milas, M.; Chanzy, H.; Rinaudo, M. Cassia spectabilis DC seed galactomannan: Structural, crystallographical and rheological studies. *Carbohydr. Res.* **1998**, *306*, 231-241.
32. Fatimi, A.; Tassin, J.-F.; Turczyn, R.; Axelos, M.A.V.; Weiss, P. Gelation studies of a cellulose-based biohydrogel: The influence of pH, temperature and sterilization. *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 3423-3432.
33. Yoo, S.-H.; Jane, J.-I. Molecular weights and gyration radii of amylopectins determined by high-performance size-exclusion chromatography equipped with multi-angle laser-light scattering and refractive index detectors. *Carbohydr. Polym.* **2002**, *49*, 307-314.
34. Franz, G.; Feuerstein, U. Chemical stability of some model polysaccharides. *Macromol. Symposia* **1997**, *120*, 169-181.
35. Sintzel, M.B.; Merkli, A.; Tabatabay, C.; Gurny, R. Influence of Irradiation Sterilization on Polymers Used as Drug Carriers. A Review. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **1997**, *23*, 857-878.
36. Schuetz, Y.B.; Gurny, R.; Jordan, O. A novel thermoresponsive hydrogel based on chitosan. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *68*, 19-25.
37. Andriola Silva Brun-Graepi, A.K.; Richard, C.; Bessodes, M.; Scherman, D.; Narita, T.; Ducouret, G.; Merten, O.-W. The effect of sterilization methods on the thermo-gelation properties of xyloglucan hydrogels. *Polym. Degrad. Stab.* **2010**, *95*, 254-259.

38. Laroussi, M.; Leipold, F. Evaluation of the roles of reactive species, heat, and UV radiation in the inactivation of bacterial cells by air plasmas at atmospheric pressure. *Int. J. Mass Spectrom.* **2004**, *233*, 81-86.
39. Kinnari, T.J.; Esteban, J.; Zamora, N.; Fernandez, R.; López-Santos, C.; Yubero, F.; Mariscal, D.; Puertolas, J.A.; Gomez-Barrena, E. Effect of surface roughness and sterilization on bacterial adherence to ultra-high molecular weight polyethylene. *Clin. Microbiol. Infect.* **2010**, *16*, 1036-1041.
40. Simmons, A.; Hyvarinen, J.; Poole-Warren, L. The effect of sterilisation on a poly(dimethylsiloxane)/poly(hexamethylene oxide) mixed macrodiol-based polyurethane elastomer. *Biomaterials* **2006**, *27*, 4484-4497.
41. Marreco, P.R.; Moreira, P.d.L.; Genari, S.C.; Moraes, Â.M. Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes used as wound dressings. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2004**, *71B*, 268-277.
42. Barbucci, R.; Lamponi, S.; Borzacchiello, A.; Ambrosio, L.; Fini, M.; Torricelli, P.; Giardino, R. Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis. *Biomaterials* **2002**, *23*, 4503-4513.
43. Silva, R.; Elvira, C.; Mano, J.; San Román, J.; Reis, R. Influence of  $\beta$ -radiation sterilisation in properties of new chitosan/soybean protein isolate membranes for guided bone regeneration. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2004**, *15*, 523-528.
44. Ellis, J.L.; Titone, J.C.; Tomasko, D.L.; Annabi, N.; Dehghani, F. Supercritical CO<sub>2</sub> sterilization of ultra-high molecular weight polyethylene. *J. Supercrit. Fluids* **2010**, *52*, 235-240.
45. Guezennec, J.; Pignet, P.; Raguenes, G.; Rougeaux, H., inventors; Ifremer, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer. Souche bactérienne marine du genre *Vibrio*, polysaccharides hydrosolubles produits par cette souche, et leurs utilisations. French Patent No. FR2760022, EP0975791, WO9838327, 1998.
46. Guezennec, J.; Pignet, P.; Raguenes, G., inventors; Ifremer, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer. Souche bactérienne marine du genre *Alteromonas*, exopolysaccharides hydrosolubles produits par cette souche, et leurs utilisations. French Patent No. FR 2 755 142, 1998.
47. Cross, M.M. Rheology of non-Newtonian fluids: A new flow equation for pseudoplastic systems. *J. Colloid. Sci.* **1965**, *20*, 417-437.
48. Lee, H.G.; Cowman, M.K. An Agarose Gel Electrophoretic Method for Analysis of Hyaluronan Molecular Weight Distribution. *Anal. Biochem.* **1994**, *219*, 278-287.
49. Vinatier, C.; Magne, D.; Weiss, P.; Trojani, C.; Rochet, N.; Carle, G.F.; Vignes-Colombeix, C.; Chadjichristos, C.; Galera, P.; Daculsi, G.; Guicheux, J. A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials* **2005**, *26*, 6643-6651.

### III. Résultats, discussion

Les résultats de l'article 1 indiquent que l'oxyde d'éthylène représente une méthode de stérilisation possible pour les EPS marins HE800 et GY785 de haute masse.

La chaleur et l'humidité peuvent entraîner des modifications des propriétés chimiques et physiques des polysaccharides et de par ce fait provoquer une perte de leurs propriétés biologiques. L'activité des polysaccharides étant liée à leur structure, il est important de développer des procédés de stérilisation modifiant le plus faiblement possible le produit de départ. En ce sens, nous avons testé 4 modes de stérilisation différents: l'oxyde d'éthylène, le plasma froid, les rayons  $\gamma$  et  $\beta$ . Nous avons ensuite évalué les éventuelles modifications physiques (propriétés rhéologiques, masse moléculaire, polydispersité) et chimiques (structure) des EPS GY785 et HE800 suite aux différentes méthodes de stérilisation.

La rhéologie traite des relations entre la contrainte (vitesse) et la déformation (cisaillement) d'un liquide. L'étude des propriétés viscoélastiques des polymères en solution apporte ainsi de précieuses informations sur leur structure. Avant stérilisation les EPS HE800 et GY785 en solution présentent un comportement rhéofluidifiant, c'est-à-dire que la solution de départ est visqueuse, avec une viscosité qui va diminuer lorsque la vitesse de cisaillement augmente. Ces informations nous indiquent que les macromolécules en solution sont déployées et déformables. Après une stérilisation aux rayons  $\gamma$  et  $\beta$  de l'EPS GY785 ou HE800, la solution est faiblement visqueuse. On observe un comportement de type Newtonien, c'est-à-dire que la viscosité de la solution est constante, quelque soit la vitesse de cisaillement appliqué. Ce comportement nous indique que les EPS GY785 et HE800 ont subi de grosses modifications de leur structure pendant la stérilisation aux rayons  $\gamma$  et  $\beta$ . Le même comportement est observé pour un traitement au plasma froid de l'EPS GY785. Les résultats de l'analyse rhéologique nous montrent que pour l'EPS GY785 seul l'oxyde d'éthylène

permet de conserver un comportement rhéologique similaire au produit non stérile de départ. Pour l'EPS HE800 une stérilisation à l'oxyde d'éthylène ainsi qu'au plasma froid permet la conservation d'un comportement rhéofluidifiant.

Nous avons ensuite analysé les changements de masse et de polydispersité des polysaccharides après stérilisation. La masse molaire est faiblement diminuée pour les deux EPS traités à l'oxyde d'éthylène. En revanche, les traitements aux rayons gamma et beta dégradent fortement les deux EPS. La diminution importante de la masse molaire des EPS est accompagnée d'une baisse de leur polydispersité. Les EPS fortement dégradés présentent majoritairement des chaînes polysaccharidiques de faible taille, comme observé par électrophorèse avec la présence d'une seule bande. Les résultats obtenus après stérilisation tendent à confirmer les résultats de rhéologie. L'EPS HE800 étant le moins modifié par un traitement au plasma froid et à l'oxyde d'éthylène. Pour l'EPS GY785, seul l'oxyde d'éthylène permet de conserver une masse moléculaire proche du produit natif.

L'étude par spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) est basée sur l'adsorption d'un rayonnement infrarouge par le polymère. L'analyse des EPS avant et après stérilisation ne montre pas de modification chimique importante.

L'ensemble des résultats montre que parmi les quatre méthodes évaluées, la stérilisation par l'oxyde d'éthylène engendre les plus faibles modifications sur la structure des EPS. Cependant l'oxyde d'éthylène est un composé toxique qui peut être adsorbé sur les polymères. Afin de vérifier si cette méthode de stérilisation est biocompatible avec une utilisation de ces EPS en biologie, nous avons évalué la cytotoxicité des EPS stérilisés. Les résultats montrent que les EPS traités par l'oxyde d'éthylène ne sont pas cytotoxiques à une dose de 100 µg/ml sur des chondrocytes articulaires de lapin.

Ces résultats nous ont amené à choisir l'oxyde d'éthylène comme la méthode de stérilisation la plus appropriée parmi les différentes techniques testées.

**PARTIE III : LES  
EXOPOLYSACCHARIDES HE800 ET  
GY785 POUR LA REALISATION DE  
MATRICES**

## **I. Problématique**

Dans le cadre d'une lésion des tissus osseux et cartilagineux, l'ingénierie tissulaire se donne pour objectif de recréer ou d'induire la formation de ces tissus à des endroits bien spécifiques. De façon générale, cette discipline combine une matrice biodégradable avec des cellules et des molécules bioactives, pour former une construction visant à favoriser la réparation et la régénération du tissu défectueux. La matrice constitue un élément clé de la régénération du tissu. Elle n'assure pas uniquement l'acheminement de cellules à l'endroit du tissu défaillant, mais permet la colonisation, la migration, la croissance, la différenciation des cellules qui la composent et définit la forme du nouveau tissu. Dans ce contexte et comme nous l'avons décrit dans la première partie, divers polysaccharides d'origine naturelle sont utilisés et étudiés pour la réalisation de matrices extracellulaires artificielles pour l'ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage.

Une matrice constituée d'un dérivé de cellulose est développée par le laboratoire. Il s'agit d'un hydrogel injectable l'hydroxylpropyl méthylcellulose silanisée (HPMC-Si), qui se présente sous la forme d'un liquide visqueux basique, capable, par addition d'une solution tampon acide, de réticuler à pH physiologique, c'est-à-dire de créer des liaisons covalentes entre les différentes chaînes du dérivé de cellulose. Cette matrice est apte à soutenir le développement, la culture tridimensionnelle et le maintien du phénotype différencié de chondrocytes (22,24,263). Cet hydrogel d'HPMC-Si peut être associée à des phosphates de calcium (IBS2) et utilisée comme substitut osseux injectable (22,23). Cependant, cette matrice composée à 90% d'eau possède de faibles propriétés mécaniques et ne fournit pas de sites d'attachement et d'adhésion aux cellules.

La matrice extracellulaire native est composée de glycosaminoglycanes (GAGs) qui jouent un rôle important. En effet, les GAGs agissent sur la prolifération, la différenciation et

l'adhésion cellulaire via différents mécanismes. De plus, l'organisation des GAGs confère une hydratation et des propriétés mécaniques à la matrice extracellulaire. Les polysaccharides HE800 et GY785 excrétés par des bactéries marines (exopolysaccharides ou EPS) peuvent être considérés, de par leur structure et leur composition comme des GAGs mimétiques avec une structure unique. Dans ce contexte, l'objectif de nos travaux fut d'utiliser un dérivé de cellulose injectable, capable de réticuler *in situ*, et d'y ajouter des polysaccharides d'origine marine de haute masse. L'objectif de ces travaux ont été d'évaluer la capacité des EPS à augmenter les propriétés mécaniques de l'hydrogel d'HPMC-Si d'une part et leurs capacités à fournir des sites d'attachement cellulaire d'autre part.

La première étape de cette étude a consisté à définir un mode d'association des EPS marins GY785 et HE800 de haute masse avec la matrice d'HPMC-Si. Après avoir généré de nouvelles matrices, préalablement aux tests *in vitro*, nous nous sommes intéressés à caractériser leurs propriétés physico-chimiques, rhéologiques et mécaniques. Nous avons mesuré le pH, l'osmolarité et le point de gel des nouveaux hydrogels. En effet, ces mesures doivent être en adéquation avec les caractéristiques biologiques *in vivo* et conditionnent de façon importante l'utilisation potentielle de ces hydrogels en ingénierie tissulaire. Notre attention s'est ensuite portée sur la caractérisation des propriétés mécaniques des hydrogels d'HPMC-Si supplémentés en polysaccharides marins. Le but de cette étude a été d'analyser la déformation du matériau. Les tests mécaniques permettent de calculer le module de compression, qui reflète la rigidité du matériau.

Les caractéristiques physico-chimiques, rhéologiques et mécaniques des hydrogels supplémentés en EPS marins, mesurées lors de l'étape précédente, nous suggèrent qu'ils pourraient être utilisés comme matrice pour l'ingénierie tissulaire. Dans une seconde étape, notre objectif fut de vérifier la biocompatibilité des nouveaux hydrogels vis-à-vis d'une lignée de chondrocytes (C28/I2) et d'une lignée d'ostéoblastes (MC3T3-E1) cultivées en 2



dimensions (2D) au contact des hydrogels, ou en trois dimensions (3D) directement au sein des différents hydrogels. Nous avons ensuite étudié l'attachement des ostéoblastes MC3T3-E1 ensemencés à la surface des hydrogels et le comportement des deux lignées cellulaires (MC3T3-E1 et C28/I2) cultivées en 3D dans les différents hydrogels.

## II. Résumé

Une étude *in vitro* de deux polysaccharides marins comme composés d'un hydrogel injectable pour l'ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage.

Les polysaccharides naturels sont des molécules attractives pour la réalisation de matrice en ingénierie tissulaire. Dans cette étude nous avons testé deux polysaccharides, produits par des bactéries marines exopolysaccharides (EPS) et encore peu connus pour cette application. Les EPS HE800 et GY785 ajoutés à une matrice ont été étudiés pour la culture en deux dimensions et en trois dimensions d'ostéoblastes (MC3T3-E1) et de chondrocytes (C28/I2). Les EPS marins sont considérés comme des GAGs mimétiques et ont été incorporés à un hydrogel d'hydroxypropyl méthyl cellulose silanisé (HPMC-Si) présentant des propriétés mécaniques faibles et une incapacité à fournir des sites d'adhésion cellulaire. Les résultats de notre étude montrent que des hydrogels d'HPMC-Si supplémentés avec 0,67% de polysaccharides HE800 et GY785 présentent les propriétés mécaniques les plus élevées, tout en induisant un attachement des cellules cultivées en deux dimensions. Cependant, les cellules ne survivent pas lorsqu'elles sont cultivées en 3 dimensions dans les hydrogels d'HPMC-Si contenant 0,67% de HE800 contrairement aux hydrogels d'HPMC-Si contenant 0,67% de GY785 où elles prolifèrent en nodules. Les hydrogels d'HPMC-Si supplémentés avec 0,34% de HE800 remplissent les caractéristiques de résistance mécanique, de viabilité et de prolifération cellulaire sous la forme de nodules en culture tridimensionnelle. De toutes les constructions testées, les hydrogels d'HPMC-Si supplémenté avec 0,34% de HE800 et 0,67% de GY785 présentent les caractéristiques mécaniques et biologiques les plus intéressantes. Cependant, les cellules gardent une morphologie ronde et ne présentent pas de signe d'adhésion cellulaire en trois dimensions, contrairement aux observations faites en deux dimensions. Les hydrogels contenant 0,34% de HE800 et 0,67% de GY785 apparaissent

prometteurs pour la réalisation de matrices tridimensionnelles destinées à l'ingénierie du cartilage, tandis que les matrices contenant 0,67% de HE800 apparaissent quant à elles prometteuses pour une utilisation sous la forme de patches, pour la culture de cellules en deux dimensions.

# **An In Vitro Study of Two GAG-like Marine Polysaccharides as Compounds of Injectable Hydrogel for Bone and Cartilage Tissue Engineering**

E. Rederstorff<sup>a,b</sup>, P. Weiss<sup>a,\*</sup>, S. Sourice<sup>a</sup>, P. Pilet<sup>a</sup>, F. Xie<sup>a</sup>, C. Siquin<sup>b</sup>, S. Collic-  
Jouault<sup>b</sup>, J. Guicheux<sup>a</sup> and S. Laïb<sup>a</sup>

*<sup>a</sup>INSERM UMRS 791, University of Nantes, Laboratory of Osteo-Articular and Dental  
Tissue Engineering, School of Dental Surgery, 1 Place Alexis Ricordeau, 44042 Nantes cedex  
1, France*

*<sup>b</sup>French Research Institute for Exploitation of the Sea, Laboratory of Biotechnology and  
Marine Molecules, Rue de l'Ile d'Yeu BP 21105, 44311 Nantes Cedex 03, France*

\* Corresponding author:

Tel.: +33 240 412 914; fax: +33 240 083 712

Email address: pweiss@sante.univ-nantes.fr (P. Weiss)

## **Keywords**

Glycosaminoglycan, Hydrogel, Polysaccharide, Bone and Cartilage Tissue Engineering,

In vitro test

## 1. Introduction

In bone and cartilage tissue engineering, a great number of natural polysaccharides have been widely studied due to their biodegradability, biocompatibility and capacity of mimicking the extracellular matrix while providing a temporary mechanical support [1-3]. Of these polysaccharides, the most are chitin, chitosan [5, 6], alginate [7, 8], cellulose derivatives [9], dextran [10], and compounds from the GAG family such as hyaluronic acid [11-13] and chondroitin sulfate [14]. So far, no scaffold made of these polysaccharides or combination of them have shown mechanical and biological properties. It is therefore still interesting to test new natural polysaccharides that could meet these requirements. Here we propose testing of two marine exopolysaccharides (EPSs), HE800 EPS [15, 16] and GY785 EPS [17, 18], which are a hyaluronic-like polysaccharide and a branched sulfated GAG-like polymer, respectively. Both EPSs were secreted under laboratory conditions from marine bacteria originating from deep-sea hydrothermal vents. Their large scale production is therefore convenient, low cost, reproducible, and free of non-conventional transmissible agents. HE800 is a non-sulfated linear polysaccharide with a high molecular mass ( $7.4 \times 10^5$  g/mol on average). Its repeating unit is a tetrasaccharide composed of two glucuronic acid units, one N-acetyl-glucosamine and one N-acetyl-galactosamine [19]. GY785 is a branched nonasaccharide of high molecular mass ( $1.4 \times 10^6$  g/mol on average) containing 3.2% of sulfate [20]. The presence of carboxylate groups on HE800 and GY785, and sulfate groups on GY785, make these polysaccharides promising candidates for promoting interactions with the cationic amino acids of proteins, such as growth factors, cytokines and cell adhesion molecules [21]. Consequently they may constitute a reservoir system for proteins and play a key role in cell adhesion and cell growth [22]. In a previous study, fibers of HE800 EPS were used to fill critical size defects in rat calvaria and showed strong bone healing after 3 weeks [23]. In addition, HE800 and GY785,

which are two hydrophilic polysaccharides of high molecular mass, should offer high viscosifying properties and strong mechanical properties similarly to hyaluronic acid [24].

In this context and as a preliminary study to further tissue engineering applications, we chose to incorporate HE800 and GY785 EPSs into a well-known cellulose-based hydrogel that has been developed in our laboratory for bone and cartilage tissue engineering. This silylated hydroxypropylmethylcellulose-based hydrogel (Si-HPMC) is injectable and auto-sets at physiological pH by a cross-link reaction involving the condensation of silanol groups [25]. In previous studies, this biocompatible and biodegradable [26] hydrogel was shown to have good capacities for maintaining the growth of differentiated chondrocytes [27] and maintaining phosphate granules in bone defects [28]. By adding HE800 and GY785 EPSs into the Si-HPMC hydrogel, the aim of our work was two-fold: (i) to assess the mechanical properties of the Si-HPMC hydrogel supplemented with HE800 and GY785 EPSs, and (ii) to evaluate the ability of the Si-HPMC hydrogels supplemented with HE800 or GY785 EPSs to support the viability, attachment and/or proliferation of osteoblasts and chondrocytes cultured in two and three dimensions. Hyaluronic acid (HA) was chosen as a positive control for the addition of HE800 or GY785 within Si-HPMC hydrogel. Hydrogel made from the Si-HPMC polymer only was used as a reference for all the new scaffolds. We evaluated the effects of the addition of a GAG-like polysaccharide (HE800, GY785 or HA) on the physical, chemical and bioactive properties of the Si-HPMC hydrogel using osteoblasts (MC3T3-E1) and chondrocytes (C28/I2). Various constructs were tuned and tested in order to offer an optimal environment for cells.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Polysaccharide origin and molecular weight determination

HE800 and GY785 exopolysaccharides were purchased from Seadev-FermenSys SAS (France). Hyaluronic acid sodium salt from *Streptococcus equi* (HA) was supplied by Sigma-Aldrich (France), and the silylated hydroxypropylmethylcellulose (Si-HPMC) was prepared as previously described [29]. Briefly, a commercial hydroxypropylmethylcellulose (Methocel E4M<sup>®</sup>, Colorcon, England) was modified by 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (Sigma-Aldrich, France) *via* a nucleophilic epoxide opening that occurred under heterogeneous conditions.

HE800, GY785 and HA polysaccharides were dissolved in distilled water at a concentration of 2mg/ml and filtered on a 0.45µm cellulose acetate syringe filter. The average molecular weight (Mw), number-average molecular weight (Mn), radius of gyration (Rg) and polydispersity ( $I=Mw/Mn$ ) of the samples were measured using high performance size exclusion chromatography (HPSEC) combined with a multi-angle laser light scattering detector (MALLS). The system was composed of an HPLC system Prominence Shimadzu<sup>™</sup>, a PL aquagel-0H mixte, 8 µm (Varian) guard column (U 7.5mm\* L50mm), and a PL aquagel-0H mixed (Varian) separation column (U 7.5\*300mm, operating range  $10^2$ - $10^7$ g/mol). Elution was performed at 1ml/min with 0.1M ammonium acetate containing 0.03% NaN<sub>3</sub>, filtrated on a 0.1µm membrane (Durapore Membrane, PVDF, Hydrophilic type VVLP, Millipore). A differential refractive index (RI) detector (Hitachi L2490) and a multi-angle light scattering detector (Dawn Heleos II <sup>™</sup>, Wyatt) were coupled on-line and data computed with Astra software for absolute molar mass determination.

## *2.2. Hydrogel formation*

### *2.2.1. Silylated hydroxypropylmethylcellulose-based hydrogel*

Si-HPMC polymer was first solubilized at 3wt% in 0.2M NaOH over 48h before being dialyzed against 0.09M NaOH using 6-8kDa dialysis tubes (SpectraPor 1, Fisher Scientific Bioblock, France). The resulting viscous solution (pH=12.6) and a 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid buffer (pH=3.6) were separately steam sterilized and then mixed with luer-lock syringes at a volume ratio of 1/0.5 before being injected into multi-well plates (Corning, VWR, France). Typically, 1ml of the hydrogel was molded per well in 24 well plates for cell culture and 2ml for compressive tests (see below). This hydrogel contained a final concentration of Si-HPMC of 2% and was noted Si-HPMC (2).

### *2.2.2. Si-HPMC/HE800, Si-HPMC/HA and Si-HPMC/GY785 hydrogels*

HE800, HA and GY785 polysaccharides were mixed with the steam sterilized 3wt% basic solution of Si-HPMC (see § 2.2.1) at the desired concentration (1, 5, 7.5 or 10mg/ml). The resulting mixtures were left in mild rotatory stirring over one night to allow the polysaccharide to dissolve or disperse. Then, as with the preparation of the Si-HPMC hydrogel, 0.5 volume of 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid buffer (pH=3.6) was mixed with the basic solutions of polysaccharides to form hydrogels within 35 minutes maximum according to the gel point measurements (see below). For an initial concentration of 10mg of HE800 or HA or GY785 per ml of 3wt% Si-HPMC solution, the resulting hydrogels contained 2wt% of Si-HPMC and 0.67wt% of the added polysaccharide. They were noted Si-HPMC/HE800 (2/0.67), Si-HPMC/HA (2/0.67), and Si-HPMC/GY785 (2/0.67), respectively.



### 2.3. Hydrogel characterization

#### 2.3.1. Osmolarity, pH and gel point measurements

Immediately (about 10 sec) after mixing the basic solutions of polymer(s) with the acid buffer, the pH of the samples (before and after hardening) was recorded on a Knick portable pH meter and the osmolarity values on an advanced micro-osmometer (model 3MO plus, Advanced Instrument Inc.) that uses the freezing point method. For gel point measurements, 3x1.5ml of each sample was injected into a rotational rheometer (RheoStress 300, Thermo Haake Co., Germany). The storage modulus  $G'$  and the loss modulus  $G''$  were monitored as a function of time at 25°C under multi-wave oscillatory shear (1 to 30 rad/s) with a titanium plate of cone-plate geometry (60 mm diameter, 1° cone angle). The strain amplitude was fixed at 0.5 Pa, which lies in the linear viscoelastic region. The gel points are given as the time taken for the liquid ( $G'' > G'$ ) to turn into a solid ( $G' > G''$ ). They were determined according to a derived percolation theory [30], which says that near the gel point,  $G' \sim G'' \sim \omega^n$  over a range of frequencies so  $G''/G'$  can be expressed as  $\tan \delta = G''(\omega) / G'(\omega) = \tan (n\pi/2)$  (where  $n$  is the relaxation exponent). Also, at the gel point, the phase angle between stress and strain,  $\delta$ , is independent of frequency but proportional to the relaxation exponent:  $\delta = n\pi/2$ . Consequently, all the curves of  $\tan \delta$  versus time at different frequencies have a common intersection point which defines the gel point.

#### 2.3.2. Compressive modulus measurements

6x2ml of each hydrogel, prepared as described in paragraph 2.2., were molded into 24-well plates and left for cross-linking for 15±3hours. Then, as with 2D cell culture (see paragraph 2.4.3), 0.5ml of culture medium was added per well and allowed to diffuse within the hydrogel over 48h. The resulting hydrogels were unmolded, and the diameter and height of each cylinder were measured with a calliper square. The hydrogels were then compressed

to rupture on a TA.HD *plus* Texture Analyser (Stable Micro Systems Lts, England) with a cylinder load (diameter of 25mm, LAP Perspex, England) of 1g moving at 1mm/sec to plot the force (Pa) as a function of the strain. The compressive modulus was calculated as the slope of the curve between 0% and 10% of strain.

### *2.3.3. Scanning electron microscopy*

The hydrogels were molded into 24-well plates and allowed to crosslink over one night before being flash frozen by immersion in isopentane cooled down by liquid nitrogen. The frozen samples were immediately lyophilized and coated with carbon on a Jeol Jee-4B (Japan). The scanning electron images of the surface of the hydrogels were recorded on a Leo 1450VP microscope (Zeiss SMT, Germany) at 20 kV.

## *2.4. Cell culture*

### *2.4.1. Cell lines*

C3T3-E1 and C28/I2 cells were cultured in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37 °C in  $\alpha$ -MEM and DMEM F-12 medium (Invitrogen corporation, France), respectively. Both culture media were supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS), 1% of penicillin/streptomycin and 1% of L-glutamine, which were changed every 2-3 days.

### *2.4.2. Cell viability in 2D and 3D cultures*

MC3T3-E1 and C28/I2 cells were allowed to attach to 24-well plates at a final density of 20,000 cells per well. After 24h, the culture medium was removed and 500 $\mu$ l of each cross-linked hydrogel was added per well. The samples were incubated at 37°C for 1h before adding 1ml of culture medium. As a positive control, cells were cultured in the absence of Si-HPMC hydrogel. As a negative control, cells were cultured in the presence of actinomycin-D

(5 $\mu$ g/ml), which is a transcription inhibitor. After 24, 48 or 72h of culture, the hydrogels and culture media were removed by aspiration. Trypan blue exclusion dye assays were performed to count the cells and the Methyl Tetrazolium Salt (MTS; Promega, USA) test was performed to evaluate their mitochondrial activity. For the latter, a MTS solution was added to each well for 1-3h according to the manufacturer's instructions. The optical density of formazan dye was measured on a spectrophotometer at 490nm. Each condition was tested in triplicate and the results were expressed as relative MTS activities as compared to the positive control.

For 3D culture, cell viability was quantitatively assessed by Live&Dead assays (Kit, Invitrogen, France) along with confocal image analysis. Briefly, MC3T3-E1 and C28/I2 cells were dispersed into the hydrogels within the 5 minutes following their preparation at a final concentration of one million cells per ml of hydrogel. 800 $\mu$ l of each mixture was molded into ultra-low attachment 24-well plates and incubated at 37°C for 1h to allow the hydrogels to crosslink. Afterwards, 1ml of appropriate culture medium was added per well and the samples were incubated for 48h before Live&Dead assays were performed. Actinomycin-D treatment (5 $\mu$ g/mL) was used as an internal control of cell death. In each well, the culture medium was replaced by 200 $\mu$ l of a solution containing 2.5ml of complete DMEM-F12 medium for C28/I2 cells or  $\alpha$ -MEM for MC3T3-E1 cells supplemented with 0.25 $\mu$ l of calcein-AM and 5 $\mu$ L of ethidium homodimer-1. After 5 to 10 minutes, the dye mixture was removed and the hydrogels were intensively rinsed with some phosphate buffered saline before being observed on a confocal laser-scanning microscope (Nikon D-eclipse C1) equipped with an argon/krypton laser. For each sample, 6 random positions (x,y,z) were chosen within the hydrogel, and series of 35 images were taken from these 6 positions along the z axis in 5 $\mu$ m stages. The 210 images obtained per sample were analyzed with a quantimeter Q550 (Leica microsystem GmbH, Wetzlar, Germany). The percentages of living cells (in green) and dead

cells (in red) were determined by using a customized image analysis program made in our laboratory.

#### *2.4.3. Morphology and spatial organization of cells in 2D culture*

MC3T3-E1 and C28/I2 cells were seeded on to cross-linked hydrogels containing the final concentration of HE800, HA or GY785 ranging from 0% to 0.67%. 3x300 $\mu$ l of each hydrogel were molded into ultra-low attachment 24-well plates and left at room temperature for 1h for cross-linking. 500 $\mu$ l of complete medium was added to each well and the samples were incubated at 37°C overnight before seeding the cells at a final density of 20,000 cells per well. After 48h of culture, cells were observed with an inverted optical microscope (Nikon Instruments, The Netherlands), and the number of cells that remained in the culture media was determined by trypan blue exclusion dye assays. To stain and count the cells per cluster, culture media were removed and replaced by a PBS-4% paraformaldehyde solution. The samples were fixed for 20min at 4°C and left 15min at 4°C in a PBS-0.1% of Triton X-100 solution. The cells were then incubated with Alexafluor 488-phalloidin (A12379, Molecular probe, Invitrogen) at a dilution of 1:40 in PBS-bovine serum albumin (BSA-10mg/ml) for 1h at 37°C in the dark to stain cytoskeletal F-actin fibers in green. The samples were then rinsed with PBS- 0.05% Tween and incubated with Hoechst at 5mg/ml in deionized water for 10 min at room temperature to stain the nuclei blue. Finally, the samples were rinsed twice with deionized water and observed with a Nikon TE2000-E inverted microscope in the green and blue excitation ranges, separately. Images were overlaid using ImageJ Software. For each condition, 20 clusters were randomly selected to count the number of blue nuclei.

#### *2.4.3. Morphology and spatial organization of cells in 3D culture*

MC3T3-E1 and C28/I2 cells were cultured in 3D as described in § 2.4.2. After 5 weeks of culture, some cells were stained by Live&Dead assays (see § 2.4.2.), and some were

fixed in formol over 1h and embedded into a 2% agarose solution before embedding in paraffin. Serial sections of each paraffin block (5 $\mu$ m thickness) were made and processed for routine histology (hematoxylin/eosin/safranin-O or alcian blue staining). Samples were observed with a Nikon TE2000-E inverted microscope.

### *2.5. Statistical analysis*

Experiments were repeated at least three times. Data were analyzed using ANOVA with a post-hoc test (Fisher's project least significant difference). Statistical significance was set to a p value  $\leq 0.05$  and the results are expressed as mean  $\pm$  SEM.

## **3. Results**

### *3.1. Polysaccharide characteristics and hydrogel preparation*

As seen in Table 1, the physical and chemical characteristics of the selected hyaluronic acid (the positive control) match those of the HE800 EPS (the polysaccharide tested). GY785 EPS has similar features except that it contains sulfate and has a 2-fold higher average molecular weight (Mw). HE800, HA and GY785 polysaccharides were added to the Si-HPMC hydrogel by solubilizing them into the basic medium. HE800, HA and GY785 polysaccharides were completely solubilized at a concentration of 10mg/mL. At higher concentrations HE800 and GY785 were not soluble within the basic solution for which we observed a saturation of the medium contrary to HA. Si-HPMC hydrogels can be supplemented at most with 0.67% of HE800 and GY785 marine polysaccharides, which was thus used as our working concentration.

### *3.2. Hydrogel characterization*

Si-HPMC hydrogels containing 0.67% of HE800, HA or GY785 (i.e. 10mg/ml of basic medium) presented all the appropriate osmolarity and pH values for cell culture (Table 2). The presence of HE800 and HA in the Si-HPMC network speeded up the gelation process and this was more pronounced with HA. In the presence of GY785, gelation time was 2 times longer. Significant variations of compressive modulus were observed between each hydrogel except between those containing HE800 and HA (Fig. 1A). The addition of 0.67% of HE800 or HA increased the compressive modulus of the Si-HPMC hydrogel roughly 3 to 4 times, and the addition of 0.67% of GY785 about twice. By varying the concentration of HE800 from 0 to 0.67% (Fig. 1B), the compressive modulus significantly increased about 1.5 times with 0.17% of HE800 and about 3.5 times for concentrations greater than or equal to 0.34% of HE800. The maximal values reached a plateau of 10-12kPa. As seen on the SEM images (Fig. 2), the flash frozen-dried hydrogels all presented a porous inner structure with interconnected channels but with different spatial organization. At low and high magnifications (100 X and 2.5K X), Si-HPMC hydrogels without or with 0.67% of GY785 showed similar outer surfaces and an irregular sheet organization. At low magnification (100 X), the outer surfaces of Si-HPMC hydrogels containing 0.67% of HE800 or HA looked alike and far more dense than the other two, while their inner structures were very different, as seen at high magnification.

Mixing HA with Si-HPMC effectively led to a uniform network, while Si-HPMC/HE800 (2/0.67) hydrogel showed two types of structure with many pendant bubble images.

### *3.3. Cell culture*

Adding marine polysaccharides HE800 and GY785 at a concentration of 0.67% to the Si-HPMC hydrogel led to two new hydrogels with higher compressive moduli than Si-HPMC alone. The aim of the cellular experiments was to evaluate the ability of the hydrogels supplemented with 0.67% of HE800 or GY785 EPS to allow viability, cell attachment as well

as cell repartition or cluster formation of osteoblast and chondrocyte cells culturing respectively in 2 dimensions on the top of the hydrogels or in 3 dimensions directly within it.

### *3.3.1. Cell viability in 2D and 3D culture*

In the 2D experiments, the MTS assays (supplementary data) and the cell counting (Fig. 3A and 3B) provided comparable data and showed that no hydrogel composition tested was cytotoxic. In the 3D experiments, the hydrogels containing the HE800 EPS dramatically affected the viability of MC3T3-E1 and C28/I2 cells, particularly at a concentration of 0.67% (Fig. 4A and 4B). This high mortality was also observed with lower concentrations of HE800 (from 0.17% to 0.5%) in the case of MC3T3-E1 cultures only (Fig 4C). The results differed slightly between the two panels (Fig. 4A and 4C) which were inherent to biological variability between two different experiments. However, the cell responses within the Si-HPMC (2) and Si-HPMC/HE800 (2/0.67) hydrogels between the two panels followed the same trend and are clearly interpretable.

### *3.3.2. Morphology and spatial organization of cells in 2D culture*

The presence of HE800, HA or GY785 within the Si-HPMC hydrogel induced the attachment of MC3T3-E1 cells even at low concentrations (Fig. 5). The dispersion of cells on to the surfaces of these types of hydrogel was even better with increased concentrations of GAG-like polysaccharides. Similar results were obtained with C28/I2 cells (results not shown). No cell attached on to the Si-HPMC hydrogel as confirmed by the counting of cells in the medium (Fig. 6). The presence of 0.67% of HE800, HA or GY785 within the Si-HPMC hydrogel allowed most of the cells to attach to the hydrogels like in 2D cultures on to tissue culture plastic (TCPS). Looking at the histochemical staining assays (Fig. 7), MC3T3-E1 cells spread better on to hydrogels containing HE800, forming clusters of 2 cells on average, than

on to hydrogels containing HA or GY785, on to which they stayed round and formed clusters of 5 to 10 cells on average, respectively.

### *3.3.3. Morphology and spatial organization of cells in 3D culture*

In 5 weeks of culture in Si-HPMC hydrogels, without or with 0.67% of HA or GY785, MC3T3-E1 cells stayed round and alive, forming clusters of only 2 or 3 cells (results not shown). In contrast to MC3T3-E1 cells, C28/I2 cells formed growing clusters of different morphology (Fig. 8). Within the Si-HPMC hydrogel, they proliferated concentrically leading to well-defined spherical clusters of about 50-55 $\mu$ m in size. Within the hydrogels containing HA or GY785, C28/I2 cells spread out more in the microenvironment, leading to clusters of about 60-100 $\mu$ m in size. The percentage of dead cells per cluster was not quantified but seemed to be low, especially in the hydrogels containing HA and GY785, as shown after calcein AM (living cells) and ethidium homodimer-1 (dead cells) assays. No yellow staining or alcian blue staining were observed, except in the presence of GY785 even without cells. C28/I2 cells cultured over 5 weeks in hydrogels containing HE800 stayed alive for concentrations ranging from 0.17% to 0.5% but cell proliferation was only observed in hydrogels containing less than 0.5% of HE800 (Fig. 9).



#### 4. Discussion

The first step of our work was to define the best way of associating HE800, HA and GY785 polysaccharides with the Si-HPMC hydrogel without dramatically affecting its gelation process, pH and osmolarity. The preparation protocol for the Si-HPMC hydrogel was optimized to match tissue engineering applications. The two options were therefore to add the polysaccharides to the basic solution containing 3wt% of Si-HPMC (pH=12.6) or to the acid buffer (pH=3.6). Adding it to the basic solution was preferred as HE800, HA and GY785 were soluble in it but not in the acid buffer. However, saturation of the basic medium was reached with 10mg of HE800 per ml. This concentration was thus defined as the maximal working concentration and was also the one used for most of our experiments as it led to the greatest mechanical properties (Fig. 1) while maintaining cell viability (Figs. 4A and 4B), except for the experiments with HE800 for which the concentration had to be tuned (Figs. 1B and Fig. 1C-D).

Although adding HE800, HA or GY785 did not affect the pH or osmolarity of the Si-HPMC hydrogel (Table 2), it did significantly modify its gelation time (Table 2) but with no dramatic consequences as the resulting hydrogels were all injectable and adapted for the incorporation of cells. The fact that HA speeded up the gel point by at least 17 times (Table 2) could be due to a high affinity of HA for the Si-HPMC polymer. It has effectively already been described that hyaluronic acid and cellulose derivatives can form cross-linked gel-like structures (31).

Adding 0.67% of HE800 or HA or GY785 to the Si-HPMC hydrogel significantly increased its compressive modulus, and the two structural analogs, HE800 and HA, offered similar mechanical properties (Fig. 1A). The values obtained by decreasing the concentration of HE800 from 0.67% down to 0.34% were not significantly different (Fig. 1B). In conclusion, the hydrogels containing 0.34% to 0.67% of HE800 or 0.67% of HA offered the

highest compressive moduli at  $10.25 \text{ kPa} \pm 0.75$ . These constructions were the most interesting in terms of mechanical properties as the value of their compressive modulus is similar to that of native cartilage, estimated at about 20kPa (32).

Authors who want to show the effect of peptide grafting on hydrogel macromolecules on cell attachment use 2 dimensional cell cultures on the surface of the modified hydrogels (33, 34). They compare 2 dimensional cell culture on the surface of the hydrogels with 3 dimensional cell culture encapsulated inside the synthetic structure. The 2 dimensional experiments make it possible to visualize the cells spreading on a surface. Inside the hydrogel, the structure is isotropic without any preferential direction (35). If the cell membrane links the RGD structures of the hydrogel by means of its integrin receptors, it is not visible because the cell attached within the hydrogel stays round without any 2 dimensional surfaces to follow. A paper by Lei *et al.* (36) reports that RGD concentration influenced the extent of cell spreading. A large percentage of cells remained spherical after 3 days of culture inside the hydrogels with low RGD concentrations (RGD 100, 250  $\mu\text{M}$ ). If the RGD concentrations become very high, most of the cells can spread inside the hydrogels with high RGD concentrations (RGD 750, 1000  $\mu\text{M}$ ), although it was difficult to quantify the extent of the spreading. However, it was generally observed that the cells were much longer and extended into the hydrogels with more RGD. In a macroporous hydrogel made, using a simultaneous gas-foaming, free-radical crosslinking approach (37), the cells are inside macropores on the surface of the hydrogel as in the 2 dimensional experiments but in a specific microenvironment and can spread on the surface of the hydrogel. On the contrary, if fibrillar proteins, such as collagen, or solid granules, such as calcium phosphate (38), are added to a hydrogel, with cells, the material is anisotropic or biphasic and the cells spread on the surface of the fibril or the granules. In our case, the macromolecules added into the Si-HPMC hydrogel were soluble in it and the structure was isotropic without any direction or surface for

the cells to attach to. If we wanted to follow cell attachment, adhesion and spreading on modified uniform hydrogels, we would have needed to observe cells on the surface. The presence of HA, HE800 and GY785 in the Si-HPMC hydrogel induced the attachment of MC3T3-E1 and C28/I2 cells when these cells were cultured in 2D on top of the hydrogels (Fig. 5). Elsewhere (39) it has been described that cell attachment and cell spreading are linked to the stiffness and electric charge of the surface. Indeed, in our experiments, the best cell dispersion and cell spreading (Figs. 5 and 7) were observed on the hydrogels with the highest compressive modulus (Fig. 1) and densest surface structure (Fig. 2) (i.e. Si-HPMC hydrogels supplemented with 0.67% of HE800 or HA). Also, cell attachment was only observed on the hydrogels containing HE800, HA and GY785, which are negatively charged polymers, contrary to Si-HPMC which is neutral. As described in the literature (24, 40, 41), negatively charged polymers promote the adsorption of proteins by interacting ionically with their cationic amino acids. Also, many papers relate that HA polysaccharide promotes cell adhesion and mobility by interacting specifically with the RHAMM cell receptor and the CD44 cell receptor, which binds to a six to ten-sugar sequence of HA (24, 42). It would therefore be interesting to investigate whether HE800 and GY785 EPSs have such specific interactions by using surface plasmon resonance technology for example.

In the 3D experiments (Fig 4), cell death was only observed in Si-HPMC hydrogels containing HE800, while no adverse effect was noticed in 2D cytotoxicity assays with this polysaccharide (Fig. 5). This cellular death was therefore not related to the HE800 polysaccharide itself. Nor was it due to a high compressive modulus as the cells cultured in hydrogels with equal compressive modulus, such as Si-HPMC hydrogels containing 0.67% of HE800 or 0.67% of HA (Fig 1A), showed either a low mortality with HA or a high mortality with HE800 (Figs. 4A and 4B). This cell death could be related to the inner structure of the hydrogel and particularly to the spatial organization of HE800. As has been well documented

in the literature, mean pore size in the scaffolds is the key point for obtaining a biologically active material (43). The pore should be greater than 20 $\mu\text{m}$  and less than 120  $\mu\text{m}$  if it is to provide cell attachment and viability in the scaffolds; a linear relationship has been found between cell attachment and specific surface area, and there is an optimal pore size or range for each distinct cell type (44). As noted by Vickers *et al.*, the decrease in pore diameter attendant to scaffold contraction has been documented histologically. The concept of dynamic pore reduction was presented previously as an approach for achieving a desired cell density by means of pore volume reduction resulting from cell-mediated contraction of porous scaffolds of lower stiffness (45). In our study, the Si-HPMC hydrogel was not a highly porous or macroporous scaffold. Cells are not seeded inside hydrogel macropores but encapsulated inside the network. We only have nanopores to enable the diffusion of gaz and nutriments. Pores are visible under scanning microscopy because water is removed in the course of the technical preparation. These SEM pictures reveal artifacts and not the real structures but these artifacts are linked to the real structures and the density of the hydrated gels. These pores revealed the viscoelasticity and ability of the macromolecule network to be strained when the water is removed before being analyzed in the SEM. As shown in the SEM images (fig.2), pore size seemed to increase when hyaluronic acid or GY785 EPS was added to the Si-HPMC hydrogel (the pore size was about 25  $\mu\text{m}$ ) and the pores seemed to be interconnected. The size of these pores was far higher than that of individual cells (5-7  $\mu\text{m}$ ), therefore cell infiltration and migration should be possible if cells can strain the structure. On the other hand, when HE800 was added to the Si-HPMC hydrogel, the hydrogel seemed less porous and no pores were observed inside the hydrogel as observed in the respective SEM images at high magnification (Fig. 2), suggesting a three-dimensional (3D) structure that is unsuitable for promoting cell proliferation and viability. The hydrogel containing 0.67% of HE800 had a dense inner structure (Fig. 2) that may lead to poor permeability (46) and consequently to

slow diffusion of nutrients and gases. The concentration of HE800 was consequently lowered to check whether this would benefit cell viability (Figs. 4C and 4D) while maintaining high mechanical properties (Fig. 1B). Results showed that this was true only with C28/I2 cells and particularly with the Si-HPMC hydrogel containing 0.34% of HE800.

In 3D culture, only the C28/I2 cells proliferated. MC3T3-E1 is a mouse osteoblastic cell line and, as with many cell types, they need to interact and adhere and bind ligands in their micro-environment to proliferate (38, 47, 48). In this study, the marine polysaccharides added to the Si-HPMC hydrogel did not seem to produce an adhesion site, even after 3 weeks of culture, and the MC3T3-E1 cells remained round. Depending on the construction, the morphology of the C28/I2 cells was different. Cell growth varied with the nature of both the hydrogel and polysaccharide (Figs. 8 and 9). In the Si-HPMC hydrogel, the cells clustered together whereas in the presence of hyaluronic acid or GY785 EPS, the cells spread out more in the microenvironment. The hydrogels containing 0.67% of HE800 or GY785 marine polysaccharides had a compressive modulus 3 and 2 times higher than Si-HPMC hydrogel alone, respectively. Therefore, they both have interesting mechanical properties, as expected. Their benefit, however, in terms of biological responses, is different. Indeed, as seen by the 2D culture experiments, both HE800 and GY785 made it possible to retain most of the cells on the surface of the hydrogels after culture medium removal, but the benefit of HE800 was that it induced cell spreading. In 3D experiments, the GY785 had the most benefit, which was to make cell viability and proliferation possible. In conclusion, HE800 seemed more adapted to 2D cell cultures (for patches for example) and GY785 for use as a 3D scaffold for cell cultures.

## **5. Conclusion**

The two GAG-like marine exopolysaccharides, HE800 and GY785 were associated with an Si-HPMC hydrogel to assess both the mechanical and biological properties of the new hydrogels built. HE800 and GY785 polysaccharides significantly improved the mechanical properties of the Si-HPMC hydrogel and induced the attachment of MC3T3-E1 and C28/I2 cells when these were cultured in 2D on top of the hydrogels. HE800 had the highest compressive modulus (11kPa) and allowed the best cell dispersion, especially with MC3T3-E1 when cultured on top of the hydrogels. Of all the constructs tested, the Si-HPMC hydrogels containing 0.34% of HE800 or 0.67% of GY785 or 0.67% of HA presented the most interesting features for cartilage tissue engineering applications as they offered the highest compressive modulus (9.5-11kPa) while supporting the proliferation of chondrocytes. The hydrogel supplemented with 0.67% of HE800 had the best cell spreading in two dimensions and will be used in the form of a patch.

## **Acknowledgements**

We acknowledge IFREMER and the *Pays de la Loire* council for their financial support through the Bioregos grant and PhD studentship (Emilie Rederstorff). We also thank Christophe Brandily for the chemical structure representation of the polysaccharides, Sandrine Lavenus for her help in histochemical staining, Caroline Colombeix for her help in using the confocal microscope and Gilles Fanchon for the osmolarity measurements.

## References

1. Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science*;35(4):403-40.
2. Dang JM, Leong KW. Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*2006;58(4):487-99.
3. Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science* 2007/9//;32(8-9):762-98.
4. Muzzarelli RAA. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers*2009;76(2):167-82.
5. Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*2005;26(30):5983-90.
6. Francis Suh JK, Matthew HWT. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*2000;21(24):2589-98.
7. Li Z, Ramay HR, Hauch KD, Xiao D, Zhang M. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*2005;26(18):3919-28.
8. Stevens MM, Qanadilo HF, Langer R, Prasad Shastri V. A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering. *Biomaterials*2004;25(5):887-94.
9. Müller FA, Müller L, Hofmann I, Greil P, Wenzel MM, Staudenmaier R. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*2006;27(21):3955-63.
10. Jin R, Moreira Teixeira LS, Dijkstra PJ, van Blitterswijk CA, Karperien M, Feijen J. Enzymatically-crosslinked injectable hydrogels based on biomimetic dextran-hyaluronic acid conjugates for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*;31(11):3103-13.
11. Barbucci R, Lamponi S, Borzacchiello A, Ambrosio L, Fini M, Torricelli P, et al. Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis. *Biomaterials*2002 Dec;23(23):4503-13.
12. Kim J, Kim IS, Cho TH, Lee KB, Hwang SJ, Tae G, et al. Bone regeneration using hyaluronic acid-based hydrogel with bone morphogenic protein-2 and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials*2007;28(10):1830-7.
13. Yoo HS, Lee EA, Yoon JJ, Park TG. Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*2005;26(14):1925-33.
14. Chen Y-L, Lee H-P, Chan H-Y, Sung L-Y, Chen H-C, Hu Y-C. Composite chondroitin-6-sulfate/dermatan sulfate/chitosan scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*2007;28(14):2294-305.
15. Rigouin C, Ladrat CD, Sinquin C, Collic-Jouault S, Dion M. Assessment of biochemical methods to detect enzymatic depolymerization of polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*2009;76(2):279-84.
16. Raguènes G, Christen R, Guezennec J, Pignet P, Barbier G. *Vibrio diabolicus* sp. nov., a New Polysaccharide-Secreting Organism Isolated from a Deep-Sea Hydrothermal Vent Polychaete Annelid, *Alvinella pompejana*. *Int J Syst Bacteriol*1997;47(4):989-95.
17. Collic-Jouault S, Chevotot L, Helley D, Ratskol J, Bros A, Sinquin C, et al. Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas infernus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*2001;1528(2-3):141-51.
18. Raguénès G, Peres A, Ruimy R, Pignet P, Christen R, Loaec M, et al. *Alteromonas infernus* sp. nov., a new polysaccharide-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Journal of Applied Microbiology*1997;82(4):422-30.

19. Rougeaux H, Kervarec N, Pichon R, Guezennec J. Structure of the exopolysaccharide of *Vibrio diabolicus* isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydrate Research* 1999;322(1-2):40-5.
20. Roger O, Kervarec N, Ratskol J, Collic-Jouault S, Chevolut L. Structural studies of the main exopolysaccharide produced by the deep-sea bacterium *Alteromonas infernus*. *Carbohydrate Research* 2004;339(14):2371-80.
21. Gandhi NS, Mancera RL. The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chemical Biology & Drug Design* 2008;72(6):455-82.
22. Lord MS, Pasqui D, Barbucci R, Milthorpe BK. Protein adsorption on derivatives of hyaluronic acid and subsequent cellular response. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2009;91A:635-46.
23. Zanchetta P, Lagarde N, Guezennec J. Systemic Effects on Bone Healing of a New Hyaluronic Acid-Like Bacterial Exopolysaccharide. *Calcified Tissue International* 2003;73(3):232-6.
24. Morra M. Engineering of Biomaterials Surfaces by Hyaluronan. *Biomacromolecules* 2005;6(3):1205-23.
25. Fatimi A, Tassin JF, Quillard S, Axelos MA, Weiss P. The rheological properties of silated hydroxypropylmethylcellulose tissue engineering matrices. *Biomaterials* 2008;29(5):533-43.
26. Laïb S, Fellah BH, Fatimi A, Quillard S, Vinatier C, Gauthier O, et al. The in vivo degradation of a ruthenium labelled polysaccharide-based hydrogel for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2009;30(8):1568-77.
27. Vinatier C, Magne D, Weiss P, Trojani C, Rochet N, Carle GF, et al. A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials* 2005 Nov;26(33):6643-51.
28. Trojani C, Boukhechba F, Scimeca J-C, Vandenbos F, Michiels J-F, Daculsi G, et al. Ectopic bone formation using an injectable biphasic calcium phosphate/Si-HPMC hydrogel composite loaded with undifferentiated bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2006;27(17):3256-64.
29. Bourges X, Weiss P, Daculsi G, Legeay G. Synthesis and general properties of silated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Advances in Colloid and Interface Science* 2002;99(3):215-28.
30. Fatimi A, Tassin J-F, Turczyn R, Axelos MAV, Weiss P. Gelation studies of a cellulose-based biohydrogel: The influence of pH, temperature and sterilization. *Acta Biomaterialia* 2009;5(9):3423-32.
31. Hoare TR, Kohane DS. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* 2008;49(8):1993-2007.
32. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW. Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells. *Science* 2009 June 26, 2009;324(5935):1673-7.
33. Shu XZ, Ghosh K, Liu Y, Palumbo FS, Luo Y, Clark RA, et al. Attachment and spreading of fibroblasts on an RGD peptide-modified injectable hyaluronan hydrogel. *J Biomed Mater Res A* 2004 Feb 1;68(2):365-75.
34. Schneider GB, English A, Abraham M, Zaharias R, Stanford C, Keller J. The effect of hydrogel charge density on cell attachment. *Biomaterials* 2004 Jul;25(15):3023-8.
35. Nuttelman CR, Tripodi MC, Anseth KS. Synthetic hydrogel niches that promote hMSC viability. *Matrix Biol* 2005 May;24(3):208-18.
36. Lei Y, Gojgini S, Lam J, Segura T. The spreading, migration and proliferation of mouse mesenchymal stem cells cultured inside hyaluronic acid hydrogels. *Biomaterials* Jan;32(1):39-47.



37. Behravesh E, Mikos AG. Three-dimensional culture of differentiating marrow stromal osteoblasts in biomimetic poly(propylene fumarate-co-ethylene glycol)-based macroporous hydrogels. *J Biomed Mater Res A*2003 Sep 1;66(3):698-706.
38. Sohier J, Corre P, Weiss P, Layrolle P. Hydrogel/calcium phosphate composites require specific properties for three-dimensional culture of human bone mesenchymal cells. *Acta Biomater*2010 Aug;6(8):2932-9.
39. Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*1996;17(2):137-46.
40. Goetinck P, Stirpe N, Tsonis P, Carlone D. The tandemly repeated sequences of cartilage link protein contain the sites for interaction with hyaluronic acid. *J Cell Biol*1987 November 1, 1987;105(5):2403-8.
41. Hascall VC, Heinegard D. Aggregation of Cartilage Proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry*1974;249(13):4232-41.
42. Underhill C. CD44: the hyaluronan receptor. *J Cell Sci*1992 October 1, 1992;103(2):293-8.
43. Yang B, Yin Z, Cao J, Shi Z, Zhang Z, Song H, et al. In vitro cartilage tissue engineering using cancellous bone matrix gelatin as a biodegradable scaffold. *Biomed Mater*2010 Aug;5(4):045003.
44. O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, Gibson LJ. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials*2005 Feb;26(4):433-41.
45. Vickers SM, Gotterbarm T, Spector M. Cross-linking affects cellular condensation and chondrogenesis in type II collagen-GAG scaffolds seeded with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*2010 Sep;28(9):1184-92.
46. Scherer GW. Influence of Viscoelasticity and Permeability on the Stress Response of Silica Gel. *Langmuir*1996;12(5):1109-16.
47. Lutolf MP, Hubbell JA. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol*2005 Jan;23(1):47-55.
48. Cushing MC, Anseth KS. Materials science. Hydrogel cell cultures. *Science*2007 May 25;316(5828):1133-4.

**Table 1:** Physico-chemical characteristics of HE800, hyaluronic acid (HA) and GY785 polysaccharides.

**Table 2:** Osmolarity, pH and gel point of Si-HPMC hydrogels without or with 0.67% of HE800 or HA or GY785.

**Figure 1:** (A) Compressive moduli of Si-HPMC hydrogels without or with 0.67% of HE800 or HA or GY785; (B) Compressive moduli of Si-HPMC hydrogels without or with HE800 at various concentrations. \* $P < 0.001$

**Figure 2:** SEM images of flash-frozen dried hydrogels at low (100 X) and high (2.5K X) magnifications.

**Figure 3:** Proliferation of (A) MC3T3-E1 and (B) C28/I2 cells cultured in 2D on culture plate over 72h in the absence of hydrogel (positive control) or in the presence of Si-HPMC (2), Si-HPMC/HE800 (2/0.67), Si-HPMC/HA (2/0.67), Si-HPMC/GY785 (2/0.67) hydrogels or in the presence of 5 $\mu$ g/ml of actinomycin-D (negative control). Results are expressed as the total number of cells per well. \* $P < 0.001$  (\* alone = significantly different from each other sample)

**Figure 4:** Percentages of live and dead cells cultured in 3D within different hydrogels over 48h: (A) MC3T3-E1 and (B) C28/I2 within Si-HPMC hydrogels without or with 0.67% of HE800 or HA or GY785, or within Si-HPMC hydrogel in the presence of actinomycin-D in the culture medium (5 $\mu$ g/ml); (C) MC3T3-E1 and (D) C28/I2 within Si-HPMC hydrogels without or with HE800 at various concentrations. \* $P < 0.001$  (\* alone = significantly different from each other sample)

**Figure 5:** Optical microscope images of MC3T3-E1 cells cultured over 48h in 2D on the top of Si-HPMC hydrogels without or with HE800, HA or GY785 at various concentrations. *(Magnification 100 X)*

**Figure 6:** Percentage of MC3T3-E1 cells that remained in the culture medium 48h after culturing them in 2D onto culture plate (positive control) or on the top of Si-HPMC hydrogels without or with 0.67% of HE800 or HA or GY785. *\*P<0.001*

**Figure 7:** (A) Fluorescent images of stained MC3T3-E1 cells cultured over 48h in 2D on the top of Si-HPMC hydrogels containing 0.67% of HE800, HA or GY785. Nuclei are in blue and actin fibers in green; (B) Number of MC3T3-E1 cells per cluster. *\*P<0.001*

**Figure 8:** Optical and fluorescent images of C28/I2 cells cultured over 5 weeks in 3D within Si-HPMC hydrogels without or with 0.67% of HA or GY785. From top to bottom: no staining, calcein AM dye (live cells in green), ethidium homodimer-1 dye (dead cells in red), alcian blue and hematoxylin/eosin/safranin-O staining of paraffin embedded hydrogels. *Scale bar = 20 $\mu$ m*

**Figure 9:** Optical images of C28/I2 cells cultured over 5 weeks in 3D within Si-HPMC hydrogels without or with HE800 at various concentrations. *Scale bar = 50 $\mu$ m*

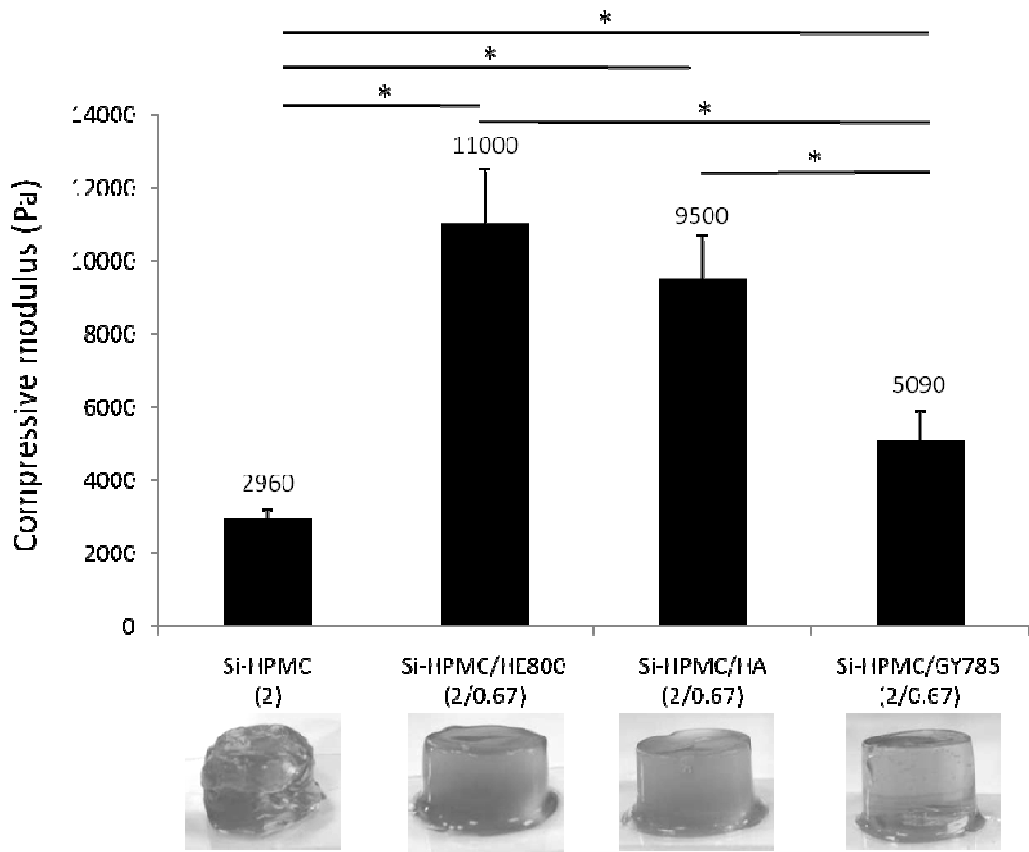
**Table 1**

	<b>HE800</b>	<b>HA</b>	<b>GY785</b>
<b>Sulphur (g/100g)</b>	0	0	3.2
<b>Sugar acids (g/100g)</b>	32	30	22
<b>I (Mw/Mn)</b>	1.098	1.054	1.18
<b>Mw (g/mol)</b>	$7,4 \cdot 10^5$	$7,4 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^6$
<b>Gyration beam (nm)</b>	70	108	117

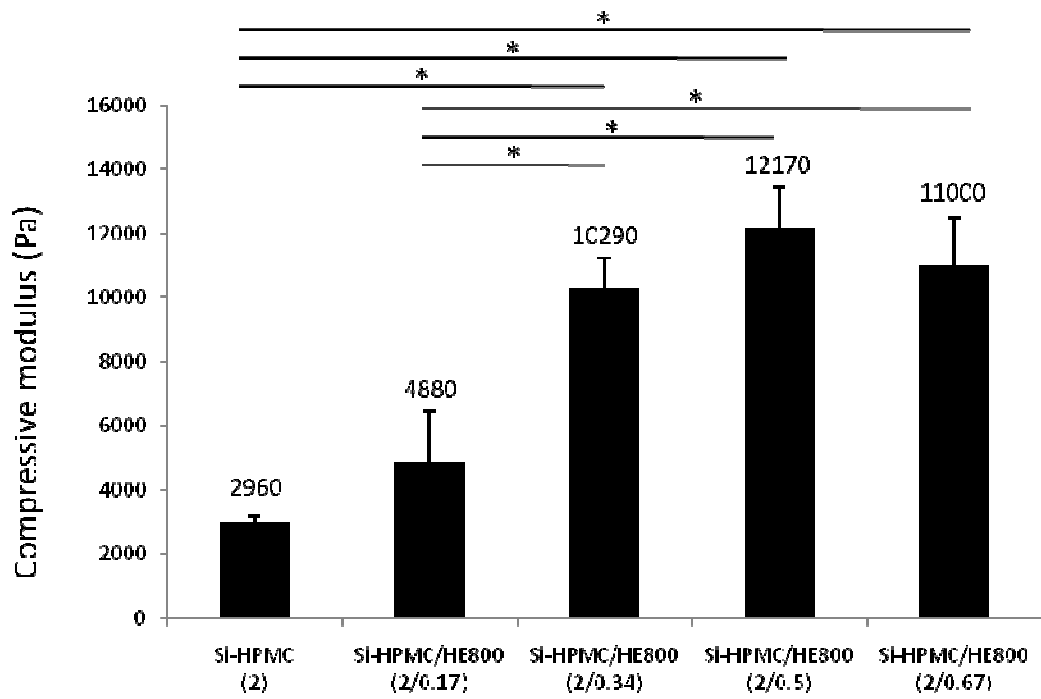
**Table 2**

	<b>Osmolarity (mOsm/L)</b>	<b>pH</b>	<b>Gel point (s)</b>
<b>Si-HPMC</b>	467	7.41	1000
<b>Si-HPMC/HE800 (2/0.67)</b>	455	7.39	821
<b>Si-HPMC/HA (2/0.67)</b>	465	7.39	<60
<b>Si-HPMC/GY785 (2/0.67)</b>	453	7.46	2002

Figure 1



(A)



(B)

**Figure 2**

Si-HPMC  
(2)

Si-HPMC/HE800  
(2/0.67)

Si-HPMC/HA  
(2/0.67)

Si-HPMC/GY785  
(2/0.67)

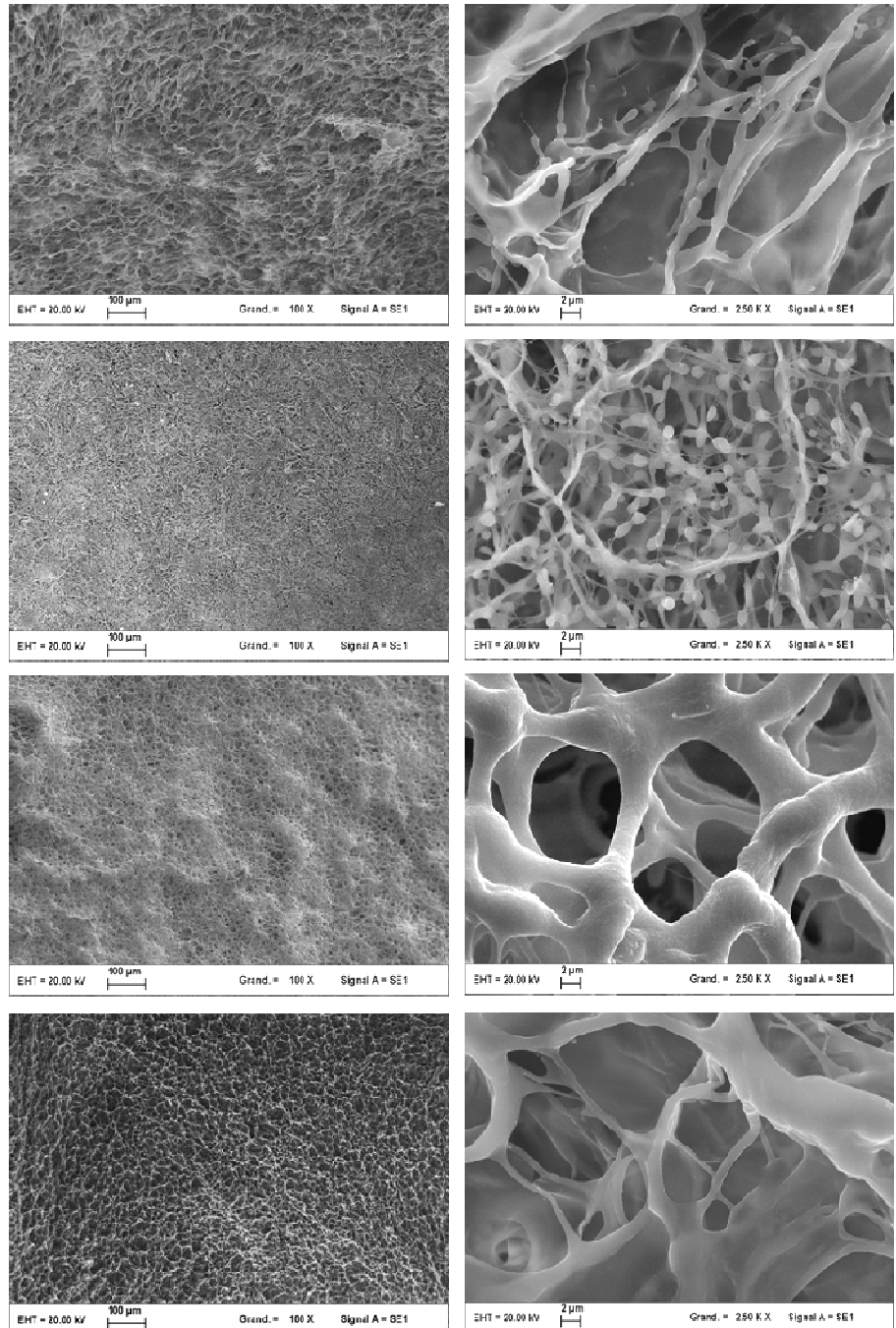


Figure 3

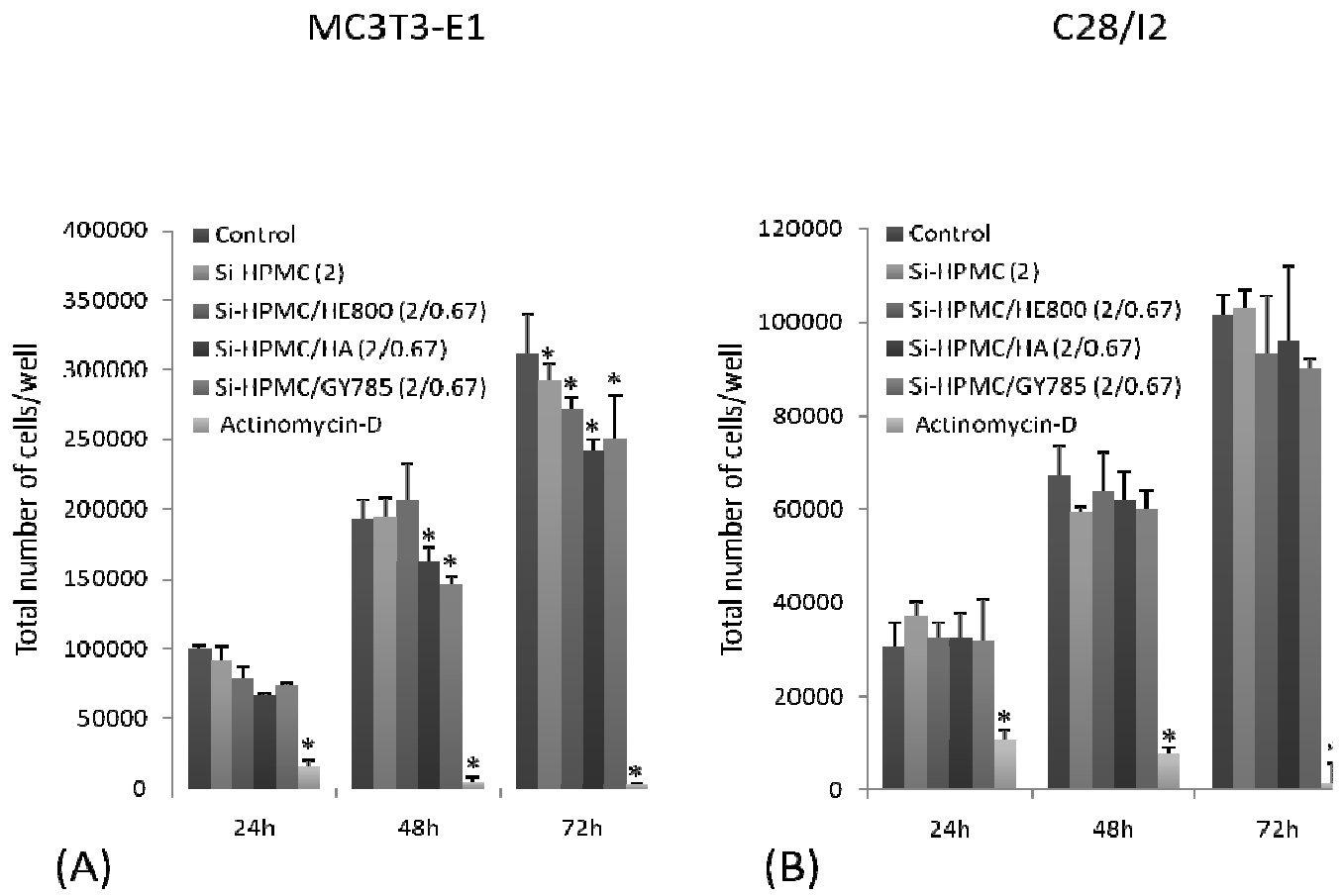
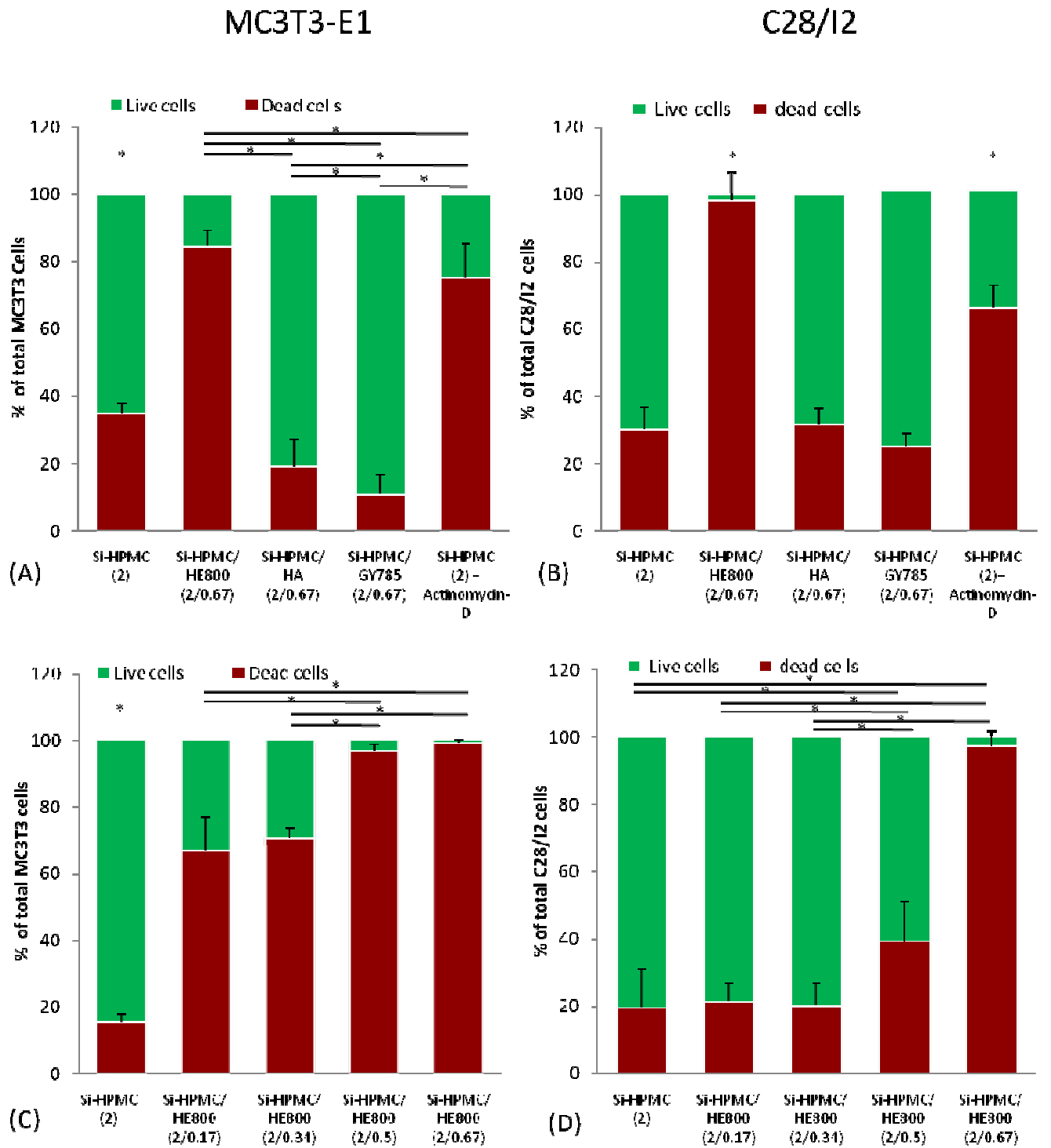


Figure 4





**Figure 5**




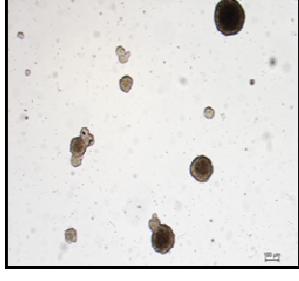
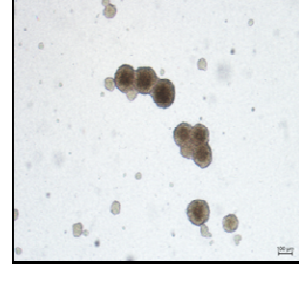
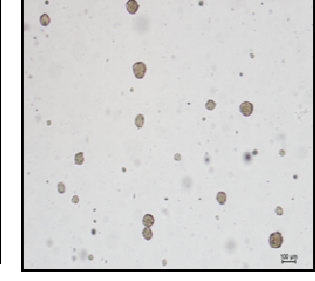
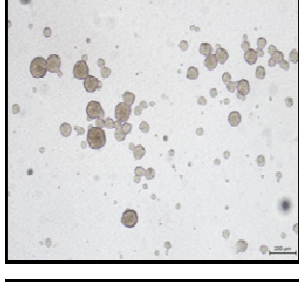
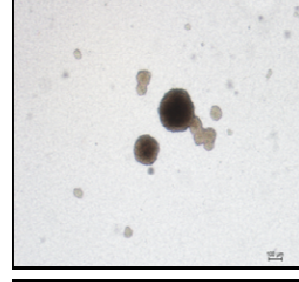
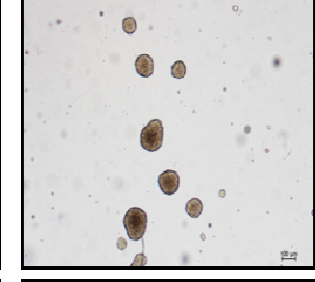
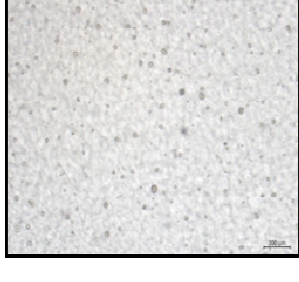
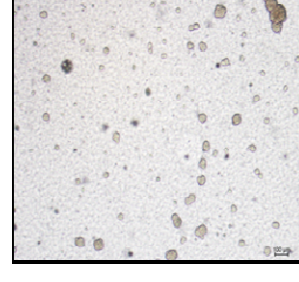
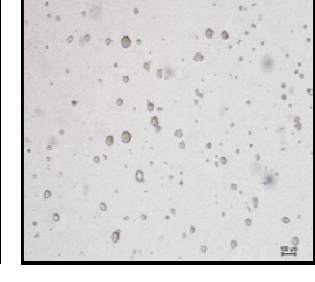
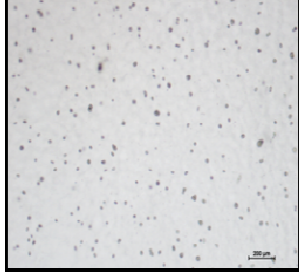
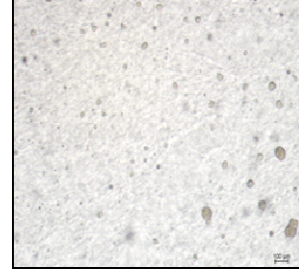
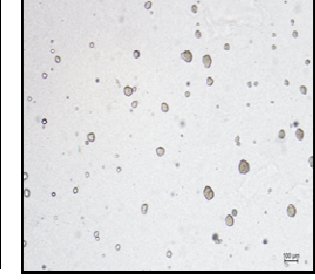
Polysaccharide Hydrogel	HE800	HA	GY785
Si-HPMC (2)			
Si-HPMC / polysaccharide (2/0.17)			
Si-HPMC/ polysaccharide (2/0.34)			
Si-HPMC/ polysaccharide (2/0.5)			
Si-HPMC/ polysaccharide (2/0.67)			

Figure 6

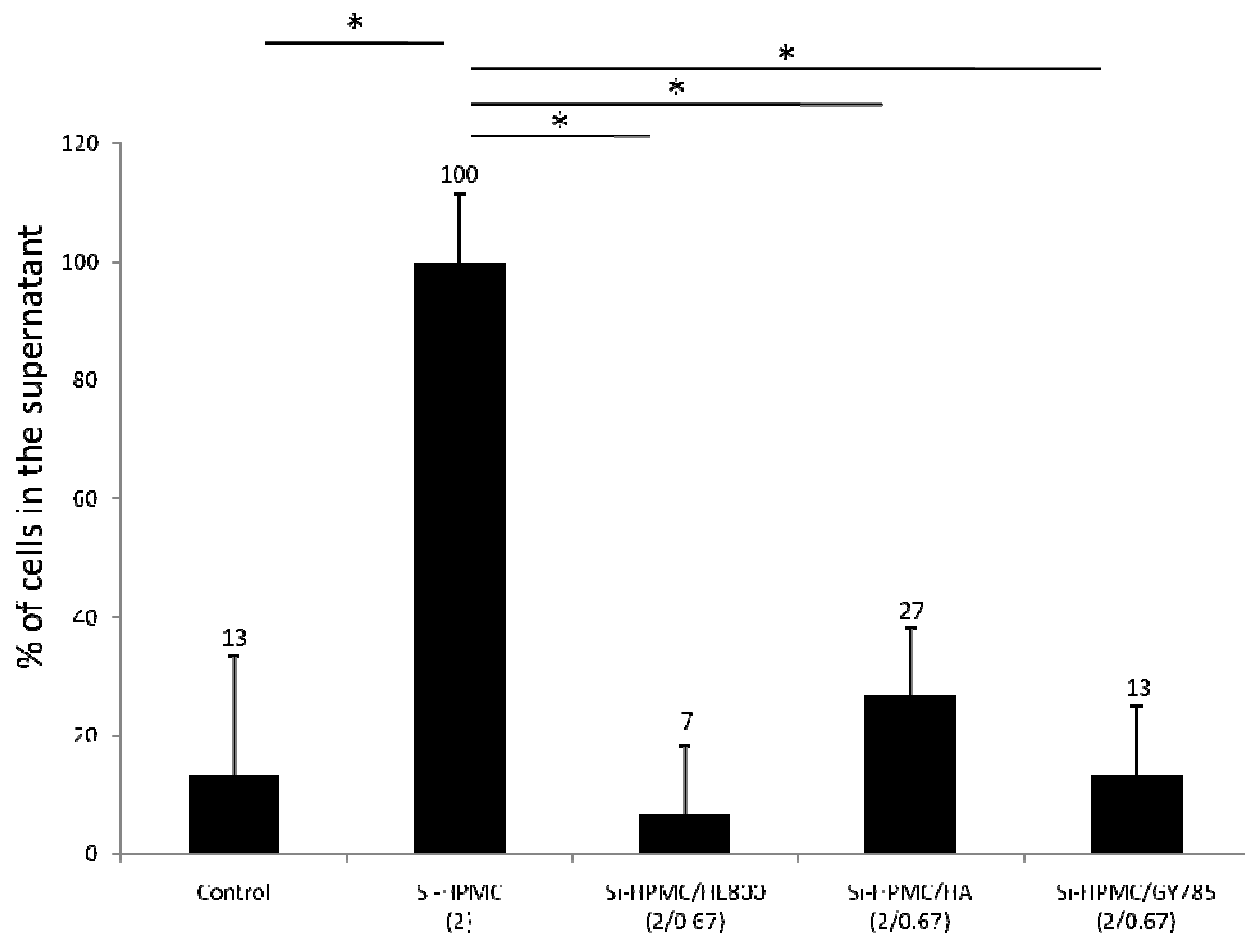
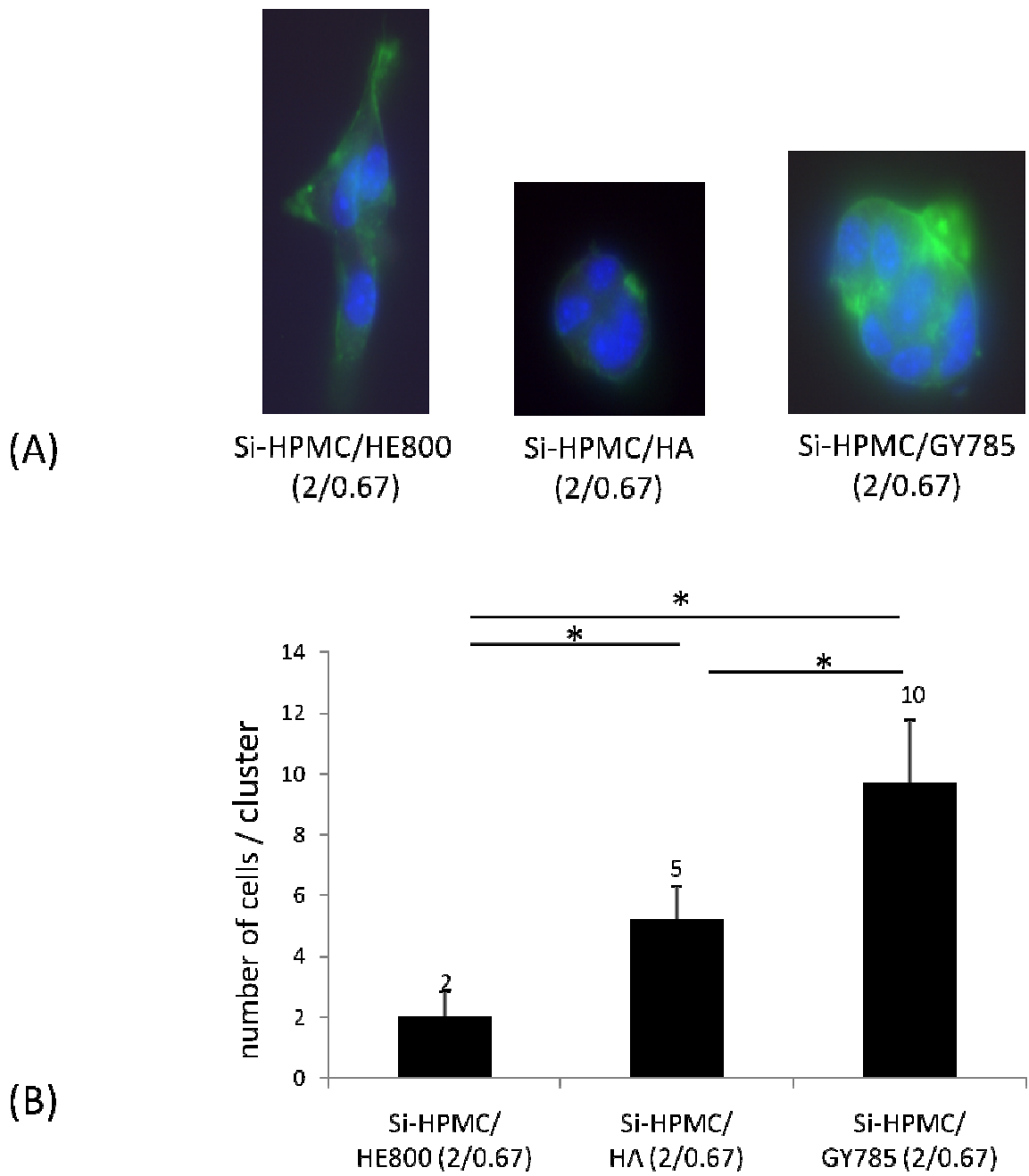


Figure 7



**Figure 8**

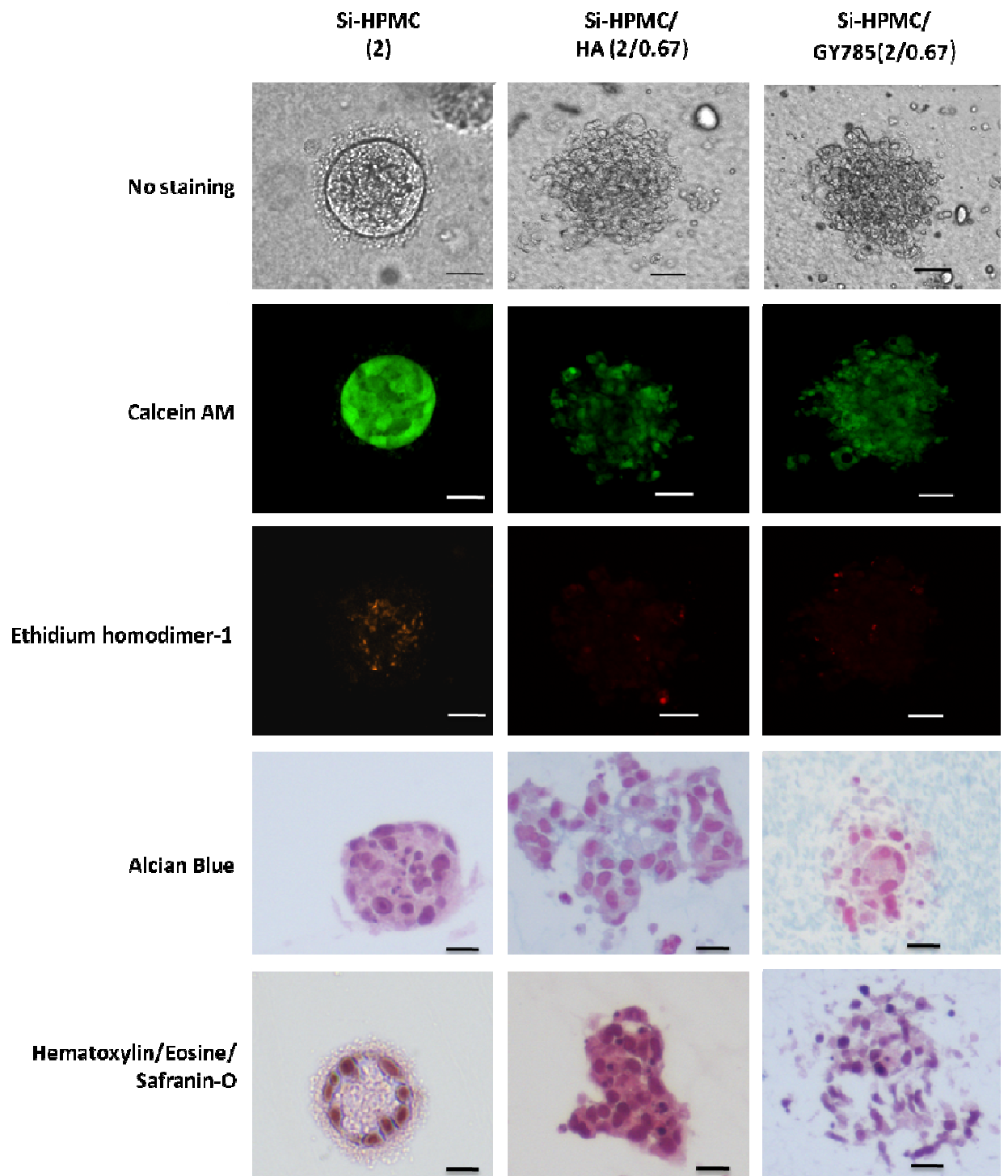
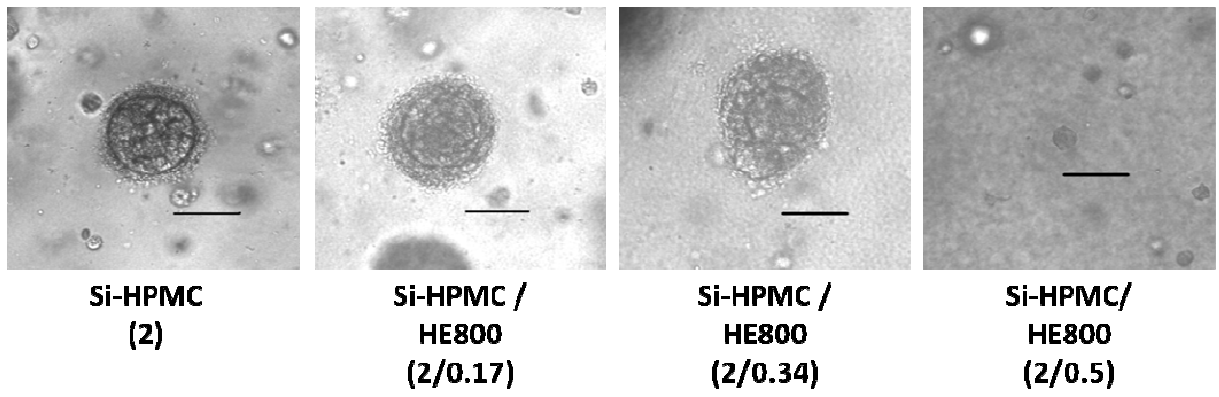
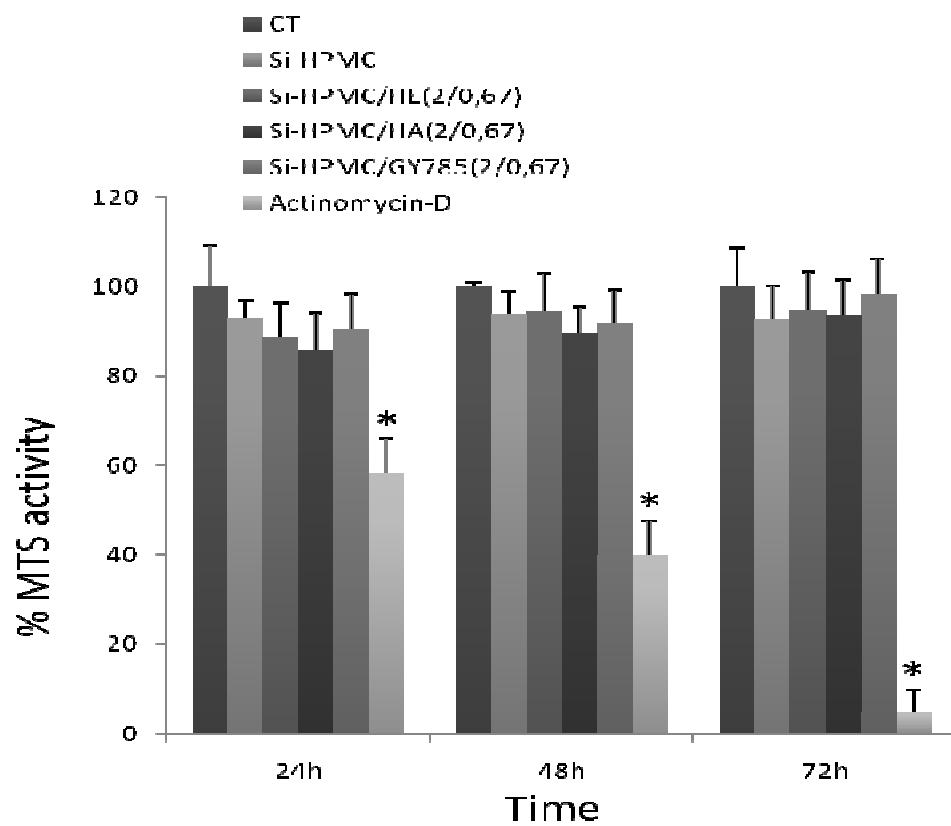
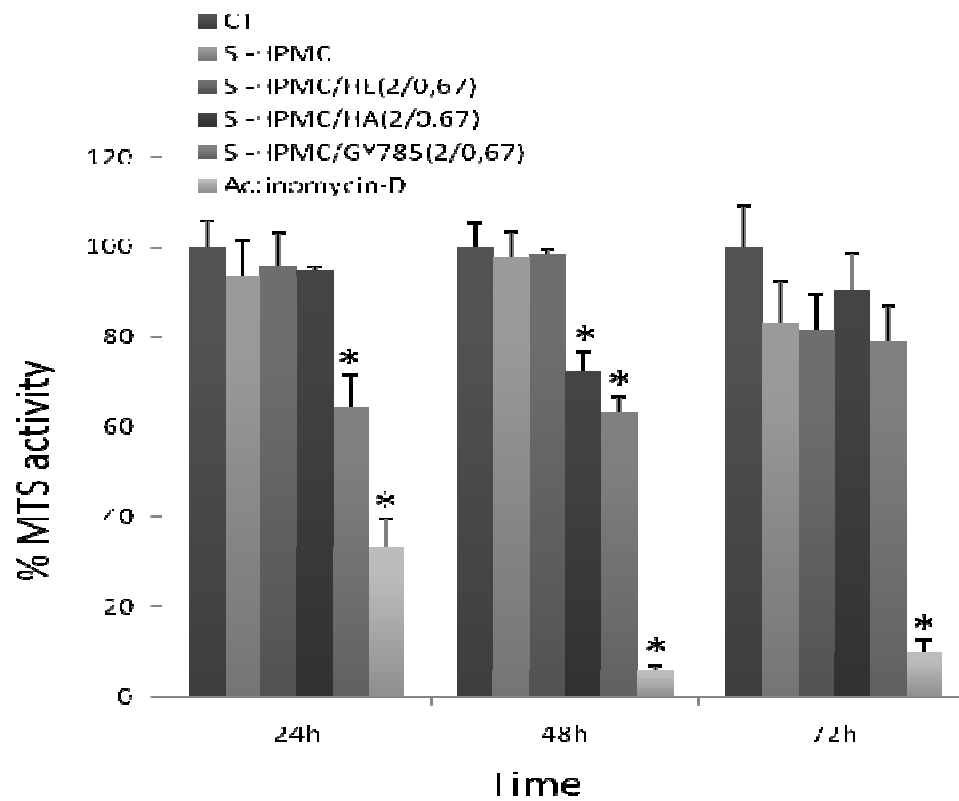
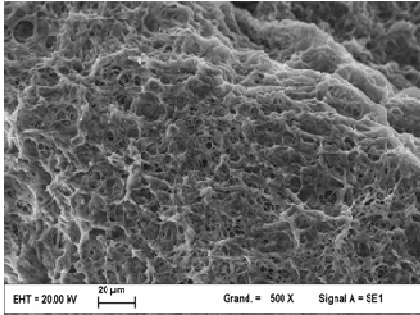


Figure 9

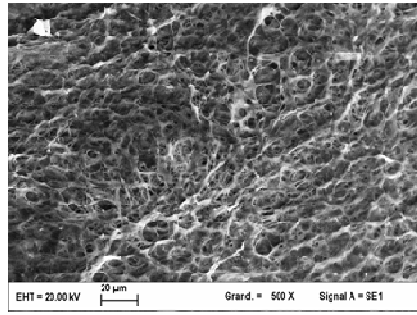


Supplementary data

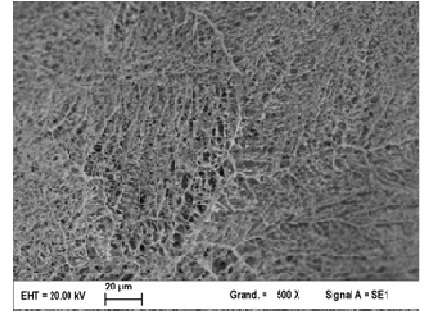




**Si-HPMC (2)**



**Si-HPMC/HE800  
(2/0.34)**



**Si-HPMC/HE800  
(2/0.67)**

### **III. Résultats, discussion**

Les résultats de ce chapitre montrent pour la première fois que l'ajout d'exopolysaccharides (EPS) marins HE800 et GY785 à un hydrogel d'hydroxypropyl méthyl cellulose silanisée (HPMC-Si), permet d'augmenter ses propriétés mécaniques, tout en induisant un attachement des ostéoblastes (MC3T3-E1) en deux dimensions, ainsi que la viabilité et une prolifération des chondrocytes (C28/I2) sous la forme de nodules en trois dimensions.

La première étape de notre travail a été de définir la meilleure façon d'associer les EPS marins HE800 et GY785 avec l'hydrogel d'HPMC-Si. L'hydrogel d'HPMC-Si est obtenu en associant une solution basique (pH=12,6) avec une solution tampon acide (pH=3.6). Les deux options envisagées ont ainsi été d'ajouter les EPS, soit à la solution basique, soit à la solution acide. La solubilisation des EPS dans la solution acide étant impossible, l'association des EPS à la solution basique a été préférée. La limite de solubilité des EPS dans la solution basique correspond à une concentration de 10 mg/mL. Cette concentration a ainsi été définie comme la concentration maximale de travail. L'ajout des EPS HE800 et GY785 à l'hydrogel d'HPMC-Si nous a permis de générer deux nouvelles matrices contenant 2% de cellulose et 0,67% d'EPS marins notés HPMC-Si/HE800 (2/0.67) et HPMC-Si/GY785 (2/0.67). Les études physico-chimiques et rhéologiques présentées dans l'article 2 ont confirmé que les hydrogels générés possédaient des caractéristiques d'osmolarité, de pH et de temps de gel en adéquation avec une application en ingénierie tissulaire. Les tests de compression mécanique ont ensuite confirmé une augmentation de la rigidité des hydrogels supplémentés en EPS marins HE800 et GY785.

Ces deux nouveaux hydrogels HPMC-Si/HE800 (2/0.67) et HPMC-Si/GY785 (2/0.67) présentent des propriétés mécaniques plus élevées que l'hydrogel d'HPMC-Si seul. La



deuxième étape de notre étude a été d'observer si la présence de 0,67% d'EPS HE800 ou GY785 induisait une modification du comportement cellulaire. Pour cela une lignée de chondrocytes (C28/I2) et une d'ostéoblastes (MC3T3-E1) ont été cultivées en deux dimensions (2D) à la surface des hydrogels ou en trois dimensions (3D) directement au sein des différents hydrogels. Les observations ont porté sur la viabilité, l'attachement et la morphologie cellulaire, ainsi que sur la capacité des hydrogels à permettre la formation de nodules cellulaires.

L'évaluation de la cytotoxicité constitue une des premières étapes de validation des biomatériaux destinés à une application biomédicale. En accord avec les normes ISO 10993, nous avons réalisé un test de cytotoxicité par contact direct entre les différents hydrogels et les cellules C28/I2 et MC3T3-E1 cultivées en 2D. La viabilité et la prolifération des deux lignées cellulaires n'ont pas été affectées par la présence des hydrogels d'HPMC-Si/HE800 et d'HPMC-Si/GY785. De nombreux types cellulaires, comme les ostéoblastes, nécessitent d'adhérer à leur substrat et de lier des ligands spécifiques dans leur environnement pour proliférer (158,264,265). Dans ce contexte, dans le cadre de l'ingénierie tissulaire osseuse, les matrices doivent être capables de fournir des sites permettant l'attachement et l'adhésion cellulaire. Nous avons souhaité évaluer en 2D la capacité des hydrogels d'HPMC-Si contenant les EPS HE800 ou GY785 à fournir des sites d'attachement cellulaire. Pour cela, des cellules MC3T3-E1 ont étéensemencées à la surface d'hydrogels contenant différentes concentrations en EPS marins. Il est décrit dans la littérature que l'attachement cellulaire est lié à plusieurs critères, dont la charge électrique et la rigidité de la surface. Un attachement cellulaire a été observé uniquement sur les hydrogels contenant les EPS HE800 et GY785 qui sont chargés négativement, contrairement à l'hydrogel d'HPMC-Si qui est neutre. Les polymères chargés négativement favorisent l'adsorption des protéines et les interactions ioniques avec les acides aminés cationiques (222,266,267). En ce sens il serait intéressant

d'explorer la capacité des EPS HE800 et GY785 à interagir avec des protéines et notamment des protéines impliquées dans l'adhésion, comme le CD44 par exemple, à l'aide d'expérimentations de résonance plasmonique de surface (BIAcore). Les résultats les plus intéressants en critère d'attachement cellulaire, d'homogénéité de répartition des cellules et de début d'étalement en 2D ont été observés avec les hydrogels contenant la concentration maximale d'EPS (0,67%) et plus particulièrement pour les hydrogels contenant l'EPS HE800.

Cependant, dans le cadre de l'ingénierie tissulaire, les cellules ne sont pas simplement en contact avec la matrice, mais cultivées directement en 3D au sein du biomatériau. Nous avons voulu savoir si, utilisés comme matrice tridimensionnelle, les hydrogels d'HPMC-Si/HE800 (2/0,67) et d'HPMC-Si/GY785 (2/0,67) présentaient en 3D les mêmes caractéristiques que celles observées en 2D. Grâce à un double marquage éthidium homodimer-1 et calcein am, nous avons montré que les chondrocytes de la lignée C28/I2 et les ostéoblastes de la lignée MC3T3-E1 étaient viables en culture 3D uniquement dans les hydrogels d'HPMC-Si/GY785 (2/0,67). Les cellules cultivées en 3D dans les hydrogels d'HPMC-Si/HE800 (2/0,67) présentent une mortalité cellulaire importante, alors qu'aucun effet n'avait été observé dans les études réalisées en 2D. Par conséquent, la mort cellulaire ne peut être due à une toxicité de l'EPS HE800. La rigidité élevée de la matrice ne peut être la cause de la forte mortalité, car les mêmes cellules cultivées dans une matrice présentant les mêmes propriétés mécaniques montrent un faible taux de mortalité. La mort cellulaire observée peut être liée à la structure interne de l'hydrogel et en particulier à l'organisation spatiale du HE800. Dans la littérature, la taille moyenne des pores des matrices constitue un point clé pour l'obtention de matériaux biologiquement compatibles (44). Les pores de la matrice doivent avoir une taille supérieure à 20  $\mu\text{m}$  et inférieure à 120  $\mu\text{m}$  pour permettre un attachement et une viabilité cellulaire. Dans notre étude, l'hydrogel d'HPMPC-Si ne constitue pas un support poreux ou macroporeux. Les cellules ne sont pasensemencées dans le matériau, mais directement encapsulées à l'intérieur

du réseau. Au sein de l'hydrogel, il existe uniquement des nanopores permettant la diffusion des gaz et des nutriments. Les observations des hydrogels d'HPMC-Si/HE800 (2/0,67) montrent une structure interne dense qui peut conduire à une faible perméabilité et par conséquent ralentir la diffusion des nutriments et des gaz. La concentration en EPS HE800 a ainsi été modifiée. Un hydrogel d'HPMC-Si à 2% contenant 0,34% d'EPS HE800 noté HPMC-Si/HE800 (2/0,34) présente une biocompatibilité avec la culture tridimensionnelle d'ostéoblastes et de chondrocytes avec des caractéristiques mécaniques supérieures à l'hydrogel d'HPMC-Si. Cependant en culture 3D, seules les cellules C28/I2, ont montré une organisation en nodules au sein des hydrogels d'HPMC-Si/HE800 (2/0,34) et d'HPMC-Si/GY785 (2/0,67). Les chondrocytes sont des cellules ne nécessitant pas une adhésion cellulaire. Les cellules MC3T3-E1 correspondant à une lignée ostéoblastique murine, comme beaucoup de types cellulaires, ces cellules nécessitent d'interagir avec leur environnement pour proliférer. Dans cette étude en 3D, les polysaccharides marins ne semblent pas fournir de sites d'adhésion même après trois semaines, car les cellules MC3T3-E1 gardent une morphologie ronde. Les C28/I2 s'organisent en nodules de morphologies différentes selon la composition de l'hydrogel. En effet, cultivées pendant trois semaines dans un hydrogel d'HPMC-Si seul ou supplémenté avec 0,34% d'EPS HE800, les chondrocytes C28/I2 adoptent une morphologie en nodules concentriques bien définis, contrairement aux cellules C28/I2 cultivées en trois dimensions dans un hydrogel d'HPMC-Si contenant 0,67% d'EPS GY785, qui présentent une morphologie en nodules beaucoup plus diffus et répartis dans l'hydrogel.

Pour conclure, l'étude en 2D nous indique que l'hydrogel d'HPMC-Si/HE800 (2/0,67) paraît intéressant pour la culture de cellules adhérentes et pourrait ainsi être utilisé sous la forme de patches. L'étude en 3D montre que les hydrogels d'HPMC-Si/HE800 (2/0,34) et

d'HPMC-Si/GY785 (2/0,67) présentent des propriétés compatibles avec la culture tridimensionnelle de cellules ne nécessitant pas une adhésion cellulaire.

**PARTIE IV :**  
**EXOPOLYSACCHARIDE GY785 ET**  
**INGENIERIE TISSULAIRE DU**  
**CARTILAGE**

## **I. Problématique**

L'extrémité des surfaces articulaires des os mobiles est recouverte d'une couche de cartilage articulaire, qui facilite le mouvement des articulations entre elles et permet d'absorber les chocs. Ces fonctions résultent de l'architecture unique de ce tissu composé d'un seul type cellulaire, le chondrocyte, enchâssé dans une matrice dense, riche en collagène de type II et en agrécane. Cependant, le cartilage possède une faible capacité de réparation spontanée due à sa non vascularisation et à la faible capacité de prolifération des cellules qui le composent (268,269). En conséquence, une blessure mineure peut être la cause de dégâts irréversibles menant à la dégénérescence progressive de ce tissu vers des lésions de type arthrosique (270). Les différentes stratégies chirurgicales développées pour la réparation des lésions cartilagineuses présentent de nombreuses limites (271,272). Dans ce contexte, l'ingénierie tissulaire combinant des cellules, une matrice et des agents bioactifs apparaît comme une bonne stratégie pour la réparation des lésions cartilagineuses (179,273,274).

Différents types de matrices à base de polymères naturels ou synthétiques ont été proposés pour une utilisation en ingénierie tissulaire du cartilage (151). La matrice extracellulaire joue un rôle important pendant le développement tissulaire avec une fonction structurale et informative (275). En conséquence, la matrice artificielle générée doit mimer la MEC d'un point de vue mécanique, structurel et biofonctionnel (154,165). Les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire de ce tissu semblent jouer un rôle important dans son développement et sa régénération. En effet, de nombreuses études ont montré que la fonction cellulaire des chondrocytes diffère selon leur mode de culture (276-278). Une culture en deux dimensions entraîne une perte progressive du phénotype chondrocytaire (dédifférenciation), alors qu'une culture en trois dimensions permet de prévenir ce phénomène voire au contraire de rétablir un phénotype chondrocytaire (redifférenciation) (279,280). La structure et

l'environnement mécanique semblent ainsi jouer un rôle clé dans le développement et la réparation de ce tissu.

Un grand intérêt est porté aux polymères d'origine naturelle comme le chitosane, les alginates ou les glycosaminoglycanes pour la réalisation de matrices artificielles tri dimensionnelles en ingénierie tissulaire du cartilage (127,161). En effet, de par leur composition et leur structure, ils contiennent de nombreux éléments reconnus par les cellules. Aujourd'hui la médecine régénérative s'oriente vers le développement de techniques de moins en moins invasives dans le but de réduire la morbidité et la durée d'hospitalisation. Dans ce contexte, les hydrogels de par leur nature injectable et hydrophile constituent un type de matériaux de choix pour des applications en ingénierie tissulaire du cartilage. Le principal défi dans le développement de nouveaux hydrogels est de permettre la viabilité des chondrocytes, leur prolifération et leur différenciation au sein de l'hydrogel tout en fournissant un support mécanique convenable. Cependant, l'une des difficultés à travailler avec des hydrogels à base de polysaccharides d'origine naturelle réside dans le fait qu'ils présentent de faibles propriétés mécaniques.

Dans l'intention de proposer un échafaudage en trois dimensions capable de soutenir mécaniquement et biologiquement la régénération du cartilage, nous avons mis au point dans le chapitre précédent un nouvel hydrogel à base d'hydroxypropyl-méthyl cellulose silanisé (2% en masse) et d'EPS marin GY785 (0,67% en masse). Les résultats des travaux de l'article 2 ont montré que cet hydrogel d'HPMC-Si/GY785 (2/0,67%) possédait des propriétés mécaniques plus élevées que l'hydrogel d'HPMC-Si seul. Ces résultats nous ont suggéré que cet hydrogel présentait des propriétés physiques intéressantes pour une utilisation possible sous la forme de matrice pour l'ingénierie tissulaire. Dans cette seconde étude nous allons déterminer si ce nouvel hydrogel d'HPMC-Si/GY785 possède les propriétés biologiques nécessaires à son utilisation comme matrice extracellulaire artificielle pour la culture

tridimensionnelle de chondrocytes dans le cadre de l'ingénierie tissulaire du cartilage. Notre objectif fut dans un premier temps de vérifier la biocompatibilité de notre hydrogel d'HPMC-Si/GY785 vis-à-vis de chondrocytes articulaires primaires de lapin. Nous avons ensuite déterminé la capacité de cet hydrogel à maintenir ou à rétablir un phénotype chondrocytaire en culture tridimensionnelle ainsi que sa capacité à former un tissu cartilagineux *in vitro* et *in vivo* lorsqu'il est associé avec des chondrocytes articulaires de lapin et des chondrocytes nasaux de cheval.



## II. Résumé

### **Article 3 Un hydrogel auto réticulant enrichi d'un exopolysaccharide d'origine marine comme matrice pour l'ingénierie tissulaire du cartilage**

Afin de développer un hydrogel compétent biologiquement et mécaniquement pour l'ingénierie tissulaire du cartilage, les propriétés mécaniques d'un hydrogel à base de dérivés de cellulose silanisé (HPMC-Si) ont été augmentées en ajoutant 0,67% d'un exopolysaccharide (EPS) marin GY785. Dans ce contexte, l'objectif de notre étude a été d'évaluer (i) la capacité de ce nouvel hydrogel d'HPMC-Si/GY785 à maintenir et à rétablir un phénotype chondrocytaire et (ii) le potentiel de cet hydrogel d'HPMC-Si/GY785 associé à des chondrocytes articulaires de lapin (RAC) à former un tissu cartilagineux *in vivo*. Des RAC (passage 0) ou dédifférenciés (passage 2) ont été cultivés en trois dimensions dans un hydrogel d'HPMC-Si/GY785 pendant 3 et 4 semaines. L'analyse phénotypique par PCR en temps réel ainsi que des colorations histologiques indiquent que les chondrocytes cultivés en trois dimensions dans l'hydrogel de HPMC-Si/GY785 expriment les transcrits codant pour le collagène de type II et l'agrécan et produisent des glycosaminoglycanes (GAG) sulfatés. De plus, l'analyse histologique d'implants constitués de l'hydrogel d'HPMC-Si/GY785 associé à des RAC en sites sous cutanés chez la souris *nude*, montre après 3 semaines la formation d'un tissu cartilagineux avec une matrice riche en GAG et en collagène de type II. Ces résultats indiquent que l'hydrogel d'HPMC-Si/GY785 apparaît comme une matrice biologiquement compétente pour la culture tridimensionnelle de chondrocytes et semble prometteuse pour une application en ingénierie tissulaire du cartilage.

# **A Self-setting Hydrogel Mechanically Reinforced with a marine Exopolysaccharide as a Scaffold for Cartilage Tissue Engineering**

E. Rederstorff<sup>1,2</sup>, P. Weiss<sup>1</sup>, S. Sourice<sup>1</sup>, M. Masson<sup>1</sup>, Samia Laib<sup>1</sup>, S. Collic-Jouault<sup>2</sup>, B.  
H. Fellah<sup>1</sup>, J. Guicheux<sup>1\*</sup>, C. Vinatier<sup>1,3</sup>.

<sup>1</sup> *INSERM UMRS 791 group STEP, University of Nantes, Laboratory of Osteo-Articular and Dental Tissue Engineering, School of Dental Surgery, 1 place Alexis ricordeau, 44042 Nantes cedex 1, France*

<sup>2</sup> *French Research Institute for Exploitation of the Sea, Laboratory of Biotechnology and Marine Molecules, Rue de l'Ille d'Yeu BP 21105, 44311 Nantes Cedex 03, France*

<sup>3</sup> *GRAFTYS SA, Eiffel Park, Bâtiment D, 415 rue Claude Nicolas Ledoux, Pôle d'activités d'Aix en Provence, 13854 Aix en Provence Cedex 3, France.*

**\*Corresponding author:** Jerome Guicheux

**Email address:** [jerome.guicheux@inserm.fr](mailto:jerome.guicheux@inserm.fr)

**Keywords:** Cartilage, Hydrogel, Glycosaminoglycan, Chondrocytes, Tissue engineering

## Abstract

Polysaccharides-based hydrogels such as chitosan, alginate or glycosaminoglycans (GAG) derivatives have been widely used as 3D scaffolds for cartilage tissue engineering. However none of them showed both mechanical and biological adequate properties. To develop a biomechanically and biologically competent hydrogel for cartilage tissue engineering, a cellulose-based hydrogel (Si-HPMC) was reinforced with a marine polysaccharide. In a previous work, we have shown that GY785-doping has improved the mechanical properties of the Si-HPMC. Therefore, the aims of the present work were (i) to investigate the ability of this Si-HPMC/GY785 to allow the maintenance and the recovery of a chondrocytic phenotype and (ii) to evaluate the potential of this Si-HPMC/GY785 associated with chondrocytes to form a cartilaginous tissue *in vivo*. Primary rabbit articular chondrocytes (RAC) or dedifferentiated RAC were cultured in 3D within Si-HPMC/GY785 for 3 weeks. The chondrocytic phenotype was investigated by real-time PCR (agrecan, type I and II collagen), alcian blue staining (sulphated GAG) and immunostaining (type II collagen). Finally, the ability of Si-HPMC/GY785 to form a cartilaginous tissue was investigated by *in vivo* transplantation of RAC and equine nasal chondrocytes (EqNC) with Si-HPMC/GY785 subcutaneously in *nude* mice. After 3 weeks, implants were histologically characterized to determine the presence of sulphated GAG and collagen. Our results showed that primary RAC 3D-cultured within Si-HPMC/GY785 express typical chondrocytic markers (type II collagen and agrecan) after 3 weeks. In addition, these cells also produced an extracellular matrix (ECM) containing sulphated GAG and type II collagen. When dedifferentiated RAC were replaced in 3D within Si-HPMC/GY785 the expression of chondrocytes markers (type II collagen and agrecan) were recovered and type I collagen expression was decreased. Finally, histological analysis of hybrid constructs transplanted in *nude* mice revealed the production of a cartilage-like ECM containing sulphated GAG and type II collagen. These results indicate

that mechanically GY785-reinforced Si-HPMC appears as a promising hydrogel for cartilage tissue engineering.

## **Introduction**

Articular cartilage (AC) is an avascular connective tissue containing a unique cell type, the chondrocyte, which synthesized an abundant extracellular matrix (ECM) (1, 2). This ECM is composed of mainly type II collagen and aggrecan contributing respectively to tensile strength and resistance to compression of AC (3, 4). AC unfortunately exhibits poor capacity for self-repair (5, 6), injuries of articular cartilage are thus irreversible and may lead to long-term joint degeneration (7).

In that circumstance, cell-based therapies for the regeneration of AC have been explored. Autologous chondrocyte transplantation (ACT) has initially been used to treat full-thickness chondral defects(8). Nevertheless, this technique suffers from limitations such as low number of cells obtained through the biopsy, donor site morbidity and the dedifferentiation of chondrocytes towards a fibroblastic phenotype during the monolayer amplificative culture (9).

To overcome these limitations, tissue engineering has emerged as a new method involving the combination of cells, scaffolds and bioactive agents to build functional new tissue in order to replace damaged cartilage (10-13).

The ideal scaffold material for cartilage tissue engineering should be one which closely mimics the natural cartilage environment in a structural, mechanical and biofunctional way (14-17). Several studies have demonstrated that chondrocyte functions differ in 2D and 3D systems (18-22) with a progressive dedifferentiation of chondrocytes in 2D culture and a prevention of this phenomenon by a 3D culture (22, 23). Taken into account that articular cartilage is a highly stressed tissue, to structurally mimic the environments of the cartilage tissue, the fundamental structure of a scaffold should therefore be a 3D system with adequate mechanical strength.

Due to their structure incorporating many of the cues needed by cells, a great number of different natural polymers have been studied and proposed for the preparation of scaffolds for cartilage such as collagen, fibrin, chitosan, hyaluronic acid, alginate and cellulose (24-26). Unfortunately, no scaffold made of these polymers or combination of them have so far been ideal materials for cartilage tissue engineering, lacking from an adequate combination of mechanical and biological properties. In that context, an injectable and self-setting silylated hydroxypropyl methylcellulose (Si-HPMC) based hydrogel has been previously developed (27, 28) and described as a suitable matrix for the 3D culture of chondrocytes *in vitro* (29) and the repair of articular cartilage *in vivo* (30). However, in spite of good biological characteristics, this scaffold suffers from weak mechanical properties. In order to develop a biomechanically and biologically competent hydrogel for cartilage tissue engineering this Si-HPMC scaffold was reinforced with 0.67% of a marine polysaccharide GY785. The aims of the present work were to investigate whether this new scaffold Si-HPMC/GY785 could be used for engineering cartilage. In this attempt, we first assessed the cytocompatibility of this Si-HPMC/GY785 towards articular chondrocytes. Secondly, its ability to allow the maintenance and the recovery of a chondrocytic phenotype were evaluated. Finally, the potential of Si-HPMC/GY785 associated with chondrocytes to produce cartilaginous matrix *in vivo* was evaluated in subcutaneous pocket of *nude* mice.

## **2. Materials and Methods**

### *2.1. Materials*

Hydroxypropyl methylcellulose (Si-HPMC) E4M<sup>®</sup> was purchased from Colorcon-Down chemical (Bougival, France). 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane (GPTMS) was obtained from Sigma-Aldrich (France). GY785 EPS was produced by Seadev-FermenSys SAS

(Plouzané, France). GY785 EPS was then sterilized by ethylene oxide by IONISOS (Gien, France). Hyaluronidase, actinomycin-D, trypsin/EDTA, type II collagenase (290 units/mg), HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic) and isopropanol were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, USA). Hank's Balanced sodium salt (HBSS), DMEM 4.5 G/l glucose), penicillin/streptomycin, L-glutamine, Trizol<sup>®</sup>, DNase I and Taq DNA polymerase were obtained from Invitrogen corporation (Paisley, UK). Methyl Tetrazolium Salt (MTS) was purchased from promega (USA). Live and dead viability/cytotoxicity kit assay was obtained from Invitrogen. Fetal calf serum (FCS) was from Dominique Dutscher (Brumath, France). Cell culture plastics were purchased from Corning (VWR, France). New Zealand rabbits were obtained from Grimaud frères (Roussay, France). Monoclonal antibody against collagen type II was purchased from Oncogene (San Diego, United States). All other chemicals were from standard laboratory suppliers and were of the highest purity available.

## *2.2. Preparation of Si-HPMC/GY785 hydrogel*

The synthesis of Si-HPMC was performed by grafting 0.5% of silicium in weight on HPMC (E4M<sup>®</sup>) heterogeneous medium, as previously described (27). Si-HPMC powder (3%, w/v) was solubilized in 0.2M NaOH under constant stirring for 48h. The solution was then sterilized by steam (121°C, 30 min). For the production of Si-HPMC/GY785, sterile GY785 polysaccharide was mixed with the sterile Si-HPMC (3% w/v) basic solution at the concentration of 10 mg/mL (1% w/v) within Si-HPMC. The resulting Si-HPMC/GY785 (3%/1% w/v) mixture was left under mild rotatory stirring during 12h to dissolve GY785. To allow the formation of a reticulated hydrogel, 1 volume of Si-HPMC(3% w/v) or Si-HPMC/GY785(3%/1% w/v) solution was mixed with 0.5 volume of 0.26 M HEPES buffer as previously described (29) (31). Final products consist in hydrogels (PH=7.4) containing Si-HPMC (2% w/v) with or without GY785 (0.67% w/v) respectively named Si-HPMC and Si-HPMC/GY785. In the same manner, a hydrogel was done with HPMC in order to obtain a Si-

HPMC/HPMC (2/0.67) hydrogel used as a control of macromolecular incorporation in the rheological experiments.

### *2.3. Rheological characteristics*

One ml of Si-HPMC or Si-HPMC/GY785 or Si-HPMC/HPMC were allowed to reticulate in well of 12-well plates. As a control of GY785 addition, a Si-HPMC/HPMC (2/0.67) hydrogel was also produced. Samples were incubated at 37°C for 1h before adding 2 ml of DMEM supplemented with 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin and 1% L-glutamine (culture medium). The plates were maintained at 37°C in a humidified atmosphere and with medium change every 2 days. After 3 weeks, oscillatory measurements were performed at 25°C on different Si-HPMC, Si-HPMC/GY785 or Si-HPMC/HPMC using the Haake MARS rheometer (ThermoHaake<sup>®</sup>, Germany) with a titanium plate geometry (20 mm diameter (PP20 Ti), plate with 3mm gap) with a homemade device for direct measurement inside the 12-well plates. We applied a 0.2 N normal force on the hydrogels before the measurements. The complex viscosity ( $\eta^*$ ) was determined as a function of stress under conditions of linear viscoelastic response in the range from 0.1 to 5 Pa, at a constant oscillation frequency ( $\omega$ ) (1 Htz). The storage ( $G'$ ) and loss ( $G''$ ) moduli were measured within the linear viscoelastic region.

### *2.4 Animals and Surgical Procedures*

All animal handling and surgical procedures were conducted according to European Community guidelines for the care and use of laboratory animals (DE 86/609/CEE). Experiments were performed according to Good Laboratory Practices (GLP) at the Experimental Therapeutics Unit of the University of Nantes.



### *2.5 Isolation of rabbit articular chondrocytes (RAC) and equine nasal chondrocytes (EqNC)*

For the isolation of rabbit articular chondrocytes (RAC), five week old New Zealand white rabbits were killed after general anesthesia. The shoulders, the knee and the femoral heads were dissected out under sterile condition prior to isolate cartilage and describe previously (32). Equine nasal chondrocytes (EqNC) were obtained from horses undergoing arthroscopic surgery. Briefly, under general anesthesia, 5 discs (8 mm in diameter) of equine nasal septum were harvested with 8 mm biopsy punch as described previously (33).

For both RAC and EqNC, the cartilage was removed, cut into small slices and digested at 37°C with 0.05% hyaluronidase in HBSS for 10 min, then with 0.2% trypsin for 15 min and with 0.2% type II collagenase for 30 min. Finally, slices were digested overnight at 37°C in 0.03% collagenase in DMEM. The suspended RAC or EqNC were plated (P0) at a density of  $5.10^4$  cells/cm<sup>2</sup> in 75cm<sup>2</sup> culture flask and cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, 1% penicillin/streptomycin and 1% L-glutamine (culture medium). The cells were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sup>2</sup> and the culture medium was changed every 2-3 days. The cells (P0) were grown until 80% confluent and then detached from the culture flask using trypsin/EDTA, counted and re-seeded at  $1.10^4$  cells/cm<sup>2</sup> (P1). Cultured RAC were passaged up to four times. RAC from passage 1, 3 and 4 were frozen in Trizol<sup>®</sup> for subsequent real-time PCR analysis.

### *2.6. Cytocompatibility of Si-HPMC/GY785 hydrogel*

Cellular viability was measured using an MTS assay as previously described (29). Briefly RAC were allowed to attach in 24-well plates at a final density of  $1.10^4$  cells/cm<sup>2</sup>. After 24h, culture medium was removed and 500µl of Si-HPMC/GY785 were added in each well. Samples were incubated at 37°C for 1h before adding 1 mL of culture medium. As a control,

RAC were also cultured in the absence of Si-HPMC/GY785 and Si-HPMC (plastic) or in the presence of actinomycin-D ( $5\mu\text{g}/\text{mL}$ ), an inhibitor of RNA polymerase (30), which was used as a potent inducer of cell death. After 1, 2, and 3 days, hydrogels and culture media were removed and MTS solution was added in each well for 1-3h according to the manufacturer's instructions. Finally colorimetric measurement of formazan dye was performed on a spectrophotometer with an optical density reading at 490 nm. Results were expressed as relative MTS activity as compared to control condition (cells cultured in the absence of Si-HPMC/GY785 and Si/HPMC).

Cell proliferation was evaluated by Trypan blue exclusion dye experiments in conditions as described above. After each indicated time, hydrogel and culture medium were removed and the cells were detached by adding trypsin/EDTA for 2 min. The suspended cells were transferred into fresh culture medium and counted with Trypan blue staining that colours dead cells in blue. Results were expressed as the total number of living cells per well.

### *2.7. Three-Dimensional Culture of rabbit articular chondrocytes (RAC)*

RAC (freshly isolated or dedifferentiated (P2)) were gently mixed with Si-HPMC/GY785 or Si-HPMC hydrogel (prepared as described previously), at a density of  $1.10^6$  cells/mL. Hybrid constructs were then seeded in 12-well plates (1.5 mL/wells) and incubated at  $37^\circ\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ . After 1h incubation, 2 mL of culture medium was added in each well and changed every 2-3 days. After 3 weeks the cellular viability, the production of sulphated glycosaminoglycans (GAG) and type II collagen, and the phenotype of RAC were evaluated.

Cellular viability in three-dimensional culture was visualized using live and dead cytotoxic assay according to manufacturer's instructions. Briefly, in each well, the culture medium was replaced by 200 $\mu\text{l}$  of a live/dead solution of calcein-AM ( $2\mu\text{M}$ ) and ethidium homodimer-1 ( $4\mu\text{M}$ ) in DMEM. After 5 to 10 min, the dye mixture was removed and the

hydrogels were intensively rinsed with phosphate buffered saline. The imaging of RAC was performed using a confocal laser-scanning microscope (Nikon D-eclipse C1).

Hybrid constructs associating RAC and hydrogels at 3 and 5 weeks were fixed in formol over 1h and embedded within 2% agarose solution before embedding in paraffin. Serial sections of each paraffin block (5 $\mu$ m thickness) were made and process for histological staining with alcian blue and immunostained for type II collagen. For immunohistochemistry anti-rabbit type II collagen (1/100) was used. Briefly 5 $\mu$ m thick paraffin sections were mounted, deparaffinized, rehydrated and rinsed in distilled water. Tissue sections were subjected to epitope retrieval with a pre-treatment with trypsin at room temperature. Tissue sections were incubated with primary antibody at room temperature for 30 min. This was followed by sequential incubation with biotinylated link antibody for 15 min and streptavidin labelled with peroxidase for 15 min. Immunopositive cells showed brown staining with type II collagen antibody.

For the real-time PCR analysis, total RNA was extracted using trizol<sup>®</sup> reagent according to the manufacturer's instructions. After DNase I digestion, RNA was quantified using a UV-spectrophotometer (Nanodrop NND-1000, Labtech, France). One microgram of RNA per samples was reverse-transcribed using the superscript III kit in a total volume of 20 $\mu$ L. Complementary DNA (cDNA) was amplified in a total volume of 25 $\mu$ L PCR reaction mix containing 12.5 $\mu$ L of Brilliant<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix (1X) and 30nM of SYBR green reference dye. The sequence and concentration of each primer set are provided in Table 1. The real time polymerase chain reaction was carried out in a MX3000P<sup>®</sup> real-time PCR system (Stratagene) under the following conditions: 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 30 s at 60°C and 30 s at 72°C as previously decribed(34). The efficiency and specificity of each primer set was confirmed with standard curves of cycle threshold (Ct) values versus serial dilution of total RNA and melting profile evaluation. Cycle thresholds were normalized

to GAPDH to control for cDNA differences. Results are reported as fold change in gene expression relative to control conditions.

## 2.8 *In vivo tissue formation*

### 2.8.1 *Implantation*

To investigate whether constructs associating RAC or EqNC with Si-HPMC/GY785 or Si-HPMC enable the formation of a cartilaginous tissue *in vivo*, constructs were implanted into subcutaneous pockets of 4 weeks old nude mice (Swiss *nude* mice, Janvier, France).  $5 \cdot 10^5$  freshly isolated RAC or EqNC were gently mixed with 250 $\mu$ L of Si-HPMC/GY785 or Si-HPMC hydrogel prior its reticulation and implanted subcutaneously into nude mice as previously described (30). Si-HPMC/GY785 and Si-HPMC without cells was also implanted and used as a negative control. Each condition was tested in quadruplicate and 12 animals were implanted (2 implants per animal). After 3 weeks, mice were sacrificed and implants were recovered and processed histologically.

### 2.8.2 *Histological and immunohistochemical analyses*

Constructs samples recovered from *nude* mice were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Paraffin sections (5 $\mu$ m thick) were deparaffinized using toluene, rehydrated through a graded series of ethanol, and rinsed in distilled water. For each sample, two tissue sections were stained with Alcian Blue and immunostained for type II collagen. Samples were visualized using a light microscope (Zeiss Axioplan 2, Göttingen, Germany).

## 2.9. *Statistical analysis*

Results are expressed as mean  $\pm$  SEM of triplicate determinations. The comparative studies of means were performed by using one-way ANOVA followed by a post hoc test with a statistical significance at  $p < 0.001$ .

### 3. Results

#### 3.1. Rheological Characteristics

To evaluate the effect of GY785 addition on the viscoelastic properties of Si-HPMC, an oscillatory measurement allowing to evaluate the elastic modulus ( $G'$ ) and the viscous modulus ( $G''$ ) was performed. The Si-HPMC/GY785 has a  $G'$  about 723  $\pm$  171 Pa and a  $G''$  about 96  $\pm$  37 Pa. Si-HPMC and Si-HPMC/HPMC exhibited the same  $G'$  with values about 398  $\pm$  65 Pa and 324  $\pm$  52 Pa and  $G''$  about 28  $\pm$  6 Pa and 22  $\pm$  5 Pa respectively.

These results indicate that Si-HPMC/GY785 hydrogel has higher rigidity than Si-HPMC and Si-HPMC/HPMC whereas Si-HPMC and Si-HPMC/HPMC exhibit similar rigidity.

#### 3.2 Cytocompatibility of Si-HPMC/GY785 hydrogels towards Rabbit Articular Chondrocytes (RAC)

To determine whether Si-HPMC/GY785 hydrogel was not cytotoxic, the viability and the proliferation of primary rabbit articular chondrocytes (RAC) cultured in contact with Si-HPMC/GY785 was examined through a measurement of MTS activity and cell counting after 24, 48 and 72h of culture. Si-HPMC hydrogel was used as a positive control. The results (Fig. 2 A) show that Si-HPMC and Si-HPMC/GY785 did not affect MTS activity of RAC at 24h. After 48h of culture, the presence of Si-HPMC and Si-HPMC/GY785 slightly reduced the MTS activity of RAC by respectively 20 and 30%. However, after 72h there was no significant difference between the MTS activity of RAC cultured in the presence or in the absence of the two different hydrogels. On the contrary, actinomycin-D treatment reduced the MTS activity of RAC by nearly 70% as early as 24h of treatment.

Cell counting experiments (fig 2 B) exhibits similar results. Indeed, after 72h no significant difference in cell number was observed between cells cultured in contact with Si-HPMC/GY785 and cells cultured in control condition or in contact with Si-HPMC alone.

Considered together, these results indicate that Si-HPMC/GY785 has no adverse effects on RAC viability and proliferation.

To investigate the 3 dimensional cytocompatibility of Si-HPMC/GY785, the viability of RAC in three-dimensional culture within Si-HPMC/GY785 hydrogel was visualized by confocal microscopy after 3 weeks of culture (Fig 2 C). Cells were stained with calcein AM and "EthD-1" which respectively label living cells in green and dead cells in red. As shown in Fig 2C, RAC 3-dimensionally (3D) cultured within Si-HPMC/GY785 are green and are organized in nodular structure as it is observed with RAC cultured in Si-HPMC alone. The absence of red fluorescence indicates the absence of dead cells within Si-HHPMC/GY785. These results show that RAC retained their viability and organized in nodular structures when three dimensionally cultured within Si-HPMC/GY785 hydrogel revealing that GY785 incorporation failed to affect the 3D cytocompatibility of Si-HPMC.

### ***3.3. Maintenance of chondrocyte phenotype in three-dimensional culture***

To assess whether Si-HPMC/GY785 allows the maintenance of a chondrocytic phenotype in three dimensional culture, RAC were cultured for 3 weeks either in two dimensions (2D) without hydrogels or in three dimensions (3D) within Si-HPMC/GY785 hydrogel or Si-HPMC alone as a control. The expressions of transcripts coding for type I collagen (dedifferentiation marker) and type II collagen and aggrecan were evaluated by real time PCR (Fig. 3 A). 2D cultured RAC exhibited a lower expression of type II collagen and aggrecan 10- and 14.3-fold lower than primary RAC (P0) respectively. In contrast to RAC cultured in 2D, RAC cultured in 3D within Si-HPMC/GY785 expressed significant higher level of type II

collagen and aggrecan transcripts of approximately 5- and 19-fold respectively. Likewise, RAC cultured in 3D within Si-HPMC alone exhibited an expression of Type II collagen and aggrecan 2- and 7-fold higher than primary RAC. Whereas the expression of type I collagen in 2D RAC (fig 3A) was more than 3-fold higher than that of RAC (P0), 3D cultured RAC within Si-HPMC/GY785 exhibited a barely detectable increase in type I collagen expression. RAC cultured in 3D within Si-HPMC did not show an increased expression of type I collagen as compared to primary RAC (P0).

These whole results suggest that Si-HPMC/GY785 enabled the maintenance of a differentiated chondrocyte-like phenotype in RAC.

To further investigate the ability of Si-HPMC/GY785 to maintain a differentiated chondrocytic phenotype, the effect of 3D culture within Si-HPMC/GY785 on sulphated GAG and type II collagen production was investigated. In this attempt, Alcian blue staining and immunostaining for type II collagen were performed on RAC cultured in 3D within Si-HPMC/GY785 or Si-HPMC for 3 weeks. In these conditions (figure 3 B), sample exhibited a positive Alcian blue staining and type II collagen immunostaining. These results show an accumulation of sulphated GAG and type II collagen in the extracellular matrix surrounding RAC nodules formed in 3D culture within Si-HPMC/GY785 hydrogels as it was observed with Si-HPMC alone. Considered together, these results indicate that Si-HPMC/GY785 hydrogel permit the 3D culture of functionally competent RAC able to produce type II collagen and sulphated GAG.

#### *3.4. Dedifferentiation of RAC in 2D culture and redifferentiation in 3D culture*

It is well known that dedifferentiated articular chondrocytes are able to retrieve a chondrocytic phenotype when replaced in a three-dimensional environment (30, 35, 36). We therefore sought to evaluate whether this phenomenon also happens with RAC initially

cultured in 2D and thereafter placed in 3D within Si-HPMC/GY785 hydrogels. For this experiment, freshly isolated RAC were first dedifferentiated in monolayer for four passages. Expressions of transcripts coding for type I and II collagen as well as aggrecan were evaluated by real time PCR (Fig. 4A). When RAC were passaged, they exhibit a decreased in type II collagen expression approximately 4-fold at passage 2 (P2) and 16-fold at P4 as compared to primary RAC (P0). Likewise, Aggrecan expression exhibited a 3-fold and 4.5-fold decrease after passage 2 and 4 respectively (Fig. 4A, P2, P4). On the contrary, the expression of type I collagen transcript was dramatically increased about 7-fold and 10-fold after respectively 2 and 4 passages in monolayer cultures (Fig. 4A). These results show that RAC underwent a dedifferentiation process as early as passage 2 (P2).

Therefore, to investigate whether Si-HPMC/GY785 allow the recovery of a chondrocytic phenotype, dedifferentiated RAC P2 were placed for 4 additional weeks either in 3D culture within Si-HPMC/GY785 or Si-HPMC or in 2D culture. Real-time PCR analysis revealed that after 4 weeks, RAC cultured in 3D within Si-HPMC/GY785 exhibited 28-fold increase in type II collagen expression and 75-fold increase in aggrecan expression as compared to RAC P2 (figure 4B). On the contrary RAC cultured in 2D for the same additional duration failed to exhibit any significant increase in type II collagen and aggrecan transcripts. Interestingly, the expression of the dedifferentiation marker type I collagen after 4 weeks in 3D culture within Si-HPMC/GY785 was 3.4-fold inferior to that measured in RAC P2 (Fig. 4B). 2D RAC exhibited a 2-fold higher type I collagen expression as compared to RAC P2. When compared to the control hydrogel (Si-HPMC) RAC cultured within Si-HPMC/GY785 exhibited a 2-fold higher expression of transcript coding for type II collagen and aggrecan. These results suggest that Si-HPMC/GY785 enables the recovery of a chondrocyte-like phenotype in RAC previously dedifferentiated.



### 3.5. *In vivo* tissue formation

To investigate whether Si-HPMC/GY785 hydrogel makes possible the formation of cartilaginous tissue *in vivo*, constructs associating freshly isolated RAC and equine nasal chondrocytes (EqNC) with Si-HPMC/GY785 or Si-HPMC hydrogels were implanted subcutaneously in *nude* mice. After 3 weeks, histological examinations (Fig. 5) showed the formation of chondroid nodules with RAC or EqNC associated with Si-HPMC/GY785 as well as with the control hydrogel (Si-HPMC). These nodules were positively stained by Alcian blue (Fig. 5), suggesting the production of an extracellular matrix containing GAG. In addition, these nodules were positively stained for type II collagen. As a control, Si-HPMC and Si-HPMC/GY785 alone showed neither the formation of nodular structure nor the presence of an extracellular matrix (data not shown).

These results indicate that Si-HPMC/GY785 allows the formation of a cartilaginous tissue *in vivo* with both freshly isolated RAC or EqNC.

## 4. Discussion

Today regenerative medicine is moving towards the development of less and less invasive surgical techniques with the objective to reduce morbidity and the duration of hospitalisation. In that objective, injectable hydrogels appear promising (37). The main challenge in developing new hydrogels is to allow viability, proliferation and differentiation of cells inside the hydrogel while providing with suitable mechanical strength. In an attempt to propose a three dimensional scaffolding hydrogel able to mechanically and biologically support regeneration of functional cartilage, we doped a self-setting hydrogel based on cellulosic derivatives (Si-HPMC) with a marine polysaccharide of high molecular weight the GY785(31). With rheologic oscillatory measurement, we have demonstrated that incorporation of GY785 within Si-HPMC hydrogel increased the mechanical properties of Si-

HPMC(31). Marine-based polysaccharides (38) which exhibit structural analogies with glycosaminoglycans (GAGs), are well acknowledged as molecules influencing cell proliferation, differentiation and adhesion (39). Moreover, their structural organization confers both hydration and mechanical properties to the extracellular matrix as aggrecan in articular cartilage tissue.

The determination of the rheological properties of Si-HPMC/GY785, Si-HPMC and Si-HPMC/HPMC hydrogels indicates that  $G'$  was higher than  $G''$  (Fig. 1) for the three hydrogels, thereby confirming that these hydrogels are solid after 3 weeks. The  $G'$  of Si-HPMC/GY785 is approximately 2-fold higher than that of Si-HPMC or Si-HPMC/HPMC revealing that the doping of Si-HPMC with GY785 has increased its rigidity. The Storage modulus  $G'$  is also linked to the network density in polysaccharide hydrogels(40). In our study, the  $G'$  value revealed a higher network density with the adjunction of GY785 polysaccharides (Fig. 1).

In order to propose Si-HPMC/GY785 hydrogel for cartilage tissue engineering, various *in vitro* characteristics should be explored as a prerequisite to *in vivo* experiments such as cytotoxicity, capacity to support a chondrocytic phenotype (41) and the production of a cartilaginous matrix by chondrocytes.

We were therefore first interested in examining the *in vitro* cytotoxicity of Si-HPC/GY78 with rabbit primary articular chondrocytes (RAC). In this attempt, we focused on a cytotoxicity test by direct contact with RAC (ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices-Part 5: test for *in vitro* cytotoxicity). As previously observed with chondrocytic cell line C28/I2 (31), our data indicate that Si-HPMC/ GY785 hydrogel is cytocompatible with respect to RAC as evidenced by the estimation of the mitochondrial dehydrogenase activity (MTS assay) and by cell counting (Fig. 2). In addition, the dual fluorescent staining using

calcein AM and EthD-1 reagent revealed that RAC three-dimensionally cultured within Si-HPMC/GY785 hydrogel retained their viability and formed nodules (Fig. 3). These results indicate that Si-HPMC/GY785 hydrogel makes possible the three-dimensional culture of RAC without altering their viability and proliferation.

It is well known that the maintain or the recovery of a chondrocytic phenotype in scaffolding hydrogel is a key point of cartilage tissue engineering strategies. Indeed, a dedifferentiation of chondrocytes, evidenced by a concomitant decrease in type II collagen and aggrecan expression and an increase in type I collagen expression, occurs during *in vitro* 2D expansion in monolayer (21, 42). In our hands and according to this dedifferentiation process (43), type II collagen and aggrecan expressions were down-regulated along with passages in RAC, whereas that of type I collagen was increased. However, culturing chondrocytes in three dimensional scaffolds has been shown to not only prevent this phenomenon but also to reverse this phenomenon allowing dedifferentiated chondrocytes to recover their phenotype (20). Accordingly, the expressions of type II collagen and aggrecan are maintained in 3D culture within Si-HPMC/GY785, enlightening the ability of Si-HPMC/GY785 to maintain a chondrocyte-like phenotype *in vitro*. These results are further confirmed by the production of GAG and collagen type II by three-dimensionally cultured RAC within Si-HPMC/GY785 hydrogel. In addition, Si-HPMC/GY785 hydrogel could also induce the recovery of a chondrocytic phenotype of previously dedifferentiated RAC (P2) as evidenced by the increased expression of type II collagen and aggrecan while expression of type I collagen remains stable. It seems therefore reasonable to speculate that Si-HPMC/GY785 enable the three-dimensional culture and the recovery of phenotypically stable chondrocytes.

To address the *in vivo* potential of Si-HPCM/GY785 as a new hydrogel for cartilage engineering we finally embarked on animal experiment in a well documented model of tissue

engineering, the subcutis of nude mice. Hybrid systems associating chondrocytes (RAC and EqNC) with Si-HPMC/GY785 were implanted in subcutaneous sites in the back of *nude* mice. Si-HPMC associated with RAC or EqNC was used as a control. Si-HPMC has indeed been successfully used in association with EqNC to allow the formation of a cartilaginous tissue in subcutis of nude mice (33). After 3 weeks of implantation, constructs associating RAC with Si-HPMC/GY785 showed the formation of nodules with an extracellular matrix containing sulphated GAG and type II collagen. Moreover, no significant difference was observed according to the chondrocyte origin or the hydrogel composition.

In conclusion, our results demonstrate that Si-HPMC doped with a marine polysaccharide exhibit increased mechanical properties and is a convenient scaffold for the three-dimensional culture of chondrocytes. This mechanically reinforced hydrogel permits the growth of phenotypically stable chondrocytes, able to synthesize cartilage-like ECM *in vitro* and *in vivo*. The whole of our results strongly suggest that GY785-doped Si-HPMC may be a promising scaffold for cartilage tissue engineering. Whether this novel scaffolding hydrogel may be clinically relevant for the treatment of cartilage will be paid further attention in adapted animal models of full thickness cartilage defects (44).

### **Acknowledgements**

E.R. received a fellowship from the “Region *Pays de la Loire*”, through the Bioregos grant. This study was supported by grants from ANR TecSan “chondrograft”, Arthritis Fondation Courtin, the “Société Française de Rhumatologie” Authors also thank E. Matthieu for her help in the cell culture, C. Colombeix for her help in using the confocal microscope and C. Sinquin for the polysaccharide preparation.

## References:

1. Marijnissen AC, Lafeber FP. Re: E. B. Hunziker. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis and Cartilage* 2002; 10:432-63. *Osteoarthritis Cartilage* 2003 Apr;11(4):300-1; author reply 2-4.
2. Steinert AF, Ghivizzani SC, Rethwilm A, Tuan RS, Evans CH, Noth U. Major biological obstacles for persistent cell-based regeneration of articular cartilage. *Arthritis Res Ther* 2007;9(3):213.
3. Hardingham TE, Fosang AJ. The structure of aggrecan and its turnover in cartilage. *J Rheumatol Suppl* 1995 Feb;43:86-90.
4. Aigner T, Stove J. Collagens--major component of the physiological cartilage matrix, major target of cartilage degeneration, major tool in cartilage repair. *Adv Drug Deliv Rev* 2003 Nov 28;55(12):1569-93.
5. Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM. Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop Relat Res* 1997 Sep(342):254-69.
6. Lindahl A, Brittberg M, Peterson L. Cartilage repair with chondrocytes: clinical and cellular aspects. *Novartis Found Symp* 2003;249:175-86; discussion 86-9, 234-8, 9-41.
7. Buckwalter JA. Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther* 1998 Oct;28(4):192-202.
8. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994 Oct 6;331(14):889-95.
9. Bonaventure J, Kadhon N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, Freisinger P. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res* 1994 May;212(1):97-104.
10. Getgood A, Brooks R, Fortier L, Rushton N. Articular cartilage tissue engineering: today's research, tomorrow's practice? *J Bone Joint Surg Br* 2009 May;91(5):565-76.

11. van Osch GJ, Brittberg M, Dennis JE, Bastiaansen-Jenniskens YM, Erben RG, Konttinen YT, Luyten FP. Cartilage repair: past and future--lessons for regenerative medicine. *J Cell Mol Med*2009 May;13(5):792-810.
12. Vinatier C, Bouffi C, Merceron C, Gordeladze J, Brondello JM, Jorgensen C, Weiss P, Guicheux J, Noel D. Cartilage tissue engineering: towards a biomaterial-assisted mesenchymal stem cell therapy. *Curr Stem Cell Res Ther*2009 Dec;4(4):318-29.
13. Chung C, Burdick JA. Engineering cartilage tissue. *Adv Drug Deliv Rev*2008 Jan 14;60(2):243-62.
14. Lynn AK, Brooks RA, Bonfield W, Rushton N. Repair of defects in articular joints. Prospects for material-based solutions in tissue engineering. *J Bone Joint Surg Br*2004 Nov;86(8):1093-9.
15. Stoop R. Smart biomaterials for tissue engineering of cartilage. *Injury*2008 Apr;39 Suppl 1:S77-87.
16. Bonzani IC, George JH, Stevens MM. Novel materials for bone and cartilage regeneration. *Curr Opin Chem Biol*2006 Dec;10(6):568-75.
17. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science*2002 Feb 8;295(5557):1009-14.
18. Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci*1994 Jan;107 ( Pt 1):17-27.
19. Kimura T, Yasui N, Ohsawa S, Ono K. Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long-term cultures. *Clin Orthop Relat Res*1984 Jun(186):231-9.
20. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell*1982 Aug;30(1):215-24.
21. Brodtkin KR, Garcia AJ, Levenston ME. Chondrocyte phenotypes on different extracellular matrix monolayers. *Biomaterials*2004 Dec;25(28):5929-38.

22. Mukaida T, Urabe K, Naruse K, Aikawa J, Katano M, Hyon SH, Itoman M. Influence of three-dimensional culture in a type II collagen sponge on primary cultured and dedifferentiated chondrocytes. *J Orthop Sci*2005 Sep;10(5):521-8.
23. Dehne T, Schenk R, Perka C, Morawietz L, Pruss A, Sittinger M, Kaps C, Ringe J. Gene expression profiling of primary human articular chondrocytes in high-density micromasses reveals patterns of recovery, maintenance, re- and dedifferentiation. *Gene*2010 Aug 15;462(1-2):8-17.
24. Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E. Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science*2010;35(4):403-40.
25. Mano JF, Silva GA, Azevedo HS, Malafaya PB, Sousa RA, Silva SS, Boesel LF, Oliveira JM, Santos TC, Marques AP, Neves NM, Reis RL. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *J R Soc Interface*2007 Dec 22;4(17):999-1030.
26. Hubbell JA. Materials as morphogenetic guides in tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol*2003 Oct;14(5):551-8.
27. Bourges X, Weiss P, Coudreuse A, Daculsi G, Legeay G. General properties of silylated hydroxyethylcellulose for potential biomedical applications. *Biopolymers*2002 Apr 5;63(4):232-8.
28. Bourges X, Weiss P, Daculsi G, Legeay G. Synthesis and general properties of silylated-hydroxypropyl methylcellulose in prospect of biomedical use. *Advances in Colloid and Interface Science*2002;99(3):215-28.
29. Vinatier C, Magne D, Weiss P, Trojani C, Rochet N, Carle GF, Vignes-Colombeix C, Chadjichristos C, Galera P, Daculsi G, Guicheux J. A silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel for the three-dimensional culture of chondrocytes. *Biomaterials*2005 Nov;26(33):6643-51.
30. Vinatier C, Magne D, Moreau A, Gauthier O, Malard O, Vignes-Colombeix C, Daculsi G, Weiss P, Guicheux J. Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel. *J Biomed Mater Res A*2007 Jan;80(1):66-74.

31. Rederstorff E, Weiss P, Sourice S, Pilet P, Xie F, Siquin C, Collic Jouault S, Guicheux J, Laïb S. An in vitro study of two GAG-like Marine Polysaccharides as a compounds of injectable hydrogel for bone and cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*2011;in press.
32. Ghayor C, Herrouin JF, Chadjichristos C, Ala-Kokko L, Takigawa M, Pujol JP, Galera P. Regulation of human COL2A1 gene expression in chondrocytes. Identification of C-Krox-responsive elements and modulation by phenotype alteration. *J Biol Chem*2000 Sep 1;275(35):27421-38.
33. Merceron C, Portron S, Masson M, Lesoeur J, Fellah BH, Gauthier O, Geffroy O, Weiss P, Guicheux J, Vinatier C. Chondrogenic potential of differentially cultured human adiposed-derived stem cells after transplantation with a cellulose hydrogel. *Cell Transplant*2010;in press.
34. Merceron C, Vinatier C, Portron S, Masson M, Amiaud J, Guigand L, Cherel Y, Weiss P, Guicheux J. Differential effects of hypoxia on osteochondrogenic potential of human adipose-derived stem cells. *Am J Physiol Cell Physiol*2010 Feb;298(2):C355-64.
35. Chen G, Sato T, Ushida T, Hirochika R, Tateishi T. Redifferentiation of dedifferentiated bovine chondrocytes when cultured in vitro in a PLGA-collagen hybrid mesh. *FEBS Lett*2003 May 8;542(1-3):95-9.
36. Miot S, Woodfield T, Daniels AU, Suetterlin R, Peterschmitt I, Heberer M, van Blitterswijk CA, Riesle J, Martin I. Effects of scaffold composition and architecture on human nasal chondrocyte redifferentiation and cartilaginous matrix deposition. *Biomaterials*2005 May;26(15):2479-89.
37. Cushing MC, Anseth KS. Materials science. Hydrogel cell cultures. *Science*2007 May 25;316(5828):1133-4.
38. Collic-Jouault S, Zanchetta P, Helley D, Ratiskol J, Siquin C, Fischer AM, Guezenec J. Les polysaccharides microbiens d'origine marine et leur potentiel en thérapeutique humaine. *Pathologie Biologie*2004;52(3):127-30.



39. Chiu LH, Chen SC, Wu KC, Yang CB, Fang CL, Lai WF, Tsai YH. Differential effect of ECM molecules on re-expression of cartilaginous markers in near quiescent human chondrocytes. *J Cell Physiol*2010 Dec 16.
40. Moe ST, Draget KI, Skjåk-Bræk G, Simdsrød O. Temperature dependence of the elastic modulus of alginate gels. *Carbohydrate Polymers*1992;19(4):279-84.
41. Pereira RC, Gentili C, Cancedda R, Azevedo HS, Reis RL. Encapsulation of human articular chondrocytes into 3D hydrogel: phenotype and genotype characterization. *Methods Mol Biol*2010;695:167-81.
42. Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J. Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage*2002 Jan;10(1):62-70.
43. Mandl EW, van der Veen SW, Verhaar JA, van Osch GJ. Multiplication of human chondrocytes with low seeding densities accelerates cell yield without losing redifferentiation capacity. *Tissue Eng*2004 Jan-Feb;10(1-2):109-18.
44. Vinatier C, Gauthier O, Fatimi A, Merceron C, Masson M, Moreau A, Moreau F, Fellah B, Weiss P, Guicheux J. An injectable cellulose-based hydrogel for the transfer of autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects. *Biotechnol Bioeng*2009 Mar 1;102(4):1259-67.

## Figure legends

**Table 1:** Sequences of primer pairs, gene bank accession numbers used for real time RT-PCR analysis and size of PCR products

**Figure 1: Oscillatory measurements.** Oscillatory measurements of the different hydrogels (Si-HPMC, Si-HPMC/HPMC (2/0.67) and Si-HPMC/GY785 (2/0.67)) after 3 weeks of storage at 37°C in humid environment. Measurements (n=3) are done directly in 12 multi-well culture plates using a ThermoHaake<sup>®</sup>, (Germany, Mars<sup>™</sup>, Titanium plate PP20Ti) with the following parameters: gap ≈3mm, Normal force 0.2N, 1 Htz, from 0.1 to 5 Pa, at 25°C. The conservative modulus G' and the loss modulus G'' are reported in Pa. \**p*<0.001 compared with the respective control Si-HPMC and Si-HPMC/HPMC.

**Figure 2: Cytocompatibility of Si-HPMC/GY785 with RAC in two-dimensional culture (2D) and three dimensional culture (3D).** Rabbit articular chondrocytes (RAC) were cultured in 2D on culture plate over 72h in the absence of hydrogel (positive control) or in the presence of actinomycin-D (5µg/ml) (negative control) or in the presence of Si-HPMC (2/0) or Si-HPMC/GY785 (2/0.67). **A)** Viability was assessed by MTS activity as indicated in the materials and methods. Results are expressed as relative MTS activity compared with the respective control. \**p*<0.001 as compared to control conditions. **B)** Proliferation was assessed by scoring the cells after trypan blue staining. Results are expressed as the total number of cells per well. \**p* <0.001 compared with the respective control. **C)** RAC were cultured in 3D for 3 weeks into Si-HPMC/GY785 (2/0.67) or Si-HPMC (2/0) prior to staining with calcein AM and EthD-1. Viability was visualized by confocal microscopy as indicated in materials and methods. Original magnification X 400.

**Figure 3: A) maintenance of chondrocyte phenotype in three-dimensional culture.**

Total RNA was purified from freshly isolated RAC (P0), from RAC cultured in two dimensions (2D) and RAC cultured in 3D during 3 weeks (3D) within Si-HPMC/GY785 or Si-HPMC. Expression of the chondrocytic markers (type II collagen and aggrecan) as well as dedifferentiation marker (Type I collagen) were investigated by real-time PCR as indicated in the materials and methods. Results are expressed as relative expression level compared to the control condition (P0). **B) Cartilaginous matrix production by RAC in three-dimensional culture.** Rabbit articular chondrocytes were cultured for 3 and 5 weeks in three dimensions (3D) within Si-HPMC/GY785 (2/0.67) and Si-HPMC (2/0). Alcian blue and immunohistochemical type II collagen stainings were performed as detailed in materials and methods. Samples were observed with a light microscope. Original magnification x400.

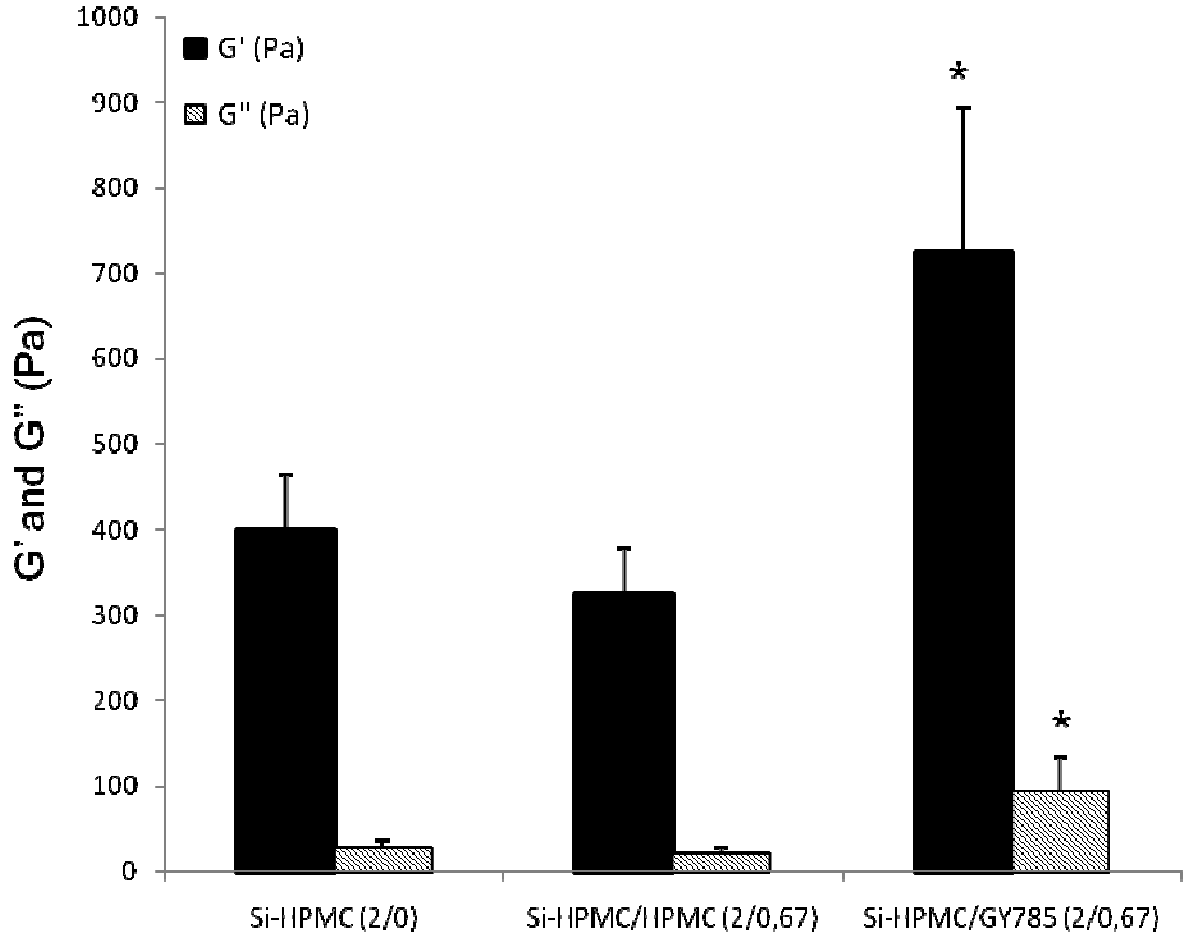
**Figure 4: A) Dedifferentiation of RAC in monolayer culture.** Total RNA was purified from freshly isolated RAC (P0), from RAC cultured in two dimensions for 2 (P2) and 4 (P4) passages. Real time PCR analysis for type II collagen and aggrecan as well as type I collagen transcripts were performed using primers and conditions detailed in experimental procedures. Results are expressed as relative expression level compared to the control condition P0. \*  $p < 0.001$  compared to RAC (P0). **B) Redifferentiation of RAC in three-dimensional culture.** Total RNA was purified from dedifferentiated RAC at passage 2 (P2) and from dedifferentiated RAC cultured for an additional time 4 weeks (P2 4w) within Si-HPMC/GY785 (2/0.67) and Si-HPMC (2/0). Real time PCR analysis for type II and I collagen transcripts, as well as aggrecan were performed using primers and conditions detailed in experimental procedures. Results are expressed as relative expression level compared to the control condition (P2). \*  $p < 0.001$  compared to P2.

**Figure 5: Histochemical analysis of tissue engineered cartilage.** RAC and EqNC associated with GY785/Si-HPMC or Si-HPMC were implanted subcutaneously in nude mice and analyzed 3 weeks later. Histological sections were stained, as described in the materials and methods, for the presence of GAG (Alcian blue) and type II collagen (Immunostaining). Samples were observed with a light microscope. Original magnification X 400.

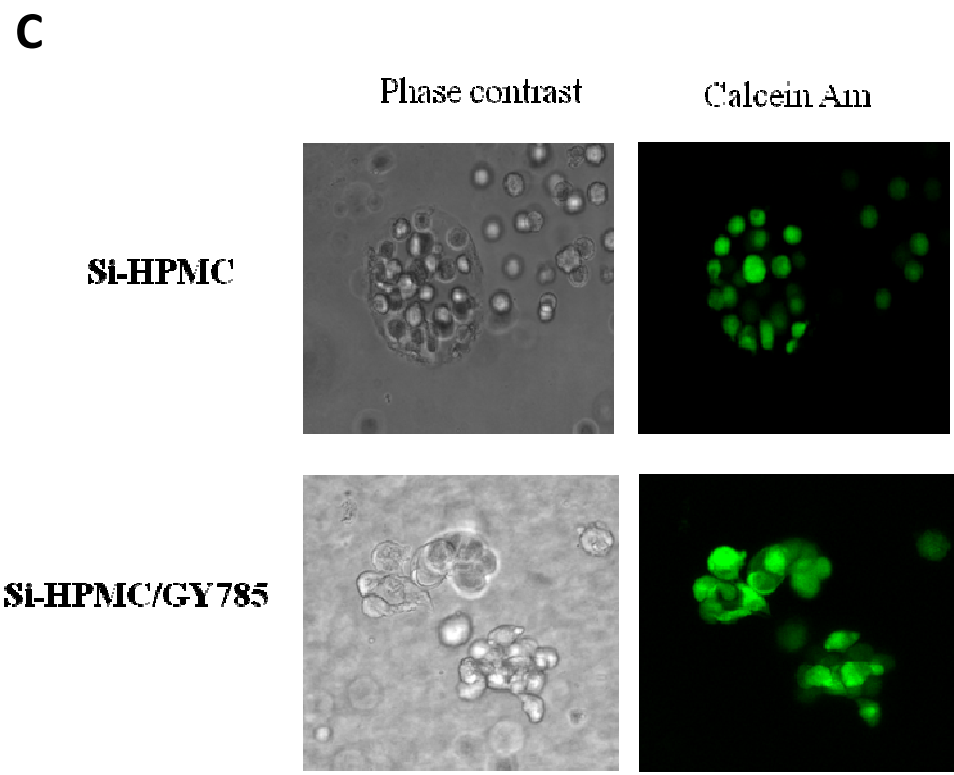
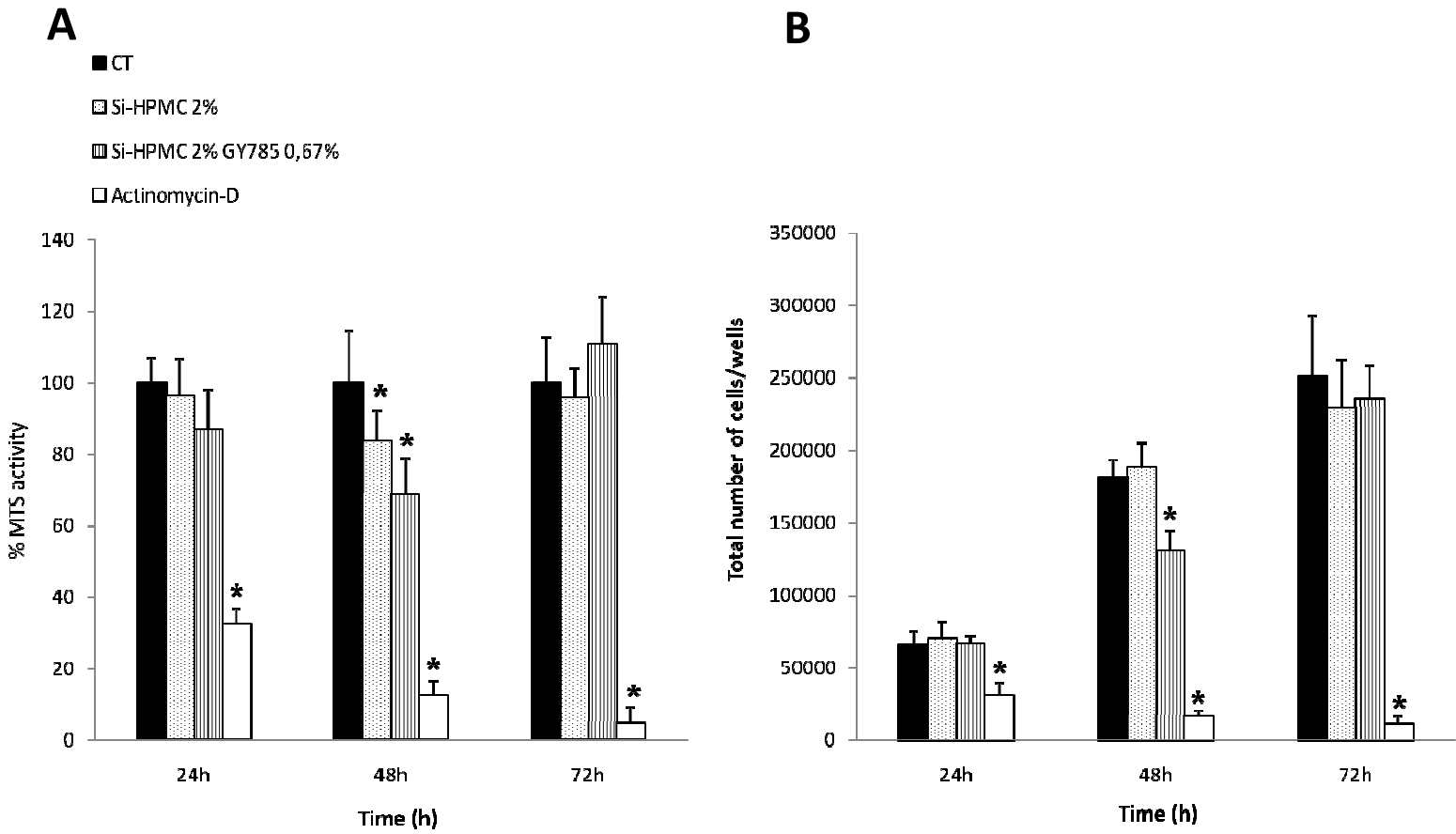
**Table 1**

<b>Gene</b>	<b>GeneBank</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>	<b>Amplicon size</b>
Glyceraldehyde 3 phosphate deshydrogenase (Gapdh)	<a href="#">NM_001082253</a>	5'-agaacgggaagctggtcat-3'	5'-ttgatgtggcgggatct-3'	70 bp
Agrecan (Acan)	<a href="#">L38480</a>	5'-gaggatggctccaccagt-3'	5'-tggggtacctgacagctga-3'	61 bp
Type I collagen, chain $\alpha$ 1 (Col1a1)	<a href="#">D49399</a>	5'-agcgatggtcctccaggt-3'	5'-gccagggtaccacggtct-3'	63 bp
Type II collagen chain $\alpha$ 1 (Col2a1)	<a href="#">D83228</a>	5'-acagcaggtcacctataccg-3'	5'-cccacttaccggtgtgttc-3'	60 bp

Figure 1



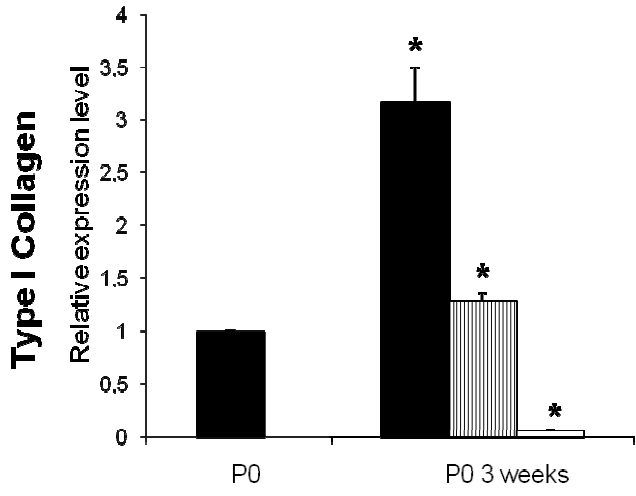
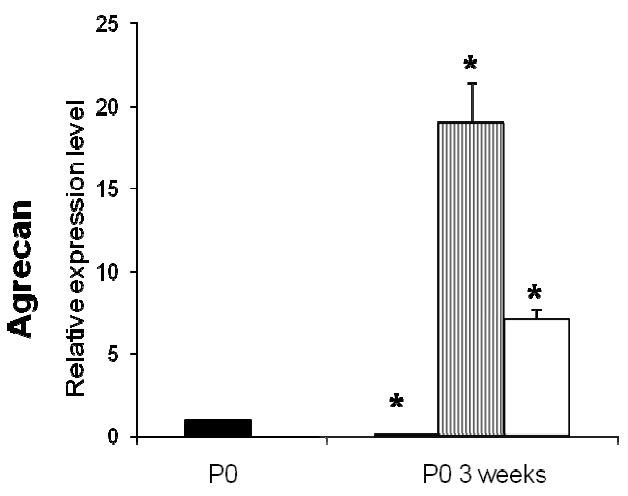
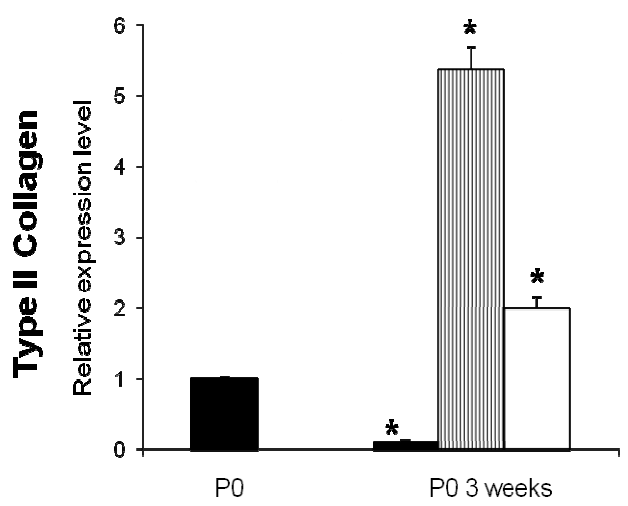
**Figure 2**



**Figure 3**

**A**

■ 2D  
 ▨ 3D Si-HPMC/GY785 (2/0,67)  
 □ 3D Si-HPMC (2/0)

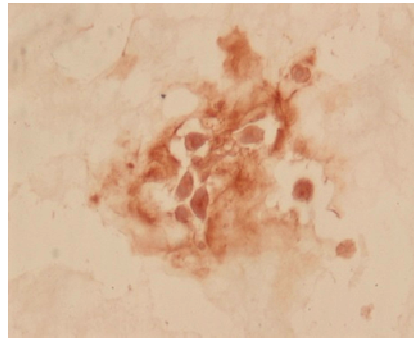
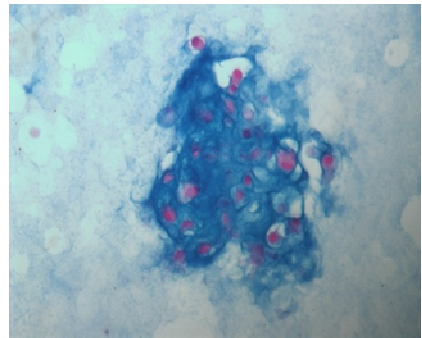


**GAG**

**Type II Collagen**

**B**

**Si-HPMC/GY785**



**Si-HPMC**

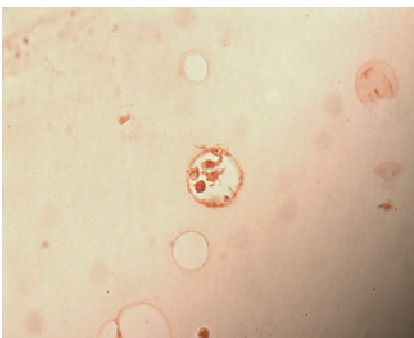
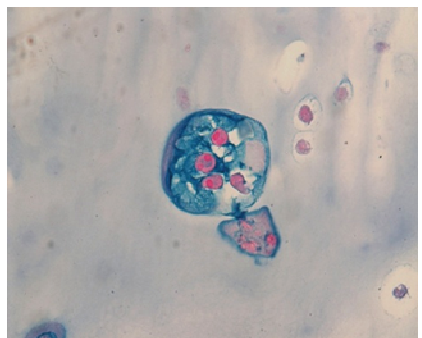
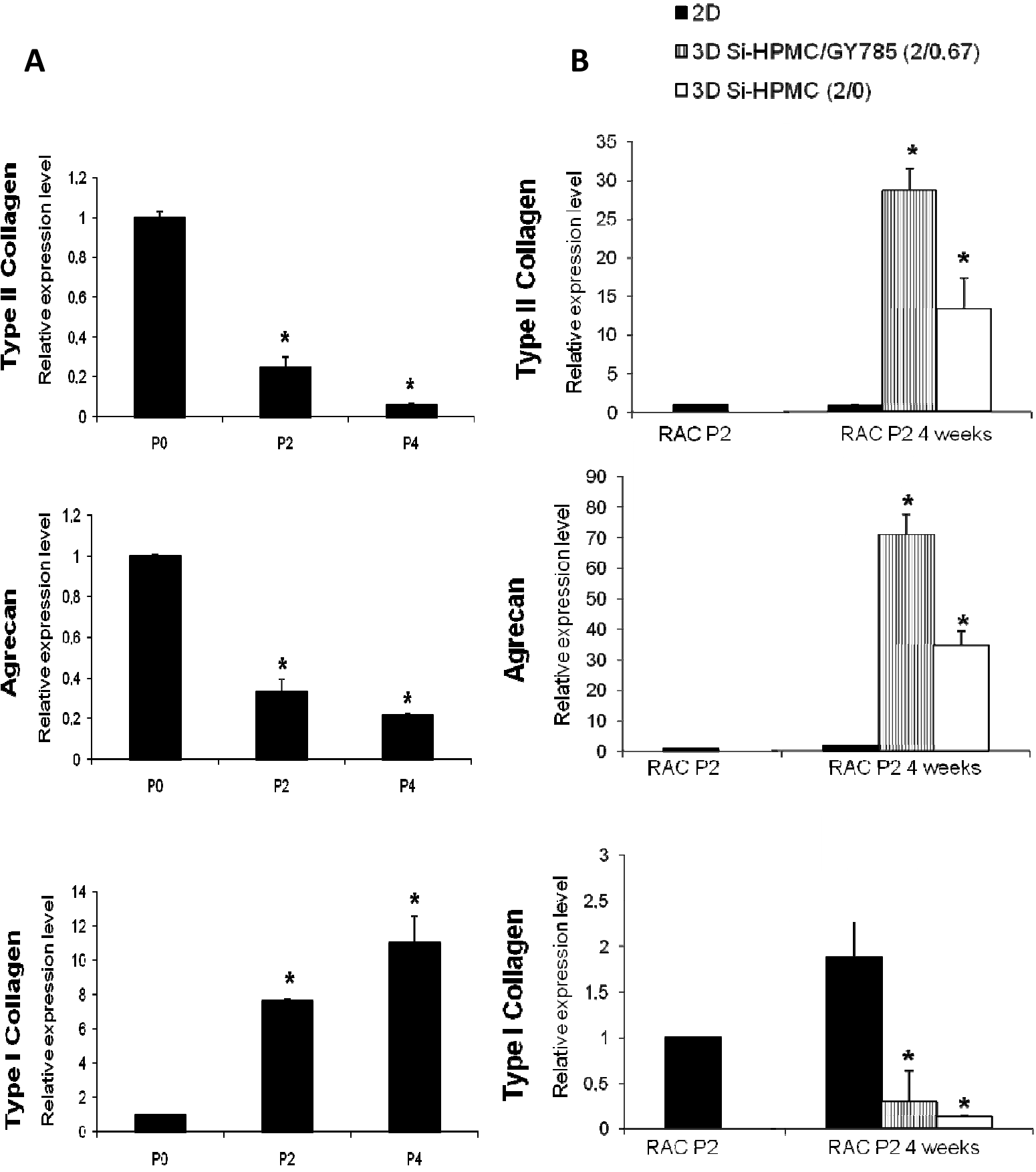
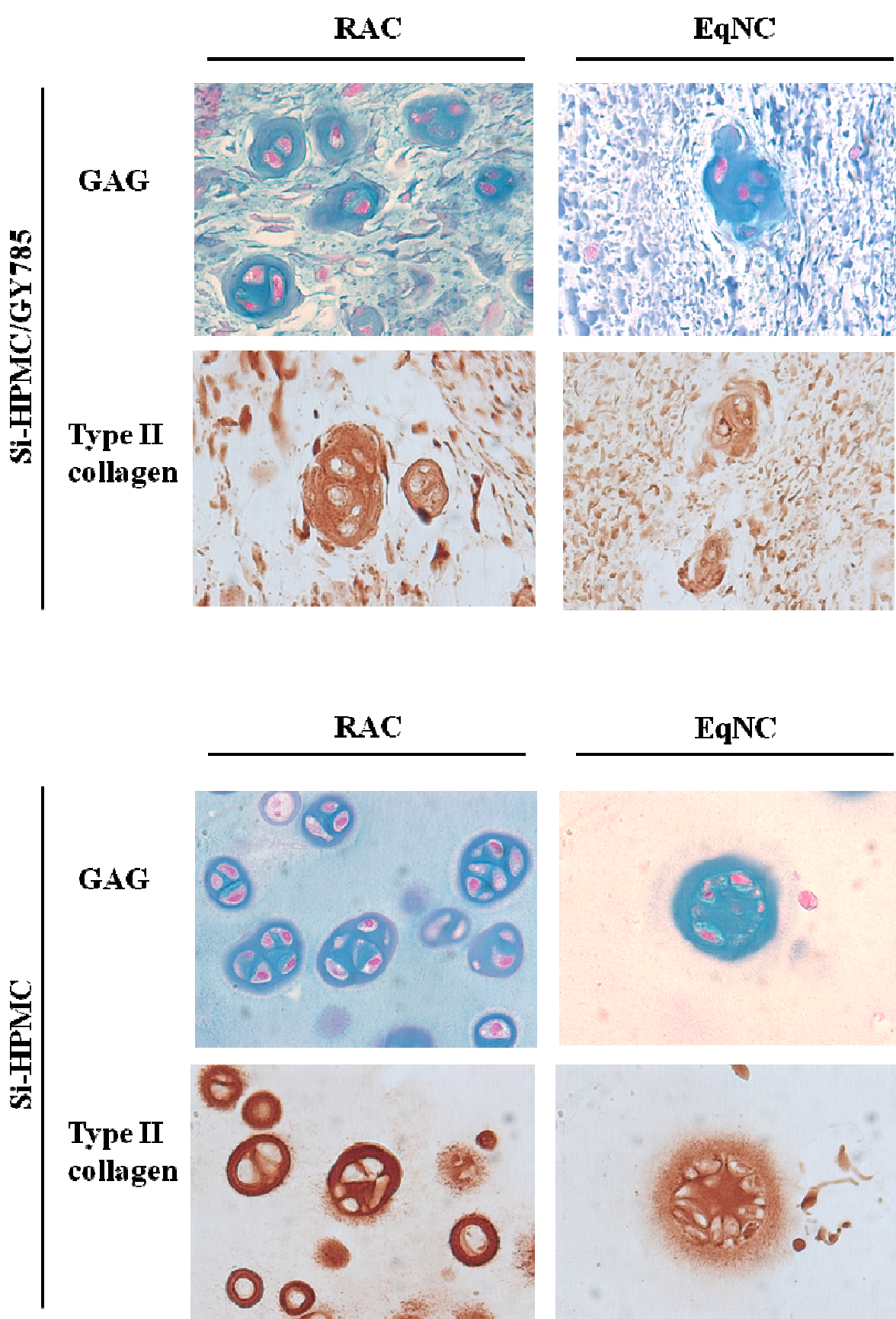




Figure 4



**Figure 5**



### III. Résultats, Discussion

Les résultats de l'article 3 montrent qu'un hydrogel d'HPMC-Si/GY785 constitue une matrice tridimensionnelle apte biologiquement à supporter le développement en culture tridimensionnelle de chondrocytes.

La détermination des propriétés rhéologiques des hydrogels d'HPMC-Si (2/0) et des hydrogels d'HPMC-Si/GY785 (2/0,67) et en particulier l'analyse du module conservatif  $G'$  et du module dispersif  $G''$  en cisaillement oscillatoire, indiquent qu'il s'agit de solides après trois semaines de culture ( $G' > G''$ ). Le ratio  $G''/G'$  pour l'hydrogel d'HPMC-Si est inférieur à 0,1 ce qui reflète un hydrogel à liaisons fortes. L'hydrogel d'HPMC-Si/GY785 présente une valeur de  $G''/G'$  supérieur à 0,1, ce qui indique qu'il s'agit plutôt d'un hydrogel à liaisons faibles. Nous sommes ici en présence d'un hydrogel avec des liaisons covalente et faible. Un gel faiblement réticulé sera capable d'absorber une plus grande quantité de liquide qu'un hydrogel très réticulé. En se basant sur la nature des liaisons transversales, les hydrogels peuvent être considérés comme des hydrogels chimiques lorsque les liaisons sont de natures covalentes et physiques lorsque les liaisons sont faibles. Il peut s'agir d'interactions de Van der Waals, des interactions électrostatiques ou des enchevêtrements moléculaires. Dans notre étude, l'analyse de  $G'$  et  $G''$  révèle une plus grande densité du réseau par l'adjonction d'EPS GY785.

Afin de proposer l'hydrogel d'HPMC-Si/GY785 comme échafaudage biologiquement compétent pour l'ingénierie tissulaire du cartilage, de nombreuses fonctionnalités doivent être explorées. Outre la biocompatibilité de la matrice, sa capacité à maintenir ou à rétablir un phénotype chondrocytaire et à permettre la synthèse d'une matrice extracellulaire (MEC) cartilagineuse *in vitro* et *in vivo* est à explorer.

La cytocompatibilité de l'hydrogel d'HPMC-Si/GY785 a été étudiée dans l'article 2 à l'aide d'une lignée chondrocytaire C28/I2. Cependant, il s'agit d'une lignée cellulaire transformée, ce qui peut diminuer la sensibilité pour certains signaux cytotoxiques. Nous avons ainsi confirmé la cytocompatibilité de l'hydrogel d'HPMC-Si/GY785 en utilisant des chondrocytes primaires isolés de cartilage articulaire de lapin (RAC). Nos résultats indiquent que l'hydrogel d'HPMC-Si/GY785 ne présente ni de cytotoxicité en culture bidimensionnelle (2D) ni en culture tridimensionnelle (3D).

La culture en monocouche (2D) entraîne la dédifférenciation des chondrocytes (281). Ce processus induit une baisse de l'expression du collagène de type II et de l'agrécan ainsi qu'une augmentation de l'expression du collagène de type I (282). En conséquence de ces données, nous avons cherché à déterminer si l'hydrogel d'HPMC-Si/GY785 était capable de maintenir un phénotype chondrocytaire. Les transcrits codant pour le collagène de type I et II et pour l'agrécan, de RAC fraîchement isolés et cultivés en 3D pendant 3 semaines dans l'hydrogel d'HPMC-Si/GY785 ont été analysés. Les résultats indiquent que l'expression du collagène de type II et de l'agrécan sont maintenues, alors que l'expression du collagène de type I est réduite. Ces résultats sont confirmés par la production de glycosaminoglycanes (GAGs) et de collagène de type II.

Le processus de dédifférenciation des chondrocytes survenant au cours d'une culture en 2D est un phénomène réversible. Un environnement 3D adéquat est capable d'induire la ré-expression des gènes spécifiques du cartilage (278). Nous nous sommes demandé si l'hydrogel d'HPMC-Si/GY785 pourrait induire la récupération d'un phénotype chondrocytaire. Des RAC ont été dédifférenciés suite à une culture en monocouche, puis replacés en 3D au sein de la matrice d'HPMC-Si/GY785. Après 4 semaines, l'expression du collagène de type II et de l'agrécan est récupérée tandis que l'expression du collagène de type I est diminuée.

Toutes les données recueillies à la suite des diverses expériences, nous ont permis de supposer que l'hydrogel d'HPMC-Si/GY785 est non cytotoxique et permet la culture en 3D de RAC avec le maintien d'un phénotype chondrocytaire stable, ainsi que la récupération de ce phénotype. Ces résultats indiquent que l'hydrogel d'HPMC-Si/GY785 peut être utilisé comme matrice pour la culture 3D de RAC mais pourrait également être utilisé pour transférer des chondrocytes amplifiés en monocouche. Cependant, il faut noter que, les systèmes de culture *in vitro* ne reflètent que partiellement la formation de tissu observée *in vivo*, ainsi nous avons testé la capacité de l'hydrogel d'HPMC-Si/GY785 associé à des RAC et des chondrocytes nasaux équins (hsNC) à former un tissu cartilagineux *in vivo* chez la souris *nude*. Des mélanges associant des RAC et hsNC fraîchement isolés avec l'hydrogel d'HPMC-Si/GY785 ont été implantés en sous-cutané chez la souris *nude*. Après 3 semaines, les implants récupérés montrent la formation de nodules cartilagineux contenant des GAG sulfatés et des collagènes.

Nous avons ainsi montré que l'hydrogel d'HPMC-Si/GY785 présentait des propriétés mécaniques plus élevées et permettait la viabilité et le maintien d'un phénotype chondrocytaire de RAC cultivés en 3D. Les études *in vitro* et *in vivo* ont également montré que l'hydrogel d'HPMC-Si/GY785 est compatible avec la synthèse d'une MEC cartilagineuse contenant des GAGs et des collagènes. Ces données suggèrent que l'hydrogel d'HPMC-Si/GY785 est prometteur pour une utilisation en ingénierie tissulaire du cartilage. Néanmoins, d'autres expériences en sites articulaires sont nécessaires pour déterminer si des constructions associant RAC ou hsNC et hydrogel d'HPMC-Si/GY785 sont en mesure de former un cartilage hyalin.

Lors de nos expériences, nous avons pris comme contrôle la matrice d'HPMC-Si. Nos résultats mettent en évidence une modification du comportement des RAC, en fonction de la composition de l'hydrogel et de sa rigidité. En effet, la présence d'EPS GY785 induit des

différences au niveau de l'expression du collagène de type I et II et l'expression du transcrit codant pour l'agrécane. De plus, la morphologie des nodules de RAC dans l'hydrogel d'HPMC-Si est bien définie et sphérique contrairement aux nodules dans l'hydrogel d'HPMC-Si/GY785 qui sont plus diffus. Dans la MEC, les GAGs sont connus pour agir en tant que régulateurs importants du comportement des chondrocytes (283,284). De la même façon, la rigidité et la densité de l'échafaudage sont capables d'influencer le comportement des cellules en terme de morphologie (29), de différenciation cellulaire (285) ou dans l'induction et le maintien d'un phénotype chondrocytaire (286). Les données observées dans cette étude ne nous permettent pas de conclure si les différences observées sont dues à la structure originale de l'EPS GY785 ou tout simplement à l'effet de paramètres mécaniques modifiés.

# **CONCLUSIONS - PERSPECTIVES**

L'ingénierie tissulaire des tissus squelettiques est une discipline séparée en deux champs d'investigation principaux, l'un orienté sur le développement de matrices tridimensionnelles, et l'autre orienté sur la recherche et la sélection de sources de cellules autologues. Dans ce contexte, l'objectif de ce travail a été d'évaluer le potentiel de deux exopolysaccharides HE800 et GY785 produits par des bactéries marines pour la réalisation de matrices tridimensionnelles.

Dans une première partie, nous avons montré la capacité des EPS GY785 et HE800 à être stérilisés par l'oxyde d'éthylène. Cette méthode induit de faibles modifications des propriétés physiques et chimiques des EPS avec une bonne efficacité de stérilisation. De ce fait, les EPS ont pu être utilisés de manière stérile pour la suite de nos expérimentations.

Dans une deuxième partie, nous avons conçu de nouvelles matrices en associant les EPS HE800 et GY785 avec un hydrogel d'HPMC-Si. La caractérisation des propriétés viscoélastiques des hydrogels d'HPMC-Si/GY785 et d'HPMC-Si/HE800 nous indique qu'ils sont injectables sous leurs formes visqueuses et capables de durcir *in situ*. Une des limites des matrices à base de polymères naturels en ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage est due à leurs faibles propriétés mécaniques. En effet, *in vivo* le tissu cartilagineux et osseux présentent en moyenne une élasticité de 20 et de 35 kPa respectivement (29). Dans nos travaux, nous avons démontré que l'ajout d'EPS marins permet d'augmenter les propriétés mécaniques de l'hydrogel d'HPMC-Si en les multipliant par trois avec l'EPS HE800 (11 kPa) et par deux avec l'EPS GY785 (5 kPa). La composition de ces nouveaux hydrogels permet de se rapprocher de la rigidité du tissu *in vivo*. Malgré cela, la construction présentant les propriétés mécaniques les plus hautes permet à peine d'atteindre la moitié de la rigidité du cartilage articulaire natif. Le deuxième objectif de notre étude a été d'associer des EPS marins GAG-mimétiques à un hydrogel de cellulose, afin de fournir des sites d'adhésion cellulaire. De nombreux types cellulaires y compris les cellules osseuses nécessitent d'adhérer à leur



substrat pour proliférer (158). Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire osseuse les matrices ont pour objectif de mimer l'environnement extracellulaire du tissu natif en fournissant des sites d'adhésion cellulaire. Nous avons montré sur un modèle de culture en 2D à la surface des différents hydrogels d'EPS marins/HPMC-Si, un attachement de cellules issues d'une lignée d'ostéoblastes (MC3T3-E1) avec un début d'étalement sur les hydrogels d'HPMC-Si/HE800. Toutefois, ce comportement n'est pas retrouvé pour la culture de ces mêmes cellules en 3D au sein des matériaux. Les EPS marins GAGs mimétiques ne semblent pas fournir de site d'adhésion cellulaire car même après trois semaines de culture, les cellules restent rondes, isolées et ne prolifèrent pas. Néanmoins, la fonction des GAG dans un tissu ne se limite pas à fournir des sites d'adhésion et d'attachement, ils peuvent également interagir avec des protéines, intervenir dans la signalisation et la migration cellulaire et participer à l'hydratation du tissu et à sa résistance face aux forces de compression (43). Les différents travaux effectués dans cette deuxième partie nous ont permis de sélectionner deux constructions avec des applications différentes. Un premier hydrogel d'HPMC-Si/HE800 avec une utilisation possible sous la forme de patches pour la culture en 2D de cellules adhérentes. Un deuxième hydrogel composé d'HPMC-Si/GY785 pour la culture en 3D de cellules non adhérentes.

Dans une troisième partie nous avons approfondi l'étude de l'hydrogel d'HPMC-Si/GY785 pour une application potentielle en ingénierie tissulaire du cartilage. Nous avons montré que cette matrice est apte à maintenir le phénotype de chondrocytes primaires cultivés en 3D. De plus, elle permet à des chondrocytes préalablement dédifférenciés en 2D de retrouver un phénotype chondrocytaire une fois placée en 3D dans cet hydrogel. Pour finir, nos résultats indiquent que l'environnement fourni par l'hydrogel d'HPMC-Si/GY785 est apte à la production d'une matrice extracellulaire cartilagineuse composée de collagène de type II et d'agrécan, par des chondrocytes cultivés en 3D, au sein du matériau. Les nombreuses limites associées à l'utilisation de chondrocytes articulaires autologues comme la morbidité

du site donneur, le faible nombre de chondrocytes obtenus et leur dédifférenciation en culture, a motivé à rechercher des sources de cellules autologues alternatives. Actuellement, en ingénierie des tissus squelettiques les cellules souches mésenchymateuses (CSM) apparaissent comme une source de cellules prometteuse (299). La poursuite de notre travail pourrait s'intéresser à étudier l'effet de matrices supplémentés en EPS marins sur le comportement de CSM. En effet, l'interaction des cellules souches avec leur microenvironnement joue un rôle important dans leurs morphogenèse et leurs différenciation (300). Ces interactions sont en partie assurées par les récepteurs de surfaces cellulaires et les composants de la matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire est capable de stocker de nombreux facteurs de croissance et des cytokines qui jouent un rôle majeur lors de l'orientation des cellules souches vers un phénotype cellulaire donné. A cela s'ajoute des données récentes de la littérature qui tendent à montrer que l'élasticité et la rigidité de la matrice jouent un rôle sur l'engagement des cellules souches vers un phénotype donné (172,301,302). En connaissance de ces hypothèses, il apparaît plus qu'intéressant au vu de la composition et des propriétés mécaniques de l'hydrogel d'HPMC-Si/GY785, d'explorer son potentiel pour la culture de CSM.

Les procédés actuellement développés par le laboratoire de Biotechnologie et Molécule Marine de l'Ifremer permettent de modifier les EPS marins et de générer différents dérivés à partir d'un polysaccharide natif. L'effet biologique des EPS est directement lié à leur taille et à leur composition. Il serait intéressant d'utiliser la méthode d'association de l'HPMC-Si avec les EPS marins mis au point dans les travaux de cette thèse, pour tester des EPS HE800 et GY785 de plus faible masse (500.000 à 700.000 Da) et sur-sulfatés. En effet, les groupements sulfates jouent un rôle important dans les processus biologiques et dans la différenciation chondrogénique (300). De cette façon différentes matrices pourraient être réalisées à façon et permettraient d'évaluer l'effet d'une modification de l'environnement cellulaire du point de

vue physique (rigidité) et biologique (quantité de sulfates) pour un éventuel effet sur la différenciation des CSM.

# **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Jadowiec JA, Celil AB, Hollinger JO 2003 Bone tissue engineering: recent advances and promising therapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther* 3(3):409-23.
2. Schreiber RE, Ratcliffe A 2000 Tissue engineering of cartilage. *Methods Mol Biol* 139:301-9.
3. Temenoff JS, Mikos AG 2000 Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering. *Biomaterials* 21(23):2405-12.
4. Langer R, Vacanti JP 1993 Tissue engineering. *Science* 260(5110):920-6.
5. Ashikari-Hada S, Habuchi H, Kariya Y, Kimata K 2005 Heparin regulates vascular endothelial growth factor165-dependent mitogenic activity, tube formation, and its receptor phosphorylation of human endothelial cells. Comparison of the effects of heparin and modified heparins. *J Biol Chem* 280(36):31508-15.
6. Stevens MM, Qanadilo HF, Langer R, Prasad Shastri V 2004 A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 25(5):887-894.
7. Müller FA, Müller L, Hofmann I, Greil P, Wenzel MM, Staudenmaier R 2006 Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 27(21):3955-3963.
8. Jin R, Moreira Teixeira LS, Dijkstra PJ, van Blitterswijk CA, Karperien M, Feijen J 2010 Enzymatically-crosslinked injectable hydrogels based on biomimetic dextran-hyaluronic acid conjugates for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 31(11):3103-3113.
9. Barbucci R, Lamponi S, Borzacchiello A, Ambrosio L, Fini M, Torricelli P, Giardino R 2002 Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis. *Biomaterials* 23(23):4503-13.
10. Kim J, Kim IS, Cho TH, Lee KB, Hwang SJ, Tae G, Noh I, Lee SH, Park Y, Sun K 2007 Bone regeneration using hyaluronic acid-based hydrogel with bone morphogenic protein-2 and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 28(10):1830-1837.
11. Yoo HS, Lee EA, Yoon JJ, Park TG 2005 Hyaluronic acid modified biodegradable scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 26(14):1925-1933.
12. Chen Y-L, Lee H-P, Chan H-Y, Sung L-Y, Chen H-C, Hu Y-C 2007 Composite chondroitin-6-sulfate/dermatan sulfate/chitosan scaffolds for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 28(14):2294-2305.
13. Di Martino A, Sittinger M, Risbud MV 2005 Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials* 26(30):5983-5990.
14. Francis Suh JK, Matthew HWT 2000 Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 21(24):2589-2598.
15. Raguene G, Christen R, Guezennec J, Pignet P, Barbier G 1997 *Vibrio diabolicus* sp. nov., a New Polysaccharide-Secreting Organism Isolated from a Deep-Sea Hydrothermal Vent Polychaete Annelid, *Alvinella pompejana*. *Int J Syst Bacteriol* 47(4):989-995.
16. Rougeaux H, Kervarec N, Pichon R, Guezennec J 1999 Structure of the exopolysaccharide of *Vibrio diabolicus* isolated from a deep-sea hydrothermal vent. *Carbohydrate Research* 322(1-2):40-45.
17. Zanchetta P, Lagarde N, Guezennec J 2003 Systemic Effects on Bone Healing of a New Hyaluronic Acid-Like Bacterial Exopolysaccharide. *Calcified Tissue International* 73(3):232-236.
18. Roger O, Kervarec N, Ratiskol J, Collic-Jouault S, Chevotot L 2004 Structural studies of the main exopolysaccharide produced by the deep-sea bacterium *Alteromonas infernus*. *Carbohydrate Research* 339(14):2371-2380.

19. Collic J, Jouault S, Chevolot L, Helley D, Ratiskol J, Bros A, Sinquin C, Roger O, Fischer A-M 2001 Characterization, chemical modifications and in vitro anticoagulant properties of an exopolysaccharide produced by *Alteromonas infernus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1528(2-3):141-151.
20. Gandhi NS, Mancera RL 2008 The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. *Chemical Biology & Drug Design* 72(6):455-482.
21. Aymard P, Cuvelier G, Launay B, Guezennec J, Barbier G, Talmont F, Fournet B 1991 Rheological properties in aqueous media of three new bacterial polysaccharides from marine origin. *Food Hydrocolloids* 5(1-2):167-169.
22. Trojani C, Weiss P, Michiels JF, Vinatier C, Guicheux J, Daculsi G, Gaudray P, Carle GF, Rochet N 2005 Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel. *Biomaterials* 26(27):5509-17.
23. Trojani C, Boukhechba F, Scimeca J-C, Vandenbos F, Michiels J-F, Daculsi G, Boileau P, Weiss P, Carle GF, Rochet N 2006 Ectopic bone formation using an injectable biphasic calcium phosphate/Si-HPMC hydrogel composite loaded with undifferentiated bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 27(17):3256-3264.
24. Vinatier C, Magne D, Moreau A, Gauthier O, Malard O, Vignes-Colombeix C, Daculsi G, Weiss P, Guicheux J 2007 Engineering cartilage with human nasal chondrocytes and a silanized hydroxypropyl methylcellulose hydrogel. *J Biomed Mater Res A* 80(1):66-74.
25. Singh P, Carraher C, Schwarzbauer JE 2010 Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26:397-419.
26. Daley WP, Peters SB, Larsen M 2008 Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci* 121(Pt 3):255-64.
27. Hynes RO 2009 The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326(5957):1216-9.
28. Berrier AL, Yamada KM 2007 Cell-matrix adhesion. *J Cell Physiol* 213(3):565-73.
29. Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW 2009 Growth Factors, Matrices, and Forces Combine and Control Stem Cells. *Science* 324(5935):1673-1677.
30. Rozario T, DeSimone DW 2010 The extracellular matrix in development and morphogenesis: a dynamic view. *Dev Biol* 341(1):126-40.
31. Ramirez F, Rifkin DB 2003 Cell signaling events: a view from the matrix. *Matrix Biol* 22(2):101-7.
32. Kadler KE, Hill A, Canty-Laird EG 2008 Collagen fibrillogenesis: fibronectin, integrins, and minor collagens as organizers and nucleators. *Curr Opin Cell Biol* 20(5):495-501.
33. Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP 2007 Collagens at a glance. *J Cell Sci* 120(Pt 12):1955-8.
34. Myllyharju J, Kivirikko KI 2001 Collagens and collagen-related diseases. *Ann Med* 33(1):7-21.
35. Germain L, Xu, W., Michel M., Fradette, J., Godbout, M-J., Li, H. 1997 Skin Stem Cell Identification and culture: A potential tool for rapid epidermal sheet production and grafting. *Skin substitute production by tissue engineering : Clinical and fundamental applications Chapter 8*:176-210.
36. Brodsky B, Persikov AV 2005 Molecular structure of the collagen triple helix. *Adv Protein Chem* 70:301-39.
37. Mostafavi-Pour Z, Askari JA, Parkinson SJ, Parker PJ, Ng TT, Humphries MJ 2003 Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. *J Cell Biol* 161(1):155-67.

38. Vakonakis I, Campbell ID 2007 Extracellular matrix: from atomic resolution to ultrastructure. *Curr Opin Cell Biol* 19(5):578-83.
39. Kao WJ 1999 Evaluation of protein-modulated macrophage behavior on biomaterials: designing biomimetic materials for cellular engineering. *Biomaterials* 20(23-24):2213-21.
40. Timpl R, Tisi D, Talts JF, Andac Z, Sasaki T, Hohenester E 2000 Structure and function of laminin LG modules. *Matrix Biol* 19(4):309-17.
41. Schenk S, Hintermann E, Bilban M, Koshikawa N, Hojilla C, Khokha R, Quaranta V 2003 Binding to EGF receptor of a laminin-5 EGF-like fragment liberated during MMP-dependent mammary gland involution. *J Cell Biol* 161(1):197-209.
42. Kleinsmith, Becker, Hardin, Bertoni 2009 *The World of the Cell*. Pearson Education.
43. Sasisekharan R, Raman R, Prabhakar V 2006 Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans. *Annu Rev Biomed Eng* 8:181-231.
44. Yang B, Yin Z, Cao J, Shi Z, Zhang Z, Song H, Liu F, Caterson B 2010 In vitro cartilage tissue engineering using cancellous bone matrix gelatin as a biodegradable scaffold. *Biomed Mater* 5(4):045003.
45. Hardingham TE, Fosang AJ 1992 Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J* 6(3):861-70.
46. Schlessinger J, Lax I, Lemmon M 1995 Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell* 83(3):357-60.
47. Itano N 2008 Simple primary structure, complex turnover regulation and multiple roles of hyaluronan. *J Biochem* 144(2):131-7.
48. Chen WY, Abatangelo G 1999 Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen* 7(2):79-89.
49. Toole BP 2001 Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 12(2):79-87.
50. Toole BP 1997 Hyaluronan in morphogenesis. *J Intern Med* 242(1):35-40.
51. Toole BP 2004 Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* 4(7):528-39.
52. Mascellani G, Liverani L, Bianchini P, Parma B, Torri G, Bisio A, Guerrini M, Casu B 1993 Structure and contribution to the heparin cofactor II-mediated inhibition of thrombin of naturally oversulphated sequences of dermatan sulphate. *Biochem J* 296 (Pt 3):639-48.
53. Penc SF, Pomahac B, Eriksson E, Detmar M, Gallo RL 1999 Dermatan sulfate activates nuclear factor-kappaB and induces endothelial and circulating intercellular adhesion molecule-1. *J Clin Invest* 103(9):1329-35.
54. Funderburgh JL 2000 Keratan sulfate: structure, biosynthesis, and function. *Glycobiology* 10(10):951-8.
55. Bishop JR, Schuksz M, Esko JD 2007 Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* 446(7139):1030-7.
56. Lindahl U, Kjellen L 1991 Heparin or heparan sulfate--what is the difference? *Thromb Haemost* 66(1):44-8.
57. Rabenstein DL 2002 Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat Prod Rep* 19(3):312-31.
58. Sasisekharan R, Shriver Z, Venkataraman G, Narayanasami U 2002 Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nat Rev Cancer* 2(7):521-8.
59. Lamoureux F, Baud'huin M, Duplomb L, Heymann D, Redini F 2007 Proteoglycans: key partners in bone cell biology. *Bioessays* 29(8):758-71.
60. Chen FH, Rousche KT, Tuan RS 2006 Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2(7):373-82.

61. Eyre DR, Wu JJ, Fernandes RJ, Pietka TA, Weis MA 2002 Recent developments in cartilage research: matrix biology of the collagen II/IX/XI heterofibril network. *Biochem Soc Trans* 30(Pt 6):893-9.
62. Rogers BA, Murphy CL, Cannon SR, Briggs TW 2006 Topographical variation in glycosaminoglycan content in human articular cartilage. *J Bone Joint Surg Br* 88(12):1670-4.
63. Dudhia J 2005 Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cell Mol Life Sci* 62(19-20):2241-56.
64. Chen L, Wu Y, Lee V, Kiani C, Adams ME, Yao Y, Yang BB 2002 The folded modules of aggrecan G3 domain exert two separable functions in glycosaminoglycan modification and product secretion. *J Biol Chem* 277(4):2657-65.
65. Esko JD, Kimata K, Lindhal U 2009 *Essentials of glycobiology* 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press Chapter 16.
66. Huber M, Trattinig S, Lintner F 2000 Anatomy, biochemistry, and physiology of articular cartilage. *Invest Radiol* 35(10):573-80.
67. Tyyni A, Karlsson J 2000 Biological treatment of joint cartilage damage. *Scand J Med Sci Sports* 10(5):249-65.
68. Gardner DL 1994 Problems and paradigms in joint pathology. *J Anat* 184 ( Pt 3):465-76.
69. Clément-Bouheddi 2005 Contribution à l'étude du traitement de lésions du cartilage fémoral par greffe de chondrocytes dans une colle de fibrine. hèse de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, Université clude bernard.
70. Roth V, Mow VC 1980 The intrinsic tensile behavior of the matrix of bovine articular cartilage and its variation with age. *J Bone Joint Surg Am* 62(7):1102-17.
71. Lyons TJ, Stoddart RW, McClure SF, McClure J 2005 The tidemark of the chondro-osseous junction of the normal human knee joint. *J Mol Histol* 36(3):207-15.
72. Sommerfeldt DWaCTR, . 2001 *Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton*. . *Eur Spine J* 10 Suppl 2:86-95.
73. Lawler JW, Slayter HS, Coligan JE 1978 Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets. *J Biol Chem* 253(23):8609-16.
74. Glowacki J, Rey C, Glimcher MJ, Cox KA, Lian J 1991 A role for osteocalcin in osteoclast differentiation. *J Cell Biochem* 45(3):292-302.
75. Swaminathan R 2001 Biochemical markers of bone turnover. *Clin Chim Acta* 313(1-2):95-105.
76. Hunter GK, Goldberg HA 1994 Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Biochem J* 302 ( Pt 1):175-9.
77. Wiesmann HP, Meyer U, Plate U, Hohling HJ 2005 Aspects of collagen mineralization in hard tissue formation. *Int Rev Cytol* 242:121-56.
78. Weiner S, Traub W 1992 Bone structure: from angstroms to microns. *Faseb J* 6(3):879-85.
79. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC 1999 Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *J Clin Invest* 104(4):439-46.
80. Burger EH, Klein-Nulend J, Smit TH 2003 Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon--a proposal. *J Biomech* 36(10):1453-9.
81. Holtrop ME, King GJ 1977 The ultrastructure of the osteoclast and its functional implications. *Clin Orthop Relat Res* (123):177-96.



82. González-Iglesias R, Pajares MA, Ocal C, Carlos Espinosa J, Oesch B, Gasset M 2002 Prion Protein Interaction with Glycosaminoglycan Occurs with the Formation of Oligomeric Complexes Stabilized by Cu(II) Bridges. *Journal of Molecular Biology* 319(2):527-540.
83. Eckert R, Ragg H 2003 Zinc ions promote the interaction between heparin and heparin cofactor II. *FEBS Letters* 541(1-3):121-125.
84. Nugent MA, Iozzo RV 2000 Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* 32(2):115-20.
85. Kreuger J, Spillmann D, Li JP, Lindahl U 2006 Interactions between heparan sulfate and proteins: the concept of specificity. *J Cell Biol* 174(3):323-7.
86. Salmivirta M, Lidholt K, Lindahl U 1996 Heparan sulfate: a piece of information. *FASEB J* 10(11):1270-9.
87. Lindahl U, Kusche-Gullberg M, Kjellen L 1998 Regulated diversity of heparan sulfate. *J Biol Chem* 273(39):24979-82.
88. Turnbull J, Powell A, Guimond S 2001 Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol* 11(2):75-82.
89. Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD 1991 Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiol Rev* 71(2):481-539.
90. Vlodaysky I, Abboud-Jarrous G, Elkin M, Naggi A, Casu B, Sasisekharan R, Ilan N 2006 The impact of heparanase and heparin on cancer metastasis and angiogenesis. *Pathophysiol Haemost Thromb* 35(1-2):116-27.
91. Lortat-Jacob H, Grosdidier A, Imberty A 2002 Structural diversity of heparan sulfate binding domains in chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(3):1229-34.
92. Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M 1999 Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 68:729-77.
93. Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S 1993 T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* 361(6407):79-82.
94. Gilat D, Hershkoviz R, Mekori YA, Vlodaysky I, Lider O 1994 Regulation of adhesion of CD4+ T lymphocytes to intact or heparinase-treated subendothelial extracellular matrix by diffusible or anchored RANTES and MIP-1 beta. *J Immunol* 153(11):4899-906.
95. Netelenbos T, Zuijderduijn S, Van Den Born J, Kessler FL, Zweegman S, Huijgens PC, Drager AM 2002 Proteoglycans guide SDF-1-induced migration of hematopoietic progenitor cells. *J Leukoc Biol* 72(2):353-62.
96. Sweeney EA, Lortat-Jacob H, Priestley GV, Nakamoto B, Papayannopoulou T 2002 Sulfated polysaccharides increase plasma levels of SDF-1 in monkeys and mice: involvement in mobilization of stem/progenitor cells. *Blood* 99(1):44-51.
97. Flannery CR 2006 MMPs and ADAMTSs: functional studies. *Front Biosci* 11:544-69.
98. Damon DH, Lobb RR, D'Amore PA, Wagner JA 1989 Heparin potentiates the action of acidic fibroblast growth factor by prolonging its biological half-life. *J Cell Physiol* 138(2):221-6.
99. Rosengart TK, Johnson WV, Friesel R, Clark R, Maciag T 1988 Heparin protects heparin-binding growth factor-I from proteolytic inactivation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 152(1):432-40.
100. Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM 1991 Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64(4):841-8.

101. Mohammadi M, Olsen SK, Ibrahimi OA 2005 Structural basis for fibroblast growth factor receptor activation. *Cytokine Growth Factor Rev* 16(2):107-37.
102. Akiyama SK, Nagata K, Yamada KM 1990 Cell surface receptors for extracellular matrix components. *Biochim Biophys Acta* 1031(1):91-110.
103. Wight TN, Kinsella MG, Qwarnstrom EE 1992 The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. *Curr Opin Cell Biol* 4(5):793-801.
104. Roughley PJ, Lee ER 1994 Cartilage proteoglycans: structure and potential functions. *Microsc Res Tech* 28(5):385-97.
105. Sekiguchi K, Hakomori S, Funahashi M, Matsumoto I, Seno N 1983 Binding of fibronectin and its proteolytic fragments to glycosaminoglycans. Exposure of cryptic glycosaminoglycan-binding domains upon limited proteolysis. *J Biol Chem* 258(23):14359-65.
106. LeBaron RG, Hook A, Esko JD, Gay S, Hook M 1989 Binding of heparan sulfate to type V collagen. A mechanism of cell-substrate adhesion. *J Biol Chem* 264(14):7950-6.
107. Koliakos GG, Kouzi-Koliakos K, Furcht LT, Reger LA, Tsilibary EC 1989 The binding of heparin to type IV collagen: domain specificity with identification of peptide sequences from the alpha 1(IV) and alpha 2(IV) which preferentially bind heparin. *J Biol Chem* 264(4):2313-23.
108. Delehedde M, Lyon M, Sergeant N, Rahmoune H, Fernig DG 2001 Proteoglycans: pericellular and cell surface multireceptors that integrate external stimuli in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6(3):253-73.
109. Eiselt P, Yeh J, Latvala RK, Shea LD, Mooney DJ 2000 Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels. *Biomaterials* 21(19):1921-7.
110. Cole GJ, Loewy A, Cross NV, Akeson R, Glaser L 1986 Topographic localization of the heparin-binding domain of the neural cell adhesion molecule N-CAM. *J Cell Biol* 103(5):1739-44.
111. Ponce S, Orive G, Hernandez R, Gascon AR, Pedraz JL, de Haan BJ, Faas MM, Mathieu HJ, de Vos P 2006 Chemistry and the biological response against immunisolating alginate-polycation capsules of different composition. *Biomaterials* 27(28):4831-9.
112. Henke CA, Roongta U, Mickelson DJ, Knutson JR, McCarthy JB 1996 CD44-related chondroitin sulfate proteoglycan, a cell surface receptor implicated with tumor cell invasion, mediates endothelial cell migration on fibrinogen and invasion into a fibrin matrix. *J Clin Invest* 97(11):2541-52.
113. Capila I, Linhardt RJ 2002 Heparin-protein interactions. *Angew Chem Int Ed Engl* 41(3):391-412.
114. Utani A, Nomizu M, Matsuura H, Kato K, Kobayashi T, Takeda U, Aota S, Nielsen PK, Shinkai H 2001 A unique sequence of the laminin alpha 3 G domain binds to heparin and promotes cell adhesion through syndecan-2 and -4. *J Biol Chem* 276(31):28779-88.
115. Wilkins-Port CE, McKeown-Longo PJ 1996 Heparan sulfate proteoglycans function in the binding and degradation of vitronectin by fibroblast monolayers. *Biochem Cell Biol* 74(6):887-97.
116. Gambarini AG, Miyamoto CA, Lima GA, Nader HB, Dietrich CP 1993 Mitogenic activity of acidic fibroblast growth factor is enhanced by highly sulfated oligosaccharides derived from heparin and heparan sulfate. *Mol Cell Biochem* 124(2):121-9.
117. Iozzo RV, San Antonio JD 2001 Heparan sulfate proteoglycans: heavy hitters in the angiogenesis arena. *J Clin Invest* 108(3):349-55.

118. Hacker U, Nybakken K, Perrimon N 2005 Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6(7):530-41.
119. Koopman G, Taher TE, Mazzucchelli I, Keehnen RM, van der Voort R, Manten-Horst E, Ricevuti G, Pals ST, Das PK 1998 CD44 isoforms, including the CD44 V3 variant, are expressed on endothelium, suggesting a role for CD44 in the immobilization of growth factors and the regulation of the local immune response. *Biochem Biophys Res Commun* 245(1):172-6.
120. Dreyfuss JL, Regatieri CV, Jarrouge TR, Cavalheiro RP, Sampaio LO, Nader HB 2009 Heparan sulfate proteoglycans: structure, protein interactions and cell signaling. *An Acad Bras Cienc* 81(3):409-29.
121. Baeg GH, Lin X, Khare N, Baumgartner S, Perrimon N 2001 Heparan sulfate proteoglycans are critical for the organization of the extracellular distribution of Wingless. *Development* 128(1):87-94.
122. Peretti T, Waisberg J, Mader AM, de Matos LL, da Costa RB, Conceicao GM, Lopes AC, Nader HB, Pinhal MA 2008 Heparanase-2, syndecan-1, and extracellular matrix remodeling in colorectal carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 20(8):756-65.
123. Yu WH, Yu S, Meng Q, Brew K, Woessner JF, Jr. 2000 TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J Biol Chem* 275(40):31226-32.
124. Grunert M, Nurcombe V, Cool SM 2008 Stem cell fate decisions: the role of heparan sulfate in the control of autocrine and paracrine signals. *Curr Stem Cell Res Ther* 3(1):1-8.
125. Kirkpatrick CA, Selleck SB 2007 Heparan sulfate proteoglycans at a glance. *J Cell Sci* 120(Pt 11):1829-32.
126. Saksela O, Moscatelli D, Sommer A, Rifkin DB 1988 Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J Cell Biol* 107(2):743-51.
127. Leicht DT, Balan V, Kaplun A, Singh-Gupta V, Kaplun L, Dobson M, Tzivion G 2007 Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. *Biochim Biophys Acta* 1773(8):1196-212.
128. Carnero A, Blanco-Aparicio C, Renner O, Link W, Leal JF 2008 The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications. *Curr Cancer Drug Targets* 8(3):187-98.
129. Escriba PV, Wedegaertner PB, Goni FM, Vogler O 2007 Lipid-protein interactions in GPCR-associated signaling. *Biochim Biophys Acta* 1768(4):836-52.
130. Murray AJ 2008 Pharmacological PKA inhibition: all may not be what it seems. *Sci Signal* 1(22):re4.
131. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A 2004 From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol* 199(2):174-80.
132. Cichy J, Bals R, Potempa J, Mani A, Pure E 2002 Proteinase-mediated release of epithelial cell-associated CD44. Extracellular CD44 complexes with components of cellular matrices. *J Biol Chem* 277(46):44440-7.
133. Hynes RO 2004 The emergence of integrins: a personal and historical perspective. *Matrix Biol* 23(6):333-40.
134. Takada Y, Ye X, Simon S 2007 The integrins. *Genome Biol* 8(5):215.
135. Takagi J 2007 Structural basis for ligand recognition by integrins. *Curr Opin Cell Biol* 19(5):557-64.
136. van der Flier A, Sonnenberg A 2001 Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 305(3):285-98.
137. Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D 2010 Integrins. *Cell Tissue Res* 339(1):269-80.

138. Homminga GN, Bulstra SK, Bouwmeester PS, van der Linden AJ 1990 Perichondral grafting for cartilage lesions of the knee. *J Bone Joint Surg Br* 72(6):1003-7.
139. Angermann P, Riegels-Nielsen P, Pedersen H 1998 Osteochondritis dissecans of the femoral condyle treated with periosteal transplantation. Poor outcome in 14 patients followed for 6-9 years. *Acta Orthop Scand* 69(6):595-7.
140. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C 1993 Cellular aspects on treatment of cartilage injuries. *Agents Actions Suppl* 39:237-41.
141. Brittberg M 1999 Autologous chondrocyte transplantation. *Clin Orthop Relat Res* (367 Suppl):S147-55.
142. Paccola CA, Xavier CA, Goncalves RP 1979 Fresh immature articular cartilage allografts. A study on the integration of chondral and osteochondral grafts both in normal and in papain-treated knee joints of rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg* 93(4):253-9.
143. Oklund SA, Prolo DJ, Gutierrez RV, King SE 1986 Quantitative comparisons of healing in cranial fresh autografts, frozen autografts and processed autografts, and allografts in canine skull defects. *Clin Orthop Relat Res* (205):269-91.
144. Prolo DJ, Rodrigo JJ 1985 Contemporary bone graft physiology and surgery. *Clin Orthop Relat Res* (200):322-42.
145. Urist MR, Strates BS 1970 Bone formation in implants of partially and wholly demineralized bone matrix. Including observations on acetone-fixed intra and extracellular proteins. *Clin Orthop Relat Res* 71:271-8.
146. Costain DJ, Crawford RW 2009 Fresh-frozen vs. irradiated allograft bone in orthopaedic reconstructive surgery. *Injury* 40(12):1260-4.
147. Delloye C, Cornu O, Druetz V, Barbier O 2007 Bone allografts: What they can offer and what they cannot. *J Bone Joint Surg Br* 89(5):574-9.
148. Langer R 1997 Tissue engineering: a new field and its challenges. *Pharm Res* 14(7):840-1.
149. Patterson J, Martino MM, Hubbell JA 2010 Biomimetic materials in tissue engineering. *Materials Today* 13(1-2):14-22.
150. Bonzani IC, George JH, Stevens MM 2006 Novel materials for bone and cartilage regeneration. *Curr Opin Chem Biol* 10(6):568-75.
151. Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E 2010 Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science* 35(4):403-440.
152. Williams DF 2009 On the nature of biomaterials. *Biomaterials* 30(30):5897-909.
153. Place ES, Evans ND, Stevens MM 2009 Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nat Mater* 8(6):457-70.
154. Stevens MM, George JH 2005 Exploring and engineering the cell surface interface. *Science* 310(5751):1135-8.
155. Liu C, Xia Z, Czernuszka JT 2007 Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering. *Chemical Engineering Research and Design* 85(7):1051-1064.
156. Leong KF, Chua CK, Sudarmadji N, Yeong WY 2008 Engineering functionally graded tissue engineering scaffolds. *J Mech Behav Biomed Mater* 1(2):140-52.
157. Grayson WL, Martens TP, Eng GM, Radisic M, Vunjak-Novakovic G 2009 Biomimetic approach to tissue engineering. *Semin Cell Dev Biol* 20(6):665-73.
158. Cushing MC, Anseth KS 2007 Materials science. Hydrogel cell cultures. *Science* 316(5828):1133-4.
159. Elisseff J 2004 Injectable cartilage tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther* 4(12):1849-59.

160. Elisseeff J, Puleo C, Yang F, Sharma B 2005 Advances in skeletal tissue engineering with hydrogels. *Orthod Craniofac Res* 8(3):150-61.
161. Hubbell JA 2003 Materials as morphogenetic guides in tissue engineering. *Curr Opin Biotechnol* 14(5):551-8.
162. Dang JM, Leong KW 2006 Natural polymers for gene delivery and tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* 58(4):487-499.
163. Gomes M, Azevedo H, Malafaya P, Silva S, Oliveira J, Silva G, Sousa R, Mano J, Reis R, Clemens van B, Peter T, Anders L, Jeffrey H, David FW, Ranieri C, Joost DdB, Jérôme S 2008 Natural Polymers in tissue engineering applications *Tissue Engineering*. Academic Press, Burlington, pp 145-192.
164. Lee CH, Singla A, Lee Y 2001 Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm* 221(1-2):1-22.
165. O'Brien FJ, Harley BA, Waller MA, Yannas IV, Gibson LJ, Prendergast PJ 2007 The effect of pore size on permeability and cell attachment in collagen scaffolds for tissue engineering. *Technol Health Care* 15(1):3-17.
166. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM 1994 Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 76(4):579-92.
167. Harriger MD, Supp AP, Warden GD, Boyce ST 1997 Glutaraldehyde crosslinking of collagen substrates inhibits degradation in skin substitutes grafted to athymic mice. *J Biomed Mater Res* 35(2):137-45.
168. van Luyn MJ, van Wachem PB, Damink LO, Dijkstra PJ, Feijen J, Nieuwenhuis P 1992 Relations between in vitro cytotoxicity and crosslinked dermal sheep collagens. *J Biomed Mater Res* 26(8):1091-110.
169. Angele P, Abke J, Kujat R, Faltermeier H, Schumann D, Nerlich M, Kinner B, Englert C, Ruszczak Z, Mehrl R, Mueller R 2004 Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. *Biomaterials* 25(14):2831-41.
170. Daamen WF, van Moerkerk HT, Hafmans T, Buttafoco L, Poot AA, Veerkamp JH, van Kuppevelt TH 2003 Preparation and evaluation of molecularly-defined collagen-elastin-glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 24(22):4001-9.
171. Liu LS, Thompson AY, Heidaran MA, Poser JW, Spiro RC 1999 An osteoconductive collagen/hyaluronate matrix for bone regeneration. *Biomaterials* 20(12):1097-108.
172. Ben-Ari A, Rivkin R, Frishman M, Gaberman E, Levdansky L, Gorodetsky R 2009 Isolation and implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells with fibrin micro beads to repair a critical-size bone defect in mice. *Tissue Eng Part A* 15(9):2537-46.
173. Gorodetsky R, Vexler A, Levdansky L, Marx G 2004 Fibrin microbeads (FMB) as biodegradable carriers for culturing cells and for accelerating wound healing. *Methods Mol Biol* 238:11-24.
174. Ahmed TA, Dare EV, Hincke M 2008 Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev* 14(2):199-215.
175. Marx G, Mou X, Hotovely-Salomon A, Levdansky L, Gaberman E, Belenky D, Gorodetsky R 2008 Heat denaturation of fibrinogen to develop a biomedical matrix. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 84(1):49-57.
176. Catelas I, Sese N, Wu BM, Dunn JC, Helgerson S, Tawil B 2006 Human mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in fibrin gels in vitro. *Tissue Eng* 12(8):2385-96.

177. Freed LE, Grande DA, Lingbin Z, Emmanuel J, Marquis JC, Langer R 1994 Joint resurfacing using allograft chondrocytes and synthetic biodegradable polymer scaffolds. *J Biomed Mater Res* 28(8):891-9.
178. van Susante JL, Buma P, Schuman L, Homminga GN, van den Berg WB, Veth RP 1999 Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: an experimental study in the goat. *Biomaterials* 20(13):1167-75.
179. Vinatier C, Gauthier O, Masson M, Malard O, Moreau A, Fellah BH, Bilban M, Spaethe R, Daculsi G, Guicheux J 2009 Nasal chondrocytes and fibrin sealant for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 89(1):176-85.
180. Almqvist KF, Wang L, Wang J, Baeten D, Cornelissen M, Verdonk R, Veys EM, Verbruggen G 2001 Culture of chondrocytes in alginate surrounded by fibrin gel: characteristics of the cells over a period of eight weeks. *Ann Rheum Dis* 60(8):781-90.
181. Vepari C, Kaplan DL 2007 Silk as a Biomaterial. *Prog Polym Sci* 32(8-9):991-1007.
182. Altman GH, Diaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, Lu H, Richmond J, Kaplan DL 2003 Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 24(3):401-16.
183. Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, Zichner L, Langer R, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G 2004 Engineering cartilage-like tissue using human mesenchymal stem cells and silk protein scaffolds. *Biotechnol Bioeng* 88(3):379-91.
184. Muzzarelli RAA 2009 Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. *Carbohydrate Polymers* 76(2):167-182.
185. Muzzarelli RAA, Mattioli-Belmonte M, Tietz C, Biagini R, Ferioli G, Brunelli MA, Fini M, Giardino R, Ilari P, Biagini G 1994 Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. *Biomaterials* 15(13):1075-1081.
186. Li Z, Ramay HR, Hauch KD, Xiao D, Zhang M 2005 Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 26(18):3919-3928.
187. Lahiji A, Sohrabi A, Hungerford DS, Frondoza CG 2000 Chitosan supports the expression of extracellular matrix proteins in human osteoblasts and chondrocytes. *J Biomed Mater Res* 51(4):586-95.
188. Yamane S, Iwasaki N, Majima T, Funakoshi T, Masuko T, Harada K, Minami A, Monde K, Nishimura S 2005 Feasibility of chitosan-based hyaluronic acid hybrid biomaterial for a novel scaffold in cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 26(6):611-9.
189. Laurent TC 1987 Biochemistry of hyaluronan. *Acta Otolaryngol Suppl* 442:7-24.
190. Kogan G, Soltes L, Stern R, Gemeiner P 2007 Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnol Lett* 29(1):17-25.
191. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL 2007 Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59(4-5):207-233.
192. Prestwich GD, Marecak DM, Marecek JF, Vercruyssen KP, Ziebell MR 1998 Controlled chemical modification of hyaluronic acid: synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *J Control Release* 53(1-3):93-103.
193. Stillaert FB, Di Bartolo C, Hunt JA, Rhodes NP, Tognana E, Monstrey S, Blondeel PN 2008 Human clinical experience with adipose precursor cells seeded on hyaluronic acid-based spongy scaffolds. *Biomaterials* 29(29):3953-9.
194. Tognana E, Padera RF, Chen F, Vunjak-Novakovic G, Freed LE 2005 Development and remodeling of engineered cartilage-explant composites in vitro and in vivo. *Osteoarthritis Cartilage* 13(10):896-905.

195. Ehlers EM, Behrens P, Wunsch L, Kuhnel W, Russlies M 2001 Effects of hyaluronic acid on the morphology and proliferation of human chondrocytes in primary cell culture. *Ann Anat* 183(1):13-7.
196. Toh WS, Lee EH, Guo XM, Chan JK, Yeow CH, Choo AB, Cao T 2010 Cartilage repair using hyaluronan hydrogel-encapsulated human embryonic stem cell-derived chondrogenic cells. *Biomaterials* 31(27):6968-80.
197. Allison DD, Grande-Allen KJ 2006 Review. Hyaluronan: a powerful tissue engineering tool. *Tissue Eng* 12(8):2131-40.
198. Smidsrod O, Skjak-Braek G 1990 Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol* 8(3):71-8.
199. Simmons CA, Alsberg E, Hsiong S, Kim WJ, Mooney DJ 2004 Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance in vivo bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone* 35(2):562-9.
200. Jeon O, Bouhadir KH, Mansour JM, Alsberg E 2009 Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties. *Biomaterials* 30(14):2724-34.
201. Alsberg E, Anderson KW, Albeiruti A, Franceschi RT, Mooney DJ 2001 Cell-interactive alginate hydrogels for bone tissue engineering. *J Dent Res* 80(11):2025-9.
202. Atala A, Kim W, Paige KT, Vacanti CA, Retik AB 1994 Endoscopic treatment of vesicoureteral reflux with a chondrocyte-alginate suspension. *J Urol* 152(2 Pt 2):641-3; discussion 644.
203. Chang SC, Rowley JA, Tobias G, Genes NG, Roy AK, Mooney DJ, Vacanti CA, Bonassar LJ 2001 Injection molding of chondrocyte/alginate constructs in the shape of facial implants. *J Biomed Mater Res* 55(4):503-11.
204. Wang L, Shelton RM, Cooper PR, Lawson M, Triffitt JT, Barralet JE 2003 Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering. *Biomaterials* 24(20):3475-81.
205. Martson M, Viljanto J, Hurme T, Laippala P, Saukko P 1999 Is cellulose sponge degradable or stable as implantation material? An in vivo subcutaneous study in the rat. *Biomaterials* 20(21):1989-95.
206. Martson M, Viljanto J, Hurme T, Saukko P 1998 Biocompatibility of cellulose sponge with bone. *Eur Surg Res* 30(6):426-32.
207. Barbie C, Chauveaux D, Barthe X, Baquey C, Poustis J 1990 Biological behavior of cellulosic materials after bone implantation: preliminary results. *Clin Mater* 5(2-4):251-8.
208. Miyamoto T, Takahashi S, Ito H, Inagaki H, Noishiki Y 1989 Tissue biocompatibility of cellulose and its derivatives. *J Biomed Mater Res* 23(1):125-33.
209. Muller-Mai C, Voigt C, Knarse W, Sela J, Gross UM 1991 The early host and material response of bone-bonding and non-bonding glass-ceramic implants as revealed by scanning electron microscopy and histochemistry. *Biomaterials* 12(9):865-71.
210. Fricain JC, Granja PL, Barbosa MA, de Jeso B, Barthe N, Baquey C 2002 Cellulose phosphates as biomaterials. In vivo biocompatibility studies. *Biomaterials* 23(4):971-80.
211. Svensson A, Nicklasson E, Harrah T, Panilaitis B, Kaplan DL, Brittberg M, Gatenholm P 2005 Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage. *Biomaterials* 26(4):419-31.
212. Kanematsu A, Marui A, Yamamoto S, Ozeki M, Hirano Y, Yamamoto M, Ogawa O, Komeda M, Tabata Y 2004 Type I collagen can function as a reservoir of basic fibroblast growth factor. *J Control Release* 99(2):281-92.

213. Schonherr E, Hausser HJ 2000 Extracellular matrix and cytokines: a functional unit. *Dev Immunol* 7(2-4):89-101.
214. Massague J 1998 TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753-91.
215. Vacanti JP, Langer R 1999 Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* 354 Suppl 1:SI32-4.
216. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, Johnstone B 1998 The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 80(12):1745-57.
217. Williams CG, Kim TK, Taboas A, Malik A, Manson P, Elisseeff J 2003 In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a photopolymerizing hydrogel. *Tissue Eng* 9(4):679-88.
218. Steinbrech DS, Mehrara BJ, Rowe NM, Dudziak ME, Luchs JS, Saadeh PB, Gittes GK, Longaker MT 2000 Gene expression of TGF-beta, TGF-beta receptor, and extracellular matrix proteins during membranous bone healing in rats. *Plast Reconstr Surg* 105(6):2028-38.
219. O'Kane S, Ferguson MW 1997 Transforming growth factor beta s and wound healing. *Int J Biochem Cell Biol* 29(1):63-78.
220. Ignatz RA, Massague J 1986 Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem* 261(9):4337-45.
221. Chen JK, Hoshi H, McKeenan WL 1987 Transforming growth factor type beta specifically stimulates synthesis of proteoglycan in human adult arterial smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(15):5287-91.
222. Morra M 2005 Engineering of Biomaterials Surfaces by Hyaluronan. *Biomacromolecules* 6(3):1205-1223.
223. Wakefield LM, Winokur TS, Hollands RS, Christopherson K, Levinson AD, Sporn MB 1990 Recombinant latent transforming growth factor beta 1 has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth factor beta 1, and a different tissue distribution. *J Clin Invest* 86(6):1976-84.
224. Nimni ME 1997 Polypeptide growth factors: targeted delivery systems. *Biomaterials* 18(18):1201-25.
225. Chen D, Zhao M, Mundy GR 2004 Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 22(4):233-41.
226. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Israel DI, Hewick RM, Kerns KM, LaPan P, et al. 1990 Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(6):2220-4.
227. Martel-Pelletier J, Di Battista JA, Lajeunesse D, Pelletier JP 1998 IGF/IGFBP axis in cartilage and bone in osteoarthritis pathogenesis. *Inflamm Res* 47(3):90-100.
228. Loeser RF, Todd MD, Seely BL 2003 Prolonged treatment of human osteoarthritic chondrocytes with insulin-like growth factor-I stimulates proteoglycan synthesis but not proteoglycan matrix accumulation in alginate cultures. *J Rheumatol* 30(7):1565-70.
229. De Mattei M, Pellati A, Pasello M, Ongaro A, Setti S, Massari L, Gemmati D, Caruso A 2004 Effects of physical stimulation with electromagnetic field and insulin growth factor-I treatment on proteoglycan synthesis of bovine articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 12(10):793-800.



230. Guler HP, Zapf J, Schmid C, Froesch ER 1989 Insulin-like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half-lives and production rates. *Acta Endocrinol (Copenh)* 121(6):753-8.
231. Hsiong SX, Mooney DJ 2006 Regeneration of vascularized bone. *Periodontol* 2000 41:109-22.
232. Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Gunther KP, Dehio C, Puhl W, Brenner RE 2002 Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone* 30(3):472-7.
233. Fujisato T, Sajiki T, Liu Q, Ikada Y 1996 Effect of basic fibroblast growth factor on cartilage regeneration in chondrocyte-seeded collagen sponge scaffold. *Biomaterials* 17(2):155-62.
234. Madry H, Emkey G, Zurakowski D, Trippel SB 2004 Overexpression of human fibroblast growth factor 2 stimulates cell proliferation in an ex vivo model of articular chondrocyte transplantation. *J Gene Med* 6(2):238-45.
235. Chung R, Foster BK, Zannettino AC, Xian CJ 2009 Potential roles of growth factor PDGF-BB in the bony repair of injured growth plate. *Bone* 44(5):878-85.
236. Niedzwiedzki T, Dabrowski Z, Miszta H, Pawlikowski M 1993 Bone healing after bone marrow stromal cell transplantation to the bone defect. *Biomaterials* 14(2):115-21.
237. Granero-Molto F, Weis JA, Longobardi L, Spagnoli A 2008 Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair. *Expert Opin Biol Ther* 8(3):255-68.
238. T C 2010 Associations cellules souches mésenchymateuses et céramiques pour l'ingénierie tissulaire osseuse. Thèse, Université François rabelais de Tours.
239. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP 1968 Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 6(2):230-47.
240. Sakaguchi Y, Sekiya I, Yagishita K, Muneta T 2005 Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 52(8):2521-9.
241. Tisato V, Naresh K, Girdlestone J, Navarrete C, Dazzi F 2007 Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia* 21(9):1992-9.
242. Garcia-Castro J, Balas A, Ramirez M, Perez-Martinez A, Madero L, Gonzalez-Vicent M, Diaz MA 2007 Mesenchymal stem cells are of recipient origin in pediatric transplantations using umbilical cord blood, peripheral blood, or bone marrow. *J Pediatr Hematol Oncol* 29(6):388-92.
243. Koch TG, Heerkens T, Thomsen PD, Betts DH 2007 Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnol* 7:26.
244. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH 2002 Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13(12):4279-95.
245. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH 2001 Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7(2):211-28.
246. Tschan GM, König GM, Wright AD, Sticher O 1996 Chamaemeloside, a new flavonoid glycoside from *Chamaemelum nobile*. *Phytochemistry* 41(2):643-646.
247. Mayer AMS, Rodríguez AD, Berlinck RGS, Fusetani N 2010 Marine pharmacology in 2007-8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities;

- affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 153(2):191-222.
248. Donia M, Hamann MT 2003 Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *The Lancet Infectious Diseases* 3(6):338-348.
  249. Glaser KB, Mayer AMS 2009 A renaissance in marine pharmacology: From preclinical curiosity to clinical reality. *Biochemical Pharmacology* 78(5):440-448.
  250. Mayer AMS, Gustafson KR 2008 Marine pharmacology in 2005-2006: Antitumour and cytotoxic compounds. *European Journal of Cancer* 44(16):2357-2387.
  251. Minic Z, Serre V, Hervé G 2006 Adaptation des organismes aux conditions extrêmes des sources hydrothermales marines profondes. *Comptes Rendus Biologies* 329(7):527-540.
  252. Collic-Jouault S, Zanchetta P, Helley D, Ratiskol J, Siquin C, Fischer AM, Guezennec J 2004 Les polysaccharides microbiens d'origine marine et leur potentiel en thérapeutique humaine. *Pathologie Biologie* 52(3):127-130.
  253. Nichols CAM, Guezennec, J. & Bowman 2005 Bacterial exopolysaccharides from extreme marine environments with special consideration of the southern ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: A review. *Marine Biotechnology* 7:253-271.
  254. Deming JW 1998 Deep ocean environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 9(3):283-287.
  255. Schiraldi C, De Rosa M 2002 The production of biocatalysts and biomolecules from extremophiles. *Trends in Biotechnology* 20(12):515-521.
  256. Vincent P, Pignet, P., Talmont, F., Bozzi, L., Fournet, B., Guezennec, J., Jeanthon, C. & Prieur D 1994 Production and characterization of an exopolysaccharide excreted by a deep sea hydrothermal vent bacterium isolated from the polychaete annelid *Alvinella Pompejana* *Applied and Environmental Microbiology* 60:4134-4141.
  257. Nardella A, Chaubet, F., BoissonVidal, C., Blondin, C., Durand, P. & Jozefonvicz 1996 Anticoagulant low molecular weight fucans produced by radical process and ion exchange chromatography of high molecular weight fucans extracted from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Carbohydrate Research* 289:201-208.
  258. Guezennec J, Pignet P, Lijour Y, Gentric E, Ratiskol J, Collic-Jouault S 1998 Sulfation and depolymerization of a bacterial exopolysaccharide of hydrothermal origin. *Carbohydrate Polymers* 37(1):19-24.
  259. Bindal A, Narsimhan G, Hem SL, Kulshreshtha A 2007 Structural changes in xanthan gum solutions during steam sterilization for sterile preparations. *Pharm Dev Technol* 12(2):159-67.
  260. Kök MS, Hill SE, Mitchell JR 1999 Viscosity of galactomannans during high temperature processing: influence of degradation and solubilisation. *Food Hydrocolloids* 13(6):535-542.
  261. Leo WJ, McLoughlin AJ, Malone DM 1990 Effects of sterilization treatments on some properties of alginate solutions and gels. *Biotechnol Prog* 6(1):51-3.
  262. Fatimi A, Tassin J-F, Turczyn R, Axelos MAV, Weiss P 2009 Gelation studies of a cellulose-based biohydrogel: The influence of pH, temperature and sterilization. *Acta Biomaterialia* 5(9):3423-3432.
  263. Weiss P, GJ, Daculsi G., Grimandi G., Vinatier C. 2004 Use of a hydrogel for the culture of chondrocytes. WO 2005/044326 A1.

264. Lutolf MP, Hubbell JA 2005 Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat Biotechnol* 23(1):47-55.
265. Sohier J, Corre P, Weiss P, Layrolle P 2010 Hydrogel/calcium phosphate composites require specific properties for three-dimensional culture of human bone mesenchymal cells. *Acta Biomater* 6(8):2932-9.
266. Goetinck P, Stirpe N, Tsonis P, Carlone D 1987 The tandemly repeated sequences of cartilage link protein contain the sites for interaction with hyaluronic acid. *J. Cell Biol.* 105(5):2403-2408.
267. Hascall VC, Heinegard D 1974 Aggregation of Cartilage Proteoglycans. *Journal of Biological Chemistry* 249(13):4232-4241.
268. Caplan AI, Elyaderani M, Mochizuki Y, Wakitani S, Goldberg VM 1997 Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop Relat Res* (342):254-69.
269. Lindahl A, Brittberg M, Peterson L 2003 Cartilage repair with chondrocytes: clinical and cellular aspects. *Novartis Found Symp* 249:175-86; discussion 186-9, 234-8, 239-41.
270. Buckwalter JA 1998 Articular cartilage: injuries and potential for healing. *J Orthop Sports Phys Ther* 28(4):192-202.
271. Gilbert JE 1998 Current treatment options for the restoration of articular cartilage. *Am J Knee Surg* 11(1):42-6.
272. O'Driscoll SW 1998 The healing and regeneration of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am* 80(12):1795-812.
273. Getgood A, Brooks R, Fortier L, Rushton N 2009 Articular cartilage tissue engineering: today's research, tomorrow's practice? *J Bone Joint Surg Br* 91(5):565-76.
274. van Osch GJ, Brittberg M, Dennis JE, Bastiaansen-Jenniskens YM, Erben RG, Kontinen YT, Luyten FP 2009 Cartilage repair: past and future--lessons for regenerative medicine. *J Cell Mol Med* 13(5):792-810.
275. Hunziker EB 2002 Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10(6):432-63.
276. Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, Kuettner KE, Thonar EJ 1994 Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci* 107 ( Pt 1):17-27.
277. Kimura T, Yasui N, Ohsawa S, Ono K 1984 Chondrocytes embedded in collagen gels maintain cartilage phenotype during long-term cultures. *Clin Orthop Relat Res* (186):231-9.
278. Benya PD, Shaffer JD 1982 Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 30(1):215-24.
279. Mukaida T, Urabe K, Naruse K, Aikawa J, Katano M, Hyon SH, Itoman M 2005 Influence of three-dimensional culture in a type II collagen sponge on primary cultured and dedifferentiated chondrocytes. *J Orthop Sci* 10(5):521-8.
280. Dehne T, Schenk R, Perka C, Morawietz L, Pruss A, Sittlinger M, Kaps C, Ringe J 2010 Gene expression profiling of primary human articular chondrocytes in high-density micromasses reveals patterns of recovery, maintenance, re- and dedifferentiation. *Gene* 462(1-2):8-17.
281. Glowacki J, Trepman E, Folkman J 1983 Cell shape and phenotypic expression in chondrocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 172(1):93-8.
282. Schnabel M, Marlovits S, Eckhoff G, Fichtel I, Gotzen L, Vecsei V, Schlegel J 2002 Dedifferentiation-associated changes in morphology and gene expression in primary human articular chondrocytes in cell culture. *Osteoarthritis Cartilage* 10(1):62-70.

283. Wang QG, Hughes N, Cartmell SH, Kuiper NJ 2010 The composition of hydrogels for cartilage tissue engineering can influence glycosaminoglycan profile. *Eur Cell Mater* 19:86-95.
284. Schlegel W, Nurnberger S, Hombauer M, Albrecht C, Vecsei V, Marlovits S 2008 Scaffold-dependent differentiation of human articular chondrocytes. *Int J Mol Med* 22(5):691-9.
285. Buxboim A, Ivanovska IL, Discher DE 2010 Matrix elasticity, cytoskeletal forces and physics of the nucleus: how deeply do cells 'feel' outside and in? *J Cell Sci* 123(Pt 3):297-308.
286. Cancedda R, Dozin B, Giannoni P, Quarto R 2003 Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol* 22(1):81-91.
287. Bessa PC, Casal M, Reis RL 2008 Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J Tissue Eng Regen Med* 2(2-3):81-96.
288. Ruoslahti E, Yamaguchi Y 1991 Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell* 64(5):867-9.
289. Pye DA, Vives RR, Turnbull JE, Hyde P, Gallagher JT 1998 Heparan sulfate oligosaccharides require 6-O-sulfation for promotion of basic fibroblast growth factor mitogenic activity. *J Biol Chem* 273(36):22936-42.
290. Mehlhorn AT, Niemeyer P, Kaschte K, Muller L, Finkenzeller G, Hartl D, Sudkamp NP, Schmal H 2007 Differential effects of BMP-2 and TGF-beta1 on chondrogenic differentiation of adipose derived stem cells. *Cell Prolif* 40(6):809-23.
291. Giraux JL, Tapon-Brethaudiere J, Matou S, Fischer AM 1998 Fucoidan, as heparin, induces tissue factor pathway inhibitor release from cultured human endothelial cells. *Thromb Haemost* 80(4):692-5.
292. Baud'huin M, Duplomb L, Teletchea S, Charrier C, Maillason M, Fouassier M, Heymann D 2009 Factor VIII-von Willebrand factor complex inhibits osteoclastogenesis and controls cell survival. *J Biol Chem* 284(46):31704-13.
293. Englebienne P, Van Hoonacker A, Verhas M, Khlebtsov NG 2003 Advances in high-throughput screening: biomolecular interaction monitoring in real-time with colloidal metal nanoparticles. *Comb Chem High Throughput Screen* 6(8):777-87.
294. Lamoureux F, Picarda G, Garrigue-Antar L, Baud'huin M, Trichet V, Vidal A, Miot-Noirault E, Pitard B, Heymann D, Redini F 2009 Glycosaminoglycans as potential regulators of osteoprotegerin therapeutic activity in osteosarcoma. *Cancer Res* 69(2):526-36.
295. Casu B, Lindahl U 2001 Structure and biological interactions of heparin and heparan sulfate *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, vol. Volume 57. Academic Press, pp 159-206.
296. Gospodarowicz D, Cheng J 1986 Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J Cell Physiol* 128(3):475-84.
297. Sommer A, Rifkin DB 1989 Interaction of heparin with human basic fibroblast growth factor: protection of the angiogenic protein from proteolytic degradation by a glycosaminoglycan. *J Cell Physiol* 138(1):215-20.
298. Freeman I, Kedem A, Cohen S 2008 The effect of sulfation of alginate hydrogels on the specific binding and controlled release of heparin-binding proteins. *Biomaterials* 29(22):3260-3268.
299. Richter W 2009 Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration. *J Intern Med* 266(4):390-405.

300. Varghese S, Hwang NS, Canver AC, Theprungsirikul P, Lin DW, Elisseeff J 2008 Chondroitin sulfate based niches for chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Matrix Biol* 27(1):12-21.
301. Holst J, Watson S, Lord MS, Eamegdool SS, Bax DV, Nivison-Smith LB, Kondyurin A, Ma L, Oberhauser AF, Weiss AS, Rasko JE Substrate elasticity provides mechanical signals for the expansion of hemopoietic stem and progenitor cells. *Nat Biotechnol* 28(10):1123-8.
302. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE 2006 Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126(4):677-89.

## **POTENTIEL DES EXOPOLYSACCHARIDES MARINS EN INGENIERIE TISSULAIRE DES TISSUS SQUELETTIQUES**

**Mots clés : glycosaminoglycanes, ingénierie tissulaire, biomatériaux, hydrogels**

Les lésions dégénératives des tissus squelettiques affectent une part importante de la population et représentent un enjeu majeur de santé publique. Cependant, les approches thérapeutiques mises en place pour la réparation de ces tissus, souffrent de nombreuses limitations. Dans ce contexte, des efforts pluridisciplinaires pour développer des solutions thérapeutiques alternatives ont conduit à une nouvelle discipline, l'ingénierie tissulaire. Cette discipline se donne pour objectif de développer des substituts biologiques aux tissus squelettiques en développant des constructions hybrides associant des matrices tridimensionnelles avec des cellules. L'objectif de cette thèse a été d'évaluer le potentiel de deux exopolysaccharides (EPS) marins HE800 et GY785, en ingénierie des tissus squelettiques. Lors d'une première étude nous avons mis en place un mode de stérilisation adapté aux EPS marins. Dans le but de développer des matrices tridimensionnelles physiquement et biologiquement compétentes nous avons démontré dans une deuxième étude que l'association d'EPS marins à un hydrogel auto réticulant à base d'hydroxypropyl méthylcellulose silanisée (HPMC-Si) permettait d'augmenter ces propriétés mécaniques. Une troisième étude plus approfondie sur la construction associant l'EPS GY785 à l'hydrogel d'HPMC-Si à montrer les capacités de cette matrice à favoriser la prolifération et le maintien du phénotype de chondrocytes articulaires de lapin tout en fournissant un microenvironnement adéquate pour la production d'une matrice extracellulaire cartilagineuse. Les résultats de ces travaux montrent l'intérêt des EPS marins en ingénierie tissulaire et plus particulièrement de l'EPS GY785 en ingénierie tissulaire du cartilage.

## **POTENTIAL OF EXOPOLYSACCHARIDES FROM MARINE ORIGIN IN SKELETAL TISSUE ENGINEERING**

**Keywords: glycosaminoglycans, tissue engineering, biomaterials, hydrogels**

Degenerative hurts of skeletal tissue affect an important part of the population and represent a major stake in health care. However, the therapeutic approaches for the repair of these tissues, suffer from numerous limitations. In this context, a multidisciplinary efforts has been done to develop alternative therapeutic solutions, leading to a new discipline; tissue engineering. This discipline has for objective to develop biological substitutes, by developing hybrid constructs associating three-dimensional matrices with cells. The goal of this thesis was to estimate the potential of two exopolysaccharides (EPS) from marine origin HE800 and GY785 in skeletal tissue engineering. During a first study, we set up a sterilization method adapted to marine EPS. Then, toward the development of physically and biologically competent 3 D matrices, we demonstrated in the second study that the association of EPS to a siliated hydroxypropyl methylcellulose (Si-HPMC) increases the mechanical properties of the scaffold. The third study deepened on the biological properties of the GY785/Si-HPMC scaffold on cartilage tissue engineering with rabbit articular chondrocytes (RAC). Results indicate the ability of this scaffold to maintain and to recover a chondrocytic phenotype as well as the production of cartilage-like extracellular matrix. The results of these works show the interest of marine EPS in tissue engineering and more particularly, the significance of GY785 EPS in cartilage tissue engineering.