



Impact de la réticulation à la génipine sur les propriétés biophysiques d'un hydrogel d'acide hyaluronique pour la culture en trois dimensions.

Sarah Bonnesoeur

► To cite this version:

Sarah Bonnesoeur. Impact de la réticulation à la génipine sur les propriétés biophysiques d'un hydrogel d'acide hyaluronique pour la culture en trois dimensions.. Biologie cellulaire. Normandie Université, 2020. Français. NNT : 2020NORMR104 . tel-03252427

HAL Id: tel-03252427

<https://theses.hal.science/tel-03252427>

Submitted on 7 Jun 2021

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

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



Normandie Université

THÈSE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

Discipline : Biologie cellulaire

Préparée au sein de l'Université Rouen Normandie

Impact de la réticulation à la génipine sur les propriétés biophysiques d'un hydrogel d'acide hyaluronique pour la culture 3D.

**Présentée et soutenue par
Sarah BONNESOEUR**

**Thèse soutenue publiquement le 7 décembre 2020
devant le jury composé de**

Monsieur Jean-Pierre VANNIER	Professeur des Universités Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse
Madame Béatrice LABAT	Maître de conférences Université Rouen Normandie	Co-encadrante de thèse
Monsieur Massoud MIRSHAHI	Professeur des Universités Université Paris VII	Rapporteur
Madame Dulce PAPY-GARCIA	Professeur des Universités Université Paris-Est Créteil Val de Marne	Rapporteur
Madame Catherine AMIEL	Professeur des Universités Université Paris XII	Examinatrice

Thèse dirigée par Jean-Pierre VANNIER, laboratoire PANTHER.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier en premier lieu le Pr. Jean Pierre Vannier de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce travail de thèse dans les bonnes conditions. Merci de m'avoir accueillie au sein de votre structure, le laboratoire M.E.R.C.I. EA 3829, dès ma troisième année de Licence et de m'avoir encadrée et accordée votre confiance à partir de ma deuxième année de Master.

Je remercie également l'association Vie et Espoir de m'avoir donné la chance et les moyens d'entreprendre ce projet.

Je veux également adresser mes remerciements à ma co-encadrante Béatrice Labat qui a su m'inspirer à chacun de nos entretiens, éclairer sous un jour nouveau mes résultats et répondre à mes questions avec bienveillance. Merci d'avoir donné de ton temps et de ton expertise pour ce travail. Merci pour ta disponibilité et ton aide pour la rédaction de l'article et du manuscrit. Merci aussi pour nos échanges animés sur la maternité !

Au Pr. Olivier Boyer, merci de m'avoir accueillie au sein de l'unité INSERM U1234. Merci pour vos conseils et votre soutien dans la concrétisation de la soutenance.

Je souhaite remercier l'ensemble des membres du jury qui m'ont fait l'honneur de lire et de juger ce travail.

Merci à Olivier Thoumire et Sandrine Morin-Grognon pour leur aide et leur travail de microscopie électronique à balayage et de microscopie à force atomique respectivement.

Souleymane, mon premier collègue de bureau. Merci d'avoir été présent pendant ce travail de thèse. J'ai beaucoup apprécié nos discussions et tu m'as beaucoup appris. Je suis

toujours très heureuse de discuter avec toi quel que soit le sujet. J'ai été ravie d'apprendre que tu étais de retour sur Rouen. Je vais pouvoir prendre de tes nouvelles plus facilement !

Manuel et Marie-Laure, mes derniers collègues de bureau. Je voulais vous remercier pour vos encouragements (que ce soit pour la thèse ou pour la passerelle), pour vos conseils, pour la relecture de l'introduction et pour les discussions beaucoup plus informelles, les anecdotes, les rires que nous avons partagés. Ce sera toujours un plaisir de vous croiser et je continuerai à passer vous voir ! Vous m'avez beaucoup apporté et je ne l'oublierai jamais.

Christophe, mon « papa du labo ». Merci pour ton enthousiasme à toute épreuve, ton sourire et ton expérience. Je me suis quasiment toujours tournée vers toi dès que j'avais un problème et tu avais toujours une réponse, merci beaucoup pour ton aide. Bien sûr, je n'oublie pas l'incident du pHmètre qui me fait rire à chaque fois que j'y pense ! Mon prochain cours au MTC aura lieu en dernière année de maïeutique ; j'espère te revoir avant ! Ce sera avec plaisir.

Maud. Je suis toujours très contente de te croiser à chaque fois que je passe par le laboratoire. Merci de m'avoir fait part de ton expérience avec humour. J'espère à bientôt !

À tous les autres membres (actuels ou non) du laboratoire : Audrey, Baptiste, Catalina, Cécile, Chantal, Gaëtan, Gladys, Laurent, Laurine, Léa, Laeticia, Marie, Mélanie, Pauline, Parvin, Rachid, Sébastien, Var et Vivien. Merci pour votre présence à mes côtés, pour votre aide et pour vos sourires.

Papa, Maman. Merci de m'avoir soutenue et encouragée toutes ces années. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir aidé à aller jusqu'au bout. Merci de vous rendre disponibles et d'alléger mes responsabilités quand vous pouvez. Merci de m'accueillir à nouveau chez vous quand j'en ai besoin. Merci de nous donner, à Benjamin et à moi, du temps pour travailler ou pour faire

avancer les travaux de la maison afin que l'on puisse se sentir mieux chez nous. J'ai hâte de vous faire redécouvrir notre maison.

Thomas, mon petit frère préféré. J'ai adoré nos petites discussions initiées par ta surprise de me retrouver dans ma chambre « d'enfant » chez nos parents. Merci de partager avec moi ce qui te plaît et pour nos conversations animées. J'espère qu'on pourra bientôt assister à notre premier concert des BTS !

Benjamin, mon amoureux, les mots me manquent pour te dire ce que je ressens. Tu as été présent pour moi à chaque étape de ce travail de thèse et de la rédaction du manuscrit. Tu m'as vu passer par toutes les émotions, tu as écouté mes plaintes, célébré mes joies et surtout pris sur toi. Tu sais, je suis consciente de tout ce que tu me donnes et de tout ce que tu fais pour moi. Je suis également consciente, et tu le sais aussi, que je ne mets pas souvent les mots sur mes sentiments. Alors je voulais te faire savoir aujourd'hui (et tous les autres jours où tu voudras me lire) que je te suis très reconnaissante mon amoureux. Merci de m'avoir soutenue dans mon projet de passerelle. Merci de m'avoir laissé le temps de travailler. Merci d'avoir été là pour moi à chaque fois que j'en ai eu besoin. Merci, mon amoureux. Tu as toute ma gratitude et ... peut-être même plus que ça !

RÉSUMÉ

La culture en trois dimensions permet de reproduire dans une certaine mesure le microenvironnement dans lequel évoluent les cellules *in vivo*. Nous avons développé un hydrogel d'acide hyaluronique (AH) dont les caractéristiques sont aisément modifiables afin d'imiter les matrices extracellulaires (MEC) saines ou malignes. Pour cela, nous avons traité nos hydrogels avec un polypeptide adhésif (poly-L-lysine, PLL) ou des protéines de la MEC (collagènes de type III et IV) qui sont naturellement présentes dans les tissus. Ensuite, nous avons modifié la rigidité des hydrogels en les réticulant avec concentrations croissantes de génipine (GnP). Chaque condition de réticulation a été caractérisée mécaniquement avant d'être utilisée en culture avec des cellules de glioblastomes, de cancer du sein, puis avec des cellules endothéliales et des cellules souches hématopoïétiques. Dans l'ensemble, nos hydrogels présentaient (a) une rigidité croissante avec la concentration de GnP pour chaque traitement et (b) une résistance enzymatique efficace avec le traitement PLL, ainsi qu'avec le collagène de type IV, mais dans une moindre mesure. Alors que le traitement à la PLL n'était pas favorable à la culture de lignées de glioblastomes, il améliorait la prolifération des cellules cancéreuses du sein proportionnellement au degré de réticulation. Contrairement au collagène de type III, les hydrogels traités au collagène de type IV soutenaient la prolifération des cellules de glioblastome. Le modèle 3D que nous avons développé peut servir de plateforme pour l'étude de diverses cellules cancéreuses en ajustant simplement sa composition biochimique et ses propriétés mécaniques.

Mots clés : modèle 3D ; collagène de type III et IV ; génipine ; acide hyaluronique ; hydrogels.

**Impact of genipin crosslinking on hyaluronan hydrogels as tumor-like models:
biophysical properties and 3D cell culture.**

ABSTRACT

Three-dimensional (3D) biomimetic cell culture platforms offer more realistic microenvironments that cells naturally experience *in vivo*. We developed a tunable hyaluronan (HA)-based hydrogels that could easily be modified to mimic healthy or malignant extracellular matrices (ECMs). For that, we pre-functionalized our hydrogels with an adhesive polypeptide (poly-l-lysine, PLL) or ECM proteins (type III and type IV collagens), naturally present in tumorous tissues, and next, we tuned their stiffness by crosslinking with gradual concentrations of genipin (GnP). Then, we thoroughly characterized our substrates before testing them with glioblastoma, breast cancer cells and thereafter with endothelial cells and hematopoietic stem cells. Overall, our hydrogels exhibited (a) increasing stiffness with GnP concentration for every pre-functionalization and (b) efficient enzyme resistance with PLL treatment, and also with type IV collagen but to a lesser extent. While PLL-treated hydrogels were not favorable to the culture of any glioblastoma cell lines, they enhanced the proliferation of breast cancer cells in a stiffness-dependent manner. Contrary to type III collagen, type IV collagen pre-treated hydrogels supported the proliferation of glioblastoma cells. The as-desired HA-based 3D tumor-like models we developed may provide a useful platform for the study of various cancer cells by simply tuning their biochemical composition and their mechanical properties.

Keywords: 3D tumor model; collagen type III and type IV; genipin; hyaluronan; hydrogels.

Unité INSERM U1234 PANTHER
Faculté de Médecine-Pharmacie – Université de Rouen Normandie – IRIB
22, boulevard Gambetta, 76 000 ROUEN

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
RÉSUMÉ	7
ABSTRACT	8
<i>Liste des figures</i>	14
<i>Liste des tableaux</i>	15
<i>Liste des abréviations</i>	16
INTRODUCTION	19
I. Le microenvironnement.....	21
1. La matrice extracellulaire.....	21
2. Facteurs de croissance matriciels	40
3. Propriétés mécaniques	43
4. Le microenvironnement tumoral	46
II. Les différents modèles de culture tridimensionnels	49
1. Culture à la surface ou au sein de supports tridimensionnels	51
2. Génération de sphéroïdes en suspension.....	61
III. L'acide hyaluronique, un modèle de culture tumorale	67
1. Généralités.....	67
2. L'hydrogel d'acide hyaluronique, notre modèle d'étude.....	68
IV. La génipine.....	69
OBJECTIFS.....	73
I. Caractérisation du modèle	73
II. Les cellules souches hématopoïétiques	74
MATÉRIEL ET MÉTHODES	75
I. Synthèse des hydrogels d'acide hyaluronique	75
II. Traitement et réticulation des hydrogels.....	75

1. Traitement des hydrogels	76
2. Réticulation des hydrogels	76
III. Caractérisation des hydrogels.....	77
1. Définition du degré de réticulation : test à la ninhydrine.....	77
2. Étude de la résistance à la dégradation enzymatique : test du carbazole	78
3. Microscopie à force atomique	79
4. Microscopie électronique à balayage.....	80
5. Propriétés thermiques.....	81
6. Gonflement ou <i>swelling ratio</i>	81
IV. Culture	82
1. Lignées CB74, CB109 et CB191	82
2. Lignée HMEC-1	82
3. Lignée MDA-MB-231.....	82
4. Culture primaire	83
5. Culture 3D	84
6. Co-culture CB74 et HMEC-1	85
V. Étude de la viabilité et de la prolifération cellulaires.....	85
1. Test au <i>LIVE/DEAD</i> ®	85
2. Test au <i>Cell Counting kit-8</i> ®	86
VI. Test de clonogénicité	86
1. Récupération des cellules à partir des hydrogels	86
2. Test de clonogénicité.....	87
VII. Analyses statistiques	88
RÉSULTATS	89
I. Article	89
II. Résultats complémentaires.....	106
1. Cellules endothéliales seules	106
2. Co-culture des cellules de glioblastomes et endothéliales	109
3. Culture de cellules souches hématopoïétiques	111

DISCUSSION	113
I. Caractérisation des hydrogels et de leurs traitements	113
1. Caractérisation physico-chimique	113
2. Caractérisation mécanique	115
3. Caractérisation biochimique.....	116
II. Effet biologique	117
1. Différents traitements	117
2. Différents types cellulaires	120
CONCLUSION – PERSPECTIVES.....	125
RÉFÉRENCES.....	127

Liste des figures

Figure 1 : Schéma représentant la matrice extracellulaire épithéliale.....	21
Figure 2 : Synthèse des fibrilles de collagène.....	24
Figure 3 : Polymérisation du collagène de type IV.	27
Figure 4 : Représentation schématique de la fibronectine.	30
Figure 5 : Représentation schématique de la famille des ténascines.....	31
Figure 6 : Possibilités de dimérisation des sous-unités des intégrines.	31
Figure 7 : Projection de Haworth des différents glycosaminoglycanes.	33
Figure 8 : Schéma explicatif de la réaction d'épimérisation.....	34
Figure 9 : Schéma représentant la structure chimique de l'unité disaccharidique du chondroïtine sulfate.....	34
Figure 10 : Représentation schématique de la biosynthèse de l'acide hyaluronique.	38
Figure 11 : Mécanorégulation par les intégrines.....	44
Figure 12 : Impact de la rigidité du support sur la prolifération des progéniteurs rénaux.	45
Figure 13 : Exemples de modules d'élasticité par tissu.....	46
Figure 14 : Changement de la morphologie cellulaire en fonction du mode de culture.....	49
Figure 15 : Localisation intra tumorale de la doxorubicine.....	50
Figure 16 : Schéma comparatif de la culture 2D et de trois modes de culture 3D.....	51
Figure 17 : Représentation schématique d'une matrice.....	53
Figure 18 : Représentation schématique des matrices de culture 3D.....	54
Figure 19 : Observation au microscope électronique à balayage d'une éponge en cellulose...56	
Figure 20 : Représentation schématique de la technique d'électrofilage.	56
Figure 21 : Représentation schématique de la technique <i>layer by layer</i> (LbL).	57
Figure 22 : Protocole schématisé de mise en culture au sein d'un hydrogel d'acide hyaluronique.....	58
Figure 23 : Observation histologique de reins décellularisés.	59
Figure 24 : Représentation schématique du système micro fluidique MiCAplate.....	60
Figure 25 : Représentation schématique de la technique du pellet de culture.	62

Figure 26 : Représentation schématique de la méthode de flottement forcé.	62
Figure 27 : Représentation schématique de la méthode de lévitation magnétique.	63
Figure 28 : Représentation schématique de la méthode de la goutte suspendue.	64
Figure 29 : Schéma représentant les techniques basées sur l'agitation.	65
Figure 30 : Photographies des appareils à agitation externe.....	66
Figure 31 : Obtention de la génipine par la β glucosidase.....	70
Figure 32 : Protocole expérimental de traitement et réticulation.....	77
Figure 33 : Principe de la microscopie à force atomique.	80
Figure 34 : Représentation d'une séparation par gradient de densité.....	83
Figure 35 : Dispositif schématique de culture des tests clonogéniques.	87
Figure 36 : Viabilité cellulaire des HMEC-1 à 14 jours de culture en 3D.	107
Figure 37 : Observation au microscope des hydrogels après 14 jours de culture des cellules HMEC-1.....	109
Figure 38 : Test de viabilité cellulaire sur les lignées CB74 et HMEC-1	110
Figure 39 : Co-culture des lignées CB74 et HMEC-1.....	110
Figure 40 : Test de viabilité cellulaire sur les cellules mononuclées.	111
Figure 41 : Colonies issues des tests clonogéniques.	112

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des sous familles de collagène.	24
Tableau 2 : Les matricryptines du collagène de type IV et leur rôle.....	28
Tableau 3 : Protocole de déshydratation des hydrogels.	81
Tableau 4 : Protocole de décongélation des cellules mononuclées.....	84

Liste des abréviations

2D :	Deux dimensions
3D :	Trois dimensions
AFM :	<i>Atomic Force Microscopy</i> - Microscopie à Force Atomique
AH :	Acide hyaluronique
BFU-E :	<i>Burst forming unit erythrocyte</i>
CD :	<i>Cluster of differentiation</i>
CFU-E :	<i>Colony forming unit erythrocyte</i>
CFU-GM :	<i>Colony forming unit granulocyte-macrophage</i>
CMN :	Cellules mononuclées
CSH :	Cellule souche hématopoïétique
DAPI :	4',6-diamidino-2-phénylindole
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
EDC :	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
EGF :	<i>Epidermal growth factor</i>
EGFR :	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
FGF :	<i>Fibroblast growth factor</i>
FGFR :	<i>Fibroblast growth factor receptor</i>
GAG :	Glycosaminoglycane
GnP :	Génipine
Hase :	Hyaluronidase
ICAM-1 :	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
LbL :	<i>Layer-by-layer</i> (LbL) - films multicouches
LEC receptor :	<i>Liver endothelial cell clearance receptor</i>
LYVE-1 :	<i>Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1</i>
MEB :	Microscopie électronique à balayage
MEC :	Matrice extracellulaire
MMP :	Métalloprotéases matricielles
MRE :	<i>Magnetic resonance elastography</i> - Elastographie par résonance magnétique
NH₂ :	Amines primaires

PBS :	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCL :	Polycaprolactone
PDGF :	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PDGFR :	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
PDMS :	Polydimethylsiloxane
PEG :	Polyéthylène glycol
PG :	Protéoglycane
PLA :	Acide polylactique
PLGA :	Acide polylactique-co-glycolique
PLL :	Poly-L-lysine
Poly-HEMA :	Poly-2-hydroxyethyl methacrylate
PVA :	Alcool polyvinylique
RGD :	Motif d'adhésion arginine-glycine-asparagine (Arg-Gly-Asp)
RHAMM :	<i>Receptor for hyaluronan-mediated motility</i>
ROS :	Espèce réactive de l'oxygène ou <i>reactive oxygen species</i>
RPMI 1640 :	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
SCF :	<i>Stem cell factor</i>
SDF-1α :	<i>Stromal cell-derived factor 1α</i>
SFEM :	<i>Serum-Free Expansion Medium</i>
SPAM1 :	<i>Sperm adhesion molecule 1</i>
SR :	<i>Swelling ratio</i>
SR1 :	<i>StemRegenin 1</i>
SVF :	Sérum de veau fœtal
TAF :	<i>Tumor-associated fibroblasts</i> - Fibroblaste associé au cancer
TAM :	<i>Tumor-associated macrophage</i> - Macrophage associé au cancer
TGF-β :	<i>Transforming growth factor β</i>
TGFBR :	<i>transforming growth factor β receptor</i>
UCP2 :	<i>Uncoupling protein 2</i>
UDP :	<i>Uridine diphosphate</i>
VEGF :	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEGF-R :	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>

INTRODUCTION

La culture *in vitro* est née d'un besoin d'aller plus loin pour améliorer la compréhension des phénomènes biologiques. En 1907, Ross Granville Harrison a été le premier à s'y essayer car il désirait voir et comprendre comment la « fibre nerveuse » s'étendait vers la périphérie lors du développement embryonnaire. Le tissu d'intérêt était déposé sur une lamelle, dans une goutte de lymphe, et immobilisé après coagulation de celle-ci. La lamelle était alors retournée, placée contre une lame creuse et leurs rebords scellés avec de la paraffine [1]. Cependant, jusqu'en 1912, il n'était pas possible de maintenir la viabilité des tissus observés plus de quinze jours. S'inspirant des travaux de Harrison, Alexis Carrel a voulu déterminer les conditions de cultures qui pourraient permettre de prolonger la vie des échantillons indéfiniment. Il a ainsi tenté de créer une circulation afin que les cellules puissent absorber les nutriments dont elles avaient besoin tout en évacuant leurs déchets. Il a alors réalisé qu'il était plus simple de renouveler le milieu cellulaire après un lavage et introduisit la notion de passage. De cette façon, il a pu augmenter l'espérance de vie des tissus qu'il avait prélevés [2] et dès lors, la culture *in vitro* s'est développée, notamment grâce à l'élaboration de nouveaux milieux de culture [3].

Aujourd'hui encore, notre connaissance de la biologie cellulaire découle de résultats expérimentaux obtenus sur des supports plats, en verre ou en plastique, soit en deux dimensions (2D). Toutefois, depuis les années 80, différents auteurs ont montré qu'en 2D les cellules adoptaient un comportement aberrant. Benya et coll. avaient observé que des chondrocytes cultivés ainsi perdaient à la fois leur morphologie et leur phénotype. Une fois transférés dans un support tridimensionnel, ces deux aspects étaient restaurés [4]. Dans une deuxième étude, des cellules épithéliales mammaires présentant une division incontrôlée ainsi qu'une polarisation anormale en 2D, recouvraient leur capacité à former des structures acinaires, à

réguler leur prolifération tout en synthétisant leur propre matrice extracellulaire (MEC) [5]. D'autres auteurs font état d'un profil d'expression génétique inhabituel ou encore de réponse faussée face à des agents pharmaceutiques [6,7].

En effet, *in vivo*, les cellules reçoivent des signaux divers par l'intermédiaire d'interactions avec les cellules voisines, la MEC ou les facteurs solubles qu'elle contient et ce de façon multidirectionnelle. Ces éléments constituent le microenvironnement cellulaire. De nombreux supports permettant une organisation en trois dimensions (3D) ont vu le jour dans le but de mimer le microenvironnement par leur composition, leur structure ainsi que leur capacité à relarguer des facteurs solubles. Ce sont des outils importants pour la recherche fondamentale mais aussi pour l'ingénierie tissulaire.

La première partie du manuscrit est une introduction divisée en quatre chapitres qui présentent le microenvironnement cellulaire, les différents moyens de le reproduire et définissent les termes du sujet de la thèse.

La deuxième partie concerne les objectifs de la thèse.

La troisième partie recense le matériel et les méthodes utilisés lors des expérimentations.

Les résultats sont présentés dans la quatrième partie et discutés dans la cinquième.

La dernière partie est consacrée à une conclusion.

Il est à noter que les mots figurant en italique dans le manuscrit sont issus de langues non francophones. Il s'agit soit d'anglais soit de latin.

I. Le microenvironnement

Le microenvironnement cellulaire correspond à tous les éléments adjacents d'un tissu donné. Il est défini par sa MEC, les cellules périphériques qui sont des cellules du même tissu, des cellules « de soutien » ou stromales telles que les fibroblastes, les cellules endothéliales ou encore des cellules immunitaires. Microenvironnement et cellules sont en échange permanent : tout comme les cellules peuvent agir sur leur microenvironnement et le remodeler, le microenvironnement peut également influencer sur l'activité cellulaire [8].

1. La matrice extracellulaire

La MEC est composée de nombreux éléments biochimiques tels que les protéines, les glycoprotéines, les protéoglycanes (PG), les polysaccharides et les glycosaminoglycanes (GAG). Yi et coll. décrivent deux compartiments au sein de la MEC : i) la matrice interstitielle située dans les espaces intercellulaires et ii) la lame basale, un tissu non-cellulaire fin qui sépare la matrice interstitielle du tissu externe (Figure 1) [9].

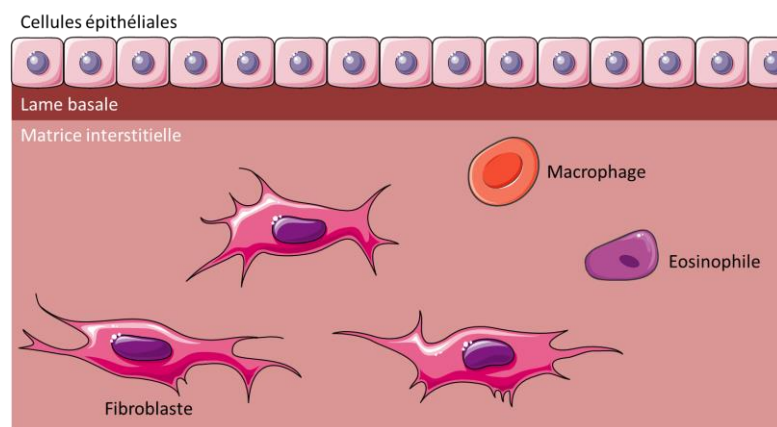


Figure 1 : Schéma représentant la matrice extracellulaire épithéliale.

La MEC épithéliale comprend une matrice interstitielle et une lame basale qui la sépare du tissu externe, ici le tissu épithélial. Sont également représentées ici les cellules « de soutien » : fibroblastes et cellules immunitaires (éosinophiles et macrophages). D'après Lu et coll., Journal of Cell Biology, 2012 [8].

À l'inverse, Lu et coll. indiquent qu'il s'agit de deux MEC bien distinctes [8]. Tout comme la matrice interstitielle, la lame basale est principalement produite par les cellules stromales mais également par les cellules du tissu externe mentionné plus haut c'est-à-dire les cellules endothéliales ou épithéliales. Due à sa fonction de filtre, la lame basale est plus compacte et moins poreuse que la matrice interstitielle qui a un rôle plus structural. Il est important de noter que certains tissus ne possèdent pas de lame basale ; c'est le cas des vaisseaux sanguins du tissu osseux [10].

Les éléments de la MEC sont généralement répartis en trois catégories : les protéines fibreuses, les glycoprotéines adhésives et les glycosaminoglycanes. L'ensemble de ces macromolécules forme un gel hydraté et chargé qui constitue un support mécanique tridimensionnel nécessaire au maintien de la structure des tissus et des organes. La MEC émet également des signaux biochimiques destinés aux cellules environnantes *via* les facteurs solubles qu'elle contient et dont elle régule l'activité. De cette manière, la MEC influe sur le comportement, la morphologie, la survie, la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire. Elle a donc un rôle critique dans la morphogenèse des tissus et le développement des organes [11,12].

a. Les protéines fibreuses

Les protéines fibreuses ont un rôle structural dans la MEC : elles lui confèrent sa résistance mais également son élasticité. Il en existe plusieurs telles que l'élastine, la fibrilline ou la fibuline, cependant, nous allons nous focaliser sur le collagène qui le composant principal de la MEC [13].

a.1. Le collagène

Le collagène est la protéine la plus abondante du corps humain, représentant 25 à 35 % de la masse protéique totale [14]. Avec ses 28 isoformes, il constitue une superfamille dite « du collagène » : une grande famille de protéines fibreuses insolubles qui contiennent un domaine commun en triple hélice [15]. La synthèse du collagène peut être divisée en quatre étapes (Figure 2). i) Le précurseur du collagène est une hélice α gauche formée de trois segments : aux extrémités les domaines N-terminal d'un côté et C-terminal de l'autre et au milieu, une séquence polypeptidique caractérisée par la répétition d'un seul et même motif : Gly-X-Y où, le plus souvent, X et Y correspondent respectivement à la proline et l'hydroxyproline. ii) Elle est importée dans le réticulum endoplasmique pour subir les modifications post-traductionnelles qui vont permettre la formation du domaine commun en triple hélice caractéristique cité plus haut. iii) L'hydroxylation de lysines et de prolines va stabiliser la triple hélice aussi appelée procollagène. Certaines hydroxylysines seront par la suite glycosylées, là encore pour promouvoir la stabilité du procollagène. iv) Le procollagène est sécrété dans la MEC où les domaines N et C terminaux vont être clivés par les métalloprotéases matricielles (MMP) créant ainsi le collagène sous sa forme mature [16].

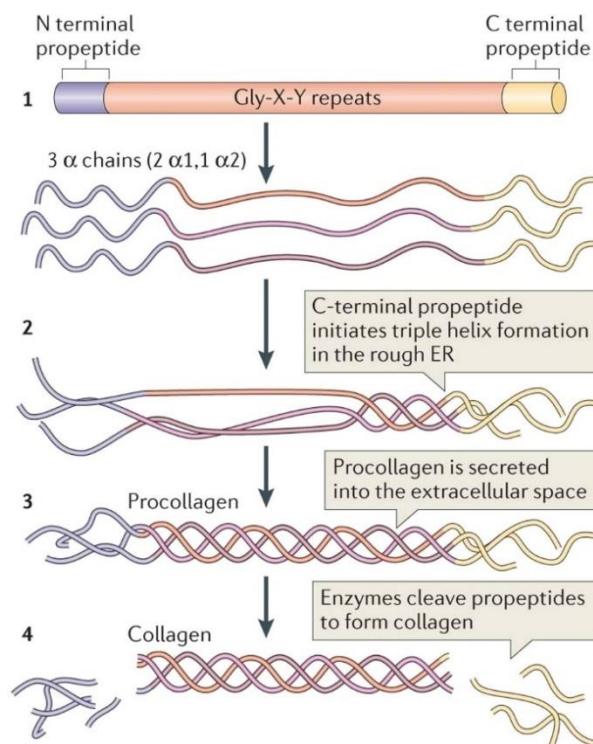


Figure 2 : Synthèse des fibrilles de collagène.

Le précurseur du collagène (1) est traduit dans le cytoplasme de la cellule et importé dans le réticulum endoplasmique pour poursuivre sa maturation. Une fois dans l'organite, il s'assemble avec deux autres précurseurs à partir du domaine C-terminal (2) pour former une triple hélice. Après plusieurs modifications post-traductionnelles (3), la triple hélice ou procollagène est sécrétée dans la MEC où les domaines C-terminaux et N-terminal seront clivés par les enzymes matricielles (4). Figure issue du travail de Mouw et coll., Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2015 [16].

Selon la structure dudit domaine commun et de la protéine totale, la grande famille de collagène peut être divisée en plusieurs sous-familles (Tableau 1).

Tableau 1 : Classification des sous familles de collagène.

D'après Mouw et coll., Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2015 et Sato et coll., The Journal of Biological Chemistry, 2002 [16,17].

Collagènes fibrillaires ou formant des fibrilles	I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII
Collagènes associés à des fibrilles et similaires à des fibrilles avec une triple hélice interrompue	IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII et XXVI
Collagènes formant un réseau	IV, VI, VII, VIII et X
Collagènes transmembranaires	XIII, XVII, XXIII, XXV
Collagènes de multiplexine	XV et XVIII

Chaque isoforme de collagène peut s'assembler ou s'intégrer à d'autres macromolécules non collagéniques et ainsi constituer « le squelette » de la MEC lui conférant ses propriétés mécaniques et participant au maintien de sa structure [18].

Les collagènes de type I, III et IV seront décrits plus en détails ici car le collagène de type I est le plus répandu [19] et les collagènes de type III et IV ont été utilisés au sein de notre hydrogel pour notre étude et dans un travail précédent ayant montré une amélioration de l'invasion et de la prolifération cellulaire [20].

a.1.1. Le collagène de type I

Le collagène de type I fait également partie de la sous-famille des collagènes fibrillaires. Il est constitué de trois chaînes α codées par les gènes *COL1A1* and *COL1A2*. La triple hélice formée mesure environ 300 nm et se termine, à chaque extrémité, par des peptides non hélicoïdaux. Le collagène de type I est retrouvé très largement dans le corps humain et chez certains vertébrés au niveau de la cornée, du cartilage, du foie, des ligaments, des os, de la peau, des poumons, des tendons et des valves cardiaques notamment. Généralement la triple hélice est constituée de deux chaînes $\alpha 1$ et une $\alpha 2$. En effet, les homotrimères de chaînes $\alpha 1$ sont retrouvés dans les tissus fœtaux, les tumeurs ou encore les cicatrices ; il sont plus résistants au clivage enzymatique [19].

Les mutations des gènes *COL1A1* et *COL1A2* causent (i) la maladie de Caffey caractérisée par des douleurs, un gonflement des tissus mous, une hyperesthésie, une irritabilité, une sensibilité à la palpation et des rougeurs sur une ou plusieurs partie(s) du corps, (ii) les syndromes d'Ehlers-Danlos de type arthrochalasique et cardiaque valvulaire respectivement caractérisées par une fragilité tissulaire, une hyper-élasticité cutanée, une hyperlaxité articulaire et par une sévère et progressive dégénérescence des valves cardiaques accompagnée des mêmes

symptômes précédemment cités, (iii) l'ostéogenèse imparfaite caractérisée par une faible masse osseuse, une fragilité osseuse et une tendance aux fractures de sévérité variable et (iv) l'ostéoporose post-ménopausique caractérisée par une diminution de la densité et de la résistance osseuse exposant le patient à un risque élevé de fracture [21–25]. La transmission de ces maladies, lorsqu'elle est génétique, est autosomique dominante ou récessive [19].

a.1.2. Le collagène de type III

Le collagène de type III fait également partie de la sous-famille des collagènes fibrillaires. Concernant la synthèse de cette protéine, sa triple hélice est constituée de trois chaînes α identiques issues de la transcription du gène *COL3A1* et son domaine N-terminal est clivé complètement de façon à s'assembler avec d'autres collagènes (types I, V et/ou XI). Le collagène de type III est plus particulièrement localisé au sein de tissus élastiques comme l'axe gastro-intestinal, le foie, la peau, les poumons ou encore l'utérus et le réseau vasculaire [16,26].

Par ailleurs, des mutations du gène *COL3A1* peuvent aboutir au syndrome d'Ehlers-Danlos vasculaire. La plupart des cas humains rapportés de ce syndrome résultent d'une mutation faux sens où une glycine du domaine en triple hélice est remplacée par un autre acide aminé. Dans cette maladie, le pronostic vital peut être rapidement engagé du fait d'un risque accru de rupture des tissus artériels, intestinaux ou utérins. Les personnes atteintes de cette maladie présentent également une peau plus fine, presque translucide [26].

a.1.3. Le collagène de type IV

Le collagène de type IV est un des principaux composants de la lame basale. Les six gènes *COL4A1* à *COL4A6* codent respectivement pour les chaînes $\alpha 1$ à $\alpha 6$ de cette protéine [16]. Seulement trois associations possibles conduisent à la formation du collagène de type IV : les

trimères $\alpha1\alpha2\alpha1$, $\alpha3\alpha4\alpha5$, et $\alpha5\alpha5\alpha6$ [27]. Les domaines globulaires présents aux extrémités de la molécule de collagène de type IV permettent une association à d'autres molécules de manière à former un réseau (Figure 3).

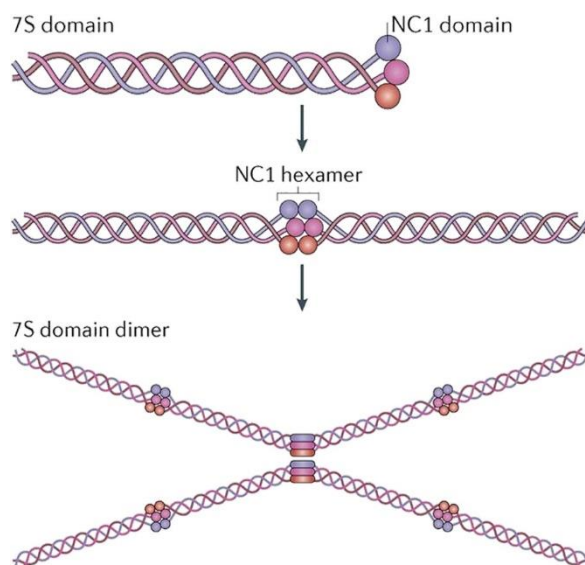


Figure 3 : Polymérisation du collagène de type IV.

Le collagène de type IV est caractérisé par deux domaines globulaires qui favorisent la polymérisation de la protéine avec d'autres molécules de collagène de type IV. Le domaine 7S permet la dimérisation et le domaine NC1 l'hexamérisation. Cet assemblage aboutit à la formation d'un réseau au sein de la lame basale. Figure issue du travail de Mouw et coll., Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2015 [16].

Au treillis obtenu s'ajoute des molécules de collagène de type VII, des glycoprotéines et PG. Il en résulte un maillage plus dense qui confère à la lame basale son rôle de filtre.

Lors du remodelage de la MEC par les enzymes matricielles, les MMP, les protéines de la matrice interstitielle ainsi que celles de la lame basale sont clivées. Certains des peptides alors formés sont connus pour avoir des propriétés biologiques. Deux grands groupes de peptides se distinguent : les matrikines et les matricryptines (qui peuvent être considérées comme un sous-groupe de matrikines) [28]. Les matrikines sont les peptides qui avaient déjà une activité biologique quand ils faisaient corps avec la protéine de la MEC (*via* un domaine de fixation par exemple). Les matricryptines correspondent aux peptides dont la fonction biologique est inactive tant qu'ils ne sont pas clivés [29]. Avec ses six chaînes α différentes, la

dégradation du collagène de type IV peut aboutir à la formation de nombreux peptides. Parmi eux, six sont connus pour avoir un rôle biologique et sont répertoriés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Les matricryptines du collagène de type IV et leur rôle.

D'après Kisling et coll., Life Sciences, 2019 et Weckmann et coll., Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2012 [27,30].

Enzyme matricielle	Chaîne α	Matricryptine	Rôle
MMP-2	$\alpha 1$	Arrestène	Anti-angiogénique Promotion de la transition endothélio-mésenchymateuse
	$\alpha 2$	Canstatine	Anti-angiogénique Migration des fibroblastes Prolifération des cellules épithéliales Promotion de la transition endothélio-mésenchymateuse
	$\alpha 4$	Tétrastatine	Anti-angiogénique Anti-tumorale : <i>pro-apoptotique, inhibition de la migration</i> Promotion de la transition endothélio-mésenchymateuse
	$\alpha 5$	Pentastatine <u>Lamstatine</u>	Anti-angiogénique <u>Anti-angiogénique</u> <u>Anti-lymphangiogénique</u>
	$\alpha 6$	Hexastatine	Anti-angiogénique Inhibition de la migration cellulaire
MMP-9	$\alpha 3$	Tumstatine	Anti-angiogénique Migration et prolifération des fibroblastes

Parmi les six différentes chaînes du collagène de type IV, les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ sont les plus conservées et les plus abondantes car elles sont distribuées dans pratiquement toutes les membranes basales. Par conséquent, lorsqu'une mutation survient sur les gènes *COL4A1* et/ou *COL4A2*, les conséquences sont multiples, ubiquitaires et critiques. En effet, les mutations du gène *COL4A1* et *COL4A2* peuvent causer la porencéphalie de type I caractérisée par la présence de cavités intracérébrales de taille variable et qui se manifeste par plusieurs symptômes : hémiparésie à paralysie cérébrale, hydrocéphalie, crises d'épilepsie, difficulté voire absence du développement du langage, retard mental. De plus, chez les porteurs de gènes mutés, des hémorragies cérébrales massives peuvent se manifester de façon spontanée ou causée par un traumatisme tel que la naissance, la pratique sportive, etc. Les atteintes peuvent également être

oculaires, musculaires et rénales mais il existe cependant des porteurs asymptomatiques [31]. Les mutations des gènes *COL4A3*, *COL4A4* and *COL4A5* sont à l'origine du syndrome d'Alport affectant la rétine, la cochlée et les reins, menant parfois jusqu'à la surdité et l'insuffisance rénale (phase terminale) [32]. Les mutations du gène *COL4A6* peuvent également aboutir au syndrome d'Alport avec léiomyomatose diffuse caractérisée par une prolifération bénigne des cellules des muscles lisses [33–35].

b. Les glycoprotéines adhésives

Les glycoprotéines adhésives possèdent des domaines de liaison cellulaire et matriciel qui permettent l'assemblage des différents composants de la MEC entre eux mais aussi les interactions des cellules avec cette matrice. Elles sont multiples et sont impliquées dans l'adhésion et la migration cellulaire.

b.1. La fibronectine

La fibronectine est la seconde protéine la plus abondante dans la MEC. Elle est exprimée à partir du gène *FN1* et structurée en dimère d'environ 250 kDa chacun relié par une paire de ponts disulfures. Chaque monomère est formé par différents domaines : les domaines fibronectine de type I, de type II et de type III respectivement appelés FN I, FN II et FN III (Figure 4). La fixation des cellules est notamment permise par l'intermédiaire du motif RGD (Arg-Gly-Asp) du domaine FN III₁₀ à une intégrine cellulaire ($\alpha 5\beta 1$) [36]. La fibronectine a également d'autres rôles biologiques tels que la cicatrisation, la différenciation, la prolifération et la réorganisation du cytosquelette [37].

Domaine de liaison :

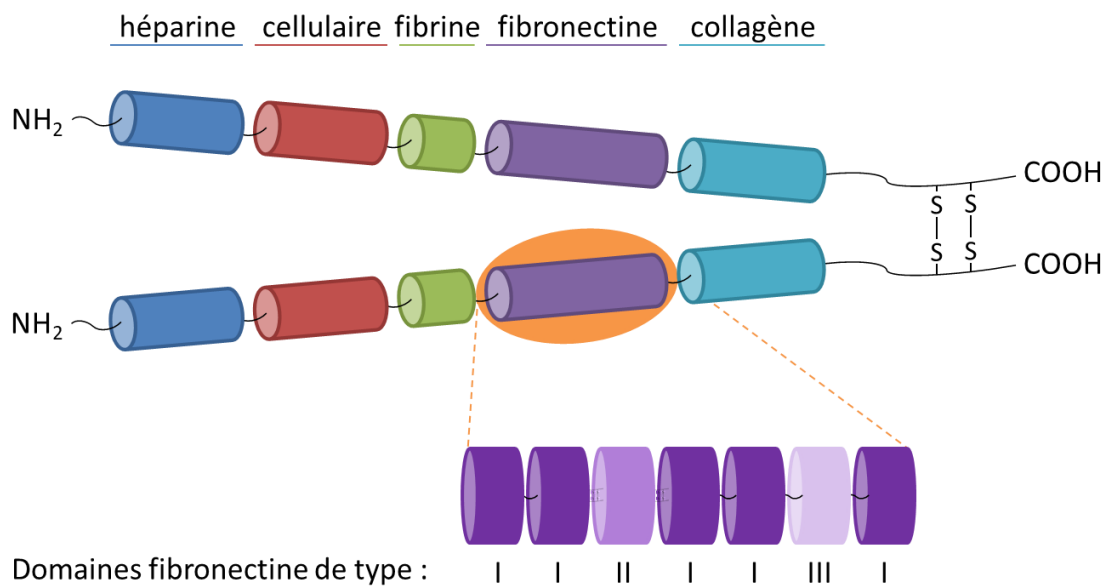


Figure 4 : Représentation schématique de la fibronectine.

La fibronectine est une protéine dimérique organisée en différents modules de liaison aux protéines matricielles et de liaison cellulaire. Ces modules sont structurés en domaine dits « fibronectine » de type I, II ou III. Les deux monomères sont liés par une paire de pont disulfure en C-terminal tout comme les domaines fibronectine de type I à ceux de type II. D'après *Ancient ECM Protein Motifs* - Page 2, 2004 [38]

b.2. La ténascine

Chez les vertébrés, la famille des ténascines comporte quatre membres : les ténascine C, R, W et X distribuées dans les différents tissus du corps et impliquées dans la réorganisation du cytosquelette et la prolifération cellulaire [39]. Chaque protéine est structurée par la répétition des mêmes domaines dans le même ordre et leur poids moléculaire est compris entre 150 et 380 kDa. Cette différence de taille est due à la variabilité du nombre de répétitions de ces domaines (Figure 5) [40].

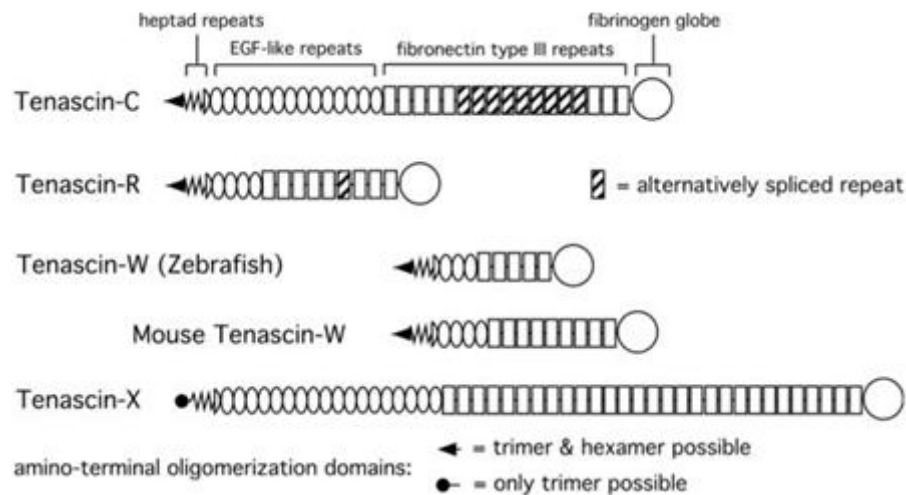


Figure 5 : Représentation schématique de la famille des ténascines.

Les ténascines C, R, X et W sont retrouvés chez les vertébrés. De l'extrémité N-terminale à la C-terminale : des répétitions d'un motif de sept acides aminés, des domaines *epidermal growth factor* (EGF), fibronectine de type III et un domaine globulaire de type fibrinogène. Figure issue du travail de Hsia et coll., The Journal of Biological Chemistry, 2005 [40].

b.3. L'intégrine

Les intégrines sont des hétérodimères transmembranaires composés de deux sous-unités, α et β , associées de façon non covalente. Elles permettent la transduction des signaux du compartiment extracellulaire au compartiment intracellulaire et inversement. Il existe 24 intégrines différentes chez les vertébrés. Chacune d'elle est associée à une fonction et à un type cellulaire. Elles sont formées par 18 sous-unités α (gènes *ITGA1-11* et *ITGAE*, *D*, *Iib*, *L*, *M*, *V* et *X*) et 8 sous-unités β (gènes *ITGB1-8*) (Figure 6) [41–43].

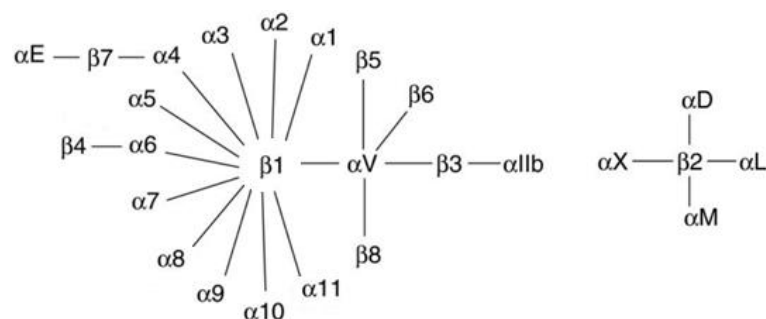


Figure 6 : Possibilités de dimérisation des sous-unités des intégrines.

D'après Takada et coll., Genome Biology, 2007 [43].

Les intégrines sont les principaux acteurs de l'adhésion et de la migration. Par leur domaine intracellulaire, les intégrines sont au contact du cytosquelette d'actine et participent à son remodelage. Au travers de leur liaison aux immunoglobulines et aux leucocytes, les intégrines ont également un rôle dans la réponse immunitaire. Par ailleurs, les intégrines contribuent (de façon indépendante ou par association à des récepteurs de facteurs de croissance) à l'angiogenèse, la cicatrisation, la croissance cellulaire, la différenciation, la division cellulaire et la survie [41–43].

c. Les glycosaminoglycanes

Les GAG sont des polymères chargés négativement, de poids moléculaire variable, de l'ordre du kDa à plusieurs centaines de kDa. Ils sont constitués d'unités disaccharidiques successives : un acide uronique ou un galactose associé à un hexosamine [44]. Leur charge négative leur permet d'attirer des cations et des molécules d'eau pour la même occasion afin de garantir leur équilibre osmotique. La présence de l'eau assure une résistance aux forces de cisaillement et de compression, et participe ainsi à la stabilité de la MEC. Associés à une protéine, les GAG forment les PG, des macromolécules aux fonctions biologiques variées. Les GAG possèdent également des fonctions biologiques qui leur sont propres telles que l'adhésion cellulaire ainsi que la régulation de la coagulation, de la croissance et prolifération cellulaires [45–48]. Selon le type de monomère, la liaison entre les monomères, la position des groupements sulfates et le degré de sulfatation, il existe quatre groupes de GAG : les chondroïtines sulfates et dermatanes sulfates, les héparanes sulfates et héparines, les kératanes sulfates et le groupe de l'acide hyaluronique (AH) (Figure 7) [49,50].

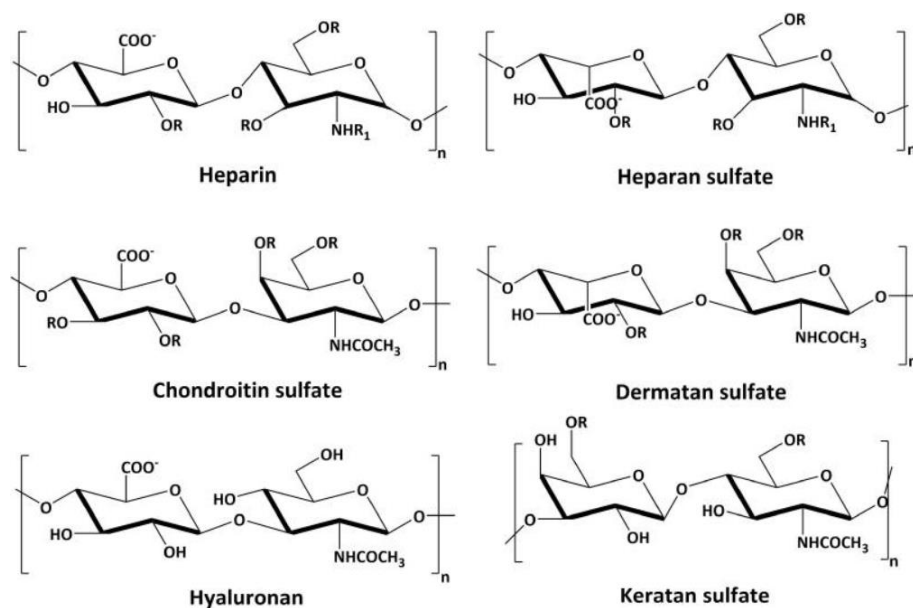


Figure 7 : Projection de Haworth des différents glycosaminoglycane.

Les radicaux R et R1 correspondent à l'hydrogène (H) ou au trioxyde de soufre (SO_3^-) pour le premier et à l'H, ou au SO_3^- ou encore au groupement COCH_3 pour le deuxième. Figure issue du travail de Morla S., International Journal of Molecular Sciences, 2019 [50].

c.1 Les glycosaminoglycane sulfatés

Le glucose et le galactose sont les principaux précurseurs des unités saccharidiques des GAG. Ils sont métabolisés par des actions enzymatiques successives dans le cytosol afin d'obtenir cinq sucres uridine diphosphate (UDP) : l'UDP acide glucuronique, l'UDP galactose, l'UDP N-acétylgalactosamine, l'UDP N-acétylglucosamine et l'UDP xylose. Les formes métabolisées du glucose et du galactose sont assemblées par des enzymes présentes pour la plupart dans le cytosol, sinon, dans le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi où peuvent se faire la liaison covalente au tronc protéique pour la synthèse d'un PG ainsi que la sulfatation pour ce dernier [45,51].

La fonction des GAG dépend de leur structure moléculaire. Cette structure est elle-même déterminée par les réactions d'épimérisation qui ont lieu dans l'appareil de Golgi (Figure 8) [45].

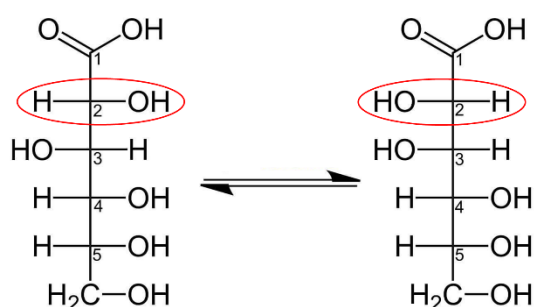


Figure 8 : Schéma explicatif de la réaction d'épimérisation.

L'épimérisation est une réaction chimique où la configuration d'un centre asymétrique tétraédrique (atome relié à quatre autres groupements non identiques) est inversée. Ici, l'atome d'hydrogène (H) et le groupement hydroxyle (OH) sont inversés au niveau du carbone - le centre asymétrique - en position 2. D'après Gnu, 2018 [52].

c.1.1. Le groupe du chondroïtine sulfate et du dermatane sulfate

Le chondroïtine sulfate est composé par les sucres acide glucuronique et N-acétylgalactosamine. Ils sont liés entre eux par des liaisons β (1-4) glycosidiques et chaque unité disaccharidique est reliée à une autre par des liaisons β (1-3) glycosidiques (Figure 9) [53].

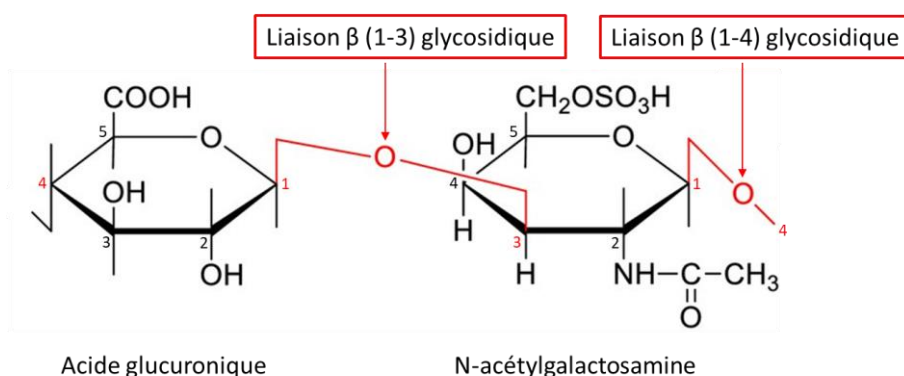


Figure 9 : Schéma représentant la structure chimique de l'unité disaccharidique du chondroïtine sulfate.

Le chondroïtine sulfate est un GAG composé d'acide glucuronique et de N-acétylgalactosamine. Les deux sucres sont liés l'un à l'autre par des liaisons β (1-3) glycosidiques. Les unités disaccharidiques sont liées les unes autres par des liaisons β (1-4) glycosidiques [54].

L'épimérisation d'un résidu quelconque de l'acide glucuronique aboutit à la formation de l'acide iduronique. Les chondroïtines sulfates sont localisés dans les tissus conjonctifs et le cartilage tandis que les dermatanes sulfates sont retrouvés dans la peau [51]. Une chaîne de

chondroïtine ou de dermatane sulfate peut contenir entre 40 et 1 000 unités disaccharidiques, ce qui correspond respectivement à 20 000 et 50 000 Da. Avec le N-acétylgalactosamine, l'acide iduronique génère le dermatane sulfate. Généralement, les carbones en position 4 et 6 du N-acétylglucosamine sont sulfatés, ainsi que le carbone en position 2 pour l'acide iduronique du dermatane sulfate. Lors de la formation d'un PG, la liaison des chondroïtine et dermatane sulfates à un cœur protéique se fait à partir d'un résidu sérine *via* un motif trisaccharidique galactosyl-galactosyl-xylosyl (Gal-Gal-Xyl) [45,55]. Les PG de la MEC sont principalement constitués de chondroïtine sulfate (agrécan, brévicane, biglycane, décorine, versicane). Ils participent à la stabilité de la MEC en réticulant les autres composés de la MEC et jouent leur rôle biologique en séquestrant des facteurs de croissance [56].

c.1.2. Le groupe de l'héparane sulfate et de l'héparine

Les héparanes sulfates et les héparines sont constitués par le N-acétylglucosamine et respectivement par l'acide glucuronique ou l'acide iduronique en cas d'épimérisation. Concernant l'héparane sulfate, les liaisons entre les sous-unités sont de type β (1-4) glycosidiques et les liaisons entre les unités disaccharidiques de type α (1-4) glycosidiques tandis que toutes les liaisons de l'héparine sont de type α (1-4) glycosidiques [45]. Les chaînes d'héparanes sulfates comptent généralement entre 50 et 200 répétitions d'unités disaccharidiques soit 25 000 à 100 kDa [57]. L'héparine a un poids moléculaire moins élevé qui varie entre 5 et 30 kDa [58]. Le degré de sulfatation de ces GAG influe sur leur capacité à interagir avec d'autres protéines telles que les cytokines ou les facteurs de croissance déterminant ainsi leur fonction biologique. Ils s'associent à un cœur protéique à partir d'un motif tétrasaccharidique de résidus xylose (1), galactose (2) et acide glucuronique (1) sur une sérine. Héparanes sulfates et héparines peuvent se lier à diverses protéines (protéines

fibreuses ou facteurs de croissance) et notamment à l'antithrombine III pour l'héparine, ce qui lui confère une activité anticoagulante [45]. Les PG à héparanes sulfates tels que le perlecan interagissent également avec des facteurs de croissance en les séquestrant afin qu'ils soient libérés suite à un stimulus particulier ou afin de créer un gradient [57].

c.1.3. Le groupe du kératane sulfate

Le kératane sulfate est majoritairement localisé dans la cornée puis le cerveau. Dans la cornée, il permet de maintenir un espace précis entre les fibres de collagène pour assurer la clarté visuelle et une hydratation optimale. Dans le cerveau, le kératane sulfate joue un rôle régulateur de la prolifération cellulaire [45]. Il peut contenir jusqu'à 50 unités disaccharidiques de galactose et de N-acétylglucosamine (entre 20 000 et 25 000 Da). Ils sont liés les uns aux autres par des liaisons β (1-4) glycosidiques et les unités disaccharidiques par des liaisons β (1-3) glycosidiques [53]. Les deux sucres peuvent être sulfatés, le N-acétylglucosamine de façon plus importante. Le kératane sulfate est le seul GAG sulfaté qui ne s'associe pas à un cœur protéique par l'intermédiaire d'un motif tri ou tétrasaccharidique lors de la formation d'un PG. Il existe trois types de kératanes sulfates selon le mécanisme utilisé pour l'ancrage au cœur protéique. Les kératanes sulfates de type I s'associent au cœur protéique par l'intermédiaire d'un glycane complexe et d'une asparagine. Les kératanes sulfates de type II, principalement retrouvés dans le cartilage, se lient au cœur protéique à partir d'un résidu N-acétylgalactosamine sur un acide aminé sérine ou thréonine. Les kératanes sulfates de type III sont plus souvent observés au niveau cérébral et utilisent un résidu mannose pour créer une liaison avec un acide aminé sérine ou thréonine du cœur protéique [45].

c.2. L'acide hyaluronique

L'AH est un GAG particulier. Non sulfaté, il est moins hydrophile que les autres GAG mais sa grande taille (jusqu'à 25 000 unités disaccharidiques soit 20 000 kDa) lui permet de stocker une quantité plus importante de molécules d'eau. Il est composé par l'acide glucuronique qui porte la charge négative et par le N-acétylglucosamine [59]. L'AH ne forme pas de PG mais il peut interagir avec eux (agrécan, brevican, neurocan et versican) de façon non-covalente *via* des motifs particuliers : les *hyaluronan-binding motifs*, jouant ainsi un rôle de plateforme [53].

L'AH sera décrit plus en détail que les autres GAG cités plus haut car il s'agit du biomatériau de base de notre modèle de culture.

c.2.1. Biosynthèse et renouvellement de l'acide hyaluronique

L'AH est le GAG dont la structure est la plus simple, sans ajout de groupements sulfates et sans modification post-polymérisation dans l'appareil de Golgi. Il est directement synthétisé à la face interne de la membrane plasmique cellulaire. Les sucres précurseurs, l'UDP acide glucuronique et l'UDP N-acétylglucosamine, sont métabolisés dans le cytoplasme et recrutés à la membrane plasmique par diffusion [45]. Ils sont alors assemblés par des liaisons β (1-3) glycosidiques et des liaisons β (1-4) glycosidiques entre les unités disaccharidiques. La polymérisation de l'AH est permise par les enzymes *hyaluronan synthases* (HAS) transcrites et traduites à partir des gènes *Has1-3* [60]. Suite à la polymérisation, l'AH est sécrété dans la MEC (Figure 10) [45].

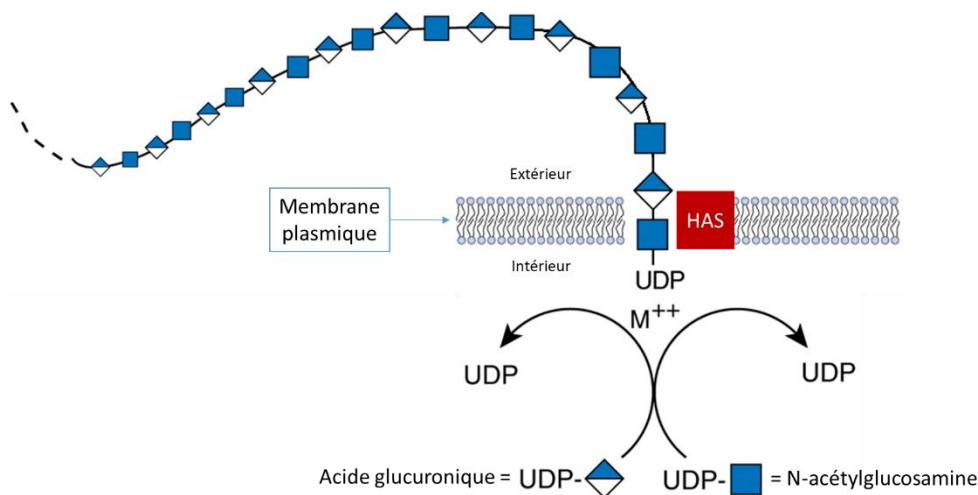


Figure 10 : Représentation schématique de la biosynthèse de l'acide hyaluronique.

L'AH est un GAG composé par l'acide glucuronique et le N-acétylglucosamine. Les formes précurseurs de ces sucres sont assemblées via une l'action enzymatique de la *hyaluronan synthase* (HAS) à la face interne de la membrane plasmique cellulaire. D'après Vincent Hascall and Jeffrey D. Esko, *Essentials of Glycobiology*, 3rd edition, 2017 [60].

L'AH est dégradé par l'action enzymatique des hyaluronidases codées par les gènes *HYAL1-3* et *SPAM1* (pour la protéine *sperm adhesion molecule 1*) où l'action est limitée à la spermatogenèse et la fécondation. Le gène *HYAL4* est un cas particulier, il code pour une hyaluronidase qui a une action de chondroïtinase. L'AH est également capté par différents récepteurs afin d'être détruit dans le lysosome. Lorsque la dégradation est locale, l'AH est reconnu par le récepteur *hyaluronan receptor for endocytosis* (HARE). Sinon, la dégradation peut avoir lieu dans les ganglions lymphatiques ou au niveau du foie. Dans ce cas, l'AH est respectivement fixé par le *lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1* (LYVE-1) ou le *liver endothelial cell clearance receptor* (LEC receptor) puis éliminé [60].

c.2.2. Les différentes fonctions de l'acide hyaluronique

L'AH est un GAG ubiquitaire capable d'attirer de nombreuses molécules d'eau (jusqu'à 10 000 fois son poids en eau). Une fois hydraté, l'AH gagne en volume ce qui lui confère la capacité de résister à la compression mais également de faciliter la migration cellulaire (particulièrement lors de la cicatrisation) grâce à sa conformation en hélice [49,60]. Sa charge

en eau lui donne une consistance de gel qui permet la lubrification notamment au niveau des articulations [45,56].

Afin d'exercer une fonction biologique, l'AH doit être fixé par un récepteur. Les deux récepteurs principaux de l'AH sont le *cluster of differentiation 44* (CD44) et le *receptor for hyaluronan-mediated motility* (RHAMM). Le CD44 est un récepteur transmembranaire avec un domaine extracellulaire unique de liaison à l'AH. La fixation du ligand entraîne un changement de conformation du domaine cytoplasmique du récepteur qui permet une interaction avec des protéines régulatrices de la migration, de la prolifération ou encore de la réorganisation du cytosquelette. Il existe des variants du récepteur CD44 qui sont obtenus par épissage alternatif, glycosylation ou oligomérisation tel que le CD44H, l'isoforme exprimée par les cellules souches hématopoïétiques (CSH). La liaison de l'AH au récepteur RHAMM active d'autres protéines impliquées dans la motilité, la prolifération cellulaire et la survie. Il existe également des variants du récepteur RHAMM, certains sont intracellulaires. L'*intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) et la layiline sont d'autres protéines réceptrices de l'AH. Lorsqu'il est fragmenté et capté par les *toll-like receptors* (TLR-2 et 4), l'AH envoie un signal de « blessure » et déclenche alors l'expression de gènes inflammatoires [61].

L'AH joue également un rôle important dans la morphogenèse. Ses fonctions de promotion de l'adhésion, la différenciation, la migration, et la prolifération cellulaires permettent la formation du cartilage, du cœur, des neurones, des os et des vaisseaux sanguins [61]. Ces fonctions, associées à l'impact de l'AH sur la survie cellulaire, sont également clés pour la carcinogenèse. En effet, l'expression de certains variants du récepteur CD44 est corrélée à l'apparition et à la progression du cancer [45,60]. C'est pourquoi la régulation de la signalisation de l'AH doit être très fine. Cette régulation est basée sur la taille de l'AH qui varie

selon l'enzyme de synthèse et l'activité enzymatique des hyaluronidases ou d'autres acteurs responsables de la dégradation de l'AH tels que les espèces réactives de l'oxygène ou *reactive oxygen species* (ROS). L'AH de haut poids moléculaire (à partir de 1 000 kDa), plus visqueux, présente des propriétés anti-inflammatoires, immunosuppressives et lubrifiantes tandis que l'AH de bas poids moléculaire peut induire la libération de cytokines pro-inflammatoires [62].

Le rôle de l'AH dans la cancérogenèse sera abordé dans la partie I.4.

L'AH est utilisé en tant qu'agent thérapeutique dans différents domaines. Dans le cas de l'arthrose, des injections d'AH au niveau des articulations touchées peuvent soulager les patients. L'AH a également une application dans la chirurgie ophtalmique où il est injecté de manière à protéger le champ d'opération tout en le maintenant accessible [60].

2. Facteurs de croissance matriciels

L'adhésion des cellules à la MEC entraîne la sécrétion de facteurs de croissance par ces cellules pour influencer leur différenciation, leur prolifération ou leur survie. Ces facteurs sont ensuite séquestrés par les protéines de la matrice, notamment par les PG à chondroïtine et héparane sulfate. Cette séquestration a plusieurs conséquences : (i) leur stockage, (ii) la protection de la dégradation des facteurs de croissance par des protéases, (iii) une concentration de l'activité pour une action prolongée, (iv) la création d'un gradient de concentration, (v) la proximité du ligand et de son récepteur pour une activation rapide de la voie de signalisation. De plus, la séquestration permet également de contrôler positivement ou négativement l'activité des facteurs de croissance. Les facteurs de croissance peuvent à leur tour exercer aussi un rôle sur la MEC en induisant sa synthèse et/ou sa dégradation en promouvant la production d'enzymes. La liaison du facteur de croissance peut être directe, c'est-à-dire sur son récepteur,

ou indirect par l'intermédiaire des intégrines. Par ailleurs, la liaison est aussi possible sur les matrikines et matricryptines des protéines de la MEC [63–65].

a. L'*epidermal growth factor*

L'*epidermal growth factor* (EGF) est une protéine de 6 kDa exprimée à partir du gène *EGF* et qui a pour récepteur l'*epidermal growth factor receptor* (EGFR). Elle peut également interagir avec des domaines protéiques liant l'EGF présents sur les protéines de la MEC décrites plus haut et leurs matrikines (avec une affinité plus faible). L'EGFR est une glycoprotéine transmembranaire de 170 kDa aux ligands multiples dotée d'une activité tyrosine kinase. L'interaction du ligand à son récepteur permet de promouvoir la différenciation, la prolifération, la migration, et la survie cellulaire ainsi que la production de ROS [56,64–67].

b. Le *fibroblast growth factor*

Chez l'Homme, la famille des *fibroblast growth factors* (FGF) compte 22 membres dont le poids moléculaire varie entre 7 et 38 kDa répartis dans six sous-familles selon leur homologie de séquence et leur phylogénie. Le récepteur du FGF (FGFR) existe sous quatre formes et chacune d'elle présente plusieurs variants obtenus après épissage alternatif. Il s'agit de protéines transmembranaires à activité tyrosine kinase. Ligands et récepteurs sont respectivement exprimés à partir des gènes *Fgf1-22* et *FGFR1-FGFR4*. Les fonctions des FGF sont nombreuses, ils sont notamment impliqués dans l'angiogenèse, la cicatrisation, la migration et la prolifération cellulaire ainsi que la mécanotransduction [56,64,65,68].

c. Le *platelet-derived growth factor*

Le *platelet-derived growth factor* (PDGF) est un dimère de 30 kDa formé par deux chaînes protéiques. Il existe quatre types de chaînes (A, B, C ou D) exprimées à partir de gènes

distincts (*Pdgfa-d*) qui forment cinq isoformes de PDGF (AA, AB, BB, CC ou DD). Les différentes isoformes peuvent se lier aux deux récepteurs du PDGF, le PDGFR α et β , avec une affinité variable. Le PDGF est un facteur pro-angiogénique qui est sécrété par les cellules endothéliales de plusieurs tissus et également par les monocytes lors de leur adhésion à la MEC. Au moment de l'angiogenèse, le PDGF est sécrété et stocké par la MEC par le biais d'intégrines car il est nécessaire à la maturation des vaisseaux sanguins [64,69,70].

d. Le *transforming growth factor* β

Le *transforming growth factor* β (TGF- β) est exprimé par toutes les cellules du corps humain sous trois formes, TGF- β 1-3, à partir de trois gènes, respectivement et *Tgfb1-3*. Dans sa forme active, le TGF- β est un homodimère de 25 kDa, associé à son récepteur, le TGF- β *receptor* (TGFB β R) qui existe également sous trois formes, TGFB β R1-3, exprimés à partir des gènes *Tgfb β r1-3*. Les récepteurs TGFB β R1 et 2 ont des activités à la fois sérine/thréonine kinase et tyrosine kinase tandis que le TGFB β R3 n'a pas d'activité kinase. Le TGF- β , régule (i) la synthèse de protéines de la MEC par les fibroblastes telles que le collagène ou encore l'AH, (ii) la différenciation, (iii) la prolifération, (iv) la réponse inflammatoire et (v) la survie cellulaire [64,65,71–73].

e. Le *vascular endothelial growth factor*

Chez l'Homme, la famille des *vascular endothelial growth factors* (VEGF) compte cinq membres : VEGF-A-D et le *placental growth factor* (PlGF). Le VEGF *receptor* (VEGFR) existe sous trois formes, VEGFR1-3, chacun avec sa spécificité de ligand et de signalisation. Les récepteurs VEGFR-1 et 2 médient l'angiogenèse tandis que le VEGFR-3 peut participer à l'angiogenèse lors des phases précoces de l'embryogenèse mais active surtout la

lymphangiogenèse. Le VEGF-A peut également être capté par les domaines FN III présents sur la fibronectine et la ténectine [56,64,69,74].

3. Propriétés mécaniques

Le corps peut capter des signaux mécaniques extérieurs par le biais de mécanorécepteurs présents dans la peau et à proximité des os. Le stimuli extérieur (contact, étirement, mouvement, ondes sonores ou pression) est transduit en un signal intracellulaire *via* des canaux ioniques sensibles à la pression. Par exemple, ce sont les barorécepteurs, des mécanorécepteurs particuliers, qui détectent et transmettent les changements de pression artérielle au système nerveux autonome afin qu'elle soit corrigée [75,76].

Les cellules sont également sensibles à leur microenvironnement mécanique. En effet, les modifications des interactions qu'elles entretiennent avec les cellules voisines ou les protéines de la MEC *via* les intégrines entraîne une contraction du cytosquelette. Cette réorganisation initie l'association de protéines clés de la motilité cellulaire qui, à son tour, active la voie de signalisation des protéines Rho (RhoA et Rac1) (Figure 11) pour la modulation de l'expression de gènes en faveur de la différenciation, de la migration, de la prolifération ou régulant la morphologie cellulaire [77,78].

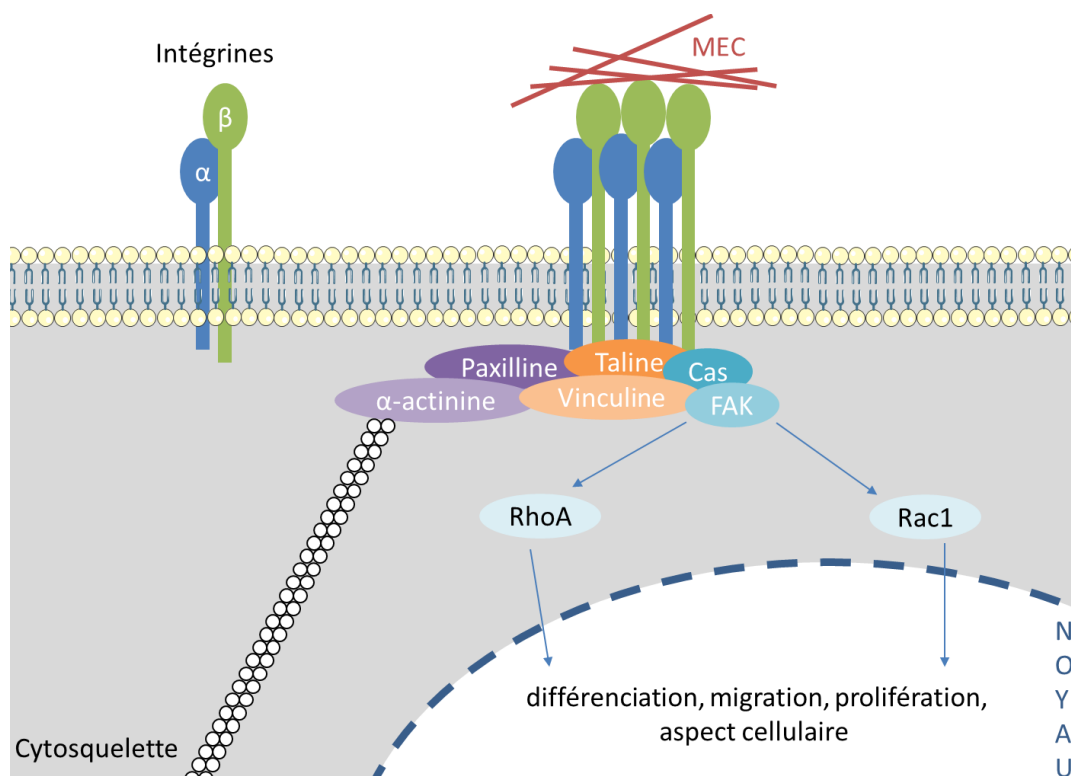


Figure 11 : Mécanorégulation par les intégrines.

Les intégrines perçoivent les modifications mécaniques de la MEC et répondent en activant les protéines de la famille Rho : RhoA et Rac1. La signalisation par ces protéines promeut la différenciation, la migration, la prolifération et régule la forme de la cellule. D'après Handorf et coll., *Organogenesis*, 2015 [77].

Engler et coll. ont illustré l'impact de la rigidité du microenvironnement sur la différenciation des cellules souches mésenchymateuses. En effet, sur des gels de polyacrylamide de rigidité variable, des forces de traction variables qui impliquent différentes intégrines sont exercées. Les cellules s'orientent soit vers un phénotype neuronal, musculaire ou ostéoblastique selon que le support soit respectivement d'une rigidité faible, modéré ou importante [79,80]. L'effet sur la prolifération et la survie de cellules de carcinome hépatocellulaire a également été observé par Schrader et coll.. Sur un support similaire à l'étude précédente, les auteurs ont noté une diminution de la capacité des cellules à former des colonies ainsi qu'une diminution de l'apoptose – la mort cellulaire programmée – sur les supports de rigidité plus importante [81]. Encore récemment, une équipe a pu illustrer l'impact de la rigidité de l'environnement sur la prolifération cellulaire [82]. Des cellules progénitrices rénales ont été

cultivées dans les mêmes conditions, sur des supports de rigidité variable, avec un revêtement de collagène. Après trois jours de culture, la prolifération sur les supports les plus rigides était beaucoup plus importante que celles menées sur des supports de rigidité moindre (Figure 12).

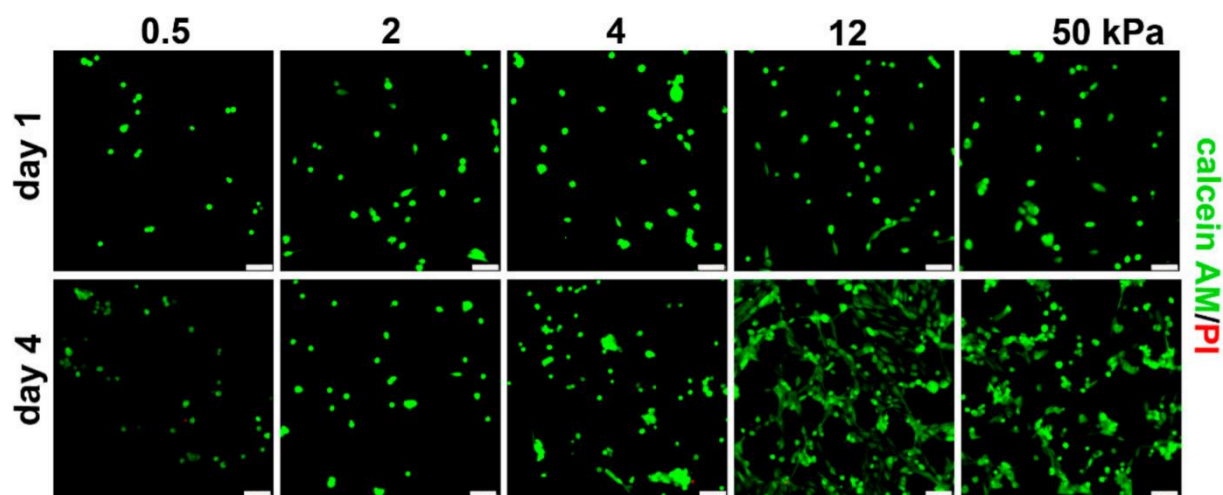


Figure 12 : Impact de la rigidité du support sur la prolifération des progéniteurs rénaux.

Les cellules sont mises en culture dans les mêmes conditions mais sur des supports de rigidité croissante pendant quatre jours. Les cellules vivantes sont marquées en vert et les mortes en rouge. Photographies obtenues par microscopie confocale, barre d'échelle = 75 μm . D'après Melica et coll. Cells, 2019 [82].

Ces résultats s'expliquent par la variabilité de la composition de la MEC. À chaque protéine correspond un module d'élasticité précis. De même, la composition de la MEC varie d'un tissu à l'autre, lui conférant ainsi une rigidité relative particulière (Figure 13). Cela implique que pour un type cellulaire, il existe une rigidité optimale pour l'activité cellulaire.

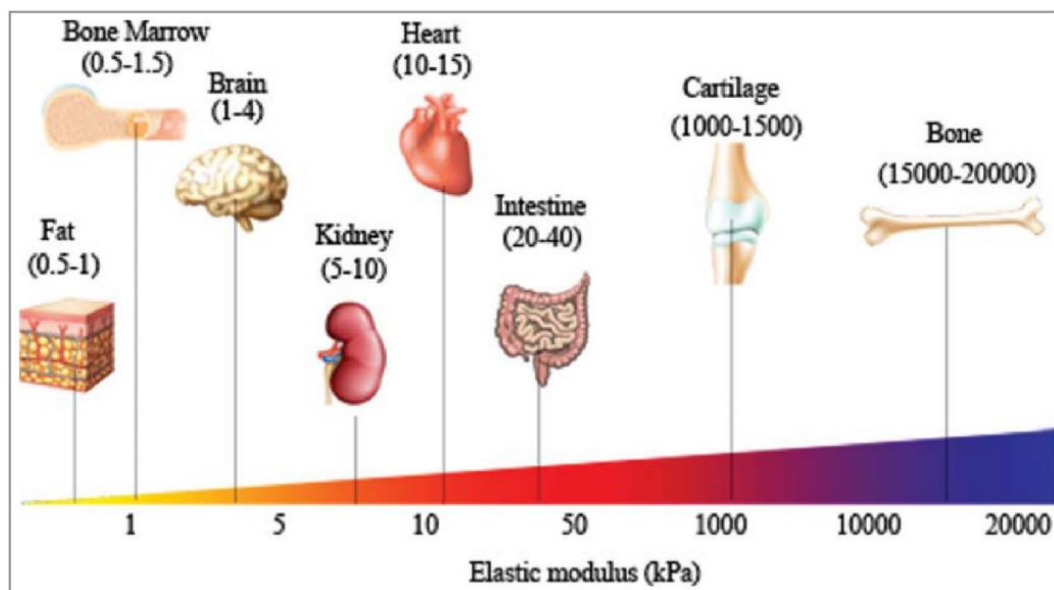


Figure 13 : Exemples de modules d'élasticité par tissu.

Figure issue du travail de Handorf et coll., Organogenesis, 2015 [77].

4. Le microenvironnement tumoral

Dans le cadre pathologique, les propriétés de la MEC changent pour favoriser le développement tumoral. En effet, la MEC tumorale est plus fibreuse car plus riche en collagène et en GAG tels que la chondroïtine sulfate et l'héparane sulfate captant les facteurs de croissance participant à l'essor tumoral. De plus, afin de faciliter l'invasion tumorale, les MMP sont surexprimées dans la MEC tumorale [83].

a. Les propriétés physico-chimiques du microenvironnement tumoral

Grâce aux intégrines notamment, les cellules cancéreuses sont également capables de percevoir les stimuli mécaniques de leur environnement, comme sa rigidité, sa pression hydrostatique et l'étirement ou la compression [84].

a.1. La rigidité

De manière générale, la MEC tumorale est plus rigide. Cette augmentation est due à la hausse de la sécrétion du collagène et des enzymes provoquant sa réticulation ainsi qu'à la

génération de forces de tension plus importantes par les cellules cancéreuses sur la MEC. Elle conduit à (i) une hausse de la sécrétion et de l'activation de MMP pour un remodelage actif de la MEC participant à une migration et propagation du cancer et (ii) à l'activation des intégrines des cellules cancéreuses promouvant ainsi leur invasion [83–85]. Par ailleurs, il a été montré récemment que les propriétés mécaniques de certains types de tumeurs dépendent en fait de leur composition. En effet, il existe une rigidité relativement hétérogène au sein même du tissu cancéreux, entre zone nécrotique et non-nécrotique par exemple [86,87].

a.2. La porosité

L'augmentation de la densité du collagène entraîne également une réduction de la porosité de la MEC tumorale limitant la motilité cellulaire. Cette contrainte est, elle aussi, propice au remodelage du microenvironnement par les MMP [85].

a.3. L'hydratation

De plus, la MEC tumorale est également plus hydratée du fait de la densité plus importante des GAG. Cette augmentation contribue à la majoration de la pression hydrostatique dans la MEC tumorale qui peut participer à la progression tumorale car elle limite le passage de traitements anti-cancéreux jusqu'au site de la tumeur [83,88].

b. Les interactions au sein du microenvironnement tumoral

b.1. Les cellules tumorales

Les cellules cancéreuses sont des cellules qui ont perdu le contrôle de la régulation de leur division et qui prolifèrent de façon anarchique. Elles interagissent avec leur microenvironnement par l'intermédiaire des intégrines qui captent les signaux mécaniques et biologiques de la MEC transmis par leur liaison au collagène, à la fibronectine, la ténascine et

au TGF- β [84]. Une sous population de cellules cancéreuses capables de s'auto renouveler a été décrite par différents auteurs. Il s'agit des cellules souches cancéreuses. Leur auto renouvellement est médié à la fois par l'AH et par le PDGF et elles jouent un rôle primordial dans la progression du cancer [83,88].

b.2. Les cellules du microenvironnement tumoral

Les cellules stromales soutiennent l'activité cellulaire en permettant aux cellules d'un tissu d'évoluer au sein d'un microenvironnement idéal pour leurs fonctions. Dans le cadre du cancer, il s'agit principalement des cellules endothéliales, des *tumor-associated macrophages* (TAM) et *tumor-associated fibroblasts* (TAF) dérivant de cellules souches mésenchymateuses [88,89].

Les TAM et les TAF sont recrutés par les cellules cancéreuses *via* la sécrétion de PDGF et de TGF- β . Ils sont ensuite respectivement activés et différenciés par l'action de la fibronectine et d'autres facteurs de croissance : l'EGF et le FGF conjointement au TGF- β . Cette activation est définitive. Elle permet notamment aux TAF de recruter les cellules endothéliales et d'autres TAM (*via* des cytokines pro-inflammatoires et le VEGF). Les endothéliales génèrent de nouveaux vaisseaux sanguins afin de faciliter l'apport de nutriments au site tumoral [84,88]. Les TAM produisent des facteurs de croissance promouvant le développement du cancer et stimulent les MMP actrices du remodelage de la MEC [83,85], les activant pour promouvoir le développement tumoral [84,85]. Par ailleurs, les TAF secrètent ténascine et fibronectine et sont capables de provoquer la dissémination des cellules cancéreuses en appliquant des forces de traction sur une masse tumorale par l'intermédiaire de protéines transmembranaires [85]. Ensemble, les cellules stromales concourent au développement tumoral en promouvant l'angiogenèse, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses [84].

II. Les différents modèles de culture tridimensionnels

La culture 3D représente un outil particulièrement important pour l'élaboration de traitements innovants. En effet, lorsque de nouvelles molécules sont développées, l'évaluation de la toxicité et de l'efficacité thérapeutique est réalisée sur des modèles *in vitro* avant de passer aux modèles animaux. Il est important d'utiliser des tests *in vitro* qui permettent d'obtenir des résultats fiables et reproductibles afin de pouvoir éliminer les molécules potentiellement inefficaces ou aux effets indésirables dans les phases précoces de l'évaluation.

Les modèles de culture 3D permettent précisément de reproduire le microenvironnement d'un tissu donné tandis que les cellules cultivées sur fond de boîte de culture perdent leur morphologie physiologique et prennent progressivement un aspect plus plat (Figure 14). Il a été montré qu'une telle altération de la morphologie cellulaire peut aboutir à des modifications de la prolifération [90], de la différenciation et de l'expression génétique [91] ainsi qu'à des variations épigénétiques [92].

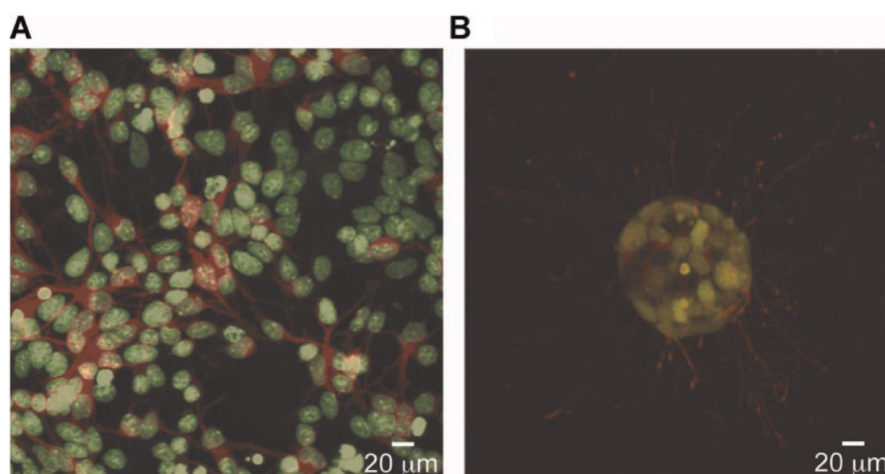


Figure 14 : Changement de la morphologie cellulaire en fonction du mode de culture.

Les cellules neurales cultivées en monocouche (A) étendent leurs axones (colorés en rouge) dans le même plan que les corps cellulaires (colorés en vert). En 3D (B), cultivées dans des hydrogels, les mêmes cellules forment des neurosphères et prolongent leurs axones de façon multidirectionnelle. Figure issue du travail de Tibbitt et coll., *Biotechnology & Bioengineering*, 2009 [93].

Le fait que les cellules puissent uniquement s'étendre sur le plan horizontal les forcent à prendre une polarisation baso-apicale. Ce changement de polarité a plusieurs inconvénients. Il a été montré qu'il module d'une part, la sensibilité des cellules à l'apoptose, et provoque d'autre part la redistribution des protéines membranaires impliquées dans l'adhésion, les intégrines et la mécanotransduction [94]. Ces deux facteurs impactent notamment la signalisation intracellulaire ou encore l'expression protéique [95]. De plus, comme nous en parlons plus haut, dans le cadre de test de nouveaux traitements, les cellules sont directement exposées à tout produit présent dans le milieu de culture. Cela va favoriser l'action dudit produit alors que, *in vivo*, l'organisation tumorale (en amas ou sphéroïdes) va compliquer la diffusion du traitement en son centre [96]. En effet, Primeau et coll. ont étudié la diffusion de doxorubicine au sein des tissus tumoraux et ont observé que le médicament était absent des zones hypoxiques des tumeurs observées (Figure 15) [97].

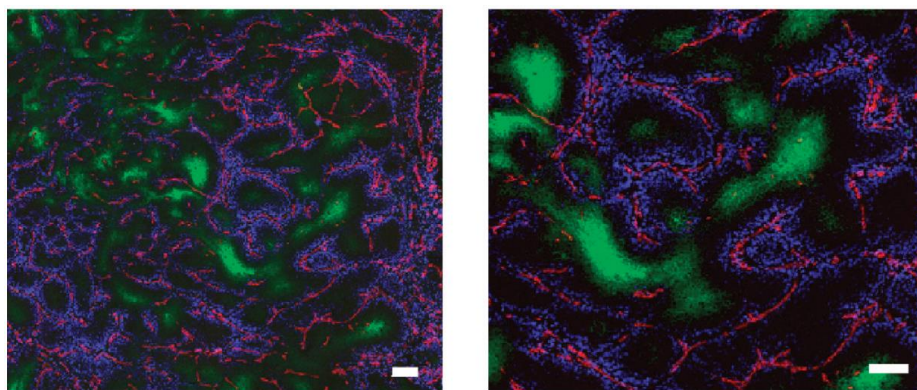


Figure 15 : Localisation intra tumorale de la doxorubicine.

Des coupes de tumeurs obtenues à partir des lignées cancéreuses PC-3 (prostate), 16C et EMT6 (sein) ont été marquées. La couleur bleue correspond à la doxorubicine, la couleur rouge aux vaisseaux sanguins et la couleur verte aux régions hypoxiques. Échelle 100 μ m. Figure issue du travail de Primeau et coll., Clinical Cancer Research, 2005.

Il a été mis en évidence récemment que la diffusion est d'autant plus difficile si la culture du sphéroïde au préalable a été longue [98].

Dans une revue de la littérature de 2014, Edmondson et coll. classent les différents modèles 3D selon le mode de culture. Ils en définissent trois ; le premier où les cellules sont cultivées sur un support 3D solide et immergées dans du milieu de culture (B), le deuxième où elles sont cultivées à l'intérieur d'un support 3D solide qui est recouvert de milieu de culture (C) et le troisième où des structures cellulaires 3D sont formées directement dans le milieu de culture (D) (Figure 16) [7].

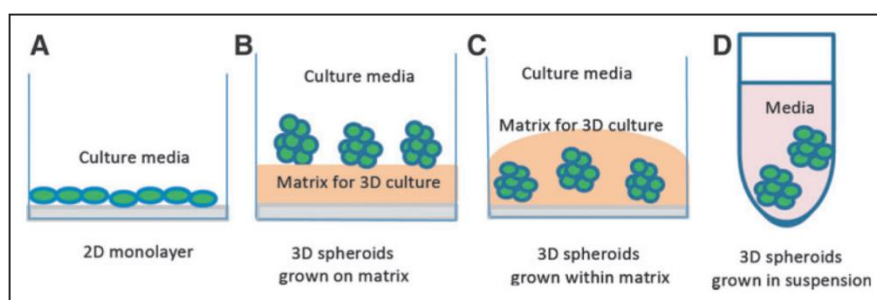


Figure 16 : Schéma comparatif de la culture 2D et de trois modes de culture 3D.

En A, une représentation de la culture 2D classique, sur fond de support solide, où les cellules forment une monocouche. Trois autres modes de culture 3D sont également représentés : les cellules sont soit cultivées sur (B) ou à l'intérieur (C) d'une matrice de culture 3D soit en suspension (D) de manière à former des sphéroïdes. Figure issue du travail de Edmondson et coll., *Assay and Drug Development Technologies*, 2014 [7].

Nous utiliserons ici cette même classification.

1. Culture à la surface ou au sein de supports tridimensionnels

Cette catégorie d'outils de culture 3D rassemble les matrices et les systèmes micro-fluidiques. Ces différents modèles permettent la culture en 3D mais également en 2D, les cellules formant une monocouche à la surface du support [99].

Si la génération de sphéroïdes permet aux cellules de retrouver des interactions physiologiques, cet agencement aboutit à la création d'un gradient de diffusion des nutriments et de l'oxygène. En effet, plus le sphéroïde est large et moins les cellules du centre peuvent les

assimiler. Cela conduit à la nécrose au cœur de l'amas cellulaire. Ce gradient est également présent *in vivo* dans les tumeurs [100,101].

a. Les matrices de culture

Les matrices sont des supports de culture également retrouvés sous le nom de *scaffolds* (qui signifie « échafaudages ») dans la littérature. Il n'existe pas de définition référencable des matrices ou des *scaffolds* les distinguant. Ils seront donc développés ensemble dans cette sous-partie – sous la dénomination de matrices – : les différents types de matrices seront présentés ainsi que quelques exemples.

La matrice idéale est caractérisée par sa biocompatibilité, sa biodégradabilité, son biomimétisme et sa non-immunogénicité. Elle doit également permettre l'adhésion et la migration cellulaire en son sein de même que la prolifération [102]. Solide ou semi solide, la matrice est poreuse afin de faciliter l'entrée des cellules tout comme la diffusion des nutriments, de l'oxygène, la sortie des déchets de consommation ainsi que le passage d'un traitement d'intérêt. Les cellules sont cultivées au sein d'éléments matriciels et/ou de (bio)polymères dont il est possible de modifier l'adhésion, la porosité, la rigidité. L'inclusion de facteurs de croissance est également possible dans des microcapsules biodégradables (Figure 17) [103,104]. Les biopolymères les plus couramment utilisés sont l'alginate et la cellulose pour les polysaccharides d'origine végétale ; la chitine, le chitosane et la soie pour les biopolymères d'origine animale [102,105].

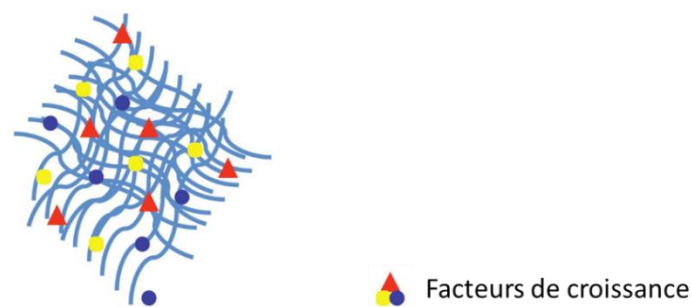


Figure 17 : Représentation schématique d'une matrice.

D'après Breslin et coll., Drug Discovery Today, 2013 [99].

a.1. Les matrices d'origine biologique

La plupart des matrices de culture sont directement extraites de MEC ce qui les rend biocompatibles et biomimétiques : elles reproduisent les conditions de la MEC en termes de composition protéique (protéines, GAG matriciels ainsi que facteurs de croissance), de mécanotransduction et permettent ainsi l'activation des voies de signalisation associées. Les cellules y interagissent les unes avec les autres et reforment des structures similaires à celles retrouvées *in vivo*. Autre point positif, ces structures sont aisément modifiables chimiquement, en termes de rigidité par exemple. Cependant, si l'objectif est la production à grande échelle, cette technique reste coûteuse. Du fait de son origine biologique, la composition exacte de la matrice peut varier d'un lot à l'autre mais il existe des matrices d'origine bactérienne, pures du point de vue de leur composition et exemptes de facteurs de croissance. De plus, la récupération totale des sphéroïdes est difficile lorsqu'ils sont complètement imbriqués dans la matrice. Par ailleurs, la taille des sphéroïdes formés est variable de même que leur distribution dans la matrice [99,106]. Cette disparité peut conduire à des chevauchements indésirables en cas d'étude distincte des sphéroïdes (Figure 18a). Pour pallier cet inconvénient, il est possible de couler la matrice dans un moule pour y former des microcavités sur ou au sein desquelles il est possible d'ensemencer des cellules (Figure 18b) [107].

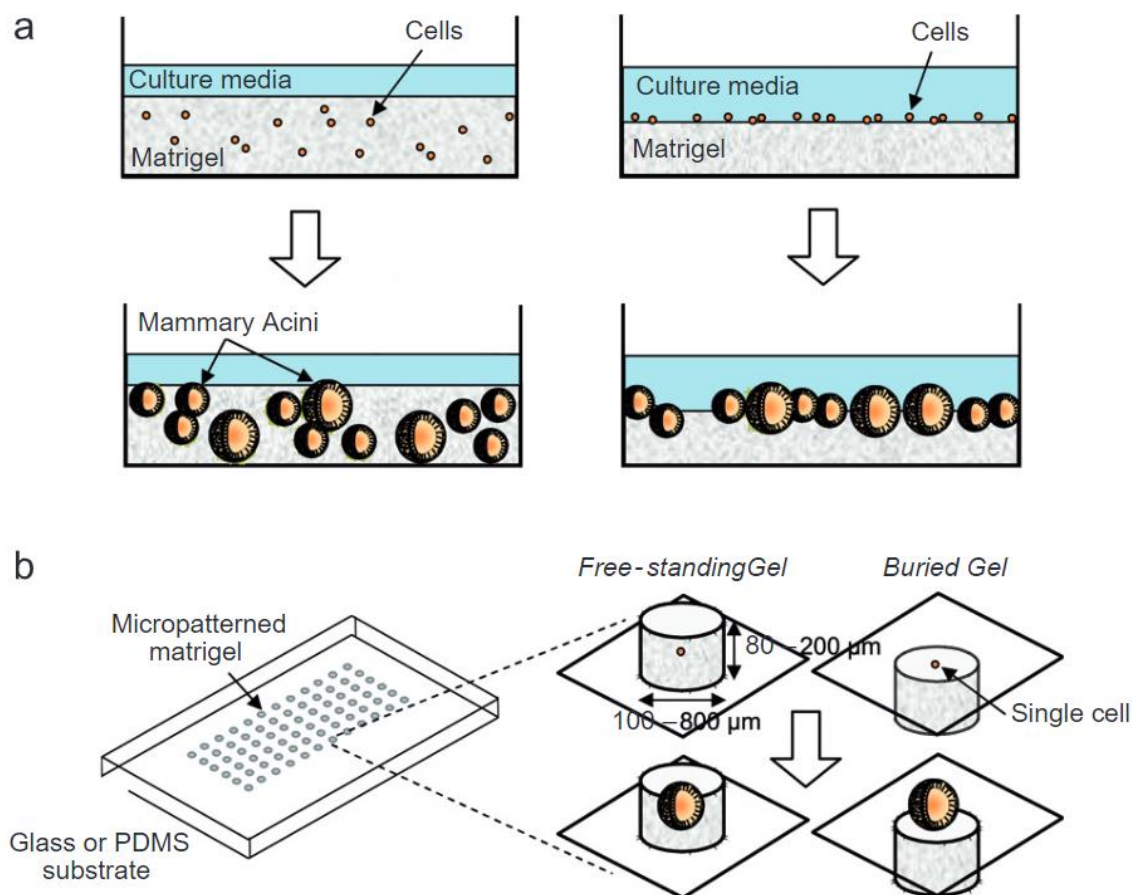


Figure 18 : Représentation schématique des matrices de culture 3D.

Sur les matrices 3D (ici Matrigel®), l'ensemencement cellulaire peut se faire sur ou au sein du support ce qui peut conduire à un chevauchement des sphéroïdes (a). Avec les matrices à microcavités, l'ensemencement est localisé, permettant ainsi une étude distincte des sphéroïdes (b). D'après Sodunke et coll., Biomaterials, 2007 [107].

a.2. Les matrices synthétiques

Les matrices synthétiques sont constituées par des molécules biocompatibles et biodégradables telles que l'acide polylactique-co-glycolique (PLGA), l'acide polylactique (PLA), le polycaprolactone (PCL), l'alcool polyvinylique (PVA) ou encore le polyéthylène glycol (PEG). Ces éléments forment des fibres entremêlées de manière à créer un treillis au sein duquel les cellules peuvent migrer et former des sphéroïdes. Ils présentent des avantages multiples : la pureté de leur composition, la facilité de leur production, leur flexibilité en termes de modification, la possibilité de la mécanotransduction et la reproductibilité des résultats. Par exemple, il est possible d'inclure des motifs RGD pour y faciliter l'adhésion des cellules.

Néanmoins, les éléments qui les composent n'activent pas de voies de signalisation et ils ne comportent pas de facteurs de croissance à moins de les y ajouter [106].

a.3. Les matrices hybrides

Les matrices hybrides réunissent les avantages des matrices synthétiques et d'origine biologique : leur réalisation est simple, leur composition est précise, pure et contient des signaux biologiques permettant, en l'état, une activité biologique : adhésion et signalisation en faveur de la différenciation, de la migration ou de la prolifération. Elles sont biocompatibles, biodégradables et caractérisées par une flexibilité qui rend toutefois leur structure moins résistante [106].

a.4. Exemples de matrices

a.4.1. Les éponges

Les *scaffolds* de type éponge sont constitués de micropores interconnectés et sont donc caractérisés par un grand pouvoir absorbant et une souplesse importante. Constitués de biopolymères matriciels et/ou de biomatériaux d'origine animale ou végétale, ils sont biodégradables. Leur structure est néanmoins trop faible pour permettre une conservation de la forme initiale jusqu'à la formation de sphéroïdes ou de tissu mature. Les éponges sont plutôt utilisées dans les pansements où elles servent de supports de colonisation cellulaire sur le site de la lésion afin de favoriser la cicatrisation (Figure 19) [102,108].

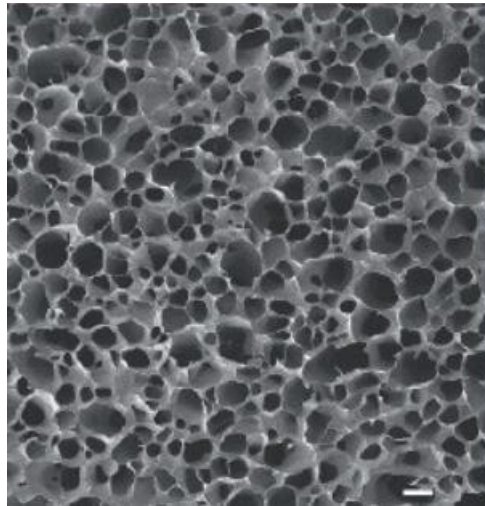


Figure 19 : Observation au microscope électronique à balayage d'une éponge en cellulose.

Barre d'échelle = 100 μm [109].

a.4.2. Les supports en mailles de filets ou *mesh-based scaffolds*

Les supports en maille de filets sont synthétisés par électrofilage, une méthode peu coûteuse, rapide et simple. Une gouttelette de (bio)polymère est exposée à une haute tension qui va lui conférer une charge électrique. Lorsque cette charge est supérieure à la force de tension superficielle, la gouttelette s'étire et est collectée sur un système rotatif (Figure 20) [108]. Il existe d'autres appareils où les fibres sont générées sur des plaques.

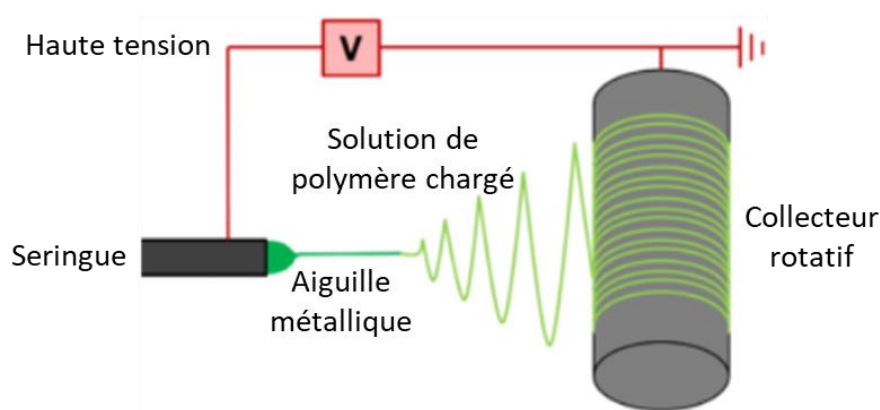


Figure 20 : Représentation schématique de la technique d'électrofilage.

Dans la seringue reliée à une aiguille métallique, une solution de polymère. La goutte qui bombe au bout de l'aiguille est chargée par la haute tension environnante. Lorsque la tension électrique est supérieure à la tension superficielle de la goutte, elle ne peut conserver sa forme et s'étire, attirée par le collecteur rotatif [110].

Les supports en mailles de filet sont souples, permettant l'adhésion et la prolifération des types cellulaires auxquels correspond ce microenvironnement mécanique. La technique est reproductible et la taille des pores formés est uniforme, cependant il faut trouver le bon équilibre entre mécanotransduction et signalisation purement biologique. En effet, dans l'étude de Neves et coll., le ratio entre le PCL et le chitosane influence l'activité cellulaire : l'augmentation de la quantité de PCL améliore les propriétés mécaniques au détriment de la vitalité cellulaire [102,111].

a.4.3. Les modèles *layer-by-layer*

La technique *layer-by-layer* (LbL) permet l'élaboration de films multicouches de (bio)polymères. Des couches de polymères successives sont appliquées les unes sur les autres et leur cohésion peut être basée sur des interactions électrostatiques avec un polymère chargé négativement et l'autre positivement, sur des interactions hydrophobes ou encore hydrogène entres autres (Figure 21).

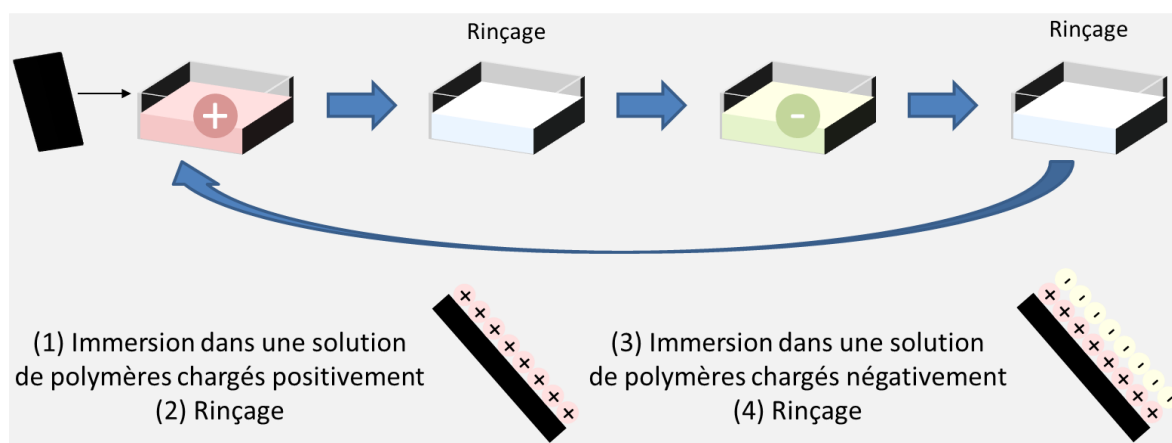


Figure 21 : Représentation schématique de la technique *layer by layer* (LbL).

Un support préalablement chargé négativement, est immergé dans une solution de polymères chargés positivement (rouge). Le polymère adhère à la surface en carbone due aux forces électrostatiques. Après rinçage (bleu), le support est à nouveau immergé dans une solution de polymères chargés cette fois-ci négativement (vert). Le processus peut être répété jusqu'à obtenir un film multicouche de l'épaisseur désirée.

Il s'agit d'une technique simple et reproductible où, là encore, le choix entre les (bio)polymères est important : il détermine l'adhésion et la prolifération cellulaire ainsi que la taille des sphéroïdes et leur temps de formation. De plus, il est possible de modifier les propriétés du film créé selon les polymères choisis et le nombre de couches appliquées [100,112].

a.4.4. Les hydrogels

Un hydrogel est formé par un réseau de (bio)polymères hydrophiles, capables d'absorber de grandes quantités d'eau (Figure 22). Cela leur confère une architecture semblable à celle retrouvée *in vivo* et permettant la mécanotransduction. Il est possible par le biais de la réticulation de définir leur temps de dégradation et d'affecter la prolifération cellulaire. Les hydrogels peuvent également servir de réservoir pour des protéines solubles ou des traitements. De plus, pour les plus souples d'entre eux, il est possible de les injecter directement dans les tissus hôtes, pour des applications d'ingénierie tissulaire par exemple [93,102,113–115].

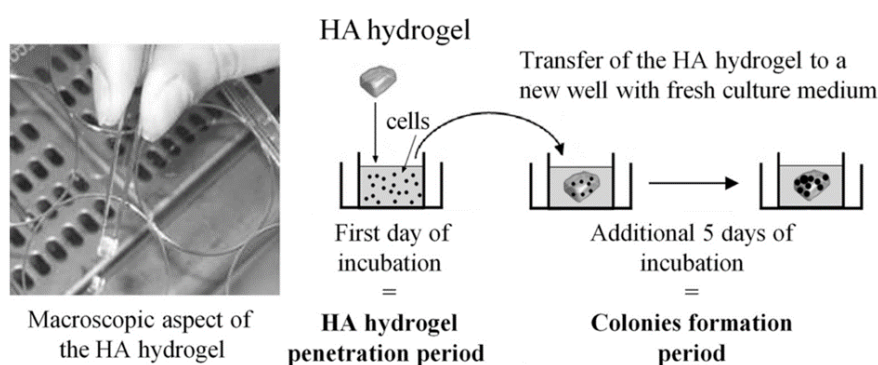


Figure 22 : Protocole schématisé de mise en culture au sein d'un hydrogel d'acide hyaluronique.

L'hydrogel est placé dans une suspension cellulaire. Après une période d'invasion, l'hydrogel est retiré et placé dans un autre puits avec du milieu de culture. D'après Simon et coll., *NeuroMolecular Medicine*, 2014 [116].

a.4.5. Les tissus décellularisés

L'utilisation de tissus décellularisés permet de reproduire la structure de tissus tels que le cartilage, la peau, le tendon ou l'os ainsi que celle de tissus plus complexes tels que le cœur, le rein ou les poumons. La décellularisation est le plus souvent réalisée par l'action chimique de détergents tels que l'acide désoxycholique, le dodécyl-sulfate de sodium ou encore le TritonTM X-100. Il s'agit de la méthode la moins délétère pour la conservation de la MEC du tissu d'intérêt. Sans cellules, le tissu n'est plus immunogène et conserve d'une part sa structure et ses propriétés natives – permettant l'adhésion, la différenciation et la prolifération cellulaire – et d'autre part sa vasculature ce qui rend possible une réimplantation *in vivo* (Figure 23) [102,117,118].

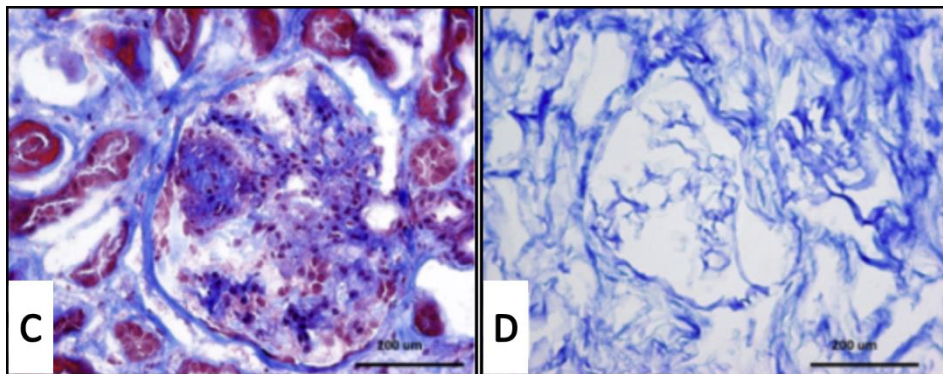


Figure 23 : Observation histologique de reins décellularisés.

Deux coupes de reins au niveau des glomérules marqués au trichrome de Masson. La coupe C est issue d'un rein natif où les cellules apparaissent en rouge et les fibres de collagène en bleu. Sur la coupe D, acellularisée, la coloration rouge est absente, témoignant de l'élimination complète des cellules du tissu. Barre d'échelle = 200 µm [117].

b. Les systèmes micro-fluidiques

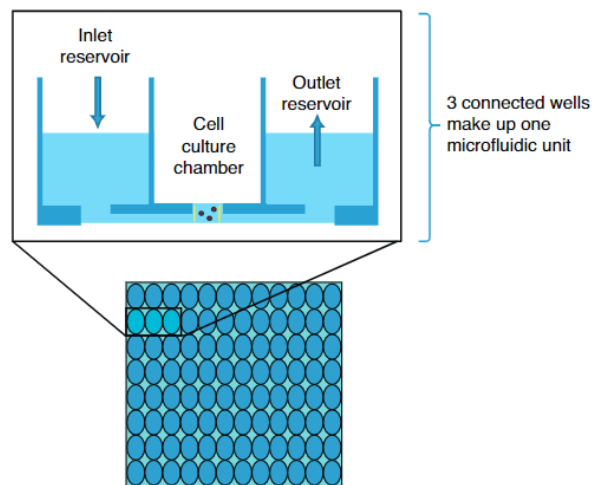


Figure 24 : Représentation schématique du système micro fluidique MiCAplate.

Les cellules sontensemencées dans la chambre de culture et du milieu de culture est placé dans les deux réservoirs de part et d'autre de la chambre. Le réservoir de remplissage (gauche) contient un volume plus important afin de créer un flux grâce à la gravité. Ce flux peut être maintenu du moment où le réservoir de remplissage continue d'être rempli et l'autre évacué. Figure issue du travail de Breslin et coll. Drug Discovery Today, 2012 [99].

La plupart de ces systèmes sont dédiés à la culture en 2D. Ici, une unité micro-fluidique est composée par trois puits : un puits de remplissage, un puits de culture et un puits d'évacuation. Un flux de milieu de culture est créé par un mécanisme passif (Figure 24) ou actif afin d'apporter les éléments nutritifs aux cellules et évacuer les déchets. Parmi les systèmes micro-fluidiques qui permettent la culture en 3D, un a été décrit par Toh et coll.. Dans ce système, une suspension cellulaire est placée dans le système micro-fluidique et, au niveau de la chambre de culture, les cellules restent bloquées ensemble ce qui permet leur interaction. Une fois passée, la suspension cellulaire est remplacée par une solution de collagène afin de figer les cellules à l'intérieur [119]. Cet outil permet de tester la sensibilité cellulaire aux agents médicamenteux et il est compatible avec les techniques d'imagerie. De plus, il est possible de reproduire les forces de tension auxquelles les cellules sont exposées *in vivo*, telle que la pression artérielle sur les cellules endothéliales, en plaçant une barrière entre les compartiments

[104]. Cependant, la récupération des sphéroïdes et, de fait, leur caractérisation est difficile [99]. Beaucoup de systèmes micro-fluidiques sont composés de polydiméthylsiloxane (PDMS) compte tenu de sa résistance à l'érosion, la pression et la température [120].

2. Génération de sphéroïdes en suspension

Cette catégorie regroupe les techniques dites du pellet, du flottement forcé, de la lévitation magnétique, de la goutte suspendue ainsi que les approches basées sur l'agitation. Le fait de former des sphéroïdes en suspension permet aux cellules d'évoluer au sein de leur propre MEC [121] et facilite la récupération cellulaire car il n'y a pas d'adhésion à un support quel qu'il soit.

a. La méthode du pellet ou *pellet culture*

Cette technique consiste à provoquer les interactions cellule-cellule au moyen de la centrifugation. Une suspension cellulaire est centrifugée à 500 g pendant dix minutes. Après élimination du surnageant, l'amas cellulaire obtenu, – le pellet, – est resuspendu dans un milieu de culture épaissi avec du méthylcellulose afin de conserver les interactions formées lors de la centrifugation et ainsi promouvoir la formation de sphéroïdes. Le pellet, dans son milieu, est alors déposé dans un support de culture 2D avec un revêtement spécifique au poly-2-hydroxyethyl methacrylate (poly-HEMA) (0,5 %) ou à l'agarose (1,5 %) pour empêcher l'adhésion au fond du support (Figure 25). Cette méthode est rapide et peu coûteuse mais laborieuse si la quantité d'échantillon voulue est importante. En effet, le milieu épaissi promouvant la formation des sphéroïdes doit être fraîchement préparé pour être utilisé [99–101,122].

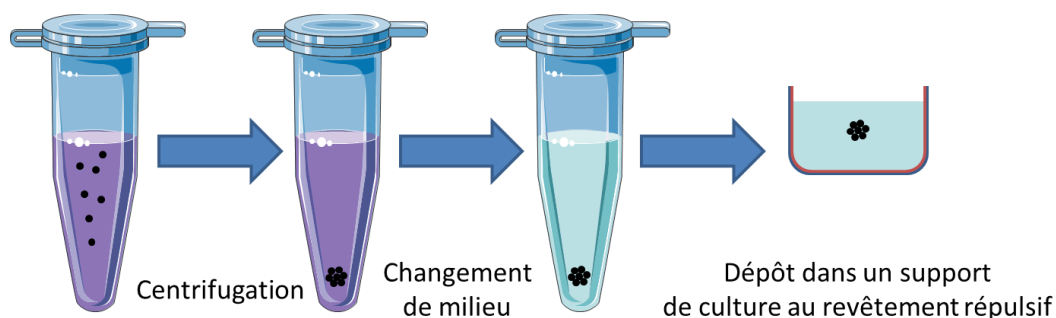


Figure 25 : Représentation schématique de la technique du pellet de culture.

Une suspension cellulaire est centrifugée de manière à réduire la distance entre les cellules et provoquer leur agrégation. Le surnageant est ensuite éliminé pour être remplacé par un milieu épaissi au méthylcellulose pour favoriser la formation des sphéroïdes. Le tout est placé dans un support de culture revêtu d'un antiadhésif (rouge).

b. Les méthodes de flottement forcé

Un des moyens pour amener les cellules à former des sphéroïdes est de les empêcher d'adhérer au support de culture. Cela est rendu possible grâce au traitement au poly-HEMA ou à l'agarose sur le fond de support de culture. Une étape de centrifugation force les cellules à interagir entre elles puis à former des sphéroïdes (Figure 26) [99].

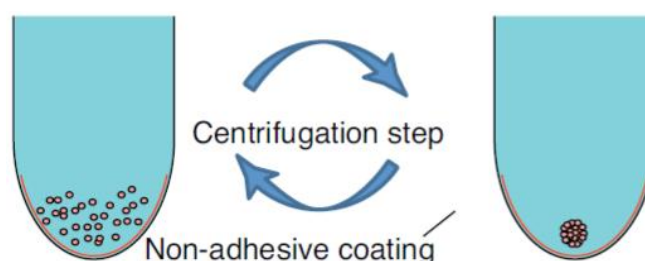


Figure 26 : Représentation schématique de la méthode de flottement forcé.

Le fond (rond ou conique) d'une plaque 96 puits est traité au poly-HEMA ou à l'agarose afin d'empêcher les cellules d'y adhérer. Une étape de centrifugation rassemble les cellules qui forment alors des sphéroïdes. Figure issue du travail de Breslin et coll. Drug Discovery Today, 2012 [99].

C'est une méthode simple, facile à mettre en place et peu coûteuse si l'expérimentateur réalise le traitement lui-même. Cependant, le protocole est laborieux du fait de la quantité de puits à traiter (pour des tests à grande échelle) mais aussi de la préparation des solutions. En effet, la dissolution du poly-HEMA dans l'éthanol prend plusieurs heures et l'ensemencement n'est possible qu'après trois jours de séchage. Néanmoins un accès aisé aux sphéroïdes formés

est possible, tout comme une culture sur le long terme (20 jours) [123]. De plus, les résultats obtenus sont généralement reproductibles [124].

c. La méthode de la lévitation magnétique

Des billes magnétiques sont placées dans une suspension cellulaire. Un aimant est placé au-dessus du support de culture afin de maintenir en suspension les cellules ayant incorporé les billes par endocytose. Les cellules qui lèvitent alors interagissent les unes avec les autres et forment des sphéroïdes (Figure 27). Cette technique est caractérisée par sa reproductibilité mais aussi par une réduction de la nécrose au cœur des sphéroïdes. En effet, du fait de la force de l'aimant, les sphéroïdes prennent une forme plutôt ovoïde qui permet une meilleure diffusion des nutriments et de l'oxygène jusqu'au centre. Cependant, l'attraction entraîne une redistribution de la masse de la cellule. Il a été montré que ces modifications peuvent conduire à l'apoptose des cellules [100,125].

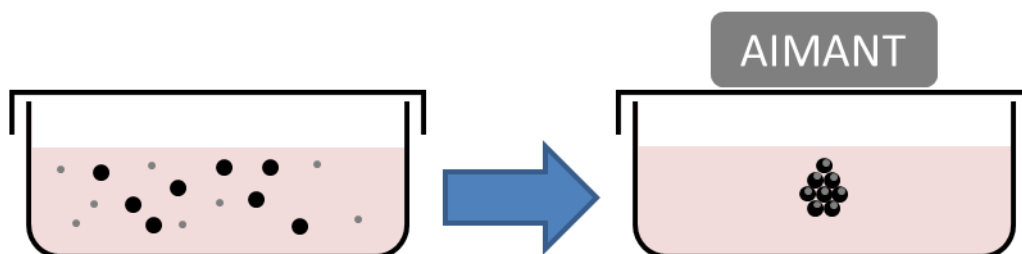


Figure 27 : Représentation schématique de la méthode de lévitation magnétique.

Les cellules (en noir) sont mises au contact de billes magnétiques (en gris). Une fois les billes incorporées, un aimant est placé au-dessus du support de culture afin d'attirer les cellules vers le haut et empêcher leur adhésion sur le fond. Les cellules forment alors des sphéroïdes.

d. La méthode de la goutte suspendue

Cette technique a été mise au point par Kelm et coll. mais dérive de la méthode utilisée par Harrison et coll. [1,126]. Elle repose sur une compétition entre la gravité et la tension superficielle ou de surface. Comme son nom l'indique, les cellules sont cultivées au sein d'une goutte de milieu de culture qui est suspendue. La goutte est déposée sur un support qui est

retourné après le dépôt. La création de cette interface liquide et solide consomme de l'énergie et génère des forces de tension, c'est pourquoi la goutte adopte une conformation sphérique qui correspond à l'état de plus basse énergie moléculaire : celui où les forces de cohésion pour garantir l'intégrité de la goutte sont les moins importantes. La goutte reste donc adhérente au support car la force de son poids est inférieure aux forces de tension superficielle. Du fait de la gravité, les cellules « sédimentent au fond » de la goutte sans pouvoir y adhérer et forment alors des sphéroïdes. Le plus souvent, 20 μ l d'une suspension cellulaire sont prélevés et placés dans une plaque de culture à 60 puits qui est ensuite retournée (Figure 28).

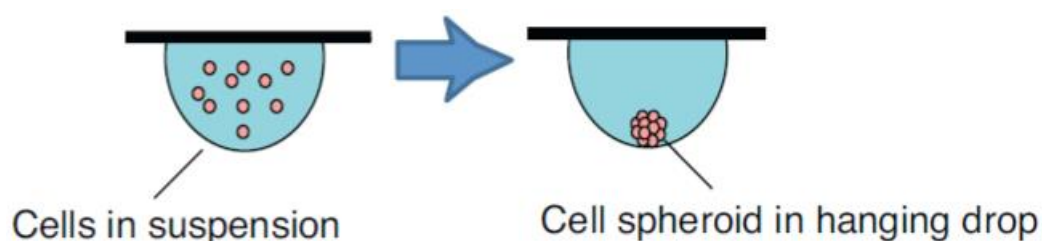


Figure 28 : Représentation schématique de la méthode de la goutte suspendue.

Une petite quantité de suspension cellulaire est placée sur une surface qui est ensuite retournée. Les cellules, attirées en bas par la gravité, vont se regrouper et former des sphéroïdes. Figure issue du travail de Breslin et coll. Drug Discovery Today, 2012 [99].

Cette technique présente des avantages et des inconvénients. D'un côté, elle est caractérisée par sa grande reproductibilité : un sphéroïde de taille identique par goutte. Simple et peu chère si l'utilisateur utilise une plaque de culture classique, elle permet elle aussi d'accéder facilement aux sphéroïdes formés. De plus, il s'agit d'une méthode qui se prête bien à l'automatisation de la réalisation et de la lecture. D'un autre côté, l'expérimentateur est limité par le volume de suspension cellulaire à utiliser qui rend le changement du milieu plus ardu que dans toute autre technique [99,127].

e. Les approches basées sur l'agitation

Avec cette méthode, la suspension cellulaire est placée dans une chambre rotative (agitation externe) ou dans une chambre avec un système d'agitation interne. Le mouvement empêche les cellules d'adhérer au fond ou aux parois de la chambre ce qui favorise l'interaction cellule-cellule et donc la formation de sphéroïdes. Selon que l'agitation est mise en place sur la chambre ou à l'intérieur, il est possible de distinguer deux sous-catégories :

e.1. L'agitation interne

Dans le cas de l'agitation interne (Figure 29a), le nombre de sphéroïdes formés dépend de la taille de la chambre utilisée. Cela permet une production importante de sphéroïdes qui sont facilement disponibles à l'utilisateur. De plus, l'agitation facilite le transport des nutriments ainsi que des déchets. Cependant, cette technique nécessite un appareil particulier, ne permet pas de contrôler la taille des sphéroïdes et, surtout, ne convient pas à tous les types cellulaires car elle expose les cellules à une contrainte de cisaillement due à l'agitation [99].

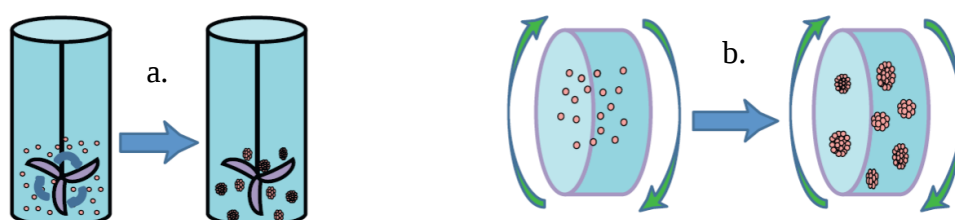


Figure 29 : Schéma représentant les techniques basées sur l'agitation.

Les cellules sont placées dans un appareil destiné à la culture qui, soit possède un système d'agitation interne (a), soit est lui-même rotatif (b). La rotation maintient les cellules en mouvement, elles ne peuvent pas adhérer à l'appareil de culture, et leur permet d'interagir et de générer des sphéroïdes. D'après Breslin et coll. Drug Discovery Today, 2012 [99].

e.2. L'agitation externe

La méthode de l'agitation externe (Figure 29b), c'est-à-dire directement appliquée à la chambre de culture, présente les mêmes avantages et inconvénients que la méthode précédente.

Néanmoins, il existe un appareil permettant de réduire la contrainte de cisaillement : le *Rotating Wall Vessel*. Il a été mis au point par la *National Aeronautics and Space Administration* (NASA) en 1992 et depuis, plusieurs auteurs dont Radtke et coll. ont ainsi montré la capacité des cellules à reproduire des réponses similaires (expression génique, sécrétion de cytokines) à celles retrouvées *in vivo* suite à un même stimuli [128–130]. Il existe deux types d'appareil, selon la source d'aération, le *high-aspect rotating vessel* (HARV) et le *slow-turning lateral vessel* (STLV). Pour le premier, la membrane en silicone permettant les échanges gazeux est plate (Figure 30A) alors que pour le second, elle est cylindrique et placée au centre de l'appareil (Figure 30B) [99,131,132].

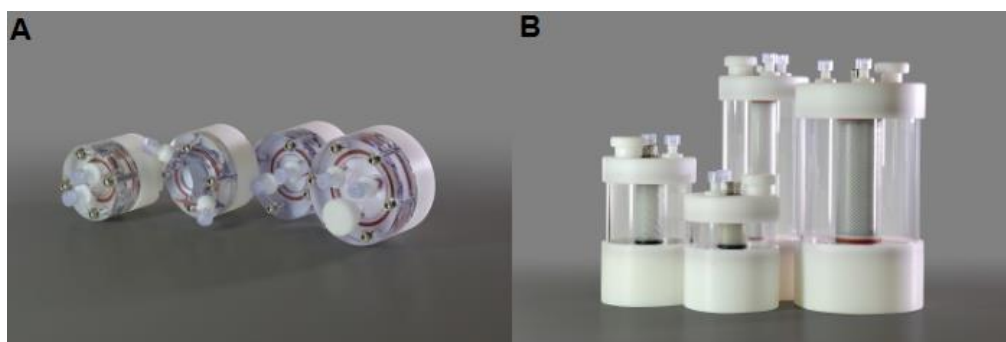


Figure 30 : Photographies des appareils à agitation externe.

Les appareils représentés sur la photographie de gauche (a) sont les *high-aspect rotating vessel* (HARV) et ceux de droite (b) les *slow-turning lateral vessel* (STLV). Les photographies sont issues du site du fournisseur SYNTHICON [131,132].

Kelm et coll. ont obtenu de meilleurs résultats en termes de rapidité de formation des sphéroïdes, de viabilité cellulaire et de taille des sphéroïdes avec la technique de la goutte suspendue comparée à la technique de flottement forcé à l'agarose et à l'utilisation de chambres de culture avec un système d'agitation intégré et ce, avec huit lignées de types cellulaires différents : hépatique, mammaire, colorectal, fibroblastique, prostatique, épithéliale ou cervical [126]. *A contrario*, Rungarunlert et coll. ont obtenu de meilleurs résultats avec le STLV qu'avec la technique de la goutte suspendue sur des cellules souches embryonnaires [133].

III. L'acide hyaluronique, un modèle de culture tumorale

Le *scaffold* idéal est caractérisé par sa biocompatibilité, sa biodégradabilité, son biomimétisme et sa non-immunogénicité. Il doit également permettre l'adhésion et la migration cellulaire en son sein de même que la prolifération [102]. Solide ou semi-solide, le *scaffold* est poreux afin de faciliter l'entrée des cellules tout comme la diffusion des nutriments et des déchets de consommation [103,104].

1. Généralités

Comme le chondroïtine sulfate et l'héparane sulfate, l'AH est sécrété de façon abondante par les cellules cancéreuses et les cellules stromales. Une densité élevée d'AH a été corrélée positivement à l'agressivité d'un cancer ; c'est le cas pour le cancer de l'ovaire, du poumon, de la prostate et du sein. Pléiotrope, les fonctions de l'AH sont finement régulées par la taille du GAG qui est définie, non seulement par l'enzyme de synthèse mais, par l'enzyme de dégradation utilisée. En effet, chaque enzyme génère des peptides de différentes tailles répartis en deux catégories : les peptides de petites tailles, pro-tumoraux, et les peptides de grandes tailles. L'accumulation de AH dans les MEC et la forte activité des hyaluronidases conduisent également à une accumulation de petits peptides d'AH, eux aussi, associés positivement à l'agressivité d'un cancer [88].

a. Acide hyaluronique et cellules endothéliales

Les petits peptides d'HA de seize unités disaccharidiques peuvent induire l'angiogenèse par plusieurs voies de signalisation. Seuls ou avec un facteur de croissance, ils stimulent alors la migration, la prolifération et la formation de capillaires par les cellules endothéliales [88].

b. Acide hyaluronique et macrophages associés au cancer

Il existe deux sous-populations de macrophages : les macrophages M1 qui défendent l'hôte contre les micro-organismes et les M2, pro-tumoraux. Les petits peptides d'AH activent également les TAM en induisant leur différenciation vers le groupe M2. Une fois activés, les TAM sécrètent des facteurs pro-angiogéniques mais également anti-inflammatoires afin de supprimer les réponses immunitaires sur le site tumoral [88].

c. Acide hyaluronique et fibroblastes associés au cancer

L'AH facilite le recrutement des TAF par les cellules cancéreuses de deux façons. Premièrement, le haut niveau d'hydratation apporté par la présence de GAG et notamment de l'AH favorise la pénétration du site tumoral par les TAF. Deuxièmement, la liaison des TAF à l'AH *via* le CD44 promeut leur invasion [88].

2. L'hydrogel d'acide hyaluronique, notre modèle d'étude

Les supports de culture 3D reproduisent les propriétés de la MEC d'un tissu donné. Comme nous l'avons vu précédemment, parmi les supports 3D, l'hydrogel possède une grande capacité d'hydratation idéale pour la diffusion, l'invasion et la mécanotransduction. Lorsqu'il est constitué de protéines matricielles, il permet une meilleure adhésion et signalisation cellulaire. Il est également aisé d'en modifier la structure, de l'enrichir de facteurs solubles ou même de traitements d'intérêt. Il s'agit du modèle qui a été choisi pour la réalisation de ces travaux de thèse.

L'élaboration de supports 3D à partir de composants matriciels permet d'améliorer l'adhésion, la prolifération ainsi que la différenciation cellulaire. Notre choix s'est porté sur l'AH, l'un des principaux GAG constituants de la MEC où il joue un rôle à la fois structurel et

dans la signalisation. Il promeut l'adhésion, la différenciation, la migration, ou encore la prolifération cellulaire. Comme nous l'avons vu plus haut, ces fonctions biologiques sont également en faveur des cellules cancéreuses c'est pourquoi les supports d'AH sont adaptés à la culture de saines comme tumorales [114].

Par ailleurs, notre support permet une analyse tout au long de la culture 3D ainsi qu'après car les cellules peuvent être récupérées et soumises à d'autres expérimentations. Il a été utilisé comme modèle d'étude de l'invasion et de la migration cellulaire ainsi que de l'évaluation de traitements anti-cancéreux. Dans ces multiples études, plusieurs types cellulaires ont été cultivés, notamment des cellules cancéreuses de différents types (cérébrales, colorectales ou mammaires), des cellules endothéliales et des CSH [20,113–116,134,135].

IV. La génipine

Les cellules sont sensibles à la rigidité du support sur lequel ou au sein duquel elles sont cultivées [82]. Il est possible d'augmenter la rigidité d'un support par l'intermédiaire de la réticulation. Il existe de multiples agents réticulants notamment ceux appartenant à la famille des aldéhydes ou encore les carbodiimides [1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC)]. Celui que nous avons choisi est la génipine (GnP), biosourcée et reconnue pour être biocompatible [136,137]

La GnP est un aglycone – le groupement non-glucidique d'un hétéroside – obtenu par l'hydrolyse des liaisons glycosidiques du geniposide, extrait du fruit de la plante *Gardenia jasminoides Ellis* de la famille des *Rubiaceae* (Figure 31) [136,138].

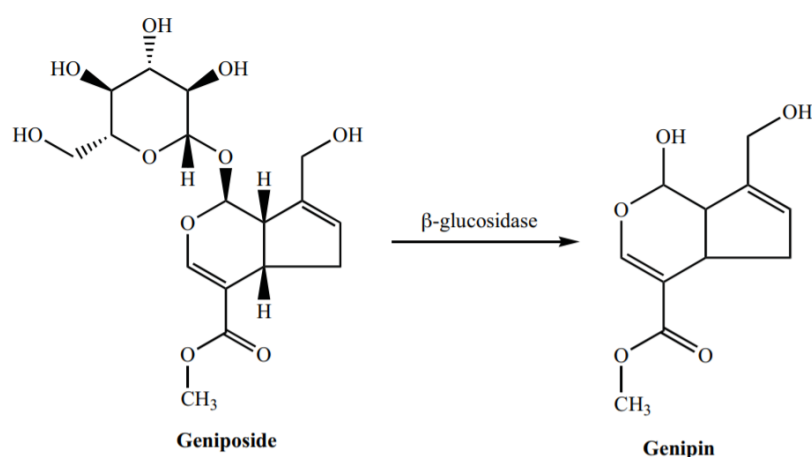


Figure 31 : Obtention de la génipine par la β glucosidase.

La génipine obtenue par l'hydrolyse des liaisons glycosiques du géniposide par la β -glycosidase. Les détails du protocole d'extraction et de production de la GnP sont décrits dans les travaux de Manickam et coll. *Current Drug Delivery*, 2014 [136].

La GnP fait partie de la pharmacopée de la médecine traditionnelle chinoise du fait de ses propriétés multiples : anti-angiogénique, anti-inflammatoire, antihypertensive, anti-oxydante, antipyrétique et de son rôle dans le traitement d'affections hépatiques. Ses pigments bleus sont également utilisés pour la coloration de produits alimentaires ou encore dans l'art du tatouage [139–141]. Plus récemment, le rôle de la GnP dans le traitement du cancer a été illustré dans différents études recensées dans les travaux de Shanmugam et coll. [138]. D'un côté, la GnP inhibe (i) l'expression de l'*uncoupling protein 2* (UCP2) une protéine impliquée dans la survie des cellules cancéreuses et souvent surexprimée dans ce cas précis et (ii) la voie de signalisation *Sonic Hedgehog* impliquée dans l'angiogenèse, la migration et la prolifération des cellules cancéreuses. D'un autre côté, la GnP (i) active l'expression de protéines pro-apoptotiques ou promotrices de l'apoptose telles que *Bax* et *Bak* et (ii) régule positivement la protéine *sirtuin 3* impliquée dans l'autophagie [138,142–144].

La GnP a également un intérêt biomécanique, elle permet la réticulation covalente de polymères naturels comme synthétiques par l'intermédiaire de ses deux sites de fixation aux groupements amines primaires (NH_2). Elle permet ainsi la formation de nombreux types de

supports 3D de l'échelle macroscopique à nanoscopique. La GnP est naturellement biocompatible et biodégradable. Elle permet de réticuler des tissus avec la même efficacité que l'amidon dialdéhyde, le glutaraldéhyde, le formaldéhyde ou les composés époxy (éther diglycidyle d'éthylène glycol) qui sont les agents réticulants les plus connus et ce sans conditions de pH ou de température particulières et tout en étant 5 000 à 10 000 fois moins cytotoxique. De plus, la GnP réticule de façon plus efficace que l'EDC, un agent réticulant non-cytotoxique sous forme réticulée [145]. Néanmoins, pour un même degré de fixation, le temps de réticulation à la GnP est plus long qu'avec les autres agents réticulants tout comme sa dégradation. De plus, en fixant les groupement NH_2 libres, la GnP améliore la biocompatibilité des polymères qu'elle réticule. En effet, la réduction du nombre de groupements NH_2 libres d'un tissu diminue son immunogénicité [136,137,146–148].

Les applications de la GnP sont variées, allant de la recherche fondamentale à l'application biomédicale notamment au travers de dispositifs à libération prolongée de produits pharmaceutiques ou encore d'implants oculaires [136,149].

OBJECTIFS

La culture 3D permet à l'expérimentateur de reproduire des conditions plus physiologiques que la culture 2D. L'hydrogel d'AH natif, est le modèle de culture de référence de ce travail. Dans les différentes études antérieures où il a été utilisé comparativement à la culture 2D, il a été observé une meilleure prolifération cellulaire et une sensibilité diminuée aux traitements anti-cancéreux [96,113–115,135]. L'invasion cellulaire a également été mesurée au sein d'hydrogels natifs et fonctionnalisés par des éléments de la MEC et s'est révélée supérieure ou égale dans les hydrogels fonctionnalisés [20,115].

Aucune de ces modifications n'avaient d'incidence sur la rigidité du support. Or, l'impact de la dureté du support sur l'activité biologique est désormais connu [77]. L'objectif de ce travail de thèse a été de caractériser les propriétés d'hydrogels d'acide hyaluronique réticulés à la GnP de façon modulable puis de tester leurs propriétés biologiques.

I. Caractérisation du modèle

L'impact de la réticulation a été évalué sur les propriétés d'une part physico-chimiques, par des techniques biochimiques, calorimétrique, microscopique ainsi que par l'évaluation du gonflement ou *swelling ratio*, et d'autres part sur les propriétés biologiques grâce à des tests de la prolifération et de la viabilité.

Concernant l'aspect biologique, les cellules CB74 – une lignée humaine cancéreuse de cellules gliales – ont principalement été utilisées pour l'étude compte tenu de leur haute capacité à coloniser l'hydrogel d'acide hyaluronique et de leur facilité de culture. L'invasion de l'hydrogel par ces cellules s'explique par l'existence d'un des récepteurs principaux à l'AH à leur membrane cellulaire, le CD44 [20]. De plus, il a été montré que la GnP peut induire

l'apoptose de plusieurs autres lignées humaines de glioblastomes, par conséquent, il est tout à fait approprié d'évaluer l'impact de la GnP sur la culture de ces cellules [144].

II. Les cellules souches hématopoïétiques

Les CSH rassemblent plusieurs caractères qui concourent à en faire des candidats de culture intéressants. Le CD44 est également retrouvé au niveau de la membrane des CSH et permet l'invasion du modèle de culture [150]. L'augmentation de la prolifération implique une invasion préalable de support de culture. De plus, la niche des CSH, le microenvironnement optimal pour leur prolifération et leur survie, est située dans la moelle osseuse, dans des conditions de rigidité plus importantes que celles offertes par notre modèle natif [77]. Il pourrait donc y avoir un impact de la rigidification de l'hydrogel sur l'activité cellulaire des CSH. Afin de répondre à cette interrogation, la culture des CSH au sein de notre modèle de culture réticulé a été réalisée.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Synthèse des hydrogels d'acide hyaluronique

Toutes les étapes conférant les propriétés spécifiques à l'hydrogel d'AH utilisé en culture cellulaire sont décrites dans deux brevets européens : « *Improved Crosslinked Hyaluronan Hydrogels for 3D Cell Culture* » EP10305666.9 du 22 juin 2010 et « *Method for Harvesting Cells Cultured in 3D Hydrogel Matrices* » EP 10305667.7 du 22 juin 2010 [151,152]. Les hydrogels d'AH sont synthétisés sous forme de feuilles de 10 × 15 cm environ, au laboratoire "Polymères, Biopolymères Surfaces" (UMR 6270, Université de Rouen) et sont reçus lyophilisés. Avant d'être utilisés en culture cellulaire, des cubes de taille 2,5 × 2,5 × 0,5 mm sont découpés, stérilisés dans un bain d'éthanol à 70 % puis réhydratés avec du milieu de culture [Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640)] contenant des antibiotiques [1 %, pénicilline (50 000 U/L) et streptomycine (50 mg/L)] dans une étuve à 37 °C, à atmosphère humide et 5 % de CO₂. Lors de la réhydratation, des bulles d'air peuvent rester piégées dans les mailles de l'hydrogel. Pour les éliminer, les hydrogels sont placés sous une cloche à vide pendant 1 heure puis remis à l'étuve. Les hydrogels sont prêts à être utilisés une fois que toutes les bulles sont évacuées.

II. Traitement et réticulation des hydrogels

La GnP (FUJIFILM Wako[®]) est utilisée pour renforcer mécaniquement les hydrogels. Elle permet de réticuler l'hydrogel grâce à ses deux sites de fixation qui reconnaissent les groupements amines primaires (NH₂) [147].

1. Traitement des hydrogels

Avant la réticulation, pour permettre une fixation optimale, les hydrogels sont traités à la poly-L-lysine (PLL) riche de groupements NH_2 . Pensant promouvoir la prolifération cellulaire, nous avons testé deux autres traitements avec des protéines de la MEC : les collagènes de type III et IV.

Les hydrogels sont d'abord rincés pendant 30 minutes dans du tampon phosphate salin (PBS, *phosphate buffered saline*).

a. Traitement à la poly-L-lysine

La PLL (P6282, Sigma Aldrich®) est solubilisée à 1 mg/mL dans un tampon Tris/NaCl préparé au préalable à 10 mM et 150 mM respectivement dans de l'eau stérile. Après stérilisation par filtration, les hydrogels y sont immergés 15 minutes à température ambiante. Les hydrogels témoins sont placés dans un bain de tampon Tris/NaCl pendant 15 minutes pour les faire passer par les mêmes étapes que les autres hydrogels.

b. Traitement aux collagènes de type III et IV

Les collagènes [collagène de type III (C4407, Sigma Aldrich®) et IV (C7521, Sigma Aldrich®)] sont solubilisés chacun à 0,6 % dans du PBS 1X à 4 °C. Les solutions obtenues sont stérilisées par filtration et le traitement des hydrogels se fait pendant 24 heures à 4 °C. Les hydrogels témoins sont placés dans du PBS 1X pendant 24 heures à 4 °C.

2. Réticulation des hydrogels

Après le traitement, les hydrogels sont rincés rapidement une première fois dans le solvant qui a servi au traitement puis une deuxième fois dans du PBS 1X. Ils sont ensuite immergés pendant 30 minutes dans du PBS 1X. La GnP est solubilisée à 10 mg/mL (44 mM) dans du

PBS 1X à 37 °C. Cette solution mère, nommée GnP100, est diluée pour créer les concentrations suivantes : GnP1, GnP5, GnP10, GnP25, GnP50, GnP75 respectivement 0,44 mM, 2,2 mM, 4,4 mM, 11 mM, 22 mM et 33 mM. La réticulation se fait pendant 16 heures, à température ambiante, dans l'obscurité et en atmosphère humide.

Une fois la réticulation terminée, les hydrogels sont rincés dans du PBS 1X, une première fois rapidement, une seconde fois 10 minutes puis ils sont ensuite individualisés dans une plaque 96 puits dans 100 μ L de PBS 1X en attendant d'être utilisés (Figure 32).

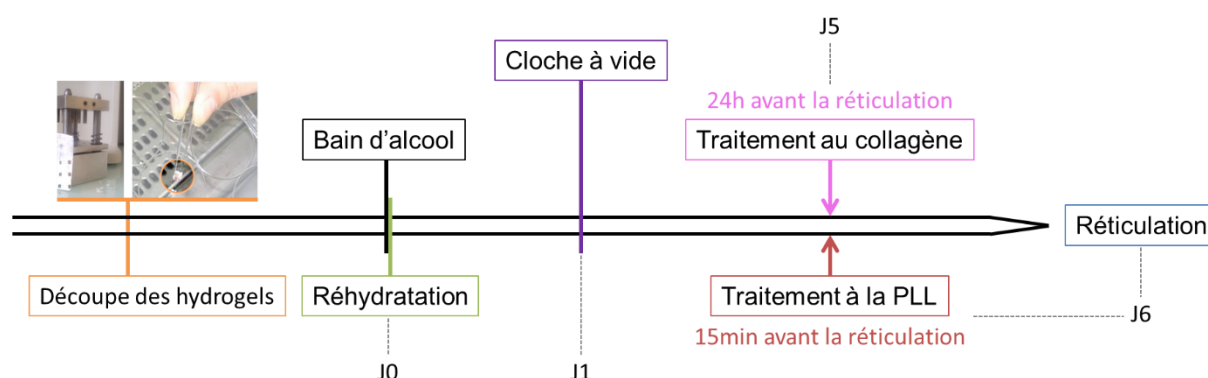


Figure 32 : Protocole expérimental de traitement et réticulation.

Les hydrogels, lyophilisés, reçus sous forme de feuilles, sont découpés en cubes grâce à un emporte-pièce (orange), stérilisés à l'alcool (noir) et réhydratés (vert). Ils sont ensuite traités à la PLL (rouge), au collagène (rose). À chaque fois, les hydrogels témoins sont placés dans les mêmes solvants, pour la même durée, mais sans la biomolécule d'intérêt. Les hydrogels sont ensuite réticulés à la GnP (bleu).

III. Caractérisation des hydrogels

1. Définition du degré de réticulation : test à la ninhydrine

Le test à la ninhydrine permet d'évaluer le degré de réticulation des hydrogels après l'utilisation de la GnP. Tout comme la GnP, la ninhydrine reconnaît également les groupements NH_2 . Se faisant, elle prend une coloration violette qui peut être quantifiée au spectrophotomètre. L'absorbance obtenue est inversement proportionnelle au degré de réticulation : plus l'hydrogel est réticulé, plus la GnP a fixé de groupements NH_2 et moins il y en a de libres pour la

ninhydrine. Pour préparer le dosage à la ninhydrine, du chlorure stanneux et un tampon acétate sont nécessaires [153]. Le chlorure stanneux est dissout dans de l'éthylène glycol (100 mg/mL) et le tampon d'acétate est préparé en mélangeant 54,4 g d'acétate de sodium dans 100 mL d'acide acétique puis en ajustant le volume total à 500 mL avec de l'eau Milli-Q®. La solution de ninhydrine est fraîchement préparée avant chaque expérimentation en dissolvant 0,2 g de ninhydrine (N4876, Sigma Aldrich®) dans 7,5 mL d'éthylène glycol et 2,5 mL de tampon acétate. Ensuite, 250 µL de solution de chlorure stanneux sont ajoutés en mélangeant jusqu'à ce que la solution devienne rouge pâle. Les hydrogels sont individualisés dans une plaque 96 puits en polycarbonate (655201, Greiner Bio-One®) et immergés dans 100 µL de la solution finale. La plaque ainsi obtenue est placée au four pendant 10 minutes à 100 °C. Les hydrogels sont ensuite retirés et l'absorbance est lue à 595 nm en utilisant le lecteur PowerWaveX™ (Bio Tek Instrument®) et le logiciel KC4™.

2. Étude de la résistance à la dégradation enzymatique : test du carbazole

L'un des avantages de notre hydrogel est qu'il permet la récupération des cellules qui sont cultivées en son sein après digestion enzymatique. Si la réticulation à la GnP permet de renforcer et de maintenir la structure de l'hydrogel, il a été montré dans la littérature qu'elle réduit la dégradation du support réticulé [136]. La résistance à la dégradation enzymatique est mesurée afin d'évaluer la capacité de récupération du contenu cellulaire des hydrogels.

Lors de la digestion de l'AH par la hyaluronidase, de l'acide glucuronique est libéré. Le carbazole est un composé aromatique qui permet précisément de quantifier les acides uroniques. Son utilisation rend possible une évaluation quantitative de la dégradation des hydrogels. Les hydrogels sont donc soumis à une dégradation enzymatique par l'intermédiaire de la hyaluronidase (H3448, Sigma Aldrich®). L'enzyme est préparée dans du PBS à pH 5

(5000 UI/750 μ L pour un hydrogel) et la solution obtenue est chauffée pendant 10 minutes à 37 °C avant d'être utilisée. Les hydrogels sont disposés séparément dans une plaque 48 puits et la dégradation se déroule sur 4 heures à 37 °C avec une agitation constante. Chaque heure, après homogénéisation, 25 μ L de surnageant sont prélevés dans chaque puits pour le test et déposés dans une plaque 96 puits en polycarbonate. Le protocole de ce test est décrit dans la littérature par Volpi et coll. [154]. Deux solutions sont préparées en amont : i) la solution A avec 0,95 g de tétraborate de sodium (229946, Sigma Aldrich®) dissous dans de l'eau chaude (2 mL) puis de l'acide sulfurique froid (98 mL) ; ii) la solution B avec 125 mg de carbazole (C5132, Sigma Aldrich®) dans 100 mL d'éthanol absolu. Aux 25 μ L prélevés précédemment, sont ajoutés 150 μ L de solution A et le tout est placé au four, à 100 °C, pendant 10 minutes. La plaque est ensuite placée au réfrigérateur à 4 °C pendant quelques minutes. Ensuite, 5 μ L de la solution B sont ajoutés et les échantillons sont à nouveau chauffés puis refroidis de la même manière avant lecture de l'absorbance à 525 nm en utilisant le lecteur PowerWaveX™ (Bio Tek Instrument®) et le logiciel KC4™.

3. Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique ou *atomic force microscopy* (AFM) est une technique fondamentale de l'analyse des surfaces, très sensible et non destructrice qui peut être utilisée sur tous types d'échantillons : aqueux, sous vide et à différentes températures. Elle repose sur l'interaction d'une sonde (pointe) extrêmement fine, de géométrie variable (sphérique, conique ou pyramidale) avec d'une surface d'intérêt. Cette interaction dépend (i) de la distance entre la sonde et la surface d'intérêt et (ii) de leur nature physicochimique. À l'approche de la sonde, les forces d'interactions avec la surface de l'échantillon provoquent la déflexion du bras de

levier auquel elle est reliée, lui-même réfléchissant un faisceau laser. C'est la déflexion du faisceau qui renseigne alors sur la qualité de la surface de l'échantillon. (Figure 33) [155].

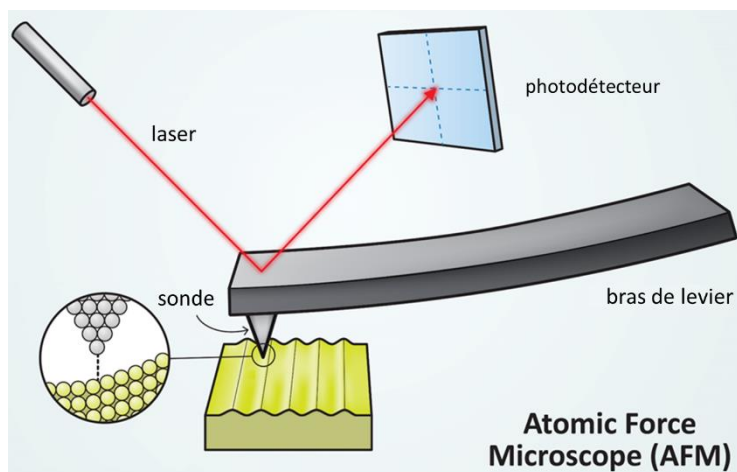


Figure 33 : Principe de la microscopie à force atomique.

Les modifications à la surface de l'échantillon sont captées par une sonde effilée et reliée à un bras de levier sur lequel est réfléchi une lumière émise par un laser. Les changements de position de la réflexion du laser sont détectés par un capteur photosensible et permettent d'avoir une représentation topographique précise de la surface de l'échantillon. D'après l'illustration issue du National Informal Stem Education Network [156].

Les mesures du module d'élasticité – Module d'Young – sont effectuées par nano-indentation AFM grâce au Pico SPM AFM de Molecular Imaging (Scientec®) en conditions liquides (PBS) pour maintenir les hydrogels dans leur état hydraté. Nous avons utilisé des pointes coniques montées sur des bras de levier ayant une constante de rappel nominale élevée de $3,5 \text{ N.m}^{-1}$. Cela permet de sonder la rigidité globale des hydrogels permettant ainsi d'obtenir le module d'élasticité, dérivé des courbes force-déplacement en utilisant le modèle Sneddon fourni par le logiciel SPIP™ (Scanning Probe Image Processor).

4. Microscopie électronique à balayage

Les hydrogels doivent être déshydratés avant d'être analysés au microscope électronique à balayage (MEB). Dans ce but, nous avons utilisé des concentrations croissantes d'alcool (Tableau 3).

Tableau 3 : Protocole de déshydratation des hydrogels.

Concentration en éthanol	70%	80%	90%	95%	100%	100%
Temps d'exposition	15 minutes	15 minutes	15 minutes	15 minutes	15 minutes	1 heure

Malheureusement cette technique conduit à un rétrécissement majeur des hydrogels ne permettant pas le maintien de leur architecture tridimensionnelle d'origine. Nous avons donc choisi de lyophiliser les hydrogels (Christ LYO cube 4-8, Bioblock®). Les échantillons peuvent être stockés à -80 °C ou utilisés directement après une étape de métallisation, ici, à l'or (JFC 1300 Autofine coater®). En effet, les échantillons biologiques doivent être rendus conducteurs pour pouvoir être imagés au MEB (JEOL® scanning electron microscope Neoscope JCM 5000™).

5. Propriétés thermiques

La stabilité thermique des hydrogels est déterminée pour chacune des conditions grâce à la calorimétrie différentielle à balayage ou *differential scanning calorimetry* (DSC, Setaram® DSC92). Les hydrogels sont lyophilisés pour s'affranchir de la perte en eau au cours du chauffage. Les échantillons sont placés dans des creusets en aluminium puis scellés et un autre creuset sans échantillon est utilisé comme témoin. L'intervalle de température étudié était compris entre 30 °C et 450 °C et la vitesse de balayage fixée à 10 °C/min.

6. Gonflement ou *swelling ratio*

Le taux de gonflement ou *swelling ratio* (SR) des hydrogels est évaluée à partir de l'équation suivante :

$$SR = (W_s - W_d)/W_d \times 100 \%$$

où W_s correspond au poids d'un hydrogel hydraté et W_d au poids d'un hydrogel sec. Les hydrogels sont pesés (i) directement après la lyophilisation et (ii) suite à une immersion de

48 heures dans de l'eau stérile. Avant la pesée, l'excédent d'eau contenu dans les hydrogels est éliminé par contact avec du papier filtre. Lors de l'évaluation, l'eau contenue dans les hydrogels peut s'évaporer. Les mesures sont donc réalisées en *triplicata* pour chaque échantillon.

IV. Culture

Afin d'évaluer les effets des différents traitements des hydrogels et de leur réticulation par la génipine sur les propriétés cellulaires, nous avons utilisé plusieurs lignées.

1. Lignées CB74, CB109 et CB191

Il s'agit de lignées cellulaires issues d'un glioblastome multiforme humain. L'obtention de la tumeur originelle et la création de ces lignées sont décrites par Chauzy et coll [157]. Les cellules sont cultivées dans une atmosphère humide à 37 °C et 5 % de CO₂ dans du RPMI 1640 supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 0,1 % d'antibiotiques.

2. Lignée HMEC-1

La lignée HMEC-1 (*Human microvascular endothelial cells*) est une lignée de cellules endothéliales de micro-vaisseaux humains cultivée dans les mêmes conditions que les lignées de glioblastomes mais dans un milieu de culture MCDB 131 supplémenté avec 15 % de SVF, 0,001 % soit 10 µg/L d'*epidermal growth factor* (EGF) et 0,1 % d'antibiotiques.

3. Lignée MDA-MB-231

La lignée MDA-MB-231 est une lignée de cellules cancéreuses mammaires issues d'une métastase pleurale et cultivées dans les mêmes conditions que les cellules de glioblastomes.

4. Culture primaire

Recueillies dans la moelle osseuse, les CSH sont également présentes dans le sang du cordon ombilical. Considéré comme un déchet opératoire, le cordon ombilical est facilement obtenu et le prélèvement y est aisé. Avec le consentement éclairé des mères, plusieurs échantillons de sangs de cordons ombilicaux sont recueillis. Ils sont dilués de moitié dans une solution saline de Hanks puis déposés sur une solution permettant de séparer les cellules mononuclées (CMN ; lymphocytes, monocytes et leurs précurseurs) du plasma et des globules rouges par centrifugation (Figure 34).

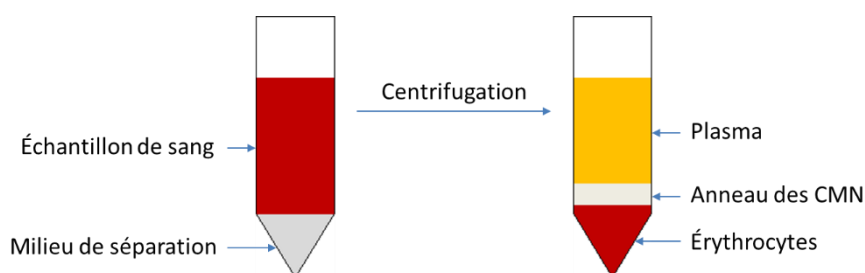


Figure 34 : Représentation d'une séparation par gradient de densité.

Afin d'isoler les cellules mononuclées (CMN) présentes dans l'échantillon, le sang de cordon préalablement dilué est déposé délicatement sur 15 mL de milieu de séparation des lymphocytes à base de Ficoll® 400 (Eurobio®) puis le tout est placé à centrifuger.

Après 35 minutes de centrifugation à 1500 tr/min, l'anneau des CMN est prélevé et lavé plusieurs fois dans du Hanks. Les échantillons sont congelés dans un milieu cryoprotecteur composé de Hanks supplémenté avec 20 % de SVF et 20 % de diméthylsulfoxyde (DMSO) à -80 °C. Le protocole de décongélation est indiqué sur la figure suivante (Tableau 4) :

Tableau 4 : Protocole de décongélation des cellules mononuclées.

Ajouter aux temps :	Hank's + 20 % SVF (à 37 °C)
0 minute	0,1 mL
1 minute	0,1 mL
2 minutes	0,2 mL
3 minutes	0,2 mL
4 minutes	0,4 mL
5 minutes	0,5 mL
6 minutes	0,5 mL
7 minutes	1 mL
8 minutes	1 mL

Un jour avant l'ensemencement, les hydrogels sont placés dans du RPMI 1640 supplémenté avec 100 ng/mL de *stromal cell-derived factor 1α* [SDF-1α (350-NS-050, R&DSYSTEMS®)], une cytokine facilitant la pénétration des progéniteurs hématopoïétiques à l'intérieur.

5. Culture 3D

Pour les lignées CB74, CB109, CB191 et HMEC-1, les cellules sont décollées des flasques de culture avec de la trypsine et comptées avec le Z1 Coulter® Particle Counter. Les hydrogels sont individualisés dans des plaques 12 puits et immergés dans 2 mL de milieu de culture supplémenté (milieu identique à celui utilisé pour la culture 2D) avec une densité cellulaire de 1 million de cellules/2 mL. En ce qui concerne les CMN, 50 000 cellules sont cultivées dans 2 mL de milieu StemSpan™ Serum-Free Expansion Medium (SFEM, #09600, STEMCELL Technologies™) supplémenté avec 50 ng/mL de *stem cell factor* (SCF [255-SC-050, R&DSYSTEMS®]), 0,75 µM de *StemRegenin 1* (SR1 [#72342, STEMCELL Technologies™]) et 0,1 % d'antibiotiques. Lorsque le temps de culture est supérieur à une semaine, la moitié du milieu est renouvelée tous les 7 jours. Nos premiers résultats avec les CMN, peu concluants, nous ont poussé à supplémenter notre milieu avec le *StemSpan*™

CD34+ Expansion Supplement, un mélange de plusieurs cytokines permettant de promouvoir l'expansion des CMN (#02691, STEMCELL Technologies™).

6. Co-culture CB74 et HMEC-1

Contrairement aux autres expérimentations, la co-culture des cellules des lignées CB74 et HMEC-1 est réalisée au sein d'hydrogels BIOMIMESYS® Brain composés d'AH et de collagène de type IV selon deux protocoles : (i) l'ensemencement des deux lignées est (i) simultané pour une culture de 7 jours et (ii) séquentiel pour 14 jours de culture. Dans le dernier cas les cellules endothéliales sont ensemencées en premier puis cultivées pendant 7 jours avant d'ensemencer les cellules de glioblastomes pour 7 jours supplémentaires. Ces hydrogels sont synthétisés selon un protocole breveté plus standardisé qui permet d'obtenir des hydrogels identiques et donc une meilleure reproductibilité des résultats. Les cellules sont cultivées dans le milieu RPMI 1640 supplémenté comme décrit précédemment et dans des conditions similaires. Avant la mise en culture, les cellules CB74 sont marquées avec le traceur fluorescent *Qtracker™ 565 Cell Labeling Kit* (Q25031MP, Thermo Fisher Scientific®) et avant l'observation au microscope à épifluorescence (Zeiss® Axio Scope A1) les cellules totales sont marquées au 4',6-diamidino-2-phénylindole [DAPI (D9542, Sigma Aldrich®)] après perméabilisation au tampon de lyse (0,3 % de Triton™ X-100).

V. Étude de la viabilité et de la prolifération cellulaires

1. Test au *LIVE/DEAD*®

Au terme de la culture en 3D, un test permettant d'observer l'organisation cellulaire au sein des hydrogels est réalisé. Il s'agit du *LIVE/DEAD*® (R37601, Thermo Fisher Scientific®), un marquage qui permet de distinguer les cellules vivantes des cellules mortes. Les réactifs A

et B sont mélangés comme décrit dans le protocole fourni par le fournisseur et 20 μL de la solution finale sont ajoutés aux hydrogels, préalablement déposés dans une plaque 96 puits, afin de les submerger. L'incubation se fait pendant 15 minutes et les hydrogels sont ensuite rincés rapidement au PBS 1X, 3 fois. Dès lors, il est possible de visualiser le marquage ou de fixer les hydrogels pour une observation plus tardive. Dans ce cas, une solution de paraformaldéhyde à 4 % est utilisée. Les hydrogels y sont immergés pendant 45 minutes puis rincés rapidement 3 fois au PBS 1X et conservés à 4 °C dans l'obscurité. Le microscope Leica® DMI 6000B est utilisé pour l'observation.

2. Test au *Cell Counting kit-8*®

La viabilité est déterminée avec le *Cell Counting kit-8* (96992, Sigma Aldrich®). Les hydrogels sont placés individuellement dans une plaque 96 puits avec 100 μL de milieu de culture supplémenté et 10 μL de réactif. L'absorbance est lue après 1, 2 et 4 heures d'incubation ; les hydrogels sont retirés pour chaque lecture. La prolifération est évaluée en mesurant la viabilité à différents temps de culture (jours 2, 7 et 14 pour les cellules endothéliales).

VI. Test de clonogénicité

Le test de clonogénicité permet d'évaluer la capacité des progéniteurs hématopoïétiques à créer des colonies. Il est également réalisé sur une fraction de la suspension cellulaire utilisée pour l'ensemencement dans les hydrogels afin de nous assurer du potentiel des cellules que nous utilisons.

1. Récupération des cellules à partir des hydrogels

Après 1 semaine de culture 3D, une solution de hyaluronidase est préparée de façon similaire au protocole du test au carbazole et les hydrogels sont soumis à son action

enzymatique pendant 90 minutes, à 37 °C avec une agitation constante à 150 tr/min. Les suspensions cellulaires obtenues sont centrifugées pendant 5 minutes à 1500 tr/min et le surnageant retiré. Le culot est repris dans 2 mL de *Detachin™ Cell Detachment Solution* pour décoller les cellules qui seraient encore attachées à des morceaux d'hydrogels non dégradés. Après 10 minutes d'incubation suit une dernière centrifugation de 5 minutes à 1500 tr/min, puis le surnageant est enlevé et le culot est repris dans le milieu fourni pour le test.

2. Test de clonogénicité

Les cellules sont ajoutées à 2,4 mL de milieu fourni dans le kit Stemα4B (Stemα®), la suspension est agitée par vortex pendant quelques secondes avant d'ajouter 1,1 mL du collagène également fourni. Après homogénéisation, le gel obtenu est déposé dans des boîtes de Pétri de 35 × 10 mm (1 mL/boîte). Les boîtes sont ensuite disposées par 3 dans une boîte de Pétri plus large avec en leur centre, une autre boîte de taille identique remplie d'eau (Figure 35).

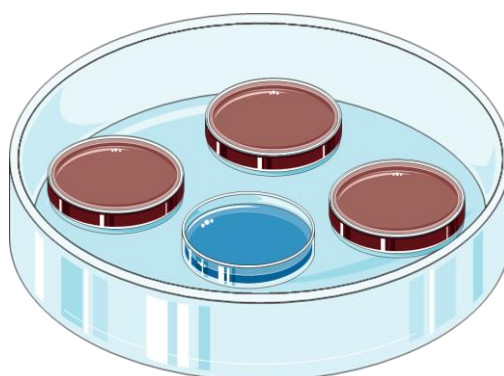


Figure 35 : Dispositif schématique de culture des tests clonogéniques.

Les tests clonogéniques sont réalisés dans des boîtes de Pétri (rouges) et disposés autour d'une boîte remplie d'eau. Les boîtes sont toutes placées au sein d'une boîte plus grande puis mises en culture.

Les cellules sont cultivées pendant deux semaines et au quatorzième jour, les colonies formées sont comptées et identifiées grâce à des critères morphologiques (coloration, organisation, circonférence et taille de la population [158]. La numération des colonies a été réalisée au microscope EVOS™ XL Core (Thermo Fisher Scientific®).

VII. Analyses statistiques

Les différentes analyses statistiques sont réalisées grâce au logiciel GraphPad Prism 5[®]. Deux tests sont utilisés, premièrement, le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du post-test de Dunn's pour toutes les expérimentations. Deuxièmement, pour comparer les traitements entre eux ou pour des études en fonction du temps, l'ANOVA à deux voies est utilisée, suivie du post-test de Bonferroni. Les différences observées sont considérées significative à partir de $p < 0,05$ (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

RÉSULTATS

I. Article

**Hyaluronan–based hydrogels as versatile tumor–like models:
tunable ECM and stiffness with genipin-crosslinking**

Sarah BONNESŒUR, Sandrine MORIN-GROGNET, Olivier THOUMIRE,
Didier LE CERF, Olivier BOYER, Jean-Pierre VANNIER, Béatrice LABAT

Publié dans *Journal of Biomedical Materials Research: Part A.*, **108A**, 1256-1268, **2020**.
DOI: [10.1002/jbm.a.36899](https://doi.org/10.1002/jbm.a.36899)

La culture en 3D permet de mimer le microenvironnement dans lequel évoluent les cellules *in vivo*. Par ailleurs, la rigidité du support de culture peut également impacter l'activité cellulaire. L'hydrogel d'HA a servi de base à nos expérimentations. Afin de le rapprocher des caractéristiques naturelles du microenvironnement, il a été fonctionnalisé avec différentes protéines matricielles et sa rigidité a été modifiée grâce à sa réticulation par la GnP.

L'objectif de cet article a été d'évaluer l'effet de la réticulation à la GnP sur les caractéristiques physico-chimiques des hydrogels d'HA ainsi que sur la prolifération cellulaire.

Dans ce but, nous avons :

1. adapté la technique de réticulation à notre support : l'hydrogel de HA ;
2. cultivé de multiples lignées cellulaires au sein de l'hydrogel ;
3. mesuré la viabilité cellulaire par différentes techniques et à des temps donnés.

Hyaluronan-based hydrogels as versatile tumor-like models: Tunable ECM and stiffness with genipin-crosslinking

Sarah Bonnesœur¹ | Sandrine Morin-Grognon² | Olivier Thoumire² |
Didier Le Cerf³ | Olivier Boyer¹ | Jean-Pierre Vannier¹ | Béatrice Labat² 

¹Normandie Université, INSERM, U1234,
Faculté de Médecine et Pharmacie,
UNIROUEN, Rouen, France

²Normandie Université, PBS UMR 6270, UFR
de Sciences et Techniques, FR3038,
UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, Evreux
Cedex, France

³Normandie Université, PBS UMR 6270, UFR
de Sciences et Techniques, FR3038,
UNIROUEN, INSA Rouen, CNRS, Rouen,
France

Correspondence

Béatrice Labat, Université de Rouen
Normandie, Campus Universitaire d'Evreux—
Navarre, Laboratoire PBS—équipe BioMMAT—
CNRS UMR 6270, 55 rue St Germain, 27000
Evreux, France.
Email: beatrice.labat@univ-rouen.fr

Abstract

Three-dimensional (3D) biomimetic cell culture platforms offer more realistic micro-environments that cells naturally experience in vivo. We developed a tunable hyaluronan-based hydrogels that could easily be modified to mimic healthy or malignant extracellular matrices (ECMs). For that, we pre-functionalized our hydrogels with an adhesive polypeptide (poly-L-lysine, PLL) or ECM proteins (type III and type IV collagens), naturally present in tumorous tissues, and next, we tuned their stiffness by crosslinking with gradual concentrations of genipin (GnP). Then, we thoroughly characterized our substrates before testing them with glioblastoma and breast cancer cells, and thereafter with endothelial cells. Overall, our hydrogels exhibited (a) increasing stiffness with GnP concentration for every pre-functionalization and (b) efficient enzyme resistance with PLL treatment, and also with type IV collagen but to a lesser extent. While PLL-treated hydrogels were not favorable to the culture of any glioblastoma cell lines, they enhanced the proliferation of breast cancer cells in a stiffness-dependent manner. Contrary to type III collagen, type IV collagen pre-treated hydrogels supported the proliferation of glioblastoma cells. The as-desired HA-based 3D tumor-like models we developed may provide a useful platform for the study of various cancer cells by simply tuning their biochemical composition and their mechanical properties.

KEYWORDS

3D tumor model, collagen type III and type IV, genipin, hyaluronan, hydrogels

1 | INTRODUCTION

In the field of tissue engineering, there is a growing demand on the development of in vitro three-dimensional (3D) tissue platforms for new cancer therapeutics and diagnostic alternatives that would contribute to pre-clinical studies (Marshall et al., 2017) and then might reduce clinical trials. In that context, modeling tumor microenvironments is a very complex and topical challenge because tumors are dynamic tissues exhibiting subtle combinations of chemical, physical, and biological cues that are drastically different from a tissue to another.

There is a particular focus on the development of tunable biomimetic 3D models able to recapitulate the complexity of tumorous extracellular matrix (ECM) composition, structure, and stiffness. To address this need, biomimetic polymeric hydrogels are promising biomaterials due to their multi-tunable properties such as chemical composition, degradation rate, nutrient and oxygen transport, and very importantly, mechanical properties (Drury & Moore, 2003). They can be used, for example, to elucidate the mechanisms of tumor progression, including invasion, metastasis, and tumor-associated angiogenesis (Taubenberger, 2014).

In a mimicry approach, hydrogels composed of hyaluronan (HA) are gaining much attention, particularly for the design of mechanically tunable soft hydrated microenvironment such as brain or breast tissues. By controlling their crosslinking density, they can match the stiffness ranges of normal or pathological tissues. HA is a glycosaminoglycan (GAG) composed of repeated disaccharide units of glucuronic acid and N-acetylglucosamine (β 1,4-GlcUA- β 1,3-GlcNAc)_n. It is one of the principal constituent of brain (Lee & Spicer, 2000) and has been observed in higher concentrations in glioblastoma tissue than in normal brain tissue (Delpech et al., 1993), explaining why it is highly implicated in glioma progression (Delpech et al., 1997; Stern, 2005; Toole, Wight, & Tammi, 2002). Normal brain has a distinct ECM composition compared to other tissues with a low stiffness, loosely connected cellular network and a lack of fibrous materials (Ruoslahti, 1996). Wang, Tong, and Yang (2014) entrapped glioblastoma cells in HA-based hydrogels, mimicking the matrix stiffness of normal brain (1 kPa) or glioblastoma tissue (26 kPa). They found that by increasing hydrogels rigidity, they reduced cell proliferation, and upregulated matrix degradation. Other HA-based hydrogels were developed to mimic brain ECM for the study of mechanobiological regulations of glioblastoma multiform (GBM) cells in terms of morphology, motility, and 3D invasion (Ananthanarayanan, Kim, & Kumar, 2011; Kim & Kumar, 2014). Interestingly, while it is generally admitted that tumorous tissues are stiffer than the normal ones, particularly for palpable tumors (due to fibrosis) (Lu, Weaver, & Werb, 2012; Paszek et al., 2005), the GAG-rich GBM tissue was recently viewed as a soft solid that exhibits a high fluidity, explaining their high degree of invasiveness (Streitberger et al., 2020). Moreover, tumor microenvironments can include heterogeneous regions, from necrotic to non-necrotic ones, with various ECM composition and stiffness. This was demonstrated in recent works both with non-invasive magnetic resonance elastography and by using atomic force microscopy (AFM) nano-indentation (Ciasca et al., 2016; Pepin et al., 2018).

In normal breast tissue, HA is in relatively low concentration, whereas in breast cancer microenvironments, it is overexpressed and has been related to highly infiltrative phenotype of breast cancer cells (Auvinen et al., 2000; Toole, 2004). To study the impact of matrix stiffness on MDA-MB-231 breast cancer cells, Narkhede, Crenshaw, Manning, and Rao (2018) used biomimetic HA hydrogels and showed that by increasing their elasticity, cells increased their adhesion, spreading, proliferation, and migration. Recently, to mimic orthotopic xenografts, Baker et al. (2019) designed mechanically controlled HA-oxime hydrogels and cultured primary breast cancer cells or breast cancer cells lines to study gene expression.

Few years ago, our team created a 3D scaffold with adipic dihydrazide as crosslinker that was designed to assess malignant invasion. A crosslinked HA hydrogel was developed to form a hydrated network, in which cells were able to penetrate and develop (David et al., 2004). The porosity of this system was interesting because it allowed the exchange of oxygen, nutrients, and metabolites (Thomas, Nozik, Patel, Singh, & Vohra, 2015). Our model demonstrated its efficiency for anticancer drug sensitivity evaluation and its adaptability as it was tuned with other ECM components or soluble factors (Coquerel

et al., 2009; David et al., 2008; David, Le Cerf, Cazin, Lamacz, & Vannier, 2008). Other cellular types have been successfully cultured in this HA-hydrogel in so far as they did possess the CD44 receptor which is one of the main receptors for HA (Kassim et al., 2014; Lee & Spicer, 2000; Tammi, Day, & Turley, 2002).

In this study, we designed a biomimetic HA-based hydrogel as a promising platform to elucidate the impact of ECM composition and matrix stiffness on the behavior of various cancer cells. We prepared different HA-hydrogels with various ECM or ECM-like components (poly-L-Lysine, type III and type IV collagens) that were crosslinked with genipin (GnP), a natural crosslinker extracted from the *Gardenia jasminoides Ellis* fruit, that binds primary amines and exhibits excellent biocompatibility properties (Sung, Huang, Huang, & Tsai, 1999). GnP is commonly used in traditional Chinese medicine for its biological properties as an anti-inflammatory, antiangiogenic (Koo et al., 2004), antioxidant (Koriyama et al., 2010), and also for the treatment of a variety of inflammation-associated diseases, including cancer (Kim et al., 2017). Then, GnP post-treatments of our pre-functionalized hydrogels provided relevant stiffness (0.1–3 kPa), bracketing the stiffness range of normal and tumor brain and breast tissues.

The resulting hydrogels were thoroughly characterized in terms of pre-functionalization efficiency and crosslinking degree, microstructure, enzyme resistance, stiffness, and thermal and swelling properties. Finally, our hydrogels were submitted to glioblastoma cells (CB74, CB109, and CB191), breast cancer cells (MDA-MB-231), and endothelial cells (HMEC) in terms of viability and proliferation.

Here, we demonstrated that our versatile 3D tumor models based on HA hydrogels that were suitable to support the culture of numerous cancer cells by simply adjusting (a) the pre-treatment with appropriate ECM compounds and (b) the stiffness of the resulting pre-treated scaffolds.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | HA hydrogels synthesis and treatment

Protocol details have been described in two international patents (Vannier et al., 2010; Vannier & Demange, 2010). HA (Sigma Aldrich; molecular weight above 10^3 kDa) is crosslinked with adipic dihydrazide (ADH, Sigma Aldrich) as crosslinking agent and 1-ethyl-3 [3-(dimethylamino)-propyl]carbodiimide (EDCI, Sigma Aldrich) as reagent according to the procedure described by Prestwich, Marecak, Marecek, Vercruysse, and Ziebell (1998). The ratio of ADH to HA was equal to 10:1 and the ratio of HA to EDCI was equal to 1:1. HA and ADH were dissolved in milliQ-water and the pH was adjusted to 4 by adding 0.1 N HCl. The EDCI, dissolved in milliQ-water, was added to the reaction mixture, and allowed to form hydrogel for 2 hr with gentle agitation. Hydrogels were purified by dialysis, casting in a mold ($10 \times 13 \times 0.7$ cm) and lyophilized. Lyophilized hydrogels were cut in parallelepipeds ($2 \times 2 \times 0.5$ mm) with a standardized cutter and rehydrated with RPMI 1640 culture medium supplemented with antibiotics (200 U/ml penicillin and 200 mg/ml streptomycin) in a

humidified atmosphere under 5% CO₂ at 37°C. Rehydrated hydrogels were treated with filtered (0.22 µm) PLL solution (Sigma Aldrich, P2636; molecular weight 30–70 kDa; 1 mg/ml in Tris/NaCl buffer, 10 and 150 mM, respectively) for 15 min or with 0.6% (wt/v in phosphate-buffered saline [PBS]) type III or type IV collagen filtered (0.22 µm) solution (Sigma Aldrich, C4407 and C7521, respectively) for 24 hr. Depending on the treatment, control hydrogels were immersed in Tris/NaCl buffer or PBS for the same duration. Hydrogels were rinsed and then crosslinked with GnP (Wako) for 16 hr with different concentrations. GnP100 solution was first prepared (10 mg/ml), filtered (0.22 µm), and diluted to obtain GnP75, GnP50, GnP25, GnP10, GnP5, and GnP1 solutions (working conditions in Table 1). Hydrogels were finally rinsed again before use.

2.2 | Crosslinking degree

To evaluate the degree of crosslinking of HA hydrogels and their derivatives after GnP crosslinking, we used ninhydrin assay that allows the detection of primary and secondary free amines. Stannous chloride (SnCl₂·2H₂O) was prepared in ethylene glycol (100 mg/ml). Ninhydrin (Sigma Aldrich, N4876) reactive was freshly prepared by dissolving 0.2 g of ninhydrin in 7.5 ml of ethylene glycol and 2.5 ml of 4 N acetate buffer. Then, 250 µl of stannous chloride solution was added with mixing until the solution turns into pale red color. Ninhydrin assay was performed in 96-well polypropylene plates with one hydrogel in each well. After adding 100 µl of solution, plates were heated for 10 min at 100°C. Absorbance was read at 595 nm using PowerWave_x™ reader (Bio Tek Instrument) and KC4® software.

2.3 | Scanning electron microscopy

Prior to scanning electron microscopy (SEM) imaging, hydrogels were lyophilized and sputter-coated with gold (JFC 1300 Autofine coater: JEOL). Samples were imaged with JEOL scanning electron microscope

(Neoscope JCM 5000: JEOL). Cross-section morphologies were viewed at 15 kV accelerating voltage.

2.4 | Carbazole micro-assay

In vitro enzymatic degradation behavior of HA hydrogels and their derivatives was assessed using carbazole assay. Hydrogels were submitted to hyaluronidase (HAase) degradation (5000 UI/750 µl [Sigma, H3448] per hydrogel) for 4 hr while gently agitating at 37°C. 25 µl from the supernatant of each sample at different times (1, 2, and 4 h) were added to 150 µl of a sodium tetraborate reagent (0.95 g in 2 ml hot water and then 98 ml cold sulfuric acid) in 96-well polypropylene plates. Samples were heated at 100°C for 10 min and cooled at 4°C for a few minutes. Thereafter, 5 µl of reagent (125 mg of carbazole in 100 ml of absolute ethanol) were added and samples were heated again for 10 min and then cooled before reading at 525 nm. A standard curve was performed prior to quantify the amount of glucuronic acid produced by the enzymatic reaction. This assay was performed as described by Volpi, Galeotti, Yang, and Linhardt (2014).

2.5 | AFM: Nano-indentation

AFM can probe the nanoscale elastic modulus of hydrated substrates. For that, we used Pico SPM AFM setup from Molecular Imaging (Scientec) in liquid conditions (PBS) to maintain the hydrated structure of the hydrogels. We used colloidal probes (7 µm diameter SiO₂, APP NANO) attached to a non-covered cantilever with a soft nominal spring constant of 0.035 N/m. This allowed to probe the global elastic modulus by nano-indentation of all HA hydrogels conditions. Global Young moduli were derived from the force-displacement curves by using the Hertz model (Kontomaris, 2018).

2.6 | Differential scanning calorimetry

The thermal stability of lyophilized samples of HA and all derivatives was assessed by using the differential scanning calorimeter (DSC) (Setaram DSC92 instrument: Setaram). Samples were loaded into standard aluminum crucibles and were hermetically sealed. An empty aluminum pan was used as standard. Thermograms were obtained in the range of 30°C–450°C at a scanning rate of 10°C/min.

2.7 | Hydrogel swelling ratio

The swelling ratio (SR) of HA hydrogels and their derivatives was determined following the equation:

$$SR = (W_s - W_d) / W_d \times 100\%$$

where W_s is the weight of the swollen hydrogels in water and W_d is the weight of dried hydrogels. In practice, dried hydrogels were

TABLE 1 Nomenclature and description of hydrogels

Treatment	Type III collagen	Type IV collagen	Crosslinking Genipin (% GnP wt/v)
PLL	Collagen III	Collagen IV	None
P.GnP1	CIII.GnP1	CIV.GnP1	0.01% GnP
P.GnP5	CIII.GnP5	CIV.GnP5	0.05% GnP
P.GnP10	CIII.GnP10	CIV.GnP10	0.1% GnP
P.GnP25	CIII.GnP25	CIV.GnP25	0.25% GnP
P.GnP50	CIII.GnP50	CIV.GnP50	0.5% GnP
P.GnP75	CIII.GnP75	CIV.GnP75	0.75% GnP
P.GnP100	CIII.GnP100	CIV.GnP100	1% GnP
Control	No treatment		No crosslinking

Abbreviation: PLL, poly-L-lysine.

weighted (a) directly after lyophilization (W_d) and (b) after being immersed in water for 48 hr (W_s) to ensure swelling equilibrium. Before weighting, the samples were wiped with filter paper to remove the excess water. The measurements were performed in triplicate for each sample to take into consideration the possible influence of remaining surface water.

2.8 | Glioblastoma, breast cancer, and endothelial cell culture

We tested three human GBM (hGBM) cell lines (CB74, CB109, and CB191), breast cancer cells (MDA-MB-231), and endothelial cells (HMEC). All hGBM and MDA-MB-231 cells were cultivated in a humidified atmosphere under 5% CO_2 at 37°C with RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 0.1% antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin). We cultured HMEC cells in MCDB 131 medium supplemented with 15% FCS and 0.001% of epidermal growth factor.

2.9 | Cell viability and proliferation assay

To cellularize our HA hydrogels, we placed them individually into wells of 12-wells plates. Next, cells were enzymatically detached from tissue culture plastic flasks with trypsin, counted by using (Z1 Coulter®: Beckman) Particle Counter and seeded at a density of 10^6 cells in 2 ml of culture medium in each well containing one hydrogel. Of note, we used the cell density for every cell line but the cell suspension was prepared in the corresponding culture medium. Then, cells were allowed to migrate and colonize the HA hydrogel for 24 hr in humidified atmosphere under 5% CO_2 in air at 37°C. Next, each HA hydrogel was transposed in a new well with fresh culture medium and incubated for the desired culture period.

Viability was determined using Cell Counting kit-8 (Sigma Aldrich, 96992). After 7 days of culture, hydrogels were placed in a 96-well plate, one hydrogel in each well with 100 μl of supplemented medium. As described in the protocol, 10 μl of reagent was added to each well and absorbance was read after 1, 2, and 4 hr of incubation. Viability was measured twice during the culture period (days 2 and 7) to indirectly assess proliferation.

2.10 | LIVE/DEAD®

The LIVE/DEAD® kit (Thermo Fisher Scientific, R37601) assay was performed directly on cells within hydrogels after 7 days of culture. Each hydrogel was placed in a 96-well plate and incubated for 15 min with 20 μl of a blend of two components. This kit is composed of (a) Calcein AM, a fluorogenic esterase substrate which gives green-fluorescent product when hydrolyzed, indicating that cells sustain esterase activity and that their membranes are not damaged and (b) ethidium homodimer-1, a red-fluorescent nucleic acid fluorophore

that can penetrate the cells that have impaired membranes. Subsequently, live cells are stained in green while dead cells appeared red. Hydrogels were rinsed rapidly three times and observed with a (Leica DMI6000B microscope: Leica).

2.11 | Statistical analysis

All cell experiments were performed in quintuplicate and characterization experiments in triplicate. Data were reported in the GraphPad Prism 5 software as the mean value $\pm$ standard error on the mean. Statistical significance was assessed using the nonparametric Kruskal–Wallis test and Dunn's post-test for ninhydrin and viability experiments with each treatment and with two-ways analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni post-test for all experiments. Differences were considered statistically significant at $p < 0.05$ (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

3 | RESULTS

3.1 | Crosslinking degree

Ninhydrin assays were performed to assess the crosslinking degree for each pre-treatment and after GnP crosslinking. As well as GnP, ninhydrin binds with NH_2 groups, so the crosslinking degree is inversely proportional to free amino-groups remaining after GnP treatment. Our results showed that, as expected, PLL treatment provided numerous free NH_2 groups compared to standard hydrogels (Figure 1). We obtained similar results with low concentrations of GnP

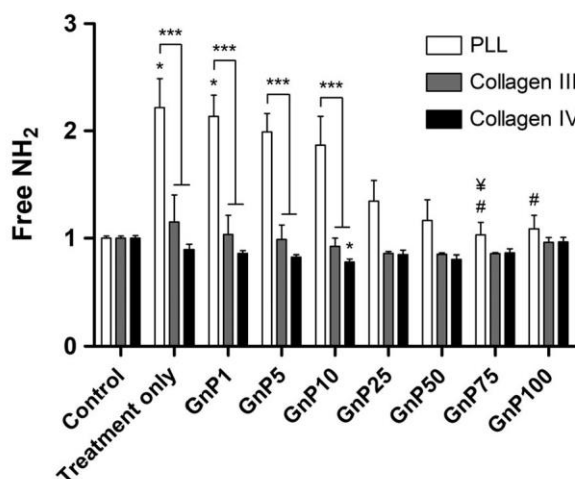


FIGURE 1 Relative number of free NH_2 groups revealed by ninhydrin assay. Hydrogels received either poly-L-lysine (PLL) treatment ($n = 5$) or type III or type IV collagen ($n = 3$). *Compared with corresponding control, #compared with PLL treatment only, and %compared with P.GnP1 condition. Results are presented as the mean $\pm$ standard error on the mean and statistical significance was determined as * < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.001

(from GnP1 to GnP10). From GnP25 to GnP100 conditions, the number of free NH_2 groups gradually decreased to reach similar values as controls, indicating their progressive consumption upon crosslinking process. Globally, for both collagen III and collagen IV treatments, no statistical difference was measured. When treatments are compared to one another, we noticed that PLL provided more crosslinking possibilities than both collagen types as the absorbance measured were at least twice higher.

3.2 | Microstructure (SEM)

All hydrogels were lyophilized and observed by using SEM to inspect their morphology and particularly their cross-sections before and after all treatments (Figure 2). Controls displayed large inner pores of about 100–150 μm . Globally, hydrogels treated with GnP displayed homogeneous 3D structure. Increasing concentrations of GnP induced a noticeable rearrangement of their inner architecture with some collapsed sheets in some places (Figure 2, red arrows) displaying small pores.

3.3 | HAase resistance

To determine whether GnP crosslinking prevents hydrogels from enzymatic degradation, we performed carbazole assays for all hydrogels conditions. Samples were withdrawn from the supernatant after specific time points of degradation by HAase that cleaves β -N-acetylhexosamine-(1 $\rightarrow$ 4) glycosidic bonds, thus releasing glucuronic acid residues, which can be measured through the carbazole assay.

For PLL treatment (Figure 3a) and for each time point, we globally observed that the more hydrogels were crosslinked the less glucuronic acid was detected in the supernatant. Compared to control, there was a significant reduction of glucuronic acid release in the supernatant from P.GnP1 to P.GnP100 conditions after 1 hr of enzyme degradation. After 2 hr, we obtained similar results. But 4-hr incubation led to a slight increase of glucuronic acid release, indicating that protection of the GnP crosslinking weakened over time. No difference was observed between control conditions, which indicates that 1 hr incubation with

the enzyme was sufficient to completely digest a standard hydrogel. No difference was observed for hydrogels treated with type III collagen, whatever the GnP concentration and the duration of HAase digestion (Figure 3b). For type IV collagen treatment, we observed the same trend as with PLL treatment. Indeed, glucuronic acid release was lower for high GnP concentrations and it increased with time, showing that HAase was still effective after 4-hr degradation (Figure 3c). By comparing the various treatments of hydrogels to one another (Figure S1), we clearly showed that PLL was more efficient to protect against HAase than type IV collagen and type III collagen.

3.4 | Stiffness (AFM nano-indentation)

Submitting our HA hydrogels and their derivatives to AFM nano-indentation allowed to access to their mechanical properties at the very local scale (Figure 4). Global Young moduli were derived from force-displacement curves. Globally, we observed that, whatever the treatment of hydrogels (i.e., PLL, Collagen III or Collagen IV), low concentrations of GnP did not affect much their stiffness (ranging from 150 to 350 Pa). However, the highest GnP concentrations induced a noticeable hydrogel stiffening (~ 1500 Pa for PLL and collagen III and ~ 1800 Pa for collagen IV), likely due to their inner architecture that were slightly reorganized upon GnP crosslinking as previously observed by SEM (Figure 2). The effective crosslinking was also optically observed since hydrogels turned to blue as the GnP binds amino-groups and hydrogels became darker as the GnP concentration increased.

3.5 | Thermal properties (DSC)

DSC was used to determine any changes in the thermal properties of HA hydrogels and their derivatives before and after all the different treatments (Figure 5). The HA hydrogel (control) exhibited a sharp exothermic peak at 232°C corresponding to its crystalline temperature (T_c). We noticed that T_c was slightly shifted to higher temperatures when the hydrogels were treated with PLL, type III collagen, and

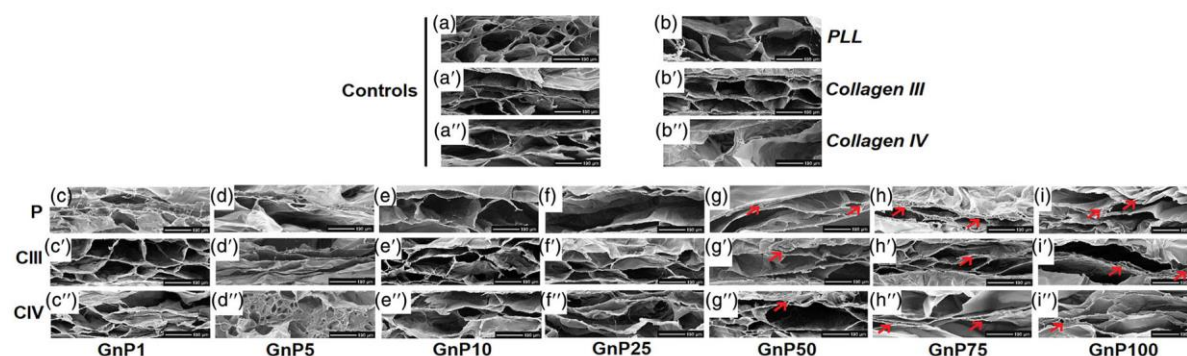


FIGURE 2 Representative scanning electron microscopy (SEM) images of cross-sections of each hydrogel treated either with poly-L-lysine (PLL) (a-i), type III collagen (a'-i') or type IV collagen (a''-i''). Controls (a, a', and a''), and PLL, collagen III, and collagen IV treatment (b, b', and b'') and respective crosslinked hydrogels with GnP1, GnP5, GnP10, GnP25, GnP50, GnP75, and GnP100 (c-i, b'-i', b''-i''). Scale bar: 100 μm

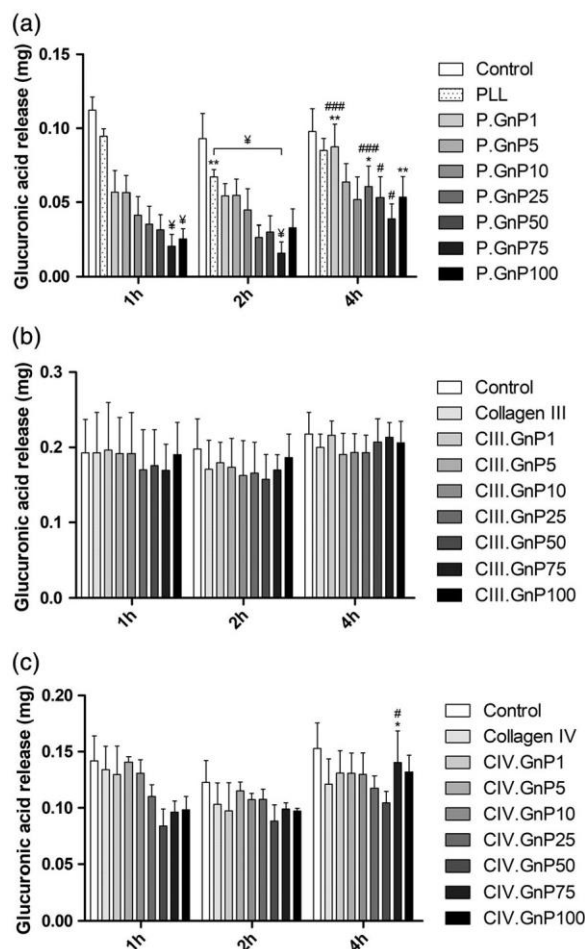


FIGURE 3 Glucuronic acid release after hyaluronidase degradation (mg). Hydrogels received PLL (a), type III collagen (b), or type IV collagen (c) treatment. *Compared with 1 hr, #between 2 and 4 hr, and %compared with control of the corresponding time. Results are presented as the mean $\pm$ standard error on the mean and statistical significance was determined as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, $n = 3$

type IV collagen indicating a very slight but not significant altering of hydrogel microstructure. Then, the crosslinking of hydrogels with increasing concentrations of GnP induced a lowering of T_c . Globally, DSC of all hydrogels produced thermograms which were similar in shape and that exhibited similar exothermic peaks. Over 360°C, all hydrogels decomposed as indicated by the profile of the peaks.

3.6 | Hydrogel Swelling (SR)

The swelling study revealed that all HA hydrogels retained high hydrophilicity with a water uptake of at least 560% for control, and 580%, 1050%, and 1180% for PLL, collagen III and collagen IV pre-treated

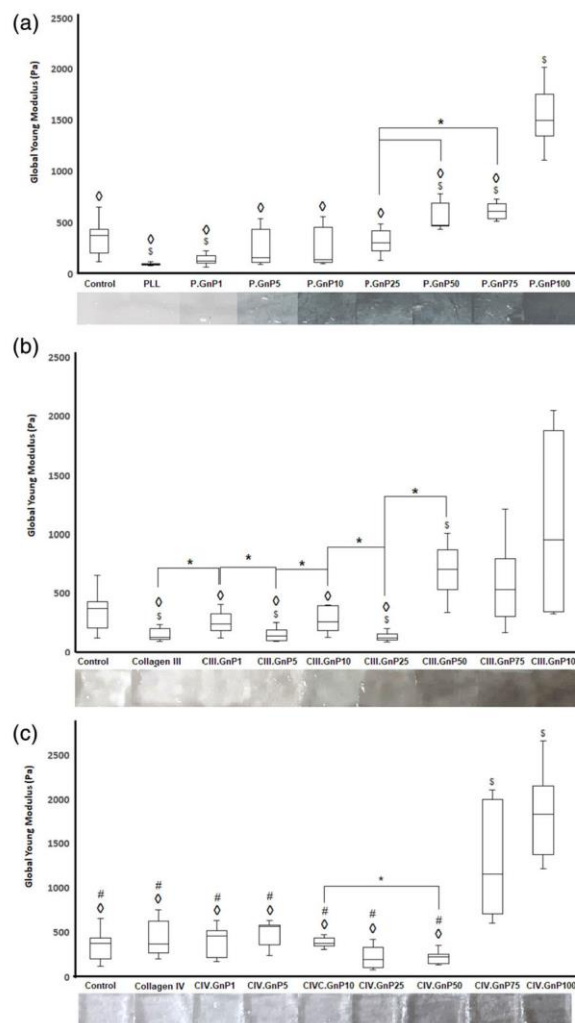


FIGURE 4 AFM nano-indentation and respective optical images of hyaluronan (HA) hydrogels. Global Young Modulus (Pa) obtained for untreated HA (control), and treated HA hydrogels with poly-L-lysine (PLL), collagen III or collagen IV, native or crosslinked with increasing concentrations of genipin (GnP1, GnP5, GnP10, GnP25, GnP50, GnP75, and GnP100). * $p < 0.05$, # $p < 0.05$ compared with control, % $p < 0.05$ compared with GnP100, # $p < 0.05$ compared with GnP75

hydrogels, respectively (Figure 6). Overall, PLL-treated hydrogels displayed lower uptake of water compared to collagen-treated ones respective to the gradual concentrations of GnP. The GnP treatments from GnP1 to GnP25 of PLL-treated hydrogels globally decreased the SR, but then increased from GnP50 to GnP100. For collagen-treated hydrogels, the increasing concentrations of GnP induced similar swelling parabolic profiles. The weakest concentrations of GnP induced the decrease of water uptake capacity of the hydrogels (from GnP1 to GnP10/GnP25) and then, we noticed a gradual return to initial values with increasing GnP concentrations to GnP100.

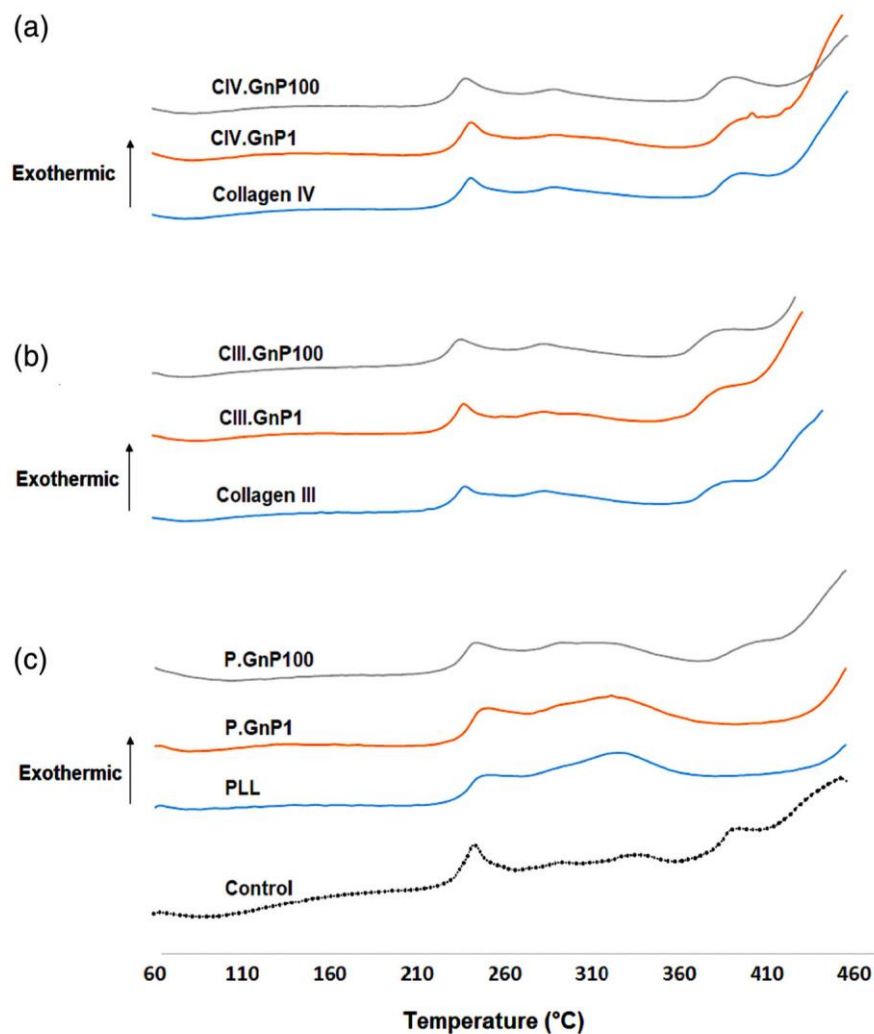


FIGURE 5 Representative differential scanning calorimeter (DSC) thermograms of control, hyaluronan (HA) treated with poly-L-lysine (PLL), type III and type IV collagens and crosslinked with GnP1 and GnP100 as examples

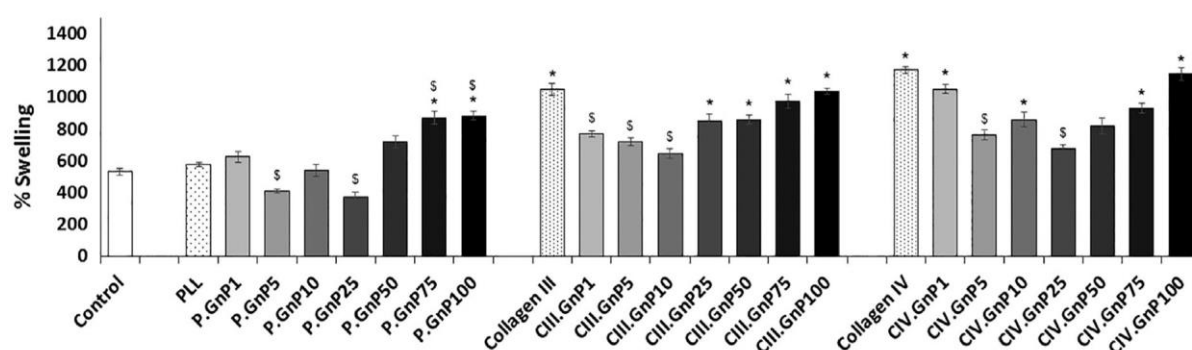


FIGURE 6 Swelling ratio for control and hyaluronan (HA) hydrogels treated with poly-L-lysine (PLL), collagen III or collagen IV, and crosslinked with GnP1, GnP5, GnP10, GnP25, GnP50, GnP75, and GnP 100, measured after 48 hr immersion in water until swelling equilibrium. * $p < 0.05$ compared to control, \$ $p < 0.05$ compared to PLL, collagen III or collagen IV

FIGURE 7 Cellular viability of CB74 cells after 7 days of culture in contact with hyaluronan (HA)-based hydrogels, treated either with poly-L-lysine (PLL), or type III/type IV collagens and crosslinked with GnP1–GnP100. (a) WST-8 assay. *Significance among the corresponding type of treatment, #significance between PLL and type IV collagen treatment, and ¥between type III and type IV collagen treatment. Results are presented as mean $\pm$ standard error on the mean and statistical significance was determined as * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 ($n = 5$ for PLL treatment, $n = 4$ for type IV collagen and $n = 3$ for type III collagen treatment). (b) Representative viability of cells cultured with collagen IV conditions. Fluorescent photomicrographs of stained cells with LIVE/DEAD® kit. Green color indicates viable cells. Red color corresponds to autofluorescence of crosslinked genipin. Scale bar: 500 μ m

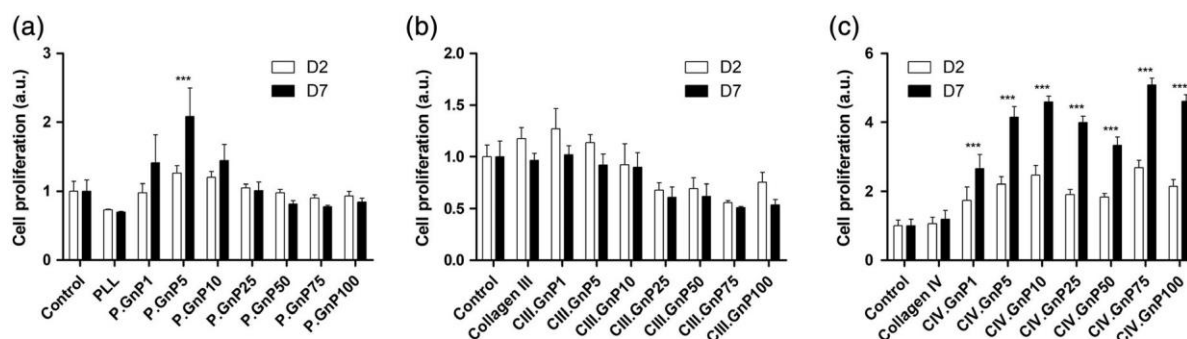
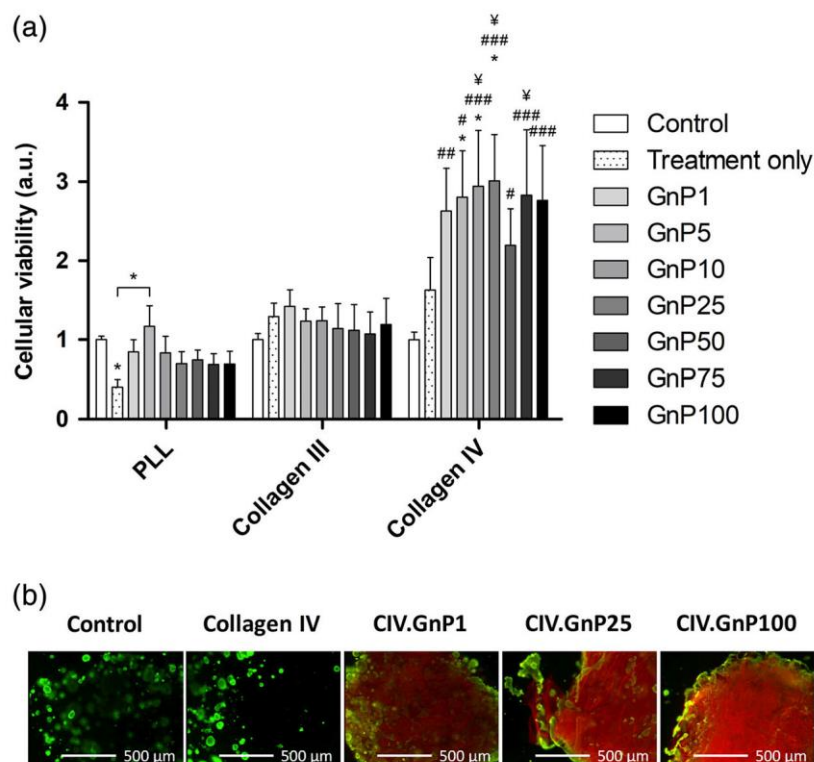


FIGURE 8 CB74 cell proliferation assessed at D2–D7 in contact with control and hyaluronan (HA) hydrogels treated with poly-L-lysine (PLL) (a), collagen III (b) or collagen IV (c), and crosslinked with GnP1, GnP5, GnP10, GnP25, GnP50, GnP75, and GnP 100. Results are displayed as the mean $\pm$ standard error on the mean and statistical significance was set as * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001, $n = 1$

3.7 | Cell viability

We observed that the pre-treatments of hydrogels with PLL, type III collagen or type IV collagen clearly affected the metabolic activity of glioblastoma cells after 7 days of culture (Figures 7a and S3). For PLL, the cell viability was markedly reduced compared to respective control. The post-treatment with GnP5 only, permitted a return to initial values for CB74 and CB109 cells, but all the other GnP concentrations had a slight adverse effect on cell viability. The use of type III collagen

and all post-treatments with GnP did not markedly change CB74 viability whatever the conditions. In contrast, type IV collagen pre-treatment of hydrogels and the subsequent GnP crosslinking induced a dramatic improvement of CB74 viability from the very first concentrations of GnP. Viability seemed to increase in a dose-dependent manner from control to CIV.GnP25 condition. From CIV.GnP50 condition, the positive effect remained but was less marked. Consistent to viability assay, LIVE/DEAD® assay of type IV-treated hydrogels showed that most cells were green-labeled indicating that they were

alive after 7 days of culture (Figure 7b). We noticed numerous glioblastoma spheroids colonizing the whole hydrogels by optical microscopy (Figure S2). Unfortunately, due to the autofluorescence in red color of amino-bound GnP, we could not observe the potential dead cells (labeled in red). We easily could see the colored red crosslinked hydrogels on CIV.GnP1, CIV.GnP25, and CIV.GnP100 conditions with numerous green cells on the hydrogel edges. Concerning PLL and collagen III-treated hydrogels, we could not observe any green cells indicating that these treatments were not favorable to hGBM culture.

3.8 | Cell proliferation

As expected, PLL pre-treatment of hydrogels induced a reduction of cell proliferation (Figure 8a). The use of GnP1 and GnP5 for crosslinking hydrogels improved the cell proliferation, but higher GnP concentrations did not affect the growth of cells or even slightly decreased it compared to control. Similarly, type III collagen treatment did not improve the cell outgrowth or even caused a gradual decrease as the GnP concentrations increased from GnP25 (Figure 8b). Finally, treating our hydrogels with type IV collagen markedly improve cell outgrowth with a twofold increase for almost all GnP-treated hydrogels between D2 and D7, and a fourfold increase compared to control at D7 (Figure 8c).

4 | DISCUSSION

Biomimetic 3D tumor-like models are increasingly investigated as they can closely match the complexity of ECMs with well-defined composition and architecture. As cancer-like microenvironments, they must recapitulate the bio-physico-chemical characteristics of the ECMs.

Glioblastoma microenvironment is a complex and dynamic ECM, consisting of various biochemical and mechanical cues. Hyaluronic acid (HA) is one of the most abundant anionic natural polymer found in brain ECM and is also a major GAG present in glioblastoma, that can dictate glioma cell fate (Pedron, Becka, & Harley, 2013; Toole et al., 2002). Moreover, in brain tumors, it is generally accepted that ECM stiffens over time, enhancing the tumor cell migration (Polacheck, Zervantonakis, & Kamm, 2013).

In that context, and contrary to numerous 3D cancer models based on fibrillary proteins, we implemented porous 3D HA-based hydrogels to study the behavior of hGBM. Our tumor-like model recapitulated the biochemical composition of tumorous brain ECM with HA-based hydrogel that were functionalized with various adhesive biomolecules: PLL, fibrillar type III collagen, and non-fibrillar network-forming type IV-collagen. Then, as most of cells, hGBM are mechanosensitive cells, our pre-functionalized hydrogels were post-crosslinked using GnP to modulate their mechanical properties because pure HA lacks mechanical strength. We then performed a thorough characterization of our hydrogels to identify the potential parameters that could affect hGBM cells behavior.

As expected, the pre-treatment of our hydrogels with PLL provided the highest amount of NH_2 compared to type III or type IV collagen (Figure 1). PLL is an amino-rich polypeptide due to the repetition of lysine residues. Thus, the post-treatment with GnP consistently provoked a gradual decrease of free amine groups as the GnP concentration increased since the amine groups were increasingly involved during the crosslinking process. These results indicate that GnP effectively crosslinked PLL-treated hydrogels, as anticipated from a previous work from our lab (Gaudiere et al., 2014) where we showed that "layer-by-layer" (LbL) nanofilms composed of PLL and chondroitin sulfate A (CSA) were successfully crosslinked after GnP treatment, leading to semi-interpenetrated networks composed of a stiff PLL network within which CSA molecules were free to diffuse. No significant changes were observed in the cases of type III and type IV-collagen-treated hydrogels. Although these two ECM proteins contain amine groups in their basic amino-acid residues (hydroxylysine, lysine, arginine, and histidine) (Babe, 1984; Pope et al., 1975), the ninhydrin assay did not reveal significant amount of free amine groups before and after GnP crosslinking compared to control.

Next, we examined the architecture of our hydrogels before and after the pre-treatments with PLL and both collagens and then, after GnP crosslinking (Figure 2). SEM images of the cross-sections revealed that the inner honeycomb-like structure was globally maintained but the highest concentrations of GnP induced a slight collapse of some inner horizontal sheets, whatever the pre-treatment. GnP have been reported to generate intramolecular and intermolecular crosslinking with fixed-tissues (Chang, Tsai, Liang, & Sung, 2001). This could explain the shrinking of some horizontal walls of hydrogels with high concentrations of GnP.

By crosslinking our hydrogels, we expected to protect them from matrix proteases (including matrix metalloproteases, MMPs) and glycosidases degradation over time. MMP-9 is a gelatinase that mainly cleaves gelatin but also non-fibrillary type IV collagen and has been found to be highly produced in primary GBM (Choe et al., 2002). HAase is known to be extensively produced by GBM cells (Hartheimer, Park, Rao, & Kim, 2019) and cleaves HA macromolecules into small fragments that are known to induce angiogenesis and inflammation (Slevin et al., 2007).

PLL-treated hydrogels clearly resisted the best to HAase as the GnP concentration increased, compared to relative collagen-treated ones (Figure 3a). Nevertheless, collagen IV-treated samples exhibited a slight HAase resistance over the first hour of enzyme action. Even though not studied in this work, we anticipate that crosslinking our type IV-treated hydrogels would also contribute to MMP-9 resistance as related in another work (Kaphle, Li, & Yao, 2019).

The mechanical cues of the cell microenvironment represent an increasing issue as cell fate can be guided depending on the stiffness of their surroundings. Thus, mimicking normal or pathological ECMs is a very current challenge in the designing of modern 3D models. Here, GnP, as natural crosslinker, was used to tune the stiffness of our hydrogels. We showed that the young modulus increased with the highest concentration of GnP (Figure 4). Our results ranged from 0.1 to 2–3 kPa. Of note, a substantial discrepancy was observed for the

highest GnP concentrations. As previously mentioned, the SEM inspection revealed regional heterogeneities with some local horizontal walls collapsing within the hydrogels that likely induced changes in the regional rigidity. During nano-indentation, the AFM tip exerts a very local compressive load on the samples, therefore, depending on the probed area, the tip can sense a cortical stiffened zone whereas elsewhere, the surface of the hydrogel could be softer. Nevertheless, although there is a large variability in the values of stiffness of normal and pathological tissues found in the literature, our results covered the range of brain and breast tissues. For example, the normal brain tissue stiffness was reported to range between 0.1 and 1 kPa (Buxboim, Rajagopal, Brown, & Discher, 2010; Engler, Sen, Sweeney, & Discher, 2006), whereas in the GBM, the microenvironment exhibit mechanically heterogeneous regions ranging from 0.1 to ~10 kPa (Franze, 2013) or even stiffer (26 kPa) (Polacheck et al., 2013). As for breast cancer tissues, depending on the regions that are probed (by AFM nano-indentation for example), the stiffness was reported to range from ~0.5 to 3–5 kPa, with the highest values obtained for fibrous ECM regions while the lowest ones were measured in cellular-rich regions (Acerbi et al., 2015; Ansardamavandi, Tafazzoli-Shadpour, Omidvar, & Jahanzad, 2016).

The swelling ratio (SR) data bring additional characteristics on the properties of our treated hydrogels (Figure 6). HA hydrogels naturally exhibit high affinity for water due to their large number of hydrophilic groups such that they are known to swell to a large extent without dissolution (Ma et al., 2003; Walimbe, Calve, Panitch, & Sivasankar, 2019). Generally, high extent of hydrogels crosslinking leads to lower water uptake because of reduction in the mobility of the macromolecular chains (Yu et al., 2019). In our case, we obtained a parabolic profile of the swelling ratio as the GnP concentration increased. A first phase corresponding to lowest amounts of GnP displayed a gradual decrease of water uptake up to GnP10–GnP25 (likely due to hydrophobicity of GnP; Gopalakrishnan, Enqvist, Wallstrom, Gattin, & Saiter, 2010) and a second phase (from GnP25 to GnP50) exhibited a progressive increase as GnP concentrations were elevated. This is in accordance with a work of Zhang et al. (2011) where they related a significant increase of swelling rate of hybrid hydrogels with GnP concentrations. They explained that the formation of small pores in hydrogels induced by GnP crosslinking would be favorable to water retention. The collapse of hydrogels sheets observed in SEM images are consistent with these findings.

Thereafter, following the thorough characterization of our hydrogels and all their derivatives, we tested them to check their suitability as 3D tumor-like models, particularly for the study of glioblastoma cells (CB74, CB109, and CB19) and breast cancer cells (MDA-MB-231) in terms of viability and capacity to proliferate.

We found that, whatever the stiffness, PLL-treated hydrogels did not promote neither survival nor cellular proliferation (Figures 7a and 8a). These cells possess the CD44, one main HA receptor, on its surface (Chauzy et al., 1992; David et al., 2004; Radotra & McCormick, 1997). CD44/HA binding allows glioblastoma cells to adhere to the HA hydrogel and thus permits invasion. We hypothesize that the hydrogel coating with PLL impaired the cell adhesion likely because

PLL overlaid HA fixation sites. Interestingly, the association of HA and PLL was mainly studied as LbL films models (Abdelkebir et al., 2011; Picart et al., 2001). For example, (HA/PLL) LbL films were designed for the culture of endothelial cells and showed a better proliferation when the films were mechanically favorable (Chang et al., 2017). Recently, Madaboosi et al. (2018) illustrated that the thicker a HA/PLL multilayer film, the more cell repellent it is, regarding various type of cells from various tissues (fibroblasts, stem cells, from kidney, bone, and ovary).

Thus, we also tested our hydrogels with two other glioblastoma cells (CB109 and CB191) (Figure S3a,b) and we noticed that the PLL pre-treatment dramatically reduced the cell viability, supporting our previous observations. Endothelial cells (HMEC) were also investigated in view of further development of co-cultures with cancer cells. Similarly to CB74 cells (Figure 8a), they demonstrated a slight improvement of viability only with the lowest GnP concentrations (GnP1 and GnP5) (Figure S3d,e), contrary to Chang et al.'s (2017) work that showed that endothelial cells were able to adhere and proliferate atop LbL films composed of PLL and HA, whatever their stiffness in the range of (200–430 kPa).

Surprisingly, the viability of breast cancer cells (MDA-MB-231) not only slightly increased when cultured in contact with PLL pre-treated hydrogels, but also exhibited a fourfold rise with increasing concentrations of GnP, in a dose-dependent manner up to GnP50 and then returned to same level as GnP5 with higher GnP concentrations (GnP75 and GnP100). We believe that this cell viability reduction is likely due to the architecture changes of hydrogels that exhibited new smaller pores within that were generated with the highest concentrations of GnP. As a reminder, PLL-treated hydrogels crosslinked with the highest concentrations of GnP exhibited the highest resistance to HAase (Figure 3a). Thus, even though MDA-MB-231 cells are known to synthesize high levels of HAase, they likely could not degrade these hydrogels and then, were restricted to the pore size. Our results clearly demonstrated that the stiffness is a discriminating parameter that modulates breast cancer cells. The stiffness of breast tissue was reported to range from 0.33 and 0.64 kPa for adipose and glandular tissues, respectively, whereas an invasive ductal carcinoma was measured at 1.42 kPa (Chen et al., 2013). The stiffness of our hydrogels was in the same range, so we can assume that when MDA-MB-231 cells were in contact with the softer hydrogels (control, PLL, P.GnP1) they likely remained in a quiescent state, while with stiffer hydrogels, they markedly proliferated, in so far as they had enough space to develop.

Treating our hydrogels with two types of collagens was a relevant approach, according to a previous study realized in our laboratory. Indeed, David, Dulong, et al. (2008) demonstrated that type IV collagen, and even more with type III collagen, did improve cancer cell lines invasion in our hydrogel model and also proliferation. Originally, type III collagen is absent from cerebral ECM (Gladson, 1999), but has been reported to enhance cancer progression (Sivridis, Giatromanolaki, & Koukourakis, 2004). Here, surprisingly, we obtained contrary results: type IV collagen offered better outcome than type III (Figure 8). In another study conducted by Simon et al. (2014), CB74 and CB191

cells have been reported to get different receptors on their surface and that the binding protein content on top of their membrane could also be variable. We thus can hypothesize that CB74 cells simply cannot bind to type III collagen.

Of note, GBM is one of the most deadly forms of human cancer and is characterized by high infiltrative capacity and vasculature. Type IV collagen is a main component of glial basement membrane (produced by GBM cells) that is invaded, through tumor progression mechanisms (Rao et al., 2013). We then assume that CB74 cells invaded type IV collagen-treated hydrogels easily and thus could proliferate much more rapidly after 7 days of culture compared to others hydrogels derivatives.

Finally, besides its crosslinking property, one cannot exclude a potential pharmacological effect of GnP. As mentioned earlier, it has been widely used in traditional Chinese medicines for many biological properties for centuries and recently for its anti-cancer activity (Ahani, Sangtarash, Houshmand, & Eskandani, 2018; Ko & Moon, 2015). Kim, Jeong, and Moon (2012) have related an inhibitory effect of GnP on the growth of MDA-MB-231 cells in a dose-dependent manner, with an IC50 value of 327 μ M. Ayyasamy et al. (2011) used MFC-7, another breast cancer cells, and found that treated with 7 μ M, cells over-expressing uncoupling protein-2 (UCP2) reduced their proliferation, clonogenic survival and invasion. The recent studies have been focused on the inhibition of UCP2 expression in cancer cells as it has been showed to promote chemo-resistance in cancer therapies, advance metabolic reprogramming, and disrupt tumor suppression (Baffy, Derdak, & Robso, 2011). In our study, the concentrations of GnP we used were in the range of (0.44–44 mM), which is far much higher than those related in the literature. In our case, GnP was not used diluted in the culture medium as in most studies, but crosslinked with PLL or collagens molecules. Nonetheless, we have tested GnP in solution as control, but as it binds any amino-containing compounds, it also bound serum proteins such that the culture medium turned blue (data not shown), which is a color indicator for successful GnP crosslinking (Sung, Liang, Chen, Huang, & Liang, 2001). We cannot exclude a potential release of unbound GnP molecules in the culture medium during the course of the study (up to 7 days), but we emphasize that all GnP-treated hydrogels were extensively rinsed before used, precisely to rule out that possibility. The mechanism by which GnP exerts its anti-cancer activity is still not well-identified but could be a substantial asset for future synergistic strategies.

5 | CONCLUSION

In this study, we developed a versatile HA-based 3D model able to recapitulate many of the tumorous ECM properties with a particular focus on biochemistry and biomechanics. We demonstrated that these biomimetic customized hydrogels supported glioblastoma and breast cancer cells cultures and were able to enhance or reduce viability and proliferation depending (a) on the type of biomolecule (i.e., PLL, type III or type IV collagen) that was used to pre-functionalize native HA hydrogels and (b) on the stiffness that was

imparted to pre-treated hydrogels after an appropriate GnP crosslinking. We showed that a gradual increase of GnP concentration induced an increase of the rigidity of the scaffolds in a range that matched normal and tumorous brain and breast tissues. We believe that this original work constitutes a significant contribution to the field of bio-based 3D models for the study of cancerous cells and elucidating the mechanisms underlying tumor progression, as well as for evaluating the efficacy of potential drug candidates.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Tony Varacavoudin (PBS UMR CNRS 6270) for HA hydrogels synthesis and lyophilization, Virginie Dulong (PBS UMR CNRS 6270) for lyophilization of our treated hydrogels prior to SEM observations. This study was supported by a grant from the association "Vie et Espoir" which also granted S. Bonnesœur a fellowship. We also thank Evreux Portes de Normandie (EPN) Agglomeration for its financial support.

ORCID

Béatrice Labat  <https://orcid.org/0000-0003-0994-8335>

REFERENCES

- Abdelkebir, K., Gaudière, F., Morin-Grognet, S., Coquerel, G., Labat, B., Atmani, H., & Ladam, G. (2011). Evidence of different growth regimes coexisting within biomimetic layer-by-layer films. *Soft Matter*, 7(19), 9197–9205.
- Acerbi, I., Cassereau, L., Dean, I., Shi, Q., Au, A., Park, C., ... WeaverHuman, V. M. (2015). Human breast cancer invasion and aggression correlates with ECM stiffening and immune cell infiltration. *Integrative Biology*, 7(10), 1120–1134.
- Ahani, N., Sangtarash, M. H., Houshmand, M., & Eskandani, M. A. (2018). Genipin induces cell death via intrinsic apoptosis pathways in human glioblastoma cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(2), 2047–2057.
- Ananthanarayanan, B., Kim, Y., & Kumar, S. (2011). Elucidating the mechanobiology of malignant brain tumors using a brain matrix-mimetic hyaluronic acid hydrogel platform. *Biomaterials*, 32(31), 7913–7923.
- Ansardamavandi, A., Tafazzoli-Shadpour, M., Omidvar, R., & Jahanzad, L. (2016). Quantification of effects of cancer on elastic properties of breast tissue by atomic force microscopy. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 60, 234–242.
- Auvinen, P., Tammi, R., Parkkinen, J., Tammi, M., Agren, U., Johansson, R., ... Kosma, V. M. (2000). Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival. *The American Journal of Pathology*, 156(2), 529–536.
- Ayyasamy, V., Owens, K. M., Desouki, M. M., Liang, P., Bakin, A., Thangaraj, K., ... Singh, K. K. (2011). Cellular model of Warburg effect identifies tumor promoting function of UCP2 in breast cancer and its suppression by genipin. *PLoS One*, 6(9), e24792.
- Babe, W. (1984). And Glanville RW, Structure of human-basement-membrane (type IV) collagen. Complete amino-acid sequence of a 914-residue-long pepsin fragment from the alpha 1(IV) chain. *European Journal of Biochemistry*, 143(3), 545–556.
- Baffy, G., Derdak, Z., & Robso, S. C. (2011). Mitochondrial recoupling: A novel therapeutic strategy for cancer? *British Journal of Cancer*, 105(4), 469–474.
- Baker, A. E. G., Bahlmann, L. C., Tam, R. Y., Liu, J. C., Ganesh, A., Mitrousis, N., ... Shoichet, M. S. (2019). Benchmarking to the gold standard: Hyaluronan-oxime hydrogels recapitulate xenograft models with in vitro breast cancer spheroid culture. *Advanced Materials*, 31(36), 1901166–1901177.

- Buxboim, A., Rajagopal, K., Brown, A. E., & Discher, D. E. (2010). How deeply cells feel: Methods for thin gels. *Journal of Physics. Condensed Matter*, 22(19), 194116.
- Chang, H., Zhang, H., Hu, M., Chen, J. Y., Li, B. C., Ren, K. F., ... Ji, J. (2017). Stiffness of polyelectrolyte multilayer film influences endothelial function of endothelial cell monolayer. *Colloids and Surfaces. B, Bio-interfaces*, 149, 379–387.
- Chang, Y., Tsai, C. C., Liang, H. C., & Sung, H. W. (2001). Reconstruction of the right ventricular outflow tract with a bovine jugular vein graft fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin) in a canine model. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 122(6), 1208–1218.
- Chauzy, C., Delpech, B., Olivier, A., Bastard, C., Girard, N., Courel, M. N., ... Creissard, P. (1992). Establishment and characterisation of a human glioma cell line. *European Journal of Cancer*, 28A(6–7), 1129–1134.
- Chen, J., Brandt, K., Ghosh, K., Grimm, R. C., Glaser, K. J., Kuge, J., & Ehman, R. L. (2013). Noncompressive MR elastography of breasts. *Proceedings of the International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, 21, 1736.
- Choe, G., Park, J. K., Jouben-Steele, L., Kremen, T. J., Liao, L. M., Vinters, H. V., ... Mischel, P. S. (2002). Active matrix metalloproteinase 9 expression is associated with primary glioblastoma subtype. *Clinical Cancer Research*, 8(9), 2894–2901.
- Ciasca, G., Sassun, T. E., Minelli, E., Antonelli, M., Papi, M., Santoro, A., ... De Spirito, M. (2016). Nano-mechanical signature of brain tumours. *Nanoscale*, 8(47), 19629–19643.
- Coquerel, B., Poyer, F., Torossian, F., Dulong, V., Bellon, G., Dubus, I., ... Vannier, J. P. (2009). Elastin-derived peptides: Matrikines critical for glioblastoma cell aggressiveness in a 3-D system. *Glia*, 57(16), 1716–1726.
- David, L., Dulong, V., Coquerel, B., Le Cerf, D., Cazin, L., Lamacz, M., & Vannier, J. P. (2008). Collagens, stromal cell-derived factor-1 α and basic fibroblast growth factor increase cancer cell invasiveness in a hyaluronan hydrogel. *Cell Proliferation*, 41(2), 348–364.
- David, L., Dulong, V., Le Cerf, D., Chauzy, C., Norris, V., Delpech, B., ... Vannier, J. P. (2004). Reticulated hyaluronan hydrogels: A model for examining cancer cell invasion in 3D. *Matrix Biology*, 23(3), 183–193.
- David L, Dulong, V., Le Cerf D, Cazin L, Lamacz M, and Vannier JP. Hyaluronan hydrogel: An appropriate three-dimensional model for evaluation of anticancer drug sensitivity. *Acta Biomaterialia*, 2008, 4 (2): p. 256–63.
- Delpech, B., Girard, M. C., Chauzy, C., Maunoury, R., Olivier, A., Tayot, J., & Creissard, P. (1993). Hyaluronan and hyaluronectin in the extracellular matrix of human brain tumour stroma. *European Journal of Cancer*, 29A(7), 1012–1017.
- Delpech, B., Girard, N., Bertrand, P., Courel, M. N., Chauzy, C., & Delpech, A. (1997). Hyaluronan: Fundamental principles and applications in cancer. *Journal of Internal Medicine*, 242(1), 41–48.
- Drury, J. L., & Moore, D. J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24(24), 4337–4351.
- Engler, A. J., Sen, S., Sweeney, H. L., & Discher, D. E. (2006). Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126(4), 677–689.
- Franze, K. (2013). The mechanical control of nervous system development. *Development*, 140(15), 3069–3077.
- Gaudiere, F., Morin-Grognon, S., Bidault, L., Lembre, P., Pauthe, E., Vannier, J. P., ... Labat, B. (2014). Genipin-crosslinked layer-by-layer assemblies: Biocompatible microenvironments to direct bone cell fate. *Biomacromolecules*, 15(5), 1602–1611.
- Gladson, C. L. (1999). The extracellular matrix of gliomas: Modulation of cell function. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 58 (10), 1029–1040.
- Gopalakrishnan, P., Enqvist, E., Wallstrom, L., Gattin, R., & Saiter, J. M. (2010). A new green thermoplastic polymer with improved hydrophobic character. *Macromolecular Symposia*, 290(1), 25–29.
- Hartheimer, J. S., Park, S., Rao, S. S., & Kim, Y. (2019). Targeting Hyaluronan interactions for glioblastoma stem cell therapy. *Cancer Microenvironment*, 12(1), 47–56.
- Kaphle, P., Li, Y., & Yao, L. (2019). The mechanical and pharmacological regulation of glioblastoma cell migration in 3D matrices. *Journal of Cellular Physiology*, 234(4), 3948–3960.
- Kassim, Y. L., Tawil, E. A., Lecerf, D., Couteau, J., Simon, T., Buquet, C., ... Demange, E. (2014). Biomimetic three dimensional cell culturing: Colorectal cancer micro-tissue engineering. *Journal of Clinical & Experimental Oncology*, 3(2).
- Kim, B. R., Jeong, Y. A., Na, Y. J., Park, S. H., Jo, M. J., Kim, J. L., ... Lee, D. H. (2017). Genipin suppresses colorectal cancer cells by inhibiting the sonic hedgehog pathway. *Oncotarget*, 8(60), 101952–101964.
- Kim, E. S., Jeong, C. S., & Moon, A. (2012). Genipin, a constituent of *Gardenia jasminoides* Ellis, induces apoptosis and inhibits invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Oncology Reports*, 27(2), 567–572.
- Kim, Y., & Kumar, S. (2014). CD44-mediated adhesion to hyaluronic acid contributes to mechanosensing and invasive motility. *Molecular Cancer Research*, 12(10), 1416–1429.
- Ko, E. Y., & Moon, A. (2015). Natural products for chemoprevention of breast cancer. *Journal of Cancer Prevention*, 20(4), 223–231.
- Kontomaris, S. V. (2018). The hertz model in AFM Nanoindentation experiments: Applications in biological samples and biomaterials. *Micro and Nanosystems*, 10(1), 11–22.
- Koo, H. J., Song, Y. S., Kim, H. J., Lee, Y. H., Hong, S. M., Kim, S. J., ... Par, E. H. (2004). Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. *European Journal of Pharmacology*, 495(2–3), 201–208.
- Koriyama, Y., Chiba, K., Yamazaki, M., Suzuki, H., Muramoto, K., & Kato, S. (2010). Long-acting genipin derivative protects retinal ganglion cells from oxidative stress models in vitro and in vivo through the Nrf2/antioxidant response element signaling pathway. *Journal of Neurochemistry*, 115(1), 79–91.
- Lee, J. Y., & Spicer, A. P. (2000). Hyaluronan: A multifunctional, megaDalton, stealth molecule. *Current Opinion in Cell Biology*, 12(5), 581–586.
- Lu, P., Weaver, V. M., & Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *The Journal of Cell Biology*, 196, 395–406.
- Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J., Shen, J., Hu, X., & Han, C. (2003). Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials*, 24(26), 4833–4841.
- Madaboosi, N., Uhlig, K., Schmidt, S., Vikulina, A. S., Mohwald, H., Duschl, C., & Volodkin, D. (2018). A "cell-friendly" window for the interaction of cells with hyaluronic acid/poly-L-lysine multilayers. *Macromolecular Bioscience*, 18(2), 1700319.
- Marshall, L. E., Goliwas, F., Miller, L. M., Penman, A. D., Frost, A. R., & Berry, J. L. (2017). Flow-perfusion bioreactor system for engineered breast cancer surrogates to be used in preclinical testing. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11(4), 1242–1250.
- Narkhede, A. A., Crenshaw, J. H., Manning, R. M., & Rao, S. S. (2018). The influence of matrix stiffness on the behavior of brain metastatic breast cancer cells in a biomimetic hyaluronic acid hydrogel platform. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 106A, 1832–1841.
- Paszek, M. J., Zahir, N., Johnson, K. R., Lakins, J. N., Rozenberg, G. I., Gefen, A., ... Weaver, V. M. (2005). Tensional homeostasis and the malignant phenotype. *Cancer Cell*, 8(3), 241–254.
- Pedron, S., Becka, E., & Harley, B. A. (2013). Regulation of glioma cell phenotype in 3D matrices by hyaluronic acid. *Biomaterials*, 34(30), 7408–7417.
- Pepin, K. M., McGee, K. P., Arani, A., Lake, D. S., Glaser, K. J., Manduca, A., ... Huston, J. (2018). MR elastography analysis of glioma stiffness and IDH1-mutation status. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 39(1), 31–36.
- Picart, C., Lavalle, P., Hubert, P., Cuisinier, F. J. G., Decher, G., Schaaf, P., & Voegel, J. C. (2001). Buildup mechanism for poly(L-lysine)/hyaluronic acid films onto a solid surface. *Langmuir*, 17(23), 7414–7424.

- Polacheck, W. J., Zervantonakis, I. K., & Kamm, R. D. (2013). Tumor cell migration in complex microenvironments. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(8), 1335–1356.
- Pope, F. M., Martin, G. R., Lichtenstein, J. R., Penttinen, R., Gerson, B., Rowe, D. W., & McKusick, V. A. (1975). Patients with Ehlers-Danlos syndrome type IV lack type III collagen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(4), 1314–1316.
- Prestwich, D., Marecak, D. M., Marecek, J. F., Vercruyse, K. P., & Ziebell, M. R. (1998). Controlled chemical modification of hyaluronic acid: Synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *Journal of Controlled Release*, 53(1–3), 93–103.
- Radotra, B., & McCormick, D. (1997). Glioma invasion in vitro is mediated by CD44-hyaluronan interactions. *The Journal of Pathology*, 181(4), 434–438.
- Rao, S. S., Dejesus, J., Short, A. R., Otero, J. J., Sarkar, A., & Winter, J. O. (2013). Glioblastoma behaviors in three-dimensional collagen-hyaluronan composite hydrogels. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 5(19), 9276–9284.
- Ruoslahti, E. (1996). Brain extracellular matrix. *Glycobiology*, 6(5), 489–492.
- Simon, T., Coquerel, B., Petit, A., Kassim, Y., Demange, E., Le Cerf, D., ... Vannier, J. P. (2014). Direct effect of bevacizumab on glioblastoma cell lines in vitro. *Neuromolecular Medicine*, 16(4), 752–771.
- Sivridis, E., Giatromanolaki, A., & Koukourakis, M. I. (2004). "Stromatogenesis" and tumor progression. *International Journal of Surgical Pathology*, 12(1), 1–9.
- Slevin, M., Krupinski, J., Gaffney, J., Matou, S., West, D., Delisser, H., ... Kumar, S. (2007). Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: Uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix Biology*, 26(1), 58–68.
- Stern, R. (2005). Hyaluronan metabolism: A major paradox in cancer biology. *Pathologie Biologie (Paris)*, 53(7), 372–382.
- Streitberger, K.-J., Lilaj, L., Schrank, F., Braun, J., Hoffmann, K.-T., Reiss-Zimmermann, M., ... Sack, I. (2020). How tissue fluidity influences brain tumor progression. *PNAS*, 117(1), 128–134.
- Sung, H. W., Huang, R. N., Huang, L. L., & Tsai, C. C. (1999). In vitro evaluation of cytotoxicity of a naturally occurring crosslinking reagent for biological tissue fixation. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 10(1), 63–78.
- Sung, H. W., Liang, I. L., Chen, C. N., Huang, R., & Liang, H. F. (2001). Stability of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin). *Journal of Biomedical Materials Research*, 55(4), 538–546.
- Tammi, M. I., Day, A. J., & Turley, E. A. (2002). Hyaluronan and homeostasis: A balancing act. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 4581–4584.
- Taubenberger, A. V. (2014). In vitro microenvironments to study breast cancer bone colonisation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 79–80, 135–144.
- Thomas, V., Nozik, D., Patel, H., Singh, R. K., & Vohra, Y. K. (2015). Biohybrid fibro-porous vascular scaffolds: Effect of crosslinking on properties. *Materials Research Society Symposium Proceedings*, 1718, 79–84.
- Toole, B. P. (2004). Hyaluronan: From extracellular glue to pericellular cue. *Nature Reviews. Cancer*, 4(7), 528–539.
- Toole, B. P., Wight, T. N., & Tammi, M. I. (2002). Hyaluronan–cell interactions in cancer and vascular disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(7), 4593–4596.
- Vannier, J. P., David, L., Le Cerf, D., Dulong, V., Coquerel, B., & Demange, E. (2010). In U. D. Rouen (Ed.), *Improved crosslinked Hyaluronan hydrogels for 3D cell culture*. France.
- Vannier, J. P., & Demange, E. (2010). In U. D. Rouen (Ed.), *Method for harvesting cells cultured in 3D hydrogel matrices*. France.
- Volpi, N., Galeotti, F., Yang, B., & Linhardt, R. J. (2014). Analysis of glycosaminoglycan-derived, precolumn, 2-aminoacridone-labeled disaccharides with LC-fluorescence and LC-MS detection. *Nature Protocols*, 9(3), 541–558.
- Walimbe, T., Calve, S., Panitch, A., & Sivasankar, M. P. (2019). Incorporation of types I and III collagen in tunable hyaluronan hydrogels for vocal fold tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, 87, 97–107.
- Wang, C., Tong, X., & Yang, F. (2014). Bioengineered 3D brain tumor model to elucidate the effects of matrix stiffness on glioblastoma cell behavior using PEG-based hydrogels. *Molecular Pharmaceutics*, 11(7), 2115–2125.
- Yu Y, Feng R, Li J, Wang Y, Song Y, Tan G, Liu D, Liu, W, Yang., Pan H, and Li S. A hybrid genipin-crosslinked dual-sensitive hydrogel/nanostructured lipid carrier ocular drug delivery platform. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(4), 2019, 423–434.
- Zhang, L., Kuifeng, L., Xiao, W., Zheng, L., Xiao, Y., Fan, H., & Zhang, X. (2011). Preparation of collagen–chondroitin sulfate–hyaluronic acid hybrid hydrogel scaffolds and cell compatibility in vitro. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 118–125.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Bonnesœur S, Morin-Grognon S, Thoumire O, et al. Hyaluronan-based hydrogels as versatile tumor-like models: Tunable ECM and stiffness with genipin-crosslinking. *J Biomed Mater Res*. 2020;108A:1256–1268. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36899>

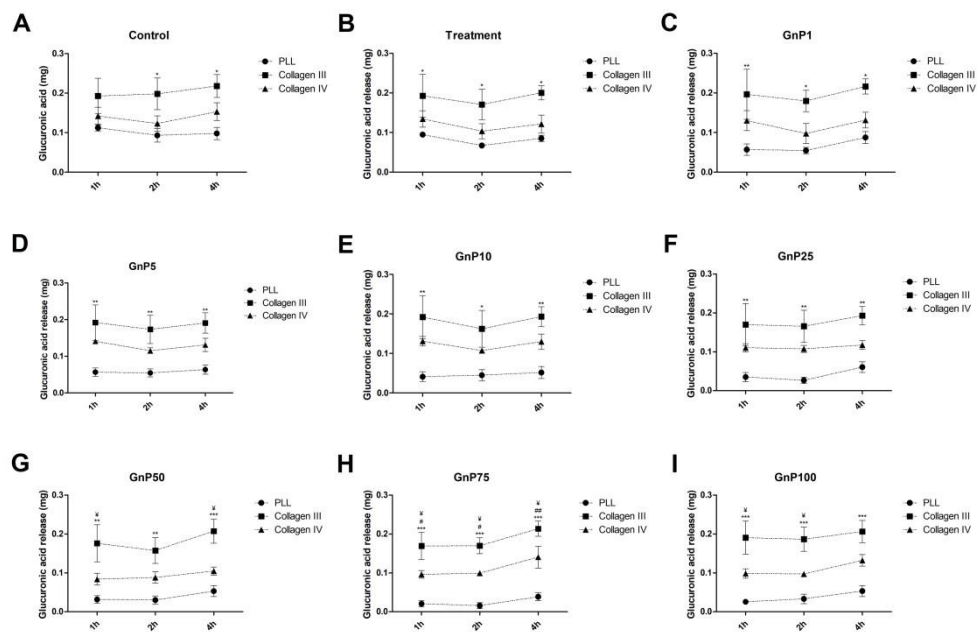


Figure S1: Glucuronic acid release after hyaluronidase degradation (mg). Results are presented one treatment vs another. * Significance between PLL and type III collagen treatment, # between PLL and type IV collagen treatment and ¥ between type III and type IV collagen treatment. Results are presented as the mean $\pm$ SEM and statistical significance was determined as *** < 0.001 , ** < 0.01 , * < 0.05 , $n=3$.

281x188mm (300 x 300 DPI)

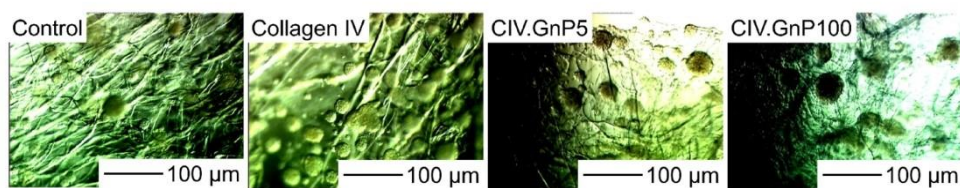


Figure S2: Representative optical images of CB74 cells cultured in contact with Control, and with type IV collagen pre-treatment (Collagen IV) and post treated with GnP5 and GnP100 (CIV.GnP5 and CIV.GnP100, respectively) after 7 days of culture. Scale bar: 100 μm.

142x32mm (300 x 300 DPI)

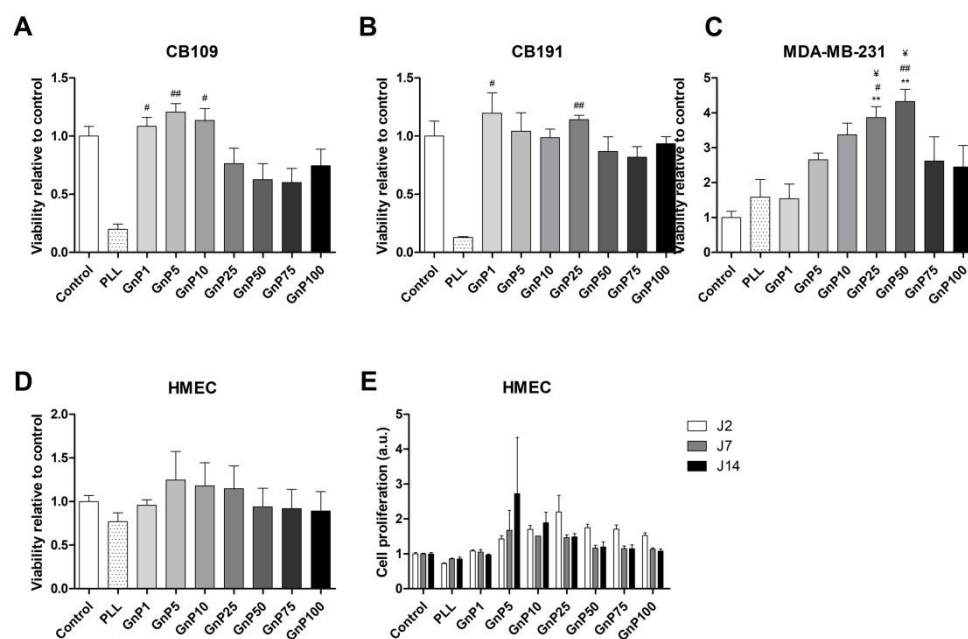


Figure S3: Viability of various cancer cell lines (CB109 and CB191 glioblastoma lines (n=1), MDA MB 231 breast cancer line (n=1), and endothelial cells (HMEC, n=3)), cultured for 7 days in contact with control and PLL-treated hydrogels, crosslinked with GnP1, GnP5, GnP10, GnP25, GnP50, GnP75, and GnP 100. Proliferation assay was realized twice on HMEC (n=2). * represents significance towards corresponding control, # towards PLL treatment only and ¥ towards P.GnP1 condition. Results are displayed as the mean $\pm$ SEM and statistical significance was set as * < 0.05 , ** < 0.01 .

264x176mm (300 x 300 DPI)

II. Résultats complémentaires

In vivo, les cellules interagissent avec leur microenvironnement mais également avec d'autres types cellulaires voisins. Dans la volonté de mimer cet aspect-là, les cellules de glioblastomes ont été co-cultivées avec des cellules endothéliales. Les cellules endothéliales sont précisément des partenaires de choix pour les cellules de glioblastomes car elles ont une action sur leur activité. En effet, les gliomes font partie des cancers les plus agressifs [159]. Les cellules de glioblastomes secrètent du *vascular endothelial growth factor* (VEGF), le principal facteur de croissance qui entraîne la néo-angiogenèse de nouveaux vaisseaux pour subvenir aux besoins de la tumeur en oxygène ou en nutriments [116].

Nous utiliserons ici la nomenclature qui figure dans l'article (Table 1.).

1. Cellules endothéliales seules

a. Viabilité et prolifération cellulaire

L'effet de la réticulation à la GnP sur les cellules endothéliales est présent mais moins marqué que sur les cellules de glioblastomes (Figure 36). Le traitement des hydrogels à la PLL entraîne une faible diminution de la viabilité cellulaire qui est restaurée avec la réticulation à la condition P.GnP1. L'influence de la réticulation est plus marquée pour les conditions P.GnP5 et P.GnP10 à partir desquelles la viabilité décroît jusqu'à atteindre des valeurs similaires aux conditions PLL et témoin. Avec le traitement au collagène de type III, les valeurs obtenues sont en dents de scie : la viabilité semble augmenter entre les conditions témoins et CIII.GnP5 puis atteint son minimum à la condition CIII.GnP25 avant de remonter jusqu'à la condition CIII.GnP100. L'utilisation du collagène de type IV pour traiter les hydrogels n'a pas permis d'obtenir d'effet significatif entre les différentes conditions. Cependant, nous observons une

tendance plus franche et similaire à celle obtenue avec le collagène de type III. La comparaison des différents traitements nous a permis de noter une meilleure viabilité cellulaire avec le collagène de type IV pour les réticulations aux plus fortes concentrations (CIV.GnP75 et CIV.GnP100).

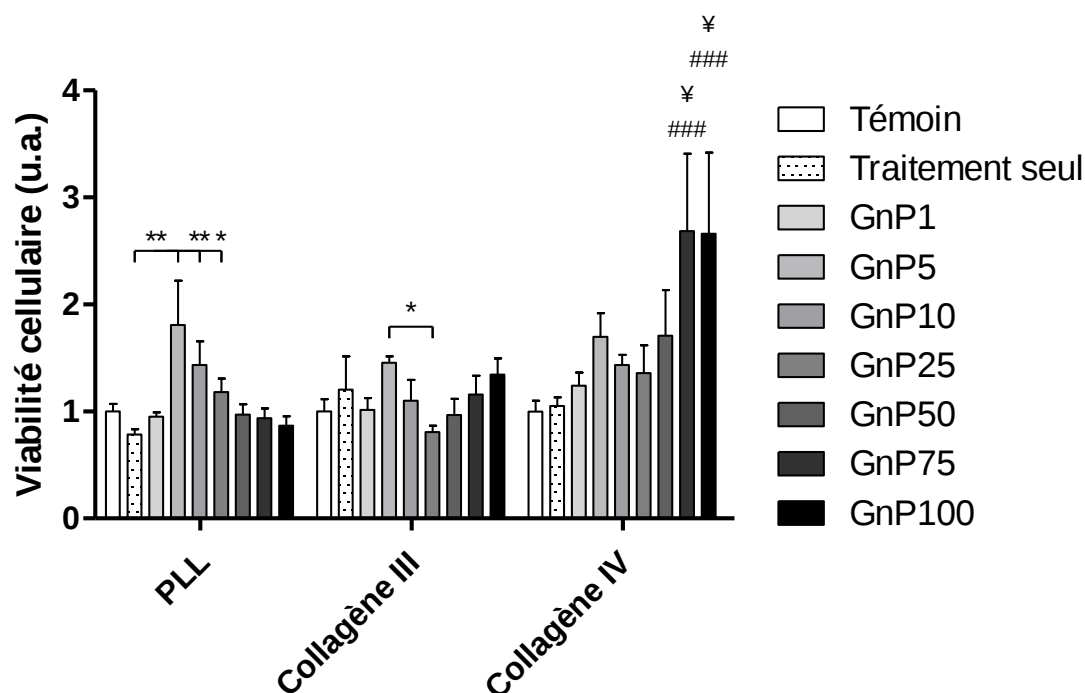


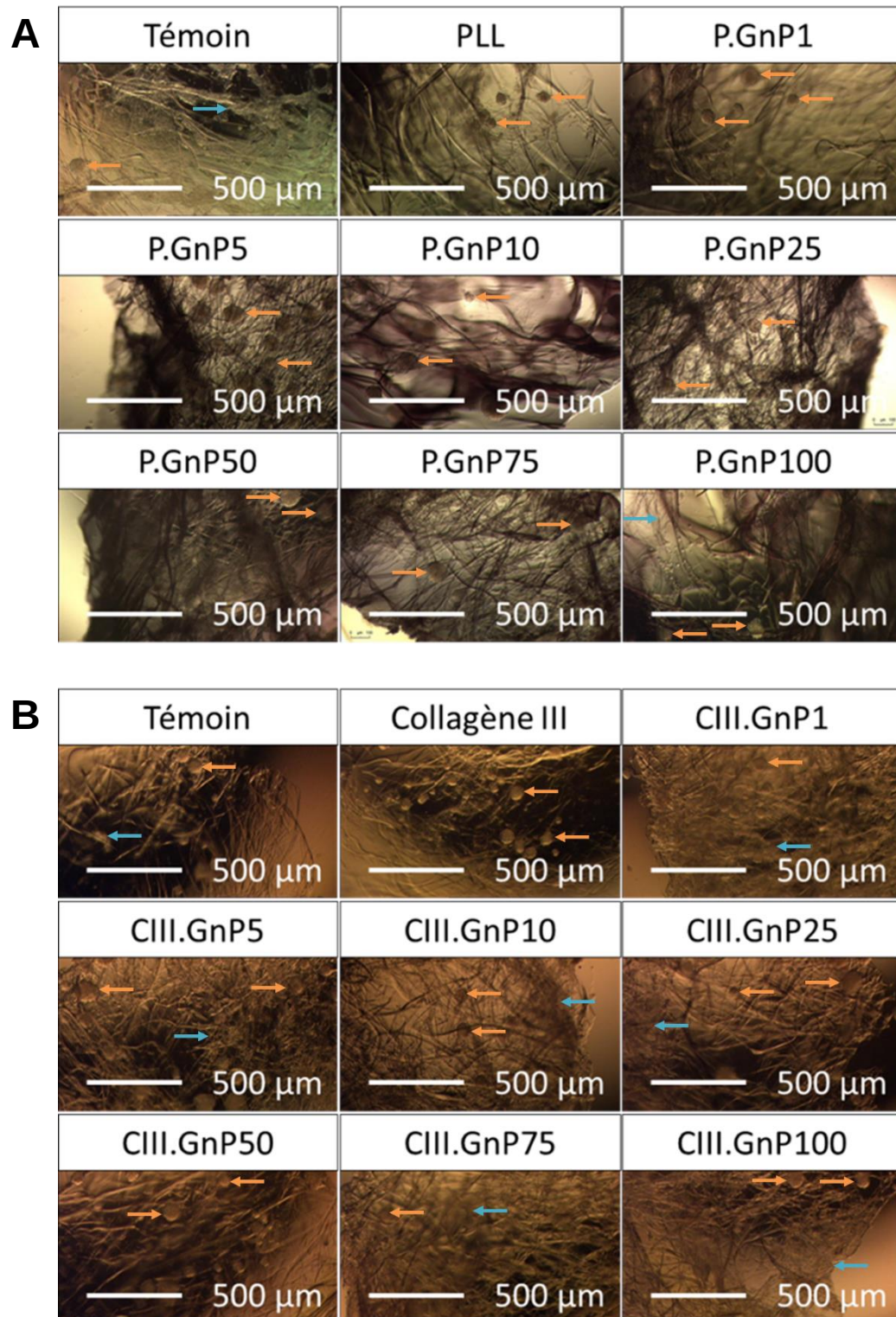
Figure 36 : Viabilité cellulaire des HMEC-1 à 14 jours de culture en 3D.

Les cellules ont été cultivées dans des hydrogels traités à la PLL, le collagène de type III ou IV et réticulés à la GnP (GnP1 à GnP100). La viabilité a été déterminée avec le *Cell Counting kit-8* après 14 jours de culture. * indique une différence significative dans la même catégorie de traitement, # entre PLL et le collagène de type IV et ¥ entre les collagènes de type III et IV. * < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.001 (n=3 pour le traitement à la PLL, n=2 pour le traitement au collagène de type IV et n=1 pour le traitement au collagène de type III).

b. Étude morphologique

Un cliché de chaque hydrogel a été réalisé lors des tests de viabilité au *Cell Counting kit-8* (Figure 37). À l'observation, nous remarquons que les cellules endothéliales présentent également une organisation en sphéroïdes mais aussi sous forme de plages cellulaires qui tapissent l'hydrogel et ses fibres. Pour la plupart, ces « tapis » cellulaires sont localisés en surface tandis que les sphéroïdes sont présents également dans le maillage de l'hydrogel. La

présence de ces plages cellulaires ne semble pas dépendre de la condition. En effet, elles sont retrouvées pour chaque condition mais pas nécessairement sur tous les répliquats.



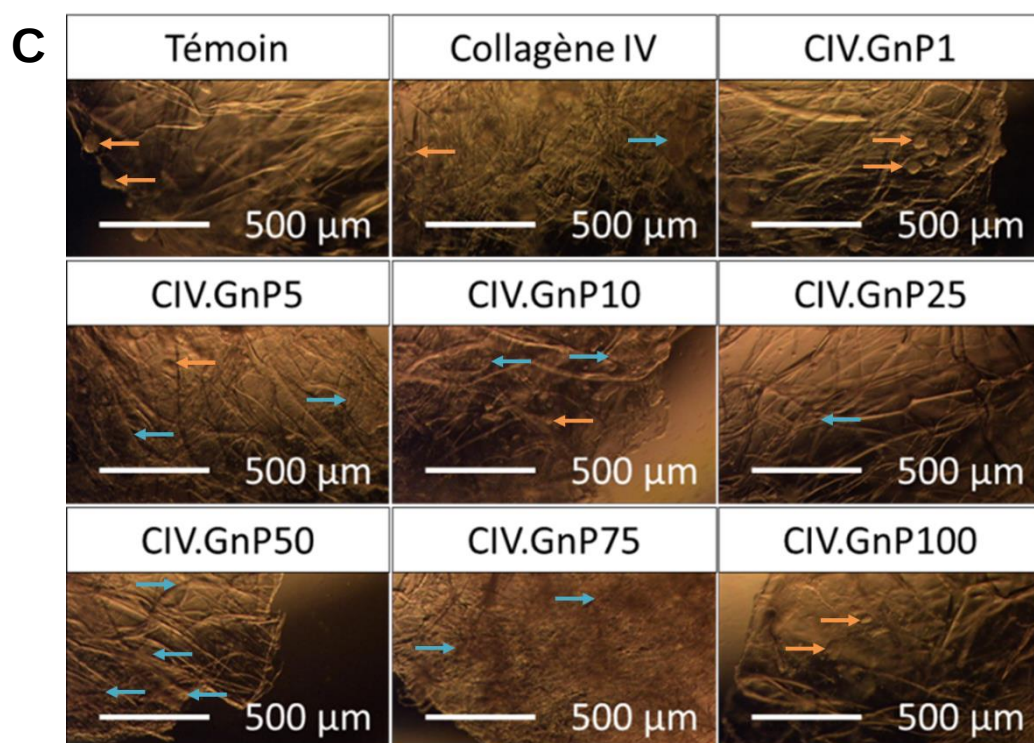


Figure 37 : Observation au microscope des hydrogels après 14 jours de culture des cellules HMEC-1.

Les cellules ont été cultivées dans des hydrogels traités à la PLL (A), le collagène de type III (B) ou IV (C) et réticulés à la GnP (GnP1 - GnP100). Les flèches oranges indiquent les sphéroïdes et les bleues les plages cellulaires. Les photographies ont été réalisées avec le microscope Axiovert 135 (Zeiss®).

2. Co-culture des cellules de glioblastomes et endothéliales

Les cellules endothéliales sont des partenaires très intéressants pour les cellules de glioblastomes. En effet, les glioblastomes sont des tumeurs très vascularisées qui ont des rapports privilégiés avec les cellules endothéliales du fait de leur sécrétion commune de VEGF. Des expérimentations de co-culture cellulaire ont déjà été réalisées au sein de notre modèle. Dans ce travail, les cellules tumorales se rassemblaient autour des cellules endothéliales [135]. L'objectif de la co-culture glioblastomes/cellules endothéliales était d'évaluer l'impact sur la prolifération des cellules de glioblastomes ainsi que leur organisation par rapport aux cellules endothéliales.

Quel que soit le protocole d'ensemencement utilisé, nous n'avons pas observé de variations significatives entre les différentes conditions. De même, nous n'avons pas remarqué de différence significative entre les protocoles avec mise en culture séquentielle ou simultanée (Figure 38).

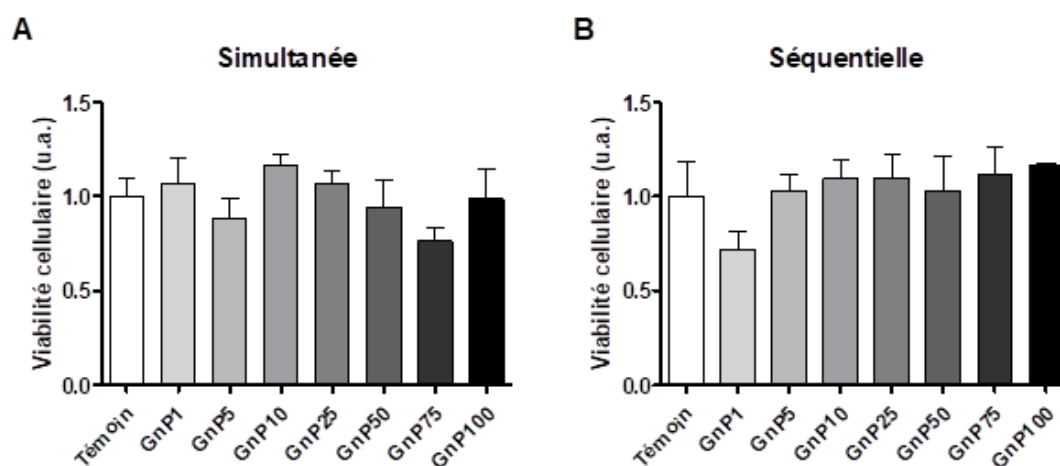


Figure 38 : Test de viabilité cellulaire sur les lignées CB74 et HMEC-1

La viabilité a été déterminée avec le *Cell Counting kit-8* après 7 jours de culture simultanée (A) ou 14 jours de culture séquentielle (B) dans les hydrogels BIOMIMESYS® Brain réticulés à la GnP1 à GnP100 (n=1).

Pour visualiser l'organisation cellulaire au sein de l'hydrogel, les cellules ont été marquées avec le traceur fluorescent *Qtracker™ 565 Cell Labeling Kit* (Figure 39). Les clichés réalisés ne nous ont pas permis de conclure ; en effet, la quantité de traceur résiduelle dans les cellules de glioblastomes était trop faible.

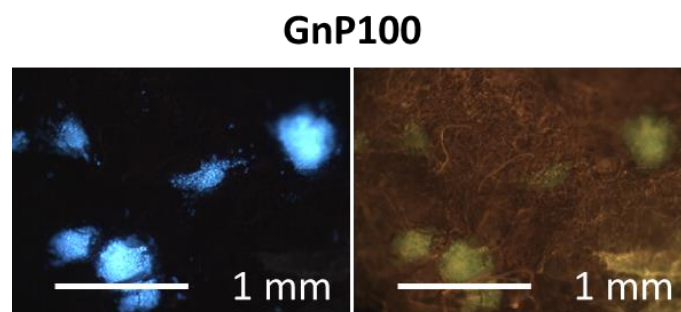


Figure 39 : Co-culture des lignées CB74 et HMEC-1.

La totalité des cellules a été marquée au DAPI (bleu) en fin de culture et les cellules de glioblastomes avaient été incubées avec un traceur cellulaire avant d'être ensemencées (vert). La GnP est visible sur la photographie de droite du fait de son auto-fluorescence (rouge).

3. Culture de cellules souches hématopoïétiques

Les CSH, lorsqu'elles ne sont pas circulantes, évoluent au sein de leur niche située dans la moelle osseuse. Tout comme notre support de culture, la MEC de cette niche est riche en AH, c'est pourquoi notre hydrogel semble être un outil de choix pour la culture des CSH qui possèdent les récepteurs principaux de l'AH à leur surface : CD44 et RHAMM [150]. En effet, en comparant à la culture 2D, une augmentation de la prolifération des CSH a été observée dans notre modèle [115]. Nous avons pensé pouvoir apporter une amélioration de la prolifération des CSH grâce à la réticulation. Avec la GnP, notre objectif était de nous rapprocher de la rigidité dont les CSH font l'expérience dans leur niche *in vivo*.

a. Viabilité cellulaire

Les résultats obtenus montrent que la réticulation à la GnP des hydrogels n'apporte aucun bénéfice du point de vue de la viabilité cellulaire (Figure 40). Au contraire, la GnP en forte concentration (GnP100) semble avoir un effet négatif vraisemblablement annulé par la *StemRegenin 1* (SR1).

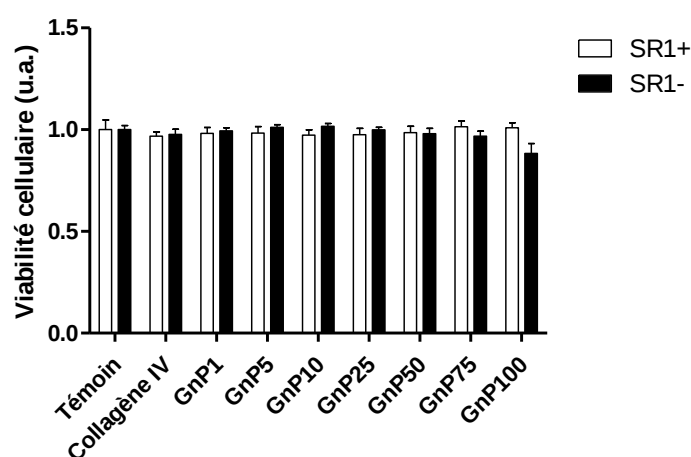


Figure 40 : Test de viabilité cellulaire sur les cellules mononuclées.

Les CMN ont été mises en culture dans les hydrogels suite à leur décongélation. Les hydrogels utilisés ont été traités au collagène de type IV et réticulés avec la GnP (GnP1 - GnP100). La moitié des hydrogels a été incubée en présence de SR1 (SR1+) (n=2).

b. Étude morphologique

Une fraction de la suspension cellulaire a été utilisée pour réaliser des tests clonogéniques directement après la décongélation afin de s'assurer de la présence de CSH dans notre échantillon et de la conservation de leur capacité à former des colonies. Aucune colonie n'a été observée dans les gels de culture. Les tests clonogéniques post-culture ont été réalisés avec les cellules ensemencées dans les hydrogels (Figure 41). Nous avons observé peu de colonies dans les hydrogels et, lorsqu'elles étaient présentes, elles étaient de petite taille. Les colonies ont pu être visualisées de façon ponctuelle : elles n'étaient pas présentes pour chaque condition et absentes d'un réplicat à l'autre. Trois types de colonies de progéniteurs hématopoïétiques ont pu être identifiés grâce à des critères morphologiques : (i) les *colony forming unit granulocyte-macrophage* (CFU-GM) sont des colonies incolores et les cellules qui les composent sont facilement individualisées lors de l'observation, (ii) les *burst forming unit erythrocyte* (BFU-E) sont des colonies d'apparence rouge ou marron qui contiennent des cellules que l'on peut difficilement dénombrer et (iii) les *colony forming unit erythrocyte* (CFU-E) possèdent des caractéristiques similaires aux BFU-E mais les colonies formées sont plus petites.

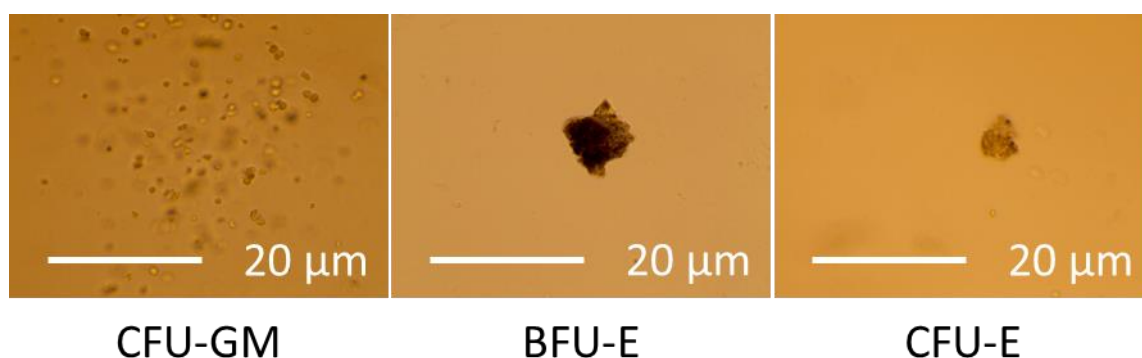


Figure 41 : Colonies issues des tests clonogéniques.

Les CMN cultivées dans les hydrogels ont été récupérées suite à une digestion enzymatique et remises en culture pendant 14 jours dans un milieu gélifié pour les tests clonogéniques. Les colonies formées ont pu être identifiées grâce à des critères morphologiques.

DISCUSSION

Dans cette partie, les figures soulignées font référence aux illustrations de l'article.

I. Caractérisation des hydrogels et de leurs traitements

La PLL est un polypeptide constitué par la répétition de résidus lysine comportant chacun une fonction amine primaire qui est nécessaire à la fixation de la GnP. Nous avons donc utilisé la PLL pour servir de pré-traitement des hydrogels afin de permettre par la suite une réticulation plus importante à la GnP en suivant le protocole de Gaudière et coll. [160]. Conformément à ce que nous attendions, le traitement à la PLL offre plus de groupements amines primaires libres que le traitement des hydrogels au collagène de type III ou IV (Figure 1). Le test à la ninhydrine est une technique simple et sensible de quantification des groupements amines libres mais ce n'est pas le seul moyen de déterminer le degré de réticulation. Il est possible de l'évaluer en mesurant le taux de gonflement du support réticulé ou SR, les propriétés mécaniques, la résistance à la dégradation enzymatique et la température de dénaturation des supports réticulés [161].

1. Caractérisation physico-chimique

La coloration bleue d'intensité croissante observée après traitement des hydrogels par des concentrations croissantes de génipine ainsi que l'imagerie au microscope à fluorescence nous permettent de nous assurer de l'efficacité de la réticulation de nos hydrogels (Figure 4 et 7). En effet, non liée, la génipine demeure transparente mais lorsqu'elle est fixée de façon covalente à des groupements amines primaires, elle devient bleue dans la lumière visible et produit une auto-fluorescence rouge lorsqu'elle est observée en microscopie à fluorescence. Elle possède

en effet des propriétés spectrales analogues à celles d'autres fluorophores comme la Rhodamine [162].

Compte tenu du grand nombre de groupements NH_2 libres qu'offre la PLL, nous pensions obtenir un SR proportionnellement plus faible par rapport au degré de réticulation. En effet, la réticulation vise précisément à rigidifier la structure d'un support et à réduire sa compliance. Donc, selon notre hypothèse, plus un hydrogel est réticulé, moins il est apte à gonfler en présence d'eau. De plus, la PLL est également caractérisée par sa nature hydrophobe, du fait de la présence de quatre groupements CH_2 dans sa chaîne latérale, ce qui est incompatible avec une grande capacité de rétention d'eau [163]. Notre hypothèse s'est révélée en partie juste : (i) nous avons observé des SR globalement moins élevés pour les hydrogels traités à la PLL et faiblement réticulés que pour ceux traités au collagène et (ii) une diminution significative du SR pour les conditions de réticulation les plus faibles (GnP1 pour les hydrogels traités aux collagènes et GnP5 pour ceux traités à la PLL) suivie d'une augmentation à partir de la condition GnP25 quel que soit le traitement préalable (Figure 6). Il est possible que la diminution du SR pour les faibles conditions de réticulation soit due au caractère hydrophobe de la GnP, repoussant ainsi les molécules d'eau [164]. Tandis que l'augmentation du SR pour les fortes conditions de réticulation a déjà été observée dans une autre étude et peut s'expliquer par la création de pores plus petits lors de la réticulation à la GnP, emprisonnant ainsi les molécules d'eau lors de l'expérimentation [165], nos résultats de MEB viennent précisément appuyer ces observations car nous avons constaté la présence de pores de taille réduite par rapport aux conditions de réticulation plus faibles (Figure 2).

2. Caractérisation mécanique

Nous avons utilisé la microscopie à force atomique ou AFM pour étudier les propriétés mécaniques de l'hydrogel, quelles que soient les conditions de traitement et de réticulation. Grâce à la technique de nano-indentation AFM, nous avons pu déterminer le module d'élasticité (Young) et définir la rigidité de nos hydrogels. Globalement, quel que soit le traitement, la réticulation des hydrogels avec de faibles concentrations de GnP n'a pas sensiblement augmenté la rigidité des hydrogels. Cependant, pour les concentrations de GnP modérées à fortes (P.GnP50 à 100, CIII.GnP50 à 100 et CIV.GnP75 et 100), nous avons observé une augmentation significative de la rigidité des hydrogels réticulés par rapport aux hydrogels témoins (Figure 4).

Parmi les différentes techniques de mesure des propriétés mécaniques, duromètre, rhéomètre ou encore appareils de traction et compression permettent d'obtenir des caractéristiques à l'échelle macroscopique. Nous avons choisi la nano-indentation par AFM, afin de déterminer l'élasticité à l'échelle nanométrique et sur toute la longueur de l'échantillon, quelle que soit la nature de son milieu (liquide ou semi-solide). En effet, la rigidité d'un matériau dépend de multiples facteurs, internes ou externes à l'échantillon (taille, température). L'utilisation de la nano-indentation permet de réduire l'influence de ces différents paramètres de façon plus importante que la micro-indentation. De plus, en nano-indentation, l'analyse se fait en temps réel et sans détérioration de l'échantillon. Néanmoins, l'utilisation d'une sonde pointue peut poser problèmes si l'échantillon est poreux. Dans ce cas, il est possible d'utiliser une sonde de forme sphérique et le modèle d'analyse correspondant (Hertz) [166–168].

3. Caractérisation biochimique

Nous avons utilisé le test du carbazole pour l'étude de la résistance à la dégradation enzymatique des hydrogels. Ici, ce test permet de mesurer la quantité d'acide glucuronique relargué par l'action de l'enzyme Hase. Logiquement, la réticulation à la GnP doit entraver et donc protéger les hydrogels de la dégradation et ce, de façon plus importante lorsque les hydrogels sont traités préalablement par la PLL, pourvoyeuse de nombreux groupement NH_2 nécessaires à la fixation de la GnP. Les résultats que nous avons obtenus vont dans ce sens. En effet, la quantité d'acide glucuronique dans le surnageant (i) augmentait dans le temps, (ii) était inversement proportionnelle à la concentration de la GnP utilisée pour la réticulation et (iii) était moins importante pour les hydrogels traités à la PLL avant la réticulation ([Figure 3 et S1](#)). Néanmoins, nous avons été surpris par la diminution significative d'acide glucuronique détecté pour la condition PLL entre 1 h et 2 h d'incubation avec l'enzyme : normalement la quantité ne peut qu'augmenter avec le temps. Cela peut s'expliquer par une mauvaise homogénéisation avant pipetage. De plus, l'absence de différence significative ou tendance pour les hydrogels traités au collagène de type III est également surprenante. En effet, d'autres expérimentations [AFM, SR et LIVE/DEAD® (résultats non présentés)] attestent de la réticulation à la GnP mais, dans le test au carbazole, elle ne semble pas avoir joué de rôle protecteur face à la Hase ([Figure 4 et 6](#)). Par ailleurs, à tous les temps de l'expérimentation et pour toutes les conditions, le traitement des hydrogels au collagène de type IV semble plus protecteur que celui au collagène de type III. Nous pensons que cela est due à la capacité d'auto-polymérisation du collagène de type IV qui permet de créer un maillage plus fort et résistant donc une structure plus stable autour de l'hydrogel d'acide hyaluronique (AH). En effet, les domaines globulaires terminaux du collagène de type IV permettant son auto-polymérisation sont absents chez le collagène de type III ([Figure 3](#)) [16].

Nos résultats de calorimétrie différentielle à balayage ou DSC n'ont pas montré de différence significative de profils thermiques entre les différentes conditions extrêmes d'expérimentation : conditions témoin, traitement seul, GnP1 et GnP100 ([Figure 5](#)). Il s'agit pourtant d'une technique précise qui permet également de vérifier l'efficacité d'une réticulation en appréciant la température de dénaturation : plus la température de dénaturation est forte et plus la réticulation est importante [161]. En effet, dans une revue de la littérature de Sorushanova et coll., il a été montré que la réticulation dans sa globalité et notamment à la GnP, permet d'augmenter la température de plusieurs types de biomatériaux à base de collagène d'origines animales différentes [169]. La température de dénaturation des collagènes et de l'acide hyaluronique étant inférieure à 60 °C, il serait intéressant de reproduire ces expérimentations à plus basse température pour compléter et confirmer les résultats d'AFM et des tests à la ninhydrine et au carbazole [170–172]. À noter que la réticulation par la GnP s'opère à la surface des hydrogels, sur la PLL ou les collagènes. Il est probable que la technique ne soit pas suffisamment sensible pour détecter une réticulation qui s'est produite seulement en surface des pores.

II. Effet biologique

Après avoir caractérisé les différentes propriétés des hydrogels, nous avons évalué leur impact sur la viabilité et la prolifération de différents types cellulaires et lignées.

1. Différents traitements

Globalement, nos résultats montrent que le traitement des hydrogels par la PLL seule (avant réticulation), malgré sa biocompatibilité, ne promeut pas la survie, ni la prolifération cellulaire ([Figure 7, 8, S3](#) et [Figure 35](#)) [163]. Il est possible qu'en traitant les hydrogels, la PLL ait masqué les sites de fixation de l'AH à ses récepteurs membranaires CD44 présents à la

surface de tous les types cellulaires que nous avons étudiés, empêchant ainsi l'adhésion cellulaire [20,115,173,174]. Toutefois, nous avons également observé que la réticulation à la GnP rétablit la viabilité cellulaire. Par conséquent, nous pouvons supposer que la GnP rétablit dans le même temps la capacité d'adhésion des cellules à l'hydrogel. En effet, il a été montré dans les travaux de Hwang et coll. que la GnP a des propriétés bio-adhésives et peut servir de colle biologique [162]. La combinaison AH/PLL a été étudiée majoritairement dans le modèle de multicouches de polyélectrolytes (films LbL) car elle présente une caractéristique particulière : outre son biomimétisme, elle permet une croissance exponentielle du film. Il faut donc moins de couches successives d'AH et de PLL pour obtenir l'épaisseur de film attendue qu'avec une autre association de (bio)polymères à croissance linéaire [175]. Les résultats du travail de Chang et coll. ont montré que les films AH/PLL permettaient une adhésion des cellules endothéliales satisfaisante, leur prolifération ainsi que l'expression de protéines caractéristiques de ce type cellulaire [176]. Avant eux, sur un modèle identique, Monteiro et coll. ont observé que les kératinocytes présentaient une adhésion au contraire plutôt limitée [177]. Néanmoins, pour un même type cellulaire, Madaboosi et coll. ont pu noter une absence d'adhésion sur ce modèle lorsque le nombre de couches était trop important [178]. Il est à noter que plus le nombre de couches augmente, plus le film LbL s'hydrate car l'AH, comme tous les GAG, a une très forte capacité de rétention d'eau [179]. À partir de ces observations, nous pouvons supposer que l'association AH/PLL est favorable selon le type cellulaire utilisé en culture. En effet, nous avons constaté un effondrement de la viabilité pour les lignées de glioblastomes mais pas pour la lignée MDA-MB-231 de cellules de cancer du sein par exemple. Par ailleurs, dans un modèle plus similaire au nôtre (un hydrogel d'AH fonctionnalisé avec plusieurs bicouches AH/PLL), Yamanlar et coll. ont noté une adhésion importante de fibroblastes, proportionnelle au nombre de couches [180]. Il pourrait être intéressant de

remplacer la PLL par des motifs peptidiques d'adhésion RGD. En effet, l'arginine est un autre résidu comportant un groupement NH_2 libre ; il serait donc capable de fixer la GnP tout en promouvant l'adhésion cellulaire au support.

Nos résultats de viabilité et de prolifération relatifs aux hydrogels traités au collagène de type III ou IV montrent que le traitement avec ces protéines matricielles promeut la survie cellulaire (Figure 7, 8 et Figure 35). C'est un résultat auquel nous nous attendions car il s'agit de protéines avec lesquelles les cellules vont interagir naturellement *in vivo* et David et coll. en ont déjà fait l'expérience auparavant [20]. En effet, pour la lignée CB191 de glioblastomes, les auteurs avaient observé un nombre de colonies plus élevé après 5 jours de culture au sein d'hydrogels traités au collagène de type III ou IV comparativement aux hydrogels témoins ; l'effet était d'autant plus marqué pour hydrogels traités au collagène de type III. Pourtant, nos résultats montrent une viabilité et une prolifération cellulaire plus importantes pour les hydrogels traités au collagène de type IV. Nous pouvons expliquer cette différence de résultats par la différence des lignées utilisées. En effet, les lignées CB74 et CB191 ne présentent pas les mêmes récepteurs à leurs surfaces, c'est le cas pour le VEGF-R par exemple ; les cellules CB74 expriment le VEGF-R1 et CB191 le VEGF-R2 [116]. Dans cette même logique, il est tout à fait possible que la lignée CB74 ne dispose pas de récepteurs à sa surface, capables de fixer le collagène de type III. Par ailleurs, le glioblastome est une forme de cancer très agressive du fait de sa grande capacité d'invasion. En effet, les cellules de glioblastomes expriment et secrètent les MMP2 et 9, deux enzymes connues pour dégrader le collagène et aboutir à la formation de matrikines du collagène (Tableau 2). Cependant, les effets biologiques connus des matrikines du collagène de type IV (pas d'informations pour le collagène de type III) sont globalement anti-angiogéniques et antitumoraux et n'ont pas été observés ici : nous n'avons

pas relevé de diminution significative de la viabilité ou de la prolifération des hydrogels traités au collagène par rapport aux témoins.

Il a été montré dans la littérature que la GnP induit l'apoptose de cellules cancéreuses et notamment des cellules de glioblastomes. Cependant, comme nous l'avons dit précédemment, dans notre modèle, la réticulation à la GnP rétablit la viabilité cellulaire et promeut la prolifération ([Figure 7 et 8](#)). Cette divergence des résultats peut s'expliquer par la différence des modèles utilisés. Dans l'étude de Ahani et coll., les cellules de glioblastomes ont été cultivées en 2D et la GnP a été ajoutée dans le milieu de culture dans des concentrations 1 000 fois plus faibles. Contrairement à notre travail, les cellules ont été exposées directement à de la GnP non réticulée et donc libre d'exercer son action biologique [144]. Il est à noter que nous avons tenté d'utiliser la GnP directement dans le milieu de culture pour vérifier son effet biologique en solution, mais le milieu virait au bleu. En effet, la GnP a la capacité de se lier de façon covalente à tout élément contenant des amines primaires, ce qui est le cas de nombreuses protéines contenues dans le sérum utilisé pour compléter les milieux de culture. Nous avons donc abandonné l'idée d'utiliser la GnP en solution comme possible contrôle.

2. Différents types cellulaires

Nous le disions plus haut, le glioblastome est caractérisé par sa grande capacité d'invasion du tissu cérébral sain et notamment de la membrane gliale composée principalement de collagène de type IV. Aussi, nos résultats concernant la lignée de glioblastome CB74 indiquant que le traitement au collagène de type IV permet une viabilité et une prolifération plus importante que les autres traitements, ne sont pas surprenant ([Figure 7 et 8](#)) [181].

Nos résultats de culture avec les cellules endothéliales HMEC-1 montrent (i) que la réticulation avec la GnP5, quel que soit le traitement, est plus adaptée à la survie cellulaire et

(ii) qu'il n'y a pas de différence d'efficacité entre les traitements sauf pour les conditions CIV.GnP75 et 100 bien qu'en ayant obtenu des écarts-types important ([Figure S3](#) et [Figure 35](#)). Nous ne nous attendions pas à de tels résultats car, premièrement, dans le modèle multicouches, l'association AH/PLL est connue pour permettre l'adhésion des cellules endothéliales quelle que soit la rigidité du film et, deuxièmement, *in vivo*, les cellules endothéliales reposent sur la lame basale principalement composée de collagène de type IV [8,176]. Pour autant, les scores de viabilité pour ces deux traitements ne sont pas particulièrement plus avantageux en termes de survie cellulaire.

Partant de ces résultats, nous avons choisi le traitement au collagène IV pour la co-culture CB74/HMEC-1, deux types cellulaires entretenant des rapports étroits. Nous avons expérimenté deux modes de culture de ces lignées : avec (i) un ensemencement simultané accompagné d'une culture de sept jours et (ii) un ensemencement séquentiel : les cellules endothéliales d'abord pour les sept premiers jours de culture puis les cellules de glioblastomes pour une culture de sept jours supplémentaires. Nous n'avons pas observé de différence entre les deux modes de cultures ou entre les différentes conditions et nous n'avons pas réussi à différencier les deux types cellulaires en imagerie dans les hydrogels ([Figure 37](#) et [38](#)). Lors de ces expérimentations, nous avons utilisé les hydrogels BIOMIMESYS® Brain composée d'AH et de collagène de type IV réticulés ensemble. Ces hydrogels lyophilisés doivent être réhydratés directement avec la suspension cellulaire mais nous les avons d'abord réticulés à la GnP. Se faisant, il est possible que nous ayons réduit l'invasion cellulaire du support en diminuant la taille des pores par exemple, ce qui expliquerait nos résultats ainsi que l'absence de tendance même non significative. Il serait intéressant de reproduire ces expérimentations au sein de notre modèle d'hydrogel d'AH en revoyant les concentrations de marqueurs fluorescents.

Les résultats de viabilité avec les cellules cancéreuses mammaires de la lignée MDA-MB-231 illustrent une tendance que nous n'avons pas observée avec les autres lignées utilisées. En effet, il semble y avoir un effet positif de la réticulation sur la viabilité cellulaire, proportionnel à la concentration de la GnP, significatif pour les conditions P.GnP25 et 50 puis qui chute brutalement ([Figure S3](#)). Nous supposons que le déclin soudain de la viabilité dans les conditions de réticulation les plus fortes est en lien avec la formation de pores de plus petites tailles observés en MEB ([Figure 2](#)). Il est possible que, dans un volume limité, les cellules n'aient pas eu assez de place pour établir de colonies et proliférer. En réticulant avec des concentrations croissantes de GnP, nous avons observé une augmentation significative du module d'Young, notamment pour les hydrogels traités à la PLL ([Figure 4](#)). Grâce aux travaux de Chen et coll., nous savons que la rigidité du tissu mammaire cancéreux est plus élevée que celle du tissu sain [182]. Il est probable qu'en cultivant dans des conditions de rigidité plus élevée, les cellules MDA-MB-231 retrouvent un environnement plus propice à leur prolifération tant que la surface des pores est satisfaisante.

La culture de CSH au sein de notre modèle présente un intérêt du fait de travaux précédents montrant une densité cellulaire et un nombre de colonies plus importants qu'en culture 2D [115]. Afin d'évaluer les effets biologiques de la réticulation des hydrogels sur les CSH, nous avons mis en culture des CMN issues de prélèvements de sang du cordon dans des hydrogels traités au collagène de type IV et réticulés à la GnP. Pour nous assurer de la présence de CSH, nous avons réalisé des tests clonogéniques avec une fraction de la suspension cellulaire utilisée pour l'ensemencement de nos hydrogels. Cependant, nous n'avons pas observé la présence de colonies dans les tests clonogéniques ou dans les hydrogels mis en culture. En effet, sans contrôle négatif, le test de viabilité réalisé ici n'atteste pas de la présence des cellules dans nos hydrogels où, par ailleurs, nous n'avons pas relevé de différence entre les différentes

conditions de réticulation (Figure 39). Nous avons néanmoins réalisé d'autres tests clonogéniques, avec succès, à partir d'un hydrolysât de tous nos hydrogels réunis pour augmenter nos chances d'observer des colonies (Figure 40). Les résultats de ces tests clonogéniques sont difficilement interprétables du fait de la présence anecdotique des colonies. Les CSH ne représentent qu'une faible proportion d'une suspension cellulaire obtenue à partir de sang du cordon (0.02 % à 1.43 %) [183]. Il est possible que la fraction cellulaire utilisée pour les premiers tests clonogéniques n'en contenait pas et que, sur la suspension totale, très peu de cellules aient résisté à la décongélation. À noter que le bénéfice de l'utilisation de la SR1 supposée améliorer la capacité de prolifération des CSH n'a pas été observé lors de nos expérimentations. Toutefois, la culture de cellules primaires est moins aisée que la culture de lignées cellulaires, surtout lorsque que les cellules ont subi les processus de congélation/décongélation qui les affaiblissent et peuvent conduire à une perte de phénotype cellulaire tel que le caractère souche : auto-renouvellement et potentiel de différenciation [184]. De plus, le temps de culture était relativement court. Une culture à plus long terme aurait sans doute permis de relever des différences entre les différentes conditions.

CONCLUSION – PERSPECTIVES

Lors de ce travail de thèse, nous avons pu transposer avec succès le protocole de traitement et de réticulation des films multicouches aux hydrogels et caractériser les modifications apportées à notre modèle. La réticulation à la GnP nous a permis d'augmenter de façon significative la rigidité de nos hydrogels et de les protéger efficacement de la dégradation enzymatique. De plus, nous avons pu montrer que la réticulation est compatible avec la culture de cellules saines tout comme tumorales. En effet, selon les traitements et les conditions de réticulation, nous avons pu observer un effet positif sur la viabilité et la prolifération cellulaire notamment avec le collagène de type IV.

L'originalité de notre travail réside dans notre modèle – l'hydrogel d'AH – réticulé pour la première fois avec la GnP, un agent réticulant naturel, biocompatible et aux propriétés anti-cancéreuses.

Cependant, les seuls paramètres évalués lors de la culture ont été la viabilité et la prolifération. Afin de s'assurer de la vitalité des lignées utilisées, il serait intéressant d'évaluer l'expression de marqueurs physiologiques de chaque lignée ou, plus simplement, d'évaluer la sécrétion protéique dans le surnageant et faire le lien avec le sécrétome normalement attendu. En effet, les cellules participent à l'élaboration de la MEC mais également à son remodelage en sécrétant des composants matriciels et enzymes [113,116,135]. La plupart des expérimentations ont été conduites sur la lignée de glioblastome CB74. En effet, les cellules des autres lignées de glioblastome et de cancer du sein ont été mises en culture dans des hydrogels traités à la PLL et non aux différents collagènes. Or, nous avons pu établir que le traitement au collagène de type IV était favorable à la croissance cellulaire. De même, les expérimentations avec les CSH pourraient être reconduites avec un temps de culture plus long.

La polyvalence de notre modèle de culture tridimensionnel devrait permettre, via l'ajustement de sa composition biochimique et de ses propriétés mécaniques, de mimer le microenvironnement naturel de diverses cellules cancéreuses afin de mieux comprendre les mécanismes de leur progression tumorale et/ou de tester l'efficacité de différents traitements pharmacologiques.

RÉFÉRENCES

- [1] Harrison RG, Greenman MJ, Mall FP, Jackson CM. Observations of the living developing nerve fiber. *Anat Rec* 1907;1:116–28. <https://doi.org/10.1002/ar.1090010503>.
- [2] Carrel A. ON THE PERMANENT LIFE OF TISSUES OUTSIDE OF THE ORGANISM. *J Exp Med* 1912;15:516–28. <https://doi.org/10.1084/jem.15.5.516>.
- [3] Bikfalvi A. Une Brève Histoire de Vaisseau Sanguin et Lymphatique. Cham: Springer; 2018.
- [4] Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell* 1982;30:215–24. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90027-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90027-7).
- [5] Petersen OW, Rønnov-Jessen L, Howlett AR, Bissell MJ. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:9064–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.19.9064>.
- [6] Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *J Cell Sci* 2012;125:3015–24. <https://doi.org/10.1242/jcs.079509>.
- [7] Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol* 2014;12:207–18. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>.
- [8] Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol* 2012;196:395–406. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102147>.
- [9] Yi S, Ding F, Gong L, Gu X. Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Curr Stem Cell Res Ther* 2017;12:233–46. <https://doi.org/10.2174/1574888X11666160905092513>.
- [10] Ben Shoham A, Rot C, Stern T, Krief S, Akiva A, Dadosh T, et al. Deposition of collagen type I onto skeletal endothelium reveals a new role for blood vessels in regulating bone morphology. *Development* 2016;143:3933–43. <https://doi.org/10.1242/dev.139253>.
- [11] Daley WP, Peters SB, Larsen M. Extracellular matrix dynamics in development and regenerative medicine. *J Cell Sci* 2008;121:255–64. <https://doi.org/10.1242/jcs.006064>.
- [12] Labat-Robert J, Bihari-Varga M, Robert L. Extracellular matrix. *FEBS Letters* 1990;268:386–93. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81291-U](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81291-U).
- [13] Khoshnoodi J, Carttailler J-P, Alvares K, Veis A, Hudson BG. Molecular recognition in the assembly of collagens: terminal noncollagenous domains are key recognition modules in the formation of triple helical protomers. *J Biol Chem* 2006;281:38117–21. <https://doi.org/10.1074/jbc.R600025200>.
- [14] Di Lullo GA, Sweeney SM, Korkko J, Ala-Kokko L, San Antonio JD. Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *J Biol Chem* 2002;277:4223–31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110709200>.
- [15] Ricard-Blum S, Ruggiero F. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol Biol* 2005;53:430–42. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2004.12.024>.
- [16] Mouw JK, Ou G, Weaver VM. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:771–85. <https://doi.org/10.1038/nrm3902>.

- [17] Sato K, Yomogida K, Wada T, Yorihuri T, Nishimune Y, Hosokawa N, et al. Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary. *J Biol Chem* 2002;277:37678–84. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205347200>.
- [18] Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3:a004978. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>.
- [19] Lu Y, Zhang S, Wang Y, Ren X, Han J. Molecular mechanisms and clinical manifestations of rare genetic disorders associated with type I collagen. *Intractable Rare Dis Res* 2019;8:98–107. <https://doi.org/10.5582/irdr.2019.01064>.
- [20] David L, Dulong V, Coquerel B, Le Cerf D, Cazin L, Lamacz M, et al. Collagens, stromal cell-derived factor-1alpha and basic fibroblast growth factor increase cancer cell invasiveness in a hyaluronan hydrogel. *Cell Prolif* 2008;41:348–64. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2008.00515.x>.
- [21] Orphanet: Maladie de Caffey n.d. [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=431&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=maladie-de-caffey&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=Maladie-de-Caffey&title=Maladie%20de%20Caffey&search=Disease_Search_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=431&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=maladie-de-caffey&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Maladie-de-Caffey&title=Maladie%20de%20Caffey&search=Disease_Search_Simple) (accessed April 13, 2020).
- [22] Orphanet: Syndrome d'Ehlers Danlos type arthrochlasique n.d. [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=4044&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Ehlers-Danlos&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-d-Ehlers-Danlos-type-arthrochlasique&title=Syndrome%20d'Ehlers-Danlos%20type%20arthrochlasique&search=Disease_Search_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=4044&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Ehlers-Danlos&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-d-Ehlers-Danlos-type-arthrochlasique&title=Syndrome%20d'Ehlers-Danlos%20type%20arthrochlasique&search=Disease_Search_Simple) (accessed April 13, 2020).
- [23] Orphanet: Syndrome d'Ehlers Danlos type cardiaque valvulaire n.d. [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=19144&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Ehlers-Danlos&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-d-Ehlers-Danlos-type-cardiaque-valvulaire&title=Syndrome%20d'Ehlers-Danlos%20type%20cardiaque%20valvulaire&search=Disease_Search_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=19144&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Ehlers-Danlos&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-d-Ehlers-Danlos-type-cardiaque-valvulaire&title=Syndrome%20d'Ehlers-Danlos%20type%20cardiaque%20valvulaire&search=Disease_Search_Simple) (accessed April 13, 2020).
- [24] Orphanet: Ostéogenèse imparfaite n.d. [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=654&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Osteogenese-imparfaite&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=Osteogenese-imparfaite&title=Ost%20e9ogen%20e8se%20imparfaite&search=Disease_Search_Simple](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=654&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Osteogenese-imparfaite&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Osteogenese-imparfaite&title=Ost%20e9ogen%20e8se%20imparfaite&search=Disease_Search_Simple) (accessed April 13, 2020).
- [25] Meunier J. Prévention et nouvelles recommandations dans la prise en charge de l'ostéoporose. Thèse d'exercice de pharmacie. Faculté de pharmacie, 2020.
- [26] D'hondt S, Guillemyn B, Syx D, Symoens S, De Rycke R, Vanhoutte L, et al. Type III collagen affects dermal and vascular collagen fibrillogenesis and tissue integrity in a mutant

- Col3a1 transgenic mouse model. *Matrix Biol* 2018;70:72–83. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.03.008>.
- [27] Kisling A, Lust RM, Katwa LC. What is the role of peptide fragments of collagen I and IV in health and disease? *Life Sci* 2019;228:30–4. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.04.042>.
- [28] Ricard-Blum S, Salza R. Matricryptins and matrikines: biologically active fragments of the extracellular matrix. *Exp Dermatol* 2014;23:457–63. <https://doi.org/10.1111/exd.12435>.
- [29] Tran KT, Lamb P, Deng J-S. Matrikines and matricryptins: Implications for cutaneous cancers and skin repair. *J Dermatol Sci* 2005;40:11–20. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2005.05.001>.
- [30] Weckmann M, Moir LM, Heckman CA, Black JL, Oliver BG, Burgess JK. Lamstatin-- a novel inhibitor of lymphangiogenesis derived from collagen IV. *J Cell Mol Med* 2012;16:3062–73. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01648.x>.
- [31] Kuo DS, Labelle-Dumais C, Gould DB. COL4A1 and COL4A2 mutations and disease: insights into pathogenic mechanisms and potential therapeutic targets. *Hum Mol Genet* 2012;21:R97–110. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds346>.
- [32] Hudson BG, Tryggvason K, Sundaramoorthy M, Neilson EG. Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med* 2003;348:2543–56. <https://doi.org/10.1056/NEJMr022296>.
- [33] Murata T, Katayama K, Oohashi T, Jahnukainen T, Yonezawa T, Sado Y, et al. COL4A6 is dispensable for autosomal recessive Alport syndrome. *Sci Rep* 2016;6:29450. <https://doi.org/10.1038/srep29450>.
- [34] Oohashi T, Naito I, Ueki Y, Yamatsuji T, Permpoon R, Tanaka N, et al. Clonal overgrowth of esophageal smooth muscle cells in diffuse leiomyomatosis-Alport syndrome caused by partial deletion in COL4A5 and COL4A6 genes. *Matrix Biol* 2011;30:3–8. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2010.09.003>.
- [35] Orphanet: Syndrome d'Alport lié à l'X léiomyomatose diffuse n.d. https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=FR&Expert=1018 (accessed June 13, 2020).
- [36] Singh P, Carraher C, Schwarzbauer JE. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2010;26:397–419. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100109-104020>.
- [37] Gao W, Liu Y, Qin R, Liu D, Feng Q. Silence of fibronectin 1 increases cisplatin sensitivity of non-small cell lung cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;476:35–41. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.081>.
- [38] ECM Gallery 2 n.d. <https://www.zoology.ubc.ca/~alorch/ecm/gallery2.htm> (accessed July 14, 2020).
- [39] Orend G, Huang W, Olayioye MA, Hynes NE, Chiquet-Ehrismann R. Tenascin-C blocks cell-cycle progression of anchorage-dependent fibroblasts on fibronectin through inhibition of syndecan-4. *Oncogene* 2003;22:3917–26. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206618>.
- [40] Hsia HC, Schwarzbauer JE. Meet the tenascins: multifunctional and mysterious. *J Biol Chem* 2005;280:26641–4. <https://doi.org/10.1074/jbc.R500005200>.
- [41] Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res* 2010;339:269–80. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>.

- [42] Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002;110:673–87. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00971-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00971-6).
- [43] Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol* 2007;8:215. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-5-215>.
- [44] Pomin VH, Mulloy B. Glycosaminoglycans and Proteoglycans. Pharmaceuticals (Basel) 2018;11. <https://doi.org/10.3390/ph11010027>.
- [45] Casale J, Crane JS. Biochemistry, Glycosaminoglycans. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
- [46] Chajra H, Auriol D, Joly F, Pagnon A, Rodrigues M, Allart S, et al. Reactivating the extracellular matrix synthesis of sulfated glycosaminoglycans and proteoglycans to improve the human skin aspect and its mechanical properties. *Clin Cosmet Investig Dermatol* 2016;9:461–72. <https://doi.org/10.2147/CCID.S116548>.
- [47] Iimaa T, Ikegami Y, Bual R, Shirakigawa N, Ijima H. Analysis of Sulfated Glycosaminoglycans in ECM Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Modified Alcian Blue Method Development and Validation. *J Funct Biomater* 2019;10. <https://doi.org/10.3390/jfb10020019>.
- [48] Theocharis AD, Skandalis SS, Gialeli C, Karamanos NK. Extracellular matrix structure. *Adv Drug Deliv Rev* 2016;97:4–27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>.
- [49] Humphrey JD. Possible mechanical roles of glycosaminoglycans in thoracic aortic dissection and associations with dysregulated transforming growth factor- β . *J Vasc Res* 2013;50:1–10. <https://doi.org/10.1159/000342436>.
- [50] Morla S. Glycosaminoglycans and Glycosaminoglycan Mimetics in Cancer and Inflammation. *Int J Mol Sci* 2019;20. <https://doi.org/10.3390/ijms20081963>.
- [51] Silbert JE, Sugumaran G. Biosynthesis of chondroitin/dermatan sulfate. *IUBMB Life* 2002;54:177–86. <https://doi.org/10.1080/15216540214923>.
- [52] Gnu. Épimérisation: définition et explications. AquaPortail n.d. <https://www.aquaportail.com/definition-5776-epimerisation.html> (accessed April 13, 2020).
- [53] Lindahl U, Couchman J, Kimata K, Esko JD. Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 3rd ed., Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015.
- [54] Department of Organic and Bioorganic Chemistry, Zaporozhye State Medical University. Carbohydrates, mono-, di-, polysaccharides n.d.
- [55] Yanagishita M. Function of proteoglycans in the extracellular matrix. *Acta Pathol Jpn* 1993;43:283–93. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1827.1993.tb02569.x>.
- [56] Kim S-H, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol* 2011;209:139–51. <https://doi.org/10.1530/JOE-10-0377>.
- [57] Mattson JM, Turcotte R, Zhang Y. Glycosaminoglycans contribute to extracellular matrix fiber recruitment and arterial wall mechanics. *Biomech Model Mechanobiol* 2017;16:213–25. <https://doi.org/10.1007/s10237-016-0811-4>.
- [58] National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Heparins. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury, Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012.

- [59] Gupta RC, Lall R, Srivastava A, Sinha A. Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. *Front Vet Sci* 2019;6:192. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00192>.
- [60] Hascall V, Esko JD. Hyaluronan. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Stanley P, Hart GW, Aebi M, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 3rd ed., Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2015.
- [61] Solis MA, Chen Y-H, Wong TY, Bittencourt VZ, Lin Y-C, Huang LLH. Hyaluronan regulates cell behavior: a potential niche matrix for stem cells. *Biochem Res Int* 2012;2012:346972. <https://doi.org/10.1155/2012/346972>.
- [62] Rivas F, Zahid OK, Reesink HL, Peal BT, Nixon AJ, DeAngelis PL, et al. Label-free analysis of physiological hyaluronan size distribution with a solid-state nanopore sensor. *Nat Commun* 2018;9:1037. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03439-x>.
- [63] Sainio A, Järveläinen H. Extracellular matrix-cell interactions: Focus on therapeutic applications. *Cellular Signalling* 2020;66:109487. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2019.109487>.
- [64] Schultz GS, Wysocki A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen* 2009;17:153–62. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00466.x>.
- [65] Wilgus TA. Growth Factor-Extracellular Matrix Interactions Regulate Wound Repair. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2012;1:249–54. <https://doi.org/10.1089/wound.2011.0344>.
- [66] Meybosch S, De Monie A, Anné C, Bruyndonckx L, Jürgens A, De Winter BY, et al. Epidermal growth factor and its influencing variables in healthy children and adults. *PLoS ONE* 2019;14:e0211212. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211212>.
- [67] Singh B, Carpenter G, Coffey RJ. EGF receptor ligands: recent advances. *F1000Res* 2016;5. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9025.1>.
- [68] Beenken A, Mohammadi M. The FGF family: biology, pathophysiology and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:235–53. <https://doi.org/10.1038/nrd2792>.
- [69] Martino MM, Brkic S, Bovo E, Burger M, Schaefer DJ, Wolff T, et al. Extracellular matrix and growth factor engineering for controlled angiogenesis in regenerative medicine. *Front Bioeng Biotechnol* 2015;3:45. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00045>.
- [70] Raica M, Cimpean AM. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for Antitumor and Antiangiogenic Therapy. *Pharmaceuticals (Basel)* 2010;3:572–99. <https://doi.org/10.3390/ph3030572>.
- [71] Vander Ark A, Cao J, Li X. TGF- β receptors: In and beyond TGF- β signaling. *Cell Signal* 2018;52:112–20. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2018.09.002>.
- [72] Massuto DA, Kneese EC, Johnson GA, Burghardt RC, Hooper RN, Ing NH, et al. Transforming growth factor beta (TGFB) signaling is activated during porcine implantation: proposed role for latency-associated peptide interactions with integrins at the conceptus-maternal interface. *Reproduction* 2010;139:465–78. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0447>.
- [73] Poniatowski ŁA, Wojdasiewicz P, Gasik R, Szukiewicz D. Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators Inflamm* 2015;2015:137823. <https://doi.org/10.1155/2015/137823>.

- [74] Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer* 2011;2:1097–105. <https://doi.org/10.1177/1947601911423031>.
- [75] Armstrong M, Moore RA. Physiology, Baroreceptors. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
- [76] Iheanacho F, Vellipuram AR. Physiology, Mechanoreceptors. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
- [77] Handorf AM, Zhou Y, Halanski MA, Li W-J. Tissue stiffness dictates development, homeostasis, and disease progression. *Organogenesis* 2015;11:1–15. <https://doi.org/10.1080/15476278.2015.1019687>.
- [78] Hanjaya-Putra D, Yee J, Ceci D, Truitt R, Yee D, Gerecht S. Vascular endothelial growth factor and substrate mechanics regulate in vitro tubulogenesis of endothelial progenitor cells. *J Cell Mol Med* 2010;14:2436–47. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00981.x>.
- [79] Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006;126:677–89. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>.
- [80] Bencherif SA, Guillemot F, Huebsch N, Edwards DA, Mooney DJ. Force de traction à l'interface cellule-matrice extracellulaire et destin des cellules souches mésenchymateuses. *Med Sci (Paris)* 2011;27:19–21. <https://doi.org/10.1051/medsci/201127119>.
- [81] Schrader J, Gordon-Walker TT, Aucott RL, van Deemter M, Quaas A, Walsh S, et al. Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 2011;53:1192–205. <https://doi.org/10.1002/hep.24108>.
- [82] Melica ME, La Regina G, Parri M, Peired AJ, Romagnani P, Lasagni L. Substrate Stiffness Modulates Renal Progenitor Cell Properties via a ROCK-Mediated Mechanotransduction Mechanism. *Cells* 2019;8. <https://doi.org/10.3390/cells8121561>.
- [83] Raavé R, van Kuppevelt TH, Daamen WF. Chemotherapeutic drug delivery by tumoral extracellular matrix targeting. *J Control Release* 2018;274:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.01.029>.
- [84] Jang I, Beningo KA. Integrins, CAFs and Mechanical Forces in the Progression of Cancer. *Cancers (Basel)* 2019;11. <https://doi.org/10.3390/cancers11050721>.
- [85] Malandrino A, Mak M, Kamm RD, Moeendarbary E. Complex mechanics of the heterogeneous extracellular matrix in cancer. *Extreme Mech Lett* 2018;21:25–34. <https://doi.org/10.1016/j.eml.2018.02.003>.
- [86] Pepin KM, McGee KP, Arani A, Lake DS, Glaser KJ, Manduca A, et al. MR Elastography Analysis of Glioma Stiffness and *IDH1* -Mutation Status. *AJNR Am J Neuroradiol* 2018;39:31–6. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A5415>.
- [87] Streitberger K-J, Lilaj L, Schrank F, Braun J, Hoffmann K-T, Reiss-Zimmermann M, et al. How tissue fluidity influences brain tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2020;117:128–34. <https://doi.org/10.1073/pnas.1913511116>.
- [88] Chanmee T, Ontong P, Itano N. Hyaluronan: A modulator of the tumor microenvironment. *Cancer Lett* 2016;375:20–30. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.02.031>.
- [89] Ruffell B, DeNardo DG, Affara NI, Coussens LM. Lymphocytes in cancer development: Polarization towards pro-tumor immunity. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2010;21:3–10. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.11.002>.

- [90] Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE. Geometric control of cell life and death. *Science* 1997;276:1425–8. <https://doi.org/10.1126/science.276.5317.1425>.
- [91] Birgersdotter A, Sandberg R, Ernberg I. Gene expression perturbation in vitro—a growing case for three-dimensional (3D) culture systems. *Semin Cancer Biol* 2005;15:405–12. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.06.009>.
- [92] Le Beyec J, Xu R, Lee S-Y, Nelson CM, Rizki A, Alcaraz J, et al. Cell shape regulates global histone acetylation in human mammary epithelial cells. *Exp Cell Res* 2007;313:3066–75. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.04.022>.
- [93] Tibbitt MW, Anseth KS. Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng* 2009;103:655–63. <https://doi.org/10.1002/bit.22361>.
- [94] Weaver VM, Lelièvre S, Lakins JN, Chrenek MA, Jones JCR, Giancotti F, et al. beta4 integrin-dependent formation of polarized three-dimensional architecture confers resistance to apoptosis in normal and malignant mammary epithelium. *Cancer Cell* 2002;2:205–16. [https://doi.org/10.1016/s1535-6108\(02\)00125-3](https://doi.org/10.1016/s1535-6108(02)00125-3).
- [95] Chiquet M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol* 1999;18:417–26. [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(99\)00039-6](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(99)00039-6).
- [96] Elias AL Tawil YLK. Biomimetic Three Dimensional Cell Culturing: Colorectal Cancer Micro-Tissue Engineering. *J Clin Exp Oncol* 2014;03. <https://doi.org/10.4172/2324-9110.1000123>.
- [97] Primeau AJ. The Distribution of the Anticancer Drug Doxorubicin in Relation to Blood Vessels in Solid Tumors. *Clinical Cancer Research* 2005;11:8782–8. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1664>.
- [98] Berrouet C, Dorilas N, Rejniak KA, Tuncer N. Comparison of drug inhibitory effects (IC_{50}) in monolayer and spheroid cultures. *Systems Biology*; 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.05.05.079285>.
- [99] Breslin S, O'Driscoll L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. *Drug Discov Today* 2013;18:240–9. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2012.10.003>.
- [100] Ryu N-E, Lee S-H, Park H. Spheroid Culture System Methods and Applications for Mesenchymal Stem Cells. *Cells* 2019;8. <https://doi.org/10.3390/cells8121620>.
- [101] Achilli T-M, Meyer J, Morgan JR. Advances in the formation, use and understanding of multi-cellular spheroids. *Expert Opin Biol Ther* 2012;12:1347–60. <https://doi.org/10.1517/14712598.2012.707181>.
- [102] Edgar L, McNamara K, Wong T, Tamburrini R, Katari R, Orlando G. Heterogeneity of Scaffold Biomaterials in Tissue Engineering. *Materials (Basel)* 2016;9. <https://doi.org/10.3390/ma9050332>.
- [103] Haas T. [Concentration of calcium in the dialysate and in the reinjection liquid in “on-line” hemofiltration]. *Nephrologie* 1990;11:182–3.
- [104] Langhans SA. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front Pharmacol* 2018;9:6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006>.
- [105] Fenn SL, Charron PN, Oldinski RA. Anticancer Therapeutic Alginate-Based Tissue Sealants for Lung Repair. *ACS Appl Mater Interfaces* 2017;9:23409–19. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b04932>.
- [106] Gurski LA, Petrelli NJ, Jia X, Farach-Carson MC. 3D Matrices for Anti-Cancer Drug Testing and Development. *Oncology Issues* 2010;25:20–5. <https://doi.org/10.1080/10463356.2010.11883480>.

- [107] Sodunke TR, Turner KK, Caldwell SA, McBride KW, Reginato MJ, Noh HM. Micropatterns of Matrigel for three-dimensional epithelial cultures. *Biomaterials* 2007;28:4006–16. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.05.021>.
- [108] Jayakumar R, Prabakaran M, Sudheesh Kumar PT, Nair SV, Tamura H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv* 2011;29:322–37. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.01.005>.
- [109] Eenzyme. Cellulosic scaffold n.d. <https://www.eenzyme.com/images/cellulosic%20scaffold.jpg> (accessed April 13, 2020).
- [110] Krista. Electrospinning Capabilities White Paper | NEI Corporation n.d. <https://www.neicorporation.com/exploring-the-capabilities-of-electrospinning/> (accessed April 13, 2020).
- [111] Neves SC, Moreira Teixeira LS, Moroni L, Reis RL, Van Blitterswijk CA, Alves NM, et al. Chitosan/poly(epsilon-caprolactone) blend scaffolds for cartilage repair. *Biomaterials* 2011;32:1068–79. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.073>.
- [112] Elizarova IS, Luckham PF. Layer-by-layer adsorption: Factors affecting the choice of substrates and polymers. *Adv Colloid Interface Sci* 2018;262:1–20. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2018.11.003>.
- [113] David L, Dulong V, Le Cerf D, Chauzy C, Norris V, Delpech B, et al. Reticulated hyaluronan hydrogels: a model for examining cancer cell invasion in 3D. *Matrix Biol* 2004;23:183–93. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2004.05.005>.
- [114] David L, Dulong V, Le Cerf D, Cazin L, Lamacz M, Vannier J-P. Hyaluronan hydrogel: an appropriate three-dimensional model for evaluation of anticancer drug sensitivity. *Acta Biomater* 2008;4:256–63. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.08.012>.
- [115] Demange E, Kassim Y, Petit C, Buquet C, Dulong V, Cerf DL, et al. Survival of cord blood haematopoietic stem cells in a hyaluronan hydrogel for ex vivo biomimicry. *J Tissue Eng Regen Med* 2013;7:901–10. <https://doi.org/10.1002/term.1482>.
- [116] Simon T, Coquerel B, Petit A, Kassim Y, Demange E, Le Cerf D, et al. Direct effect of bevacizumab on glioblastoma cell lines in vitro. *Neuromolecular Med* 2014;16:752–71. <https://doi.org/10.1007/s12017-014-8324-8>.
- [117] Orlando G, Booth C, Wang Z, Totonelli G, Ross CL, Moran E, et al. Discarded human kidneys as a source of ECM scaffold for kidney regeneration technologies. *Biomaterials* 2013;34:5915–25. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.033>.
- [118] Lee DJ, Diachina S, Lee YT, Zhao L, Zou R, Tang N, et al. Decellularized bone matrix grafts for calvaria regeneration. *Journal of Tissue Engineering* 2016;7:204173141668030. <https://doi.org/10.1177/2041731416680306>.
- [119] Tan W, Krishnaraj R, Desai TA. Evaluation of nanostructured composite collagen--chitosan matrices for tissue engineering. *Tissue Eng* 2001;7:203–10. <https://doi.org/10.1089/107632701300062831>.
- [120] Duval K, Grover H, Han L-H, Mou Y, Pegoraro AF, Fredberg J, et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)* 2017;32:266–77. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>.
- [121] Klingelhutz AJ, Gourronc FA, Chaly A, Wadkins DA, Burand AJ, Markan KR, et al. Scaffold-free generation of uniform adipose spheroids for metabolism research and drug discovery. *Sci Rep* 2018;8:523. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-19024-z>.
- [122] Maritan SM, Lian EY, Mulligan LM. An Efficient and Flexible Cell Aggregation Method for 3D Spheroid Production. *J Vis Exp* 2017. <https://doi.org/10.3791/55544>.

- [123] Friedrich J, Seidel C, Ebner R, Kunz-Schughart LA. Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach. *Nat Protoc* 2009;4:309–24. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.226>.
- [124] Ivascu A, Kubbies M. Rapid generation of single-tumor spheroids for high-throughput cell function and toxicity analysis. *J Biomol Screen* 2006;11:922–32. <https://doi.org/10.1177/1087057106292763>.
- [125] Lewis NS, Lewis EE, Mullin M, Wheadon H, Dalby MJ, Berry CC. Magnetically levitated mesenchymal stem cell spheroids cultured with a collagen gel maintain phenotype and quiescence. *J Tissue Eng* 2017;8:2041731417704428. <https://doi.org/10.1177/2041731417704428>.
- [126] Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng* 2003;83:173–80. <https://doi.org/10.1002/bit.10655>.
- [127] Aijian AP, Garrell RL. Digital microfluidics for automated hanging drop cell spheroid culture. *J Lab Autom* 2015;20:283–95. <https://doi.org/10.1177/2211068214562002>.
- [128] Radtke AL, Herbst-Kralovetz MM. Culturing and applications of rotating wall vessel bioreactor derived 3D epithelial cell models. *J Vis Exp* 2012. <https://doi.org/10.3791/3868>.
- [129] Hjelm BE, Berta AN, Nickerson CA, Arntzen CJ, Herbst-Kralovetz MM. Development and characterization of a three-dimensional organotypic human vaginal epithelial cell model. *Biol Reprod* 2010;82:617–27. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.080408>.
- [130] Ishikawa M, Sekine K, Okamura A, Zheng Y, Ueno Y, Koike N, et al. Reconstitution of hepatic tissue architectures from fetal liver cells obtained from a three-dimensional culture with a rotating wall vessel bioreactor. *J Biosci Bioeng* 2011;111:711–8. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.01.019>.
- [131] Synthecon Autoclavable High Aspect Ratio Vessels n.d. https://synthecon.com/pages/synthecon_autoclavable_high_aspect_ratio_vessels_27.asp (accessed April 13, 2020).
- [132] Synthecon Autoclavable Slow Turning Lateral Vessels n.d. https://synthecon.com/pages/synthecon_autoclavable_slow_turning_lateral_vessels_28.asp (accessed April 13, 2020).
- [133] Rungarunlert S, Klincumhom N, Tharasanit T, Techakumphu M, Purity MK, Dinnyes A. Slow turning lateral vessel bioreactor improves embryoid body formation and cardiogenic differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cell Reprogram* 2013;15:443–58. <https://doi.org/10.1089/cell.2012.0082>.
- [134] Coquerel B, Poyer F, Torossian F, Dulong V, Bellon G, Dubus I, et al. Elastin-derived peptides: matrikines critical for glioblastoma cell aggressiveness in a 3-D system. *Glia* 2009;57:1716–26. <https://doi.org/10.1002/glia.20884>.
- [135] Kassim YL, Tawil EA, Buquet C, Cerf DL, PierreVannier J. Three Dimensional Tumor Engineering by Co-Culture of Breast Tumor and Endothelial Cells Using a Hyaluronic Acid Hydrogel Model. *J Clin Exp Oncol* 2017;06. <https://doi.org/10.4172/2324-9110.1000194>.
- [136] Manickam B, Sreedharan R, Elumalai M. “Genipin” - the natural water soluble cross-linking agent and its importance in the modified drug delivery systems: an overview. *Curr Drug Deliv* 2014;11:139–45. <https://doi.org/10.2174/15672018113106660059>.
- [137] Výborný K, Vallová J, Kočí Z, Kekulová K, Jiráková K, Jendelová P, et al. Genipin and EDC crosslinking of extracellular matrix hydrogel derived from human umbilical cord for neural tissue repair. *Sci Rep* 2019;9:10674. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47059-x>.

- [138] Shanmugam MK, Shen H, Tang FR, Arfuso F, Rajesh M, Wang L, et al. Potential role of genipin in cancer therapy. *Pharmacol Res* 2018;133:195–200. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.05.007>.
- [139] Koo H-J, Song YS, Kim H-J, Lee Y-H, Hong S-M, Kim S-J, et al. Antiinflammatory effects of genipin, an active principle of gardenia. *Eur J Pharmacol* 2004;495:201–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.05.031>.
- [140] Koriyama Y, Chiba K, Yamazaki M, Suzuki H, Muramoto K, Kato S. Long-acting genipin derivative protects retinal ganglion cells from oxidative stress models in vitro and in vivo through the Nrf2/antioxidant response element signaling pathway. *J Neurochem* 2010;115:79–91. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06903.x>.
- [141] Bircher AJ, Sigg R, Scherer Hofmeier K, Schlegel U, Hauri U. Allergic contact dermatitis caused by a new temporary blue-black tattoo dye - sensitization to genipin from jagua (*Genipa americana* L.) fruit extract. *Contact Derm* 2017;77:374–8. <https://doi.org/10.1111/cod.12844>.
- [142] Kim BR, Jeong YA, Na YJ, Park SH, Jo MJ, Kim JL, et al. Genipin suppresses colorectal cancer cells by inhibiting the Sonic Hedgehog pathway. *Oncotarget* 2017;8:101952–64. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21882>.
- [143] Shumin C, Wei X, Yunfeng L, Jiangshui L, Youguang G, Zhongqing C, et al. Genipin alleviates vascular hyperpermeability following hemorrhagic shock by up-regulation of SIRT3/autophagy. *Cell Death Discov* 2018;4:52. <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0057-2>.
- [144] Ahani N, Sangtarash MH, Houshmand M, Eskandani MA. Genipin induces cell death via intrinsic apoptosis pathways in human glioblastoma cells. *J Cell Biochem* 2018. <https://doi.org/10.1002/jcb.27512>.
- [145] Ahmad Z, Shepherd JH, Shepherd DV, Ghose S, Kew SJ, Cameron RE, et al. Effect of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide and N-hydroxysuccinimide concentrations on the mechanical and biological characteristics of cross-linked collagen fibres for tendon repair. *Regen Biomater* 2015;2:77–85. <https://doi.org/10.1093/rb/rbv005>.
- [146] Sung HW, Chang Y, Liang IL, Chang WH, Chen YC. Fixation of biological tissues with a naturally occurring crosslinking agent: fixation rate and effects of pH, temperature, and initial fixative concentration. *J Biomed Mater Res* 2000;52:77–87. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200010\)52:1<77::aid-jbm10>3.0.co;2-6](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200010)52:1<77::aid-jbm10>3.0.co;2-6).
- [147] Butler MF, Ng Y-F, Pudney PDA. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *J Polym Sci A Polym Chem* 2003;41:3941–53. <https://doi.org/10.1002/pola.10960>.
- [148] Haris PI, Chapman D, editors. *New biomedical materials: basic and applied studies*. Amsterdam ; Washington, DC: IOS Press; 1998.
- [149] Lai J-Y. Biocompatibility of genipin and glutaraldehyde cross-linked chitosan materials in the anterior chamber of the eye. *Int J Mol Sci* 2012;13:10970–85. <https://doi.org/10.3390/ijms130910970>.
- [150] Pilarski LM, Pruski E, Wizniak J, Paine D, Seeberger K, Mant MJ, et al. Potential role for hyaluronan and the hyaluronan receptor RHAMM in mobilization and trafficking of hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1999;93:2918–27.
- [151] Vannier J-P, Laurent D, Le Cerf D, Dulong V, Coquerel B, Demange E. Improved Crosslinked Hyaluronan Hydrogels for 3D Cell Culture. WO2011161172A1, n.d.
- [152] Vannier J-P, Demange E. Method for Harvesting Cells Cultured in 3D Hydrogel Matrices. WO2011161174A1, n.d.

- [153] Leach JB, Bivens KA, Collins CN, Schmidt CE. Development of photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol-peptide composite hydrogels for soft tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2004;70:74–82. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30063>.
- [154] Volpi N, Galeotti F, Yang B, Linhardt RJ. Analysis of glycosaminoglycan-derived, precolumn, 2-aminoacridone-labeled disaccharides with LC-fluorescence and LC-MS detection. *Nat Protoc* 2014;9:541–58. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.026>.
- [155] Stylianou A, Kontomaris S-V, Grant C, Alexandratou E. Atomic Force Microscopy on Biological Materials Related to Pathological Conditions. *Scanning* 2019;2019:1–25. <https://doi.org/10.1155/2019/8452851>.
- [156] Maletz E. Atomic Force Microscopy. Nanoscale Informal Science Education Network n.d. <https://www.nisenet.org/sites/default/files/catalog/uploads/AFM.jpg> (accessed April 13, 2020).
- [157] Chauzy C, Delpech B, Olivier A, Bastard C, Girard N, Courel MN, et al. Establishment and characterisation of a human glioma cell line. *Eur J Cancer* 1992;28A:1129–34. [https://doi.org/10.1016/0959-8049\(92\)90471-d](https://doi.org/10.1016/0959-8049(92)90471-d).
- [158] STEMCELL Technologies Inc. Identification of Colonies Derived from Human Hematopoietic Progenitor Cells. n.d.
- [159] Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N Engl J Med* 2008;359:492–507. <https://doi.org/10.1056/NEJMr0708126>.
- [160] Gaudière F, Morin-Grognet S, Bidault L, Lembré P, Pauthe E, Vannier J-P, et al. Genipin-cross-linked layer-by-layer assemblies: biocompatible microenvironments to direct bone cell fate. *Biomacromolecules* 2014;15:1602–11. <https://doi.org/10.1021/bm401866w>.
- [161] Delgado LM, Bayon Y, Pandit A, Zeugolis DI. To cross-link or not to cross-link? Cross-linking associated foreign body response of collagen-based devices. *Tissue Eng Part B Rev* 2015;21:298–313. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2014.0290>.
- [162] Hwang Y-J, Larsen J, Krasieva TB, Lyubovitsky JG. Effect of genipin crosslinking on the optical spectral properties and structures of collagen hydrogels. *ACS Appl Mater Interfaces* 2011;3:2579–84. <https://doi.org/10.1021/am200416h>.
- [163] Maruyama A, Ishihara T, Kim J-S, Wan Kim S, Akaike T. Design of multi-functional nanoparticles as a DNA carrier. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 1999;153:439–43. [https://doi.org/10.1016/S0927-7757\(98\)00534-2](https://doi.org/10.1016/S0927-7757(98)00534-2).
- [164] Gopalakrishnan P, Enqvist E, Wallstrom L, Gattin R, Saiter JM. A New Green Thermoplastic Polymer with Improved Hydrophobic Character. *Macromol Symp* 2010;290:25–9. <https://doi.org/10.1002/masy.201050403>.
- [165] Zhang L, Li K, Xiao W, Zheng L, Xiao Y, Fan H, et al. Preparation of collagen–chondroitin sulfate–hyaluronic acid hybrid hydrogel scaffolds and cell compatibility in vitro. *Carbohydrate Polymers* 2011;84:118–25. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.11.009>.
- [166] Broitman E. Indentation Hardness Measurements at Macro-, Micro-, and Nanoscale: A Critical Overview. *Tribol Lett* 2017;65:23. <https://doi.org/10.1007/s11249-016-0805-5>.
- [167] Cárdenas-Pérez S, Chanona-Pérez JJ, Méndez-Méndez JV, Arzate-Vázquez I, Hernández-Varela JD, Vera NG. Recent advances in atomic force microscopy for assessing the nanomechanical properties of food materials. *Trends in Food Science & Technology* 2019;87:59–72. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.011>.
- [168] Markert CD, Guo X, Skardal A, Wang Z, Bharadwaj S, Zhang Y, et al. Characterizing the micro-scale elastic modulus of hydrogels for use in regenerative medicine. *Journal of*

- the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 2013;27:115–27. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2013.07.008>.
- [169] Soroushanova A, Delgado LM, Wu Z, Shologu N, Kshirsagar A, Raghunath R, et al. The Collagen Suprafamily: From Biosynthesis to Advanced Biomaterial Development. *Adv Mater* 2019;31:1801651. <https://doi.org/10.1002/adma.201801651>.
- [170] Pietrucha K. Changes in denaturation and rheological properties of collagen-hyaluronic acid scaffolds as a result of temperature dependencies. *Int J Biol Macromol* 2005;36:299–304. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2005.07.004>.
- [171] Network of Excellence in Functional Biomaterials, National University of Ireland, Galway, Ireland, Calderon L, Collin E, Velasco-Bayon D, Murphy M, O'Halloran D, et al. Type II collagen-hyaluronan hydrogel – a step towards a scaffold for intervertebral disc tissue engineering. *ECM* 2010;20:134–48. <https://doi.org/10.22203/eCM.v020a12>.
- [172] Dolz R, Engel J, Kuhn K. Folding of collagen IV. *Eur J Biochem* 1988;178:357–66. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14458.x>.
- [173] Xu Y, Swerlick RA, Sepp N, Bosse D, Ades EW, Lawley TJ. Characterization of expression and modulation of cell adhesion molecules on an immortalized human dermal microvascular endothelial cell line (HMEC-1). *J Invest Dermatol* 1994;102:833–7. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12382086>.
- [174] Chang G, Wang J, Zhang H, Zhang Y, Wang C, Xu H, et al. CD44 targets Na(+)/H(+) exchanger 1 to mediate MDA-MB-231 cells' metastasis via the regulation of ERK1/2. *Br J Cancer* 2014;110:916–27. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.809>.
- [175] Picart C, Mutterer J, Richert L, Luo Y, Prestwich GD, Schaaf P, et al. Molecular basis for the explanation of the exponential growth of polyelectrolyte multilayers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12531–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.202486099>.
- [176] Chang H, Zhang H, Hu M, Chen J-Y, Li B-C, Ren K-F, et al. Stiffness of polyelectrolyte multilayer film influences endothelial function of endothelial cell monolayer. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2017;149:379–87. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.012>.
- [177] Monteiro IP, Gabriel D, Timko BP, Hashimoto M, Karajanagi S, Tong R, et al. A two-component pre-seeded dermal-epidermal scaffold. *Acta Biomater* 2014;10:4928–38. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.08.029>.
- [178] Madaboosi N, Uhlig K, Schmidt S, Vikulina AS, Möhwald H, Duschl C, et al. A “Cell-Friendly” Window for the Interaction of Cells with Hyaluronic Acid/Poly-L-Lysine Multilayers. *Macromol Biosci* 2018;18. <https://doi.org/10.1002/mabi.201700319>.
- [179] Crouzier T, Boudou T, Picart C. Polysaccharide-based polyelectrolyte multilayers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* 2010;15:417–26. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2010.05.007>.
- [180] Yamanlar S, Sant S, Boudou T, Picart C, Khademhosseini A. Surface functionalization of hyaluronic acid hydrogels by polyelectrolyte multilayer films. *Biomaterials* 2011;32:5590–9. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.030>.
- [181] Rao SS, Dejesus J, Short AR, Otero JJ, Sarkar A, Winter JO. Glioblastoma behaviors in three-dimensional collagen-hyaluronan composite hydrogels. *ACS Appl Mater Interfaces* 2013;5:9276–84. <https://doi.org/10.1021/am402097j>.
- [182] Chen J, Brandt K, Ghosh K, Grimm R, Glaser K, Kugel J, et al. Noncompressive MR Elastography of Breasts 2013;1.
- [183] Hordyjewska A, Popiołek Ł, Horecka A. Characteristics of hematopoietic stem cells of umbilical cord blood. *Cytotechnology* 2015;67:387–96. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9796-y>.

- [184] Iwasaki H, Suda T. Hematopoietic Stem Cells and Their Niche. In: Kondo M, editor. Hematopoietic Stem Cell Biology, Totowa, NJ: Humana Press; 2010, p. 37–55. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-347-3_2.