



HAL
open science

Conception d'hydrogels à la composition et aux propriétés mécaniques ajustables pour l'étude des interactions cellules-matériaux et l'amélioration de la thérapie cellulaire de l'arthrose

Nathan Lagneau

► **To cite this version:**

Nathan Lagneau. Conception d'hydrogels à la composition et aux propriétés mécaniques ajustables pour l'étude des interactions cellules-matériaux et l'amélioration de la thérapie cellulaire de l'arthrose. Médecine humaine et pathologie. Nantes Université, 2022. Français. NNT : 2022NANU1025 . tel-04325390

HAL Id: tel-04325390

<https://theses.hal.science/tel-04325390>

Submitted on 6 Dec 2023

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.

THESE DE DOCTORAT DE

NANTES UNIVERSITE

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Technologies Biomédicales, Vectorisation, Nanomédecine,
Thérapie Cellulaire et Génique, Médecine Régénératrice et
Biomatériaux

Par

Nathan LAGNEAU

**Conception d'hydrogels à la composition et aux propriétés
mécaniques ajustables pour l'étude des interactions cellules-
matériaux et l'amélioration de la thérapie cellulaire de l'arthrose**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 05 décembre 2022

Unité de recherche : Laboratoire RMeS – Inserm U1229 – Nantes Université

Rapporteurs avant soutenance :

Astrid Pinzano Directeur de Recherche

Loïc Jierry Professeur des Universités

Laboratoire IMOPA – CNRS U7365 –
Université de Lorraine
Institut Charles Sadron – CNRS
UPR22 – Université de Strasbourg

Composition du Jury :

Président : Astrid Pinzano Directeur de Recherche

Examineurs : Elisa Migliorini Chargé de Recherche

Alice Courties Maître de conférences des Universités
Praticien Hospitalier

Dir. de thèse : Yves Maugars Professeur des Universités
Praticien Hospitalier

Co-encadrant : Vianney Delplace Chargé de Recherche

Laboratoire IMOPA – CNRS U7365 –
Université de Lorraine
Laboratoire Biosanté – Inserm U1292
– Université de Grenoble
CRSA – Inserm U938 – Sorbonne
Université
Laboratoire RMeS – Inserm U1229 –
Nantes Université
Laboratoire RMeS -Inserm U1229 –
Nantes Université

Invité

Jérôme Guicheux Directeur de Recherche

Catherine Le Visage Directeur de Recherche

Laboratoire RMeS -Inserm U1229 –
Nantes Université
Laboratoire RMeS -Inserm U1229 –
Nantes Université

Remerciements

La thèse quelle aventure... Arrivé au laboratoire il y'a presque 4 ans, j'ai eu le temps de croiser de nombreuses personnes remarquables durant cette période.

Je tiens tout d'abord à adresser mes plus sincères remerciements à **Astrid Pinzano** et **Loïc Jierry** pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail de thèse en tant que rapporteurs. Je tiens également à remercier **Elisa Migliorini** et **Alice Courties** d'avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examineurs.

Comment ne pas aussi remercier **Jérôme Guicheux** pour son accueil au laboratoire. Un directeur de laboratoire comme il n'en existe pas beaucoup, un manceau qui ne s'assume pas. Sache que ça a toujours été un plaisir de te charrier, notamment sur la santé de tes genoux.

Je remercie ensuite **Yves Maugars**, mon directeur de thèse. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissé mener ce projet comme je le souhaitais. Merci aussi pour tes remarques et tes questions toujours pertinentes.

J'ai toujours clamé aux nouveaux entrants que le sujet de la thèse importait peu, seul l'encadrant comptait. Cette thèse n'aurait jamais été la même sans toi, **Vianney Delplace**. Merci pour tout ! Tu as parfaitement su me guider au début du projet, et tu as su me laisser prendre mon envol quand il le fallait. Ces 4 années passées à tes côtés, « 2 chimistes au milieu des biologistes », ont été une expérience géniale à vivre. Bien évidemment, la thèse n'est pas qu'une aventure scientifique. Je retiendrai entre autres tes « Viannades », ta capacité à allumer à barbecue, et tous ces moments passés en congrès. Sache que grâce, ou à cause de toi, je ne verrais plus jamais la chanson « Still loving you » de la même manière. Je te souhaite de continuer sur ta lancée, de faire une très belle carrière académique, et de passer un jour ton HDR ;) !

Je tiens bien évidemment à remercier les membres du groupe BIOMAX : **Pierre Tournier**, **Mathilde Ambrosino**, **Emmaelle Carrot** et nouvellement **Léa Terriac** et **Garance Saint-Pé**. Je tiens particulièrement à remercier **Pierre Tournier** qui était présent au tout début de ce groupe. Merci pour ta joie de vivre, tes conseils, ton aide sur les différentes expériences, et cette vision de toi en peignoir/chaussons pendant le confinement. Je te souhaite bon courage pour cette épreuve du post-doc !

J'adresse également un immense merci aux personnes qui m'ont aidé sur ce projet. Je pense notamment à **Boris Halgand** pour ses conseils et son aide pour la culture cellulaire. Merci aussi à **Solène Tessier**, que j'ai embêté pas mal de fois lorsqu'il m'est venu l'idée un peu folle de me lancer dans des expériences de biologie. Je remercie **Olivier Gauthier** d'avoir pris de son temps pour réaliser les chirurgies des lapins. Enfin, merci à **Joelle Veziers** pour l'analyse microCT et à **Yoan Le Guennec** pour tout son travail en histologie et bon courage pour la découpe des articulations restantes. Enfin, mes remerciements vont envers **Julien Drochon** pour son aide à l'animalerie, **Steven Nedellec** et **Philippe Hulin** pour m'avoir dépanné sur mes acquisitions au confocal, et **Pierre-Alix Dancer** et **Perrine De Villemagne** de la société Kaer Labs pour leur collaboration.

Bien entendu, ces remerciements doivent comporter une pensée pour les membres du bureau 134 (le meilleur de tous soit dit en passant). Tout d'abord merci au pilier de ce bureau, **Pierre Guihard**, cet enfant coincé dans le corps d'un quarantenaire. Je pense avoir été ton salut pour ne pas devenir un boomer en t'apprenant quelques phrases de « djeun's ». Je retiendrais entre autres de toi ce fameux congrès de Bourg-St-Maurice qui restera à jamais inégalable (merci Brice), ton amour pour The Office (j'aurais dû compter le nombre de « that's what she said » depuis mon arrivée), et ton cruel manque de discernement sur le catch. Une pensée également à **Emilie Hascoet** qui a dû me supporter derrière son bureau. Enfin bon courage à **Romain Guiho** pour remplacer Vianney dans le cœur de Pierre.

Je tiens ensuite à remercier tous les membres du rez-de-jardin, notamment **Marianne Lafont**, pour avoir égayé mes journées de synthèse/rhéologie/microsquisher dans ce sombre endroit. Merci également aux filles du bureau gestion, **Sophie Salle**, **Fabienne Seynaeve** et surtout **Carole Gauthier** pour sa bonne humeur, son rire communicatif, et pour me complimenter sur mon style vestimentaire. J'ai aussi une pensée pour les anciens thésards, **Hilel Moussi**, **Fabien Nativel**, mon khey **Brian Le Moal** avec qui on a fait un clip de rap mémorable, et évidemment le plus vieux d'entre tous, ce fan de l'OM, celui que j'aime le plus charrier, **Cyril D'Arros**.

Je souhaite bon courage à **Anais Defois** et à **Mélina Georget** qui soutiennent en même temps que moi. Bon courage également à tous les jeunes doctorants, **Floriane Kellner**, **Constance Lesage**, **Lucie Danet**, **Nicolas Gaigeard** pour la fin de leur thèse, avec mention spéciale pour le duo **Julie Warin** et **Marie Guicheteau** qui iront très loin j'en suis sûr (même si t'es plus au

RMeS Marie). Enfin, je n'oublie pas de saluer les quelques post-doc, **Baptiste Charbonnier** (bientôt chercheur) et **Paul Humbert**, et tous les autres membres du labo.

Je remercie évidemment ma famille, mes retours au Mans étaient souvent gage de repos. J'ai également une pensée pour mon grand-père qui s'est éteint durant cette fin de thèse. Enfin, je remercie ma seconde famille, mes potes sarthois, **Covin, Bastien, Dim, Tom, Louis, Tintin, les Colly, Maeva, Kam, Manon, Thibault, Anto, Juliette, Solveig, Claire, Léo** (j'espère n'oublier personne). Merci pour vos encouragements et accessoirement ces soirées de débauches. Et bon courage à **Bastien, Kévin** et **Léo** qui sont les prochains à soutenir.

Enfin, il est temps de remercier comme il se doit celle qui m'a accompagné pendant une grande partie de cette aventure, **Lily**. Si j'ai aussi bien vécu cette thèse, c'est en grande partie grâce à toi et à ton sourire. Tu as su m'épauler, m'écouter et m'aimer comme tu sais si bien le faire. J'ai déjà hâte de connaître ce que nous réserve l'avenir, et je n'ai aucun doute sur le fait que nous le vivrons ensemble et heureux.

Publications

Article de revue

“Harnessing cell-material interactions to control stem cell secretion for osteoarthritis treatment”

N. Lagneau, P. Tournier, F. Nativel, Y. Maugars, J. Guicheux, C. Le Visage, V. Delplace.

Cet article de revue sera prochainement soumis dans le journal *Biomaterials*

Articles expérimentaux

“Click and Bioorthogonal Hyaluronic Acid Hydrogels as an Ultra-Tunable Platform for the Investigation of Cell-Material Interactions”

N. Lagneau, P. Tournier, B. Halgand, F. Loll, Y. Maugars, J. Guicheux, C. Le Visage, V. Delplace.

Cet article expérimental a été soumis dans le journal *Bioactive Materials*

“A New Boronate Ester-Based Crosslinking Strategy Allows the Design of Nonswelling and Long-Term Stable Dynamic Covalent Hydrogels”

N. Lagneau, P. Tournier, J-J. Helesbeux, G. Viault, D. Séraphin B. Halgand, F. Loll, C. Garnier, C. Jonchère, M. Rivière, A. Tessier, J. Lebreton, Y. Maugars, J. Guicheux, C. Le Visage, V. Delplace.

Cet article expérimental a été soumis dans le journal *Biomaterials Science*

“Clickable Dynamic Bioinks”

P. Tournier, **N. Lagneau**, B. Halgand, F. Loll, A. Tessier, J. Guicheux, C. Le Visage, V. Delplace.

Cet article expérimental sera prochainement soumis dans le journal *Advanced Materials*

Communications

Présentations orales

V. Delplace, **N. Lagneau**, P. Tournier, B. Halgand, F. Loll, Y. Maugars, J. Guicheux, C. Le Visage.

Using SPAAC for the Synthesis of Versatile Covalent Hydrogels: Outperforming Them All?.

ESB, virtuel, 5-9 septembre 2021 (intervenant V. Delplace)

N. Lagneau, P. Tournier, B. Halgand, F. Loll, Y. Maugars, J. Guicheux, C. Le Visage, V. Delplace.

Design of Injectable and Self-Healing Boronic Acid-Based Hydrogels for a Material-Assisted Cell Therapy of Osteoarthritis.

TERMIS World, virtuel, 15-19 novembre 2021

P. Tournier, **N. Lagneau**, B. Halgand, F. Loll, J. Guicheux, C. Le Visage, V. Delplace.

Clickable Dynamic Bioinks

TERMIS EU, Cracovie, 28 juin-1 juillet 2022 (intervenant P. Tournier)

N. Lagneau, P. Tournier, B. Halgand, F. Loll, Y. Maugars, J. Guicheux, C. Le Visage, V. Delplace.

Learning from Cell-Material Interactions to Improve MSC Immunomodulatory Potential

TERMIS AM, Toronto, 10-13 juillet 2022

N. Lagneau, P. Tournier, B. Halgand, F. Loll, Y. Maugars, J. Guicheux, C. Le Visage, V. Delplace.

Learning from Cell-Material Interactions to Improve MSC Therapeutic Potential

ESB, Bordeaux, 4-8 septembre 2022 (obtention d'une bourse pour participer au congrès)

P. Tournier, **N. Lagneau**, B. Halgand, F. Loll, J. Guicheux, C. Le Visage, V. Delplace.

Clickable Dynamic Bioinks

ESB, Bordeaux, 4-8 septembre 2022 (intervenant V. Deplace)

Présentations affichées

N. Lagneau, P. Tournier, L. Paillat, N. Vedrenne, B. Halgand, F. Loll, A. Camus, Y. Maugars, J. Guicheux, C. Le Visage, V. Delplace.

Investigating SPAAC for the Design of Polysaccharide-Based Hydrogels: A Most Versatile Platform for Cell Culture

Biomat, Bourg Saint Maurice, 19-22 octobre 2021

V. Delplace, **N. Lagneau**, P. Tournier, B. Halgand, F. Loll, Y. Maugars, J. Guicheux, C. Le Visage.

Using SPAAC for the Synthesis of Versatile Covalent Hydrogels: Outperforming Them All?.

TERMIS World, virtuel, 15-19 novembre 2021 (intervenant V. Deplace)

P. Tournier, **N. Lagneau**, B. Halgand, F. Loll, J. Guicheux, C. Le Visage, V. Delplace.

Dual-« Click » Bioinks for the 3D Bioprinting of In Vitro Mini-Joint Models

TERMIS World, virtuel, 15-19 novembre 2021 (intervenant P. Tournier)

P. Tournier, **N. Lagneau**, B. Halgand, F. Loll, J. Guicheux, C. Le Visage, V. Delplace.

Clickable Dynamic Bioinks

TERMIS AM, Toronto, 10-13 juillet 2022 (intervenant V. Deplace)

Encadrements

Leyla Ustun, stage de **technicien** (juillet à août 2019)

Investigating SPAAC chemistry to produce click hydrogels

Lou Riedel, stage d'**assistant ingénieur** (janvier à juillet 2021)

Multi-click viscoelastic hydrogels for cell encapsulation and OA therapy

Tom Duret, stage de **technicien** (juillet à août 2021)

Synthesis and optimization of hyaluronic acid derivatives

Nathan Belliard, stage de **Master 2** (janvier à juillet 2022)

Tunable viscoelastic hydrogels for cell encapsulation and OA therapy

Liste des abréviations

AH : acide hyaluronique

BCN : bicyclononyne

bFGF : facteur de croissance des fibroblastes-2

CS : chondroïtine sulfate

CSMs : cellules souches mésenchymateuses

CuAAC : cycloaddition azoture-alcyne catalysée par du cuivre(I)

EVs : vésicules extracellulaires

GAGs : glycosaminoglycanes

hASCs : cellules souches humaines dérivées du tissu adipeux

hiPS : cellules souches pluripotentes induites humaines

HGF : facteur de croissance des hépatocytes

IDO : indoléamine 2,3-dioxygénase

IEDDA : réaction de Diels-Alder à demande électronique inversée

IL : interleukine

INF- γ : interféron- γ

LPS : lipopolysaccharides

MC : milieu conditionné

MEC : matrice extracellulaire

PBA : acide phénylboronique

PEG : polyéthylène glycol

PGE2 : prostaglandine E2

PMA : phorbol 12-myristate 13-acetate

PNIPAAm : poly-N-isopropylacrylamide

ROS : dérivés réactifs de l'oxygène

SPAAC : cycloaddition azoture-alcyne promue par tension de cycle

TGF β i : protéine induite par le facteur de croissance transformant- β

THBS : thrombospondine

TNF- α : facteur de nécrose tumorale- α

YAP/TAZ : cofacteur de transcription yes-associated protein/transcriptional coactivator PDZ binding motif

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de la structure d'une articulation synoviale.....	8
Figure 2 : Organisation tissulaire du cartilage.....	10
Figure 3 : Propriétés de renouvellement, de différenciation et de sécrétion des CSMs.....	13
Figure 4 : Représentation schématique d'un hydrogel.....	16
Figure 5 : Exemples de polymères présentant des propriétés de gélification naturelles.....	17
Figure 6 : Systèmes de réticulation envisageables pour la conception d'hydrogels.....	20
Figure 7 : Mécanisme général de la ligation de Staudinger	23
Figure 8 : Mécanisme général de la réaction photo-click entre un thiol et un alcène.....	24
Figure 9 : Mécanisme général de la réaction de l'IEDDA.....	25
Figure 10 : Mécanisme général de la réaction de SPAAC	26
Figure 11 : Mécanisme général de la réaction de Diels-Alder	28
Figure 12 : Formation de bases de Schiff.....	29
Figure 13 : Formation d'ester de boronate via la complexation entre un acide boronique et un diol.....	30
Figure 14 : Méthodologie pour l'étude de l'influence des interactions cellules-matériaux. ..	141
Figure 15 : Protocole de différenciation des macrophages.....	142
Figure 16 : Influence de la viscoélasticité sur les propriétés de sécrétion des hASCs.....	143
Figure 17 : Influence du module d'élasticité G' sur le sécrétome des hASCs.....	145
Figure 18 : Influence de la nature du polymère sur le sécrétome des hASCs.....	146
Figure 19 : Influence de l'immobilisation du peptide HAVDI sur le sécrétome des hASCs.....	147
Figure 20 : Etude de l'influence du milieu conditionné sur l'expression des gènes pro-inflammatoires (i.e., IL-6, TNF- α , IL-1 β) et anti-inflammatoires (i.e., IL-10, CD206) des macrophages.....	149
Figure 21 : Injectabilité des hydrogels à base d'esters de boronate.....	153
Figure 22 : Etude de la stabilité d'un hydrogel à base d'esters de boronate (hydrogel mou) en présence de liquide synovial d'un patient arthrosique.....	154
Figure 23 : Suivi de la stabilité des hydrogels in vivo.....	155
Figure 24 : Caractérisation mécanique des hydrogels implantés en sous-cutané.....	156

TABLE DES MATIERES

Avant-propos.....	1
Chapitre 1 : L'arthrose : de sa physiopathologie à une thérapie cellulaire assistée par un hydrogel.....	5
1. L'arthrose et sa physiopathologie	6
1.1 Généralités.....	6
1.2 Structure et fonctions de l'articulation.....	7
1.3 Physiopathologie de l'arthrose	11
1.4 Prise en charge de l'arthrose	11
2. La thérapie cellulaire comme traitement potentiel de l'arthrose	12
2.1 Généralités.....	12
2.2 Effet thérapeutique des CSMs par la sécrétion de facteurs pro-régénératifs et immunomodulateurs.....	13
2.3 Limites de l'injection intra-articulaire de CSMs pour le traitement de l'arthrose.	14
3. Hydrogels : utilisation et conception	15
3.1 Généralités.....	15
3.2 Les polymères aux propriétés de gélification naturelles.....	16
3.3 Conception d'hydrogels via la modification chimique de polymères	20
4. Vers l'étude des interactions cellules-matériaux.....	31
4.1 D'un modèle de culture 2D à 3D.....	31
4.2 Influence des interactions cellules-matériaux.....	31
4.3 Influence des interactions cellules-matériaux sur la sécrétion des CSMs	34
Chapitre 2 : Développement d'une plateforme d'hydrogels pour l'étude d'interactions cellules-matériaux.....	68
1. Rationnel pour le développement d'une plateforme d'hydrogels	69
2. Articles expérimentaux	69
Chapitre 3 : Etude de l'influence des interactions cellules-matériaux sur les propriétés de sécrétion des CSMs	138
1. Rationnel pour l'étude de l'influence des interactions cellules-matériaux.....	139
2. Partie expérimentale.....	140
2.1 Stimulation pro-inflammatoires des hASCs	140
2.2 Polarisation des macrophages	141

2.3	Analyse statistique.....	142
3.	Résultats et discussion	142
3.1	Influence des interactions cellules-matériaux sur la sécrétion des CSMs en conditions pro-inflammatoires	142
3.2	Influence du secrétome des hASCs encapsulées sur les macrophages.....	148
Chapitre 4 :	Evaluation de l'injectabilité et de la stabilité in vivo des hydrogels	150
1.	Rationnel et objectifs des études.....	151
2.	Partie expérimentale.....	151
2.1	Evaluation de l'injectabilité	151
2.2	Stabilité en présence de liquide synoviale d'un patient arthrosique	152
2.3	Stabilité des hydrogels en sous-cutané chez la souris.....	152
2.4	Analyse statistique.....	152
3.	Résultats et discussion	153
3.1	Injectabilité des hydrogels.....	153
3.2	Stabilité des hydrogels en présence de liquide synoviale d'un patient arthrosique.	153
3.3	Stabilité des hydrogels in vivo.....	154
Chapitre 5 :	Discussion générale.....	157
1.	Considérations sur la plateforme d'hydrogels	158
2.	Considérations sur l'intérêt des interactions cellules-matériaux	161
3.	Considérations sur le projet global	163
Chapitre 6 :	Conclusions et Perspectives	165
	Bibliographie	168
	Annexes	177
	Annexe 1	178
	Annexe 2	178

AVANT-PROPOS

Avec l'augmentation constante de certains facteurs de risques (e.g. vieillissement, surpoids), la prévalence des maladies musculosquelettiques est un problème de santé publique majeur. L'arthrose est la maladie articulaire la plus fréquente, handicapant environ 10 millions de personnes en France. Du point de vue physiopathologique, l'arthrose est une maladie dégénérative présentant de multiples facettes, et qui atteint l'ensemble des tissus des articulations mobiles. Elle se manifeste essentiellement par une dégradation du cartilage articulaire, une inflammation de la membrane synoviale, une sclérose de l'os sous-chondral, ainsi que la formation d'ostéophytes (excroissances osseuses). Malgré d'importantes répercussions socioéconomiques, il n'existe toujours pas de traitement curatif ni de traitement permettant de retarder la progression de l'arthrose.

En raison de leur capacité à sécréter divers agents thérapeutiques, tels que des facteurs anti-inflammatoires, anti-fibrotiques et anti-apoptotiques, les cellules stromales mésenchymateuses (CSMs) constituent un outil thérapeutique prometteur pour le traitement de l'arthrose. Malgré des résultats cliniques encourageants (e.g., diminution de la douleur, amélioration de la mobilité), l'injection intra-articulaire de CSMs souffre de certaines limites, notamment une mortalité cellulaire importante suite à l'injection des cellules, ou encore la potentielle fuite des cellules hors du site d'injection. L'encapsulation de CSMs dans un hydrogel injectable est aujourd'hui envisagée pour améliorer la thérapie cellulaire de l'arthrose, facilitant ainsi la délivrance des CSMs et leur rétention, et fournissant un environnement favorable pour leur survie au sein de l'articulation.

Longtemps envisagés comme de simples supports injectables, les hydrogels se révèlent aujourd'hui comme l'une des clés pour l'amélioration de l'efficacité de la thérapie cellulaire. En effet, de récentes études in vitro ont montré l'importance des propriétés mécaniques (e.g., rigidité, viscoélasticité) et biochimiques (e.g., présence de peptides biomimétiques) des hydrogels sur le comportement et les fonctions biologiques des CSMs. Cependant, parmi ces récents travaux, seuls quelques-uns se sont intéressés à l'influence des interactions cellules-matériaux sur les facultés de sécrétion des CSMs. De plus, il reste encore difficile à ce jour d'étudier indépendamment l'influence des différents paramètres physicochimiques des hydrogels sur le comportement cellulaire.

C'est dans ce contexte qu'a été réalisé ce travail de thèse, ayant pour objectif d'étudier l'influence des interactions cellules-matériaux sur le sécrétome des CSMs, ouvrant ainsi la voie

à la conception rationnelle d'hydrogels pour l'amélioration de la thérapie cellulaire de l'arthrose. Pour cela, des hydrogels stables, cytocompatibles, et à la composition et aux propriétés mécaniques ajustables ont été développés. Cette plateforme a par la suite été utilisée pour étudier l'influence de la composition (i.e., nature du polymère, présence de peptides biomimétiques) et des propriétés mécaniques (i.e., rigidité, viscoélasticité) sur les propriétés de sécrétion des CSMs en conditions pro-inflammatoires.

Ce manuscrit est divisé en 5 grands chapitres. Le premier chapitre, intitulé « L'arthrose : de sa physiopathologie à une thérapie cellulaire assistée par un hydrogel », propose un état de l'art de l'arthrose et sa physiopathologie (Chapitre 1 – Partie 1), avant d'aborder successivement la thérapie cellulaire comme traitement potentiel de l'arthrose (Chapitre 1 – Partie 2), l'utilisation et la conception des hydrogels (Chapitre 1 – Partie 3), et l'influence des interactions cellules-matériaux pour l'amélioration de la thérapie cellulaire de l'arthrose (Chapitre 1 – Partie 4). Enfin, ce chapitre se termine par un article de revue intitulé « Harnessing cell-material interactions to control stem cell secretion for osteoarthritis treatment » qui sera prochainement soumis dans le journal *Biomaterials* (Chapitre 1 – Article I).

Le deuxième chapitre s'intéresse au développement d'une plateforme d'hydrogels à la composition et aux propriétés mécaniques ajustables. Il comporte notamment le développement d'hydrogels élastiques à la composition et aux propriétés mécaniques ajustables, formés par une réaction de réticulation click et bioorthogonale (la cycloaddition azoture-alcyne promue par tension de cycle). Ces résultats sont sous la forme d'un article qui a été soumis dans le journal *Bioactive Materials* (Chapitre 2 – Partie 2 – Article II). Ce chapitre comporte aussi une partie consacrée au développement d'une nouvelle génération d'hydrogels viscoélastiques, obtenus par une réticulation originale à base d'esters de boronate et dont les résultats ont été soumis sous la forme d'un article expérimental dans le journal *Biomaterials Science* (Chapitre 2 – Partie 2 – Article III).

Le troisième et le quatrième chapitre présentent des résultats préliminaires obtenus dans le cadre d'une plus large étude sur la conception rationnelle d'hydrogels pour l'amélioration de la thérapie cellulaire de l'arthrose. Le troisième chapitre aborde l'étude de l'influence des interactions cellules-matériaux sur les propriétés de sécrétion des CSMs. Dans ce chapitre, l'influence des propriétés mécaniques et biochimiques des hydrogels sur la sécrétion de

facteurs potentiellement « anti-arthrosiques » par des CSMs est étudiée (Chapitre 3 – Partie 3). Ces travaux sont suivis d'une étude sur l'effet du sécrétome des CSMs encapsulées sur une culture de macrophages. Le quatrième chapitre se concentre quant à lui sur l'évaluation de l'injectabilité des hydrogels et l'évaluation de leur stabilité in vivo (Chapitre 4 – Partie 3).

Enfin, ce manuscrit se conclut par une discussion générale (Chapitre 5) et d'une partie « Conclusions et Perspectives » (Chapitre 6) qui synthétisent l'ensemble des travaux réalisés et proposent des nouvelles pistes de réflexions pour la suite de ce projet.

**CHAPITRE 1 : L'ARTHROSE : DE SA
PHYSIOPATHOLOGIE A UNE THERAPIE CELLULAIRE
ASSISTEE PAR UN HYDROGEL**

1. L'arthrose et sa physiopathologie

1.1 Généralités

L'arthrose a été définie par la société internationale de recherche sur l'arthrose (OARSI) comme étant « un trouble touchant les articulations mobiles, caractérisé par un stress cellulaire et une dégradation de la matrice extracellulaire. Ces événements sont initiés par des micro- et macro-lésions qui engendrent, en réponse, des signaux inappropriés des voies pro-inflammatoires de l'immunité. L'arthrose se manifeste dans un premier temps par un dérèglement au niveau moléculaire (métabolisme dérégulé des tissus articulaires) puis au niveau anatomique et/ou physiologique (caractérisé par la dégradation du cartilage, le remodelage osseux, la formation d'ostéophytes, l'inflammation et la perte de fonction du tissu articulaire) qui aboutissent, ultimement, à la maladie » (traduit de l'anglais).^[1]

L'arthrose est la maladie articulaire handicapante la plus fréquente, touchant principalement les articulations du genou, de la hanche et des mains. Elle handicape environ 7% de la population mondiale (500 millions de personnes) mais est cependant plus présente dans les pays industrialisés avec une prévalence allant de 15 à 20% (e.g., 17% en France, 19% aux Etats-Unis).^[2,3] Au sein de ces populations, il existe une disparité entre les sexes, les femmes étant touchées environ deux fois plus que les hommes par cette maladie après 50 ans.^[4] La prévalence de l'arthrose augmente aussi avec l'âge, atteignant ≈ 60% des personnes de plus de 60 ans.^[4] Avec le vieillissement de la population, il est attendu que cette prévalence continue d'augmenter, aggravant l'impact de l'arthrose sur la santé publique.^[5]

L'arthrose se manifeste par une inflammation au niveau des articulations associée à des douleurs invalidantes. Les patients atteints d'arthrose sont grandement handicapés dans leur quotidien (e.g., difficulté de mouvements, risque de chutes, inaptitude au travail, activités sociales moins fréquentes), et présentent une plus forte proportion de dépression et une mauvaise estime de soi.^[6] Il a aussi été montré que ces patients présentent un risque accru de survenue de comorbidités, telles qu'un infarctus du myocarde, un ulcère gastro-intestinal ou un syndrome métabolique.^[7] En plus d'un impact sociétal important, l'arthrose représente un coût économique majeur pour la société, avec notamment des coûts directs (e.g., diagnostic, traitements médicamenteux, hospitalisation) et des coûts indirects (e.g., absentéisme au travail, altération de la productivité, nécessité d'une assistance) élevés.^[8,9] Le coût total induit

par l'arthrose se révèle donc considérable, et une estimation de 400 à 800 milliards d'euros par an (les coûts directs représentant 350 à 700 milliards d'euros) en Europe est avancée.^[10]

Longtemps décrite comme résultant uniquement du processus de vieillissement, il est désormais admis que de nombreux facteurs peuvent favoriser l'arthrose, tels que la ménopause, une prédisposition génétique, un traumatisme, une activité physique trop intensive ou encore le surpoids.^[11] Une étude a notamment mis en évidence que l'augmentation de la prévalence de l'arthrose du genou entre l'ère pré- et post-industrielle ne pouvait pas être expliquée par une simple augmentation de la longévité et de l'indice de masse corporelle.^[3] Cette étude confirme donc la présence d'autres facteurs, tels que l'évolution du mode de vie, qui pourraient influencer la prévalence de la maladie.

1.2 Structure et fonctions de l'articulation

Une articulation est une zone de jonction plus ou moins mobile entre deux extrémités osseuses. Selon leur structure, les articulations peuvent être fibreuses, cartilagineuses ou synoviales (ou diarthrose). Dans ce manuscrit, seules les articulations synoviales seront abordées.

Les articulations synoviales sont composées de deux extrémités osseuses maintenues par une membrane fibreuse : la capsule articulaire (Figure 1).^[4] Les extrémités osseuses sont recouvertes par du cartilage articulaire permettant la transmission des forces de compression entre les deux pièces osseuses, et réduisant la friction lors d'un mouvement.^[12] La capsule articulaire est remplie par du liquide synovial. Ce liquide synovial est produit par la membrane synoviale, qui tapisse la face interne de la capsule articulaire, et assure la lubrification de l'articulation et la nutrition des tissus non vascularisés de l'articulation.^[13] Au sein de la capsule articulaire se trouvent également les ménisques (qui améliorent la stabilité et la mobilité de l'articulation) et les coussinets adipeux. L'unité de l'articulation est assurée par des ligaments qui la consolident et limitent l'amplitude des mouvements. Ces tissus fibreux de soutien relient les pièces osseuses entre elles et peuvent être intra- ou extra-capsulaires, mais toujours extra-synoviaux. Enfin, l'articulation est entourée de muscles agonistes et antagonistes (insérés sur les extrémités osseuses par leurs tendons) assurant la mobilité, la stabilité et la protection de l'articulation.

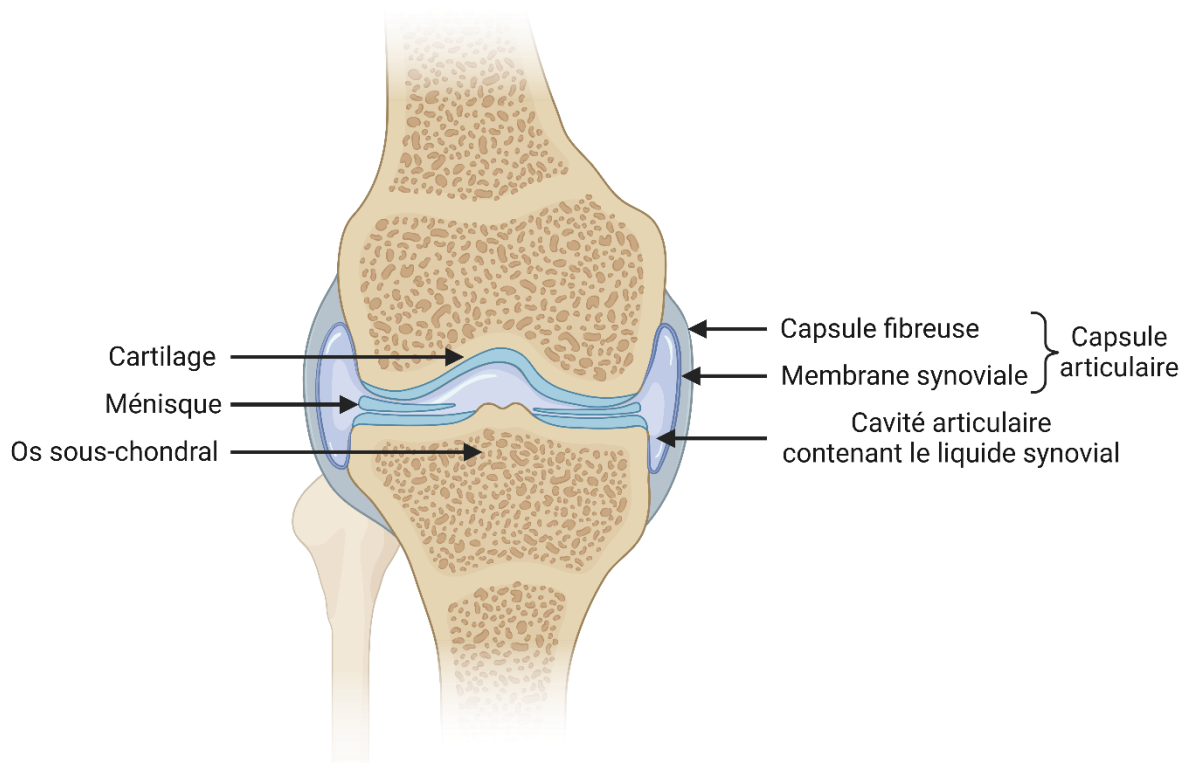


Figure 1 : Représentation schématique de la structure d'une articulation synoviale.

1.2.1 Cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est un tissu conjonctif hyalin (blanc-bleuté) majoritairement composé d'eau (> 75%) et présent à la surface des extrémités des pièces osseuses de l'articulation. Ce tissu n'est ni vascularisé, ni innervé et se nourrit des molécules présentes dans le liquide synovial. Le cartilage articulaire est principalement constitué d'un type cellulaire : les chondrocytes, qui se chargent de maintenir l'homéostasie tissulaire.^[14,15] Ces cellules sont emprisonnées dans une matrice extracellulaire (MEC) principalement composée de protéoglycanes, de glycosaminoglycanes (GAGs) et de fibres de collagène.^[16] Les protéoglycanes (e.g., agrécanes, décorines) sont constitués d'une protéine associée à des GAGs, tels que la chondroïtine sulfate (CS) et le kérotane sulfate. Certains de ces protéoglycanes (i.e., agrécanes) peuvent se lier à de l'acide hyaluronique (AH) pour former des complexes (agrégats) stables au sein de la MEC. Ces agrégats sont chargés négativement et ainsi retiennent, par pression osmotique, une grande quantité de molécules d'eau au sein de la matrice, assurant l'hydratation du tissu et lui conférant une certaine résistance à la compression. Ces protéoglycanes sont enchevêtrés dans un réseau fibrillaire dense de

collagène (de type II principalement). Cette organisation particulière stabilise la matrice et confère au cartilage une résistance importante à la traction et aux forces de cisaillement.^[17]

Les propriétés biomécaniques du cartilage articulaire sont déterminées par la composition et la structuration de sa matrice.^[18] Le cartilage articulaire est organisé en 4 zones (Figure 2). La zone se situant au niveau de la lumière articulaire est la zone superficielle. Dans cette zone les chondrocytes sont aplatis, et la MEC est principalement composée de fibres de collagène alignées horizontalement. Cette organisation offre une grande résistance aux forces de cisaillement et de friction.^[19] La zone transitionnelle est située sous la zone superficielle et représente 40 à 50% du volume total du cartilage articulaire. Cette zone est composée de chondrocytes sphériques, ainsi que d'une plus grande concentration en protéoglycanes et en fibres de collagène enchevêtrées. Sous cette zone se trouve la zone profonde qui représente 30 à 40% du volume total du cartilage articulaire. Cette couche est composée d'une forte concentration en protéoglycanes (la plus grande de tout le cartilage) associée à d'épaisses fibres de collagène orientées verticalement. Dans cette zone les chondrocytes sont organisés en colonnes, en parallèle des fibres de collagène. Cette architecture particulière confère à cette zone une grande résistance aux forces de compression. Enfin, la zone calcifiée correspond à la couche la plus profonde du cartilage, séparée de la zone profonde par une fine ligne basophile dont le rôle est encore incertain.^[17] Dans cette zone, les fibres de collagène sont ancrées à l'os sous-chondral, stabilisant ainsi le cartilage sur les extrémités osseuses. Les chondrocytes retrouvés dans cette zone sont peu nombreux et présentent un phénotype hypertrophique. Ces chondrocytes sécrètent une MEC avec une composition différente des autres zones, partiellement minéralisée et contenant du collagène de type X. Cette architecture permet de réduire les contraintes à l'interface entre le cartilage et l'os sous-chondral.

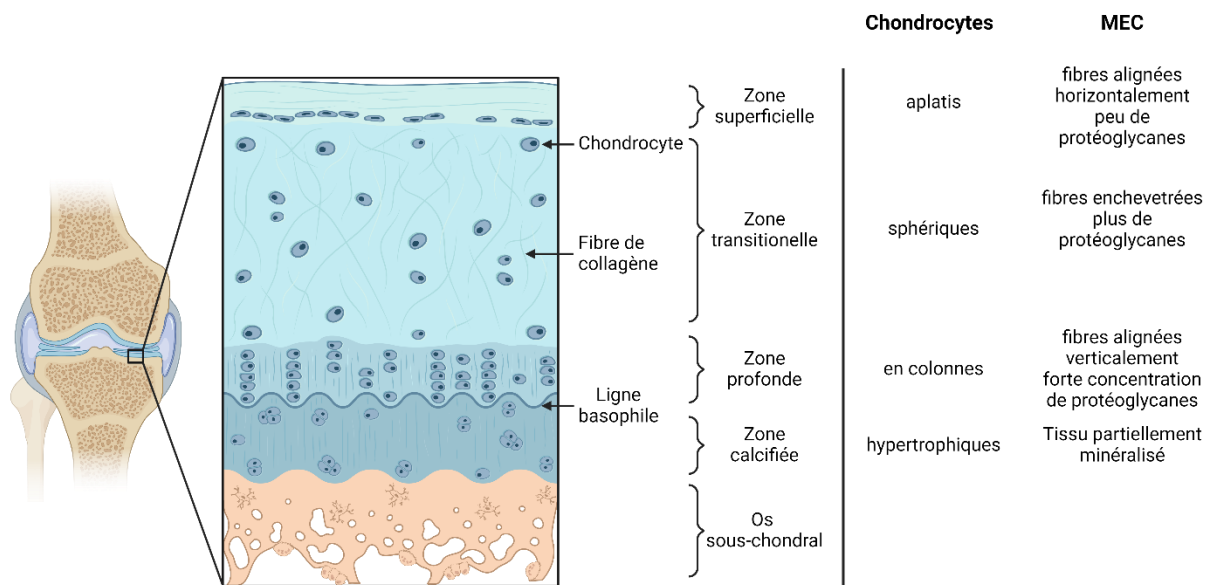


Figure 2 : Organisation tissulaire du cartilage.

1.2.2 Tissu synovial et liquide synovial

Le tissu synovial (ou membrane synoviale) est un tissu conjonctif qui tapisse la face interne de la capsule articulaire. Cette membrane est semi-perméable et régule les échanges de molécules entre la partie intra- et extra-articulaire. Elle est aussi responsable de la production du liquide synovial.^[20] La membrane synoviale est composée de deux couches : l'intima et la subintima.^[21] La première est constituée d'une fine couche de cellules, les synoviocytes, qui ont pour rôles de synthétiser les composants du liquide synovial (e.g., AH, protéoglycanes, nutriments) et d'éliminer les débris ou pathogènes potentiellement présents dans le liquide synovial. Ces synoviocytes sont classés en deux catégories : les synoviocytes de type A (assimilables à des macrophages), et les synoviocytes de type B (assimilables à des fibroblastes).^[22] La subintima est quant à elle composée de différents tissus conjonctifs innervés et vascularisés, notamment des tissus fibreux ou adipeux, et participe à la stabilisation de l'articulation.

Le liquide synovial est un liquide visqueux (non-newtonien), tapissant les tissus présents au sein de la cavité articulaire. Il assure la lubrification des tissus, réduisant ainsi les forces de friction durant le mouvement.^[20] Il permet aussi de transporter les nutriments et les déchets au sein de la cavité articulaire. Le liquide synovial est composé principalement d'AH. Il contient aussi de la lubricine, qui aide à la lubrification, et d'autres protéines (e.g., enzymes).

1.2.3 Os sous-chondral

L'os sous-chondral est situé au niveau de l'épiphyse des os longs et fait donc la transition entre le tissu cartilagineux et osseux. L'os sous-chondral est divisé en deux parties : la plaque osseuse sous-chondrale (partie supérieure) et l'os trabéculaire (partie inférieure)^[23]. Cette structure particulière confère à l'os sous-chondral une forte résistance aux contraintes mécaniques. C'est un tissu minéralisé, innervé, vascularisé et constamment renouvelé, permettant l'ancrage du cartilage et l'échange de métabolites à l'interface de ces deux tissus en réponse à des stimuli chimiques ou mécaniques.^[24,25] Il possède aussi un rôle majeur dans la transmission des contraintes mécaniques en amortissement fortement les forces de compression subies par l'articulation.^[26] Enfin, en raison de la présence de CSMs, l'os sous-chondral peut servir de réservoir de cellules progénitrices pour la réparation des tissus.

1.3 Physiopathologie de l'arthrose

Bien que l'arthrose soit une maladie largement étudiée, identifier tous les mécanismes impliqués dans la progression de la maladie reste un défi. Les processus impliqués dans le développement de l'arthrose ont fait l'objet d'une partie dédiée dans la revue de la littérature « Harnessing cell-material interactions to control stem cell secretion for osteoarthritis treatment » qui se trouve dans la partie 4 du chapitre 1.

1.4 Prise en charge de l'arthrose

Malgré un impact socioéconomique important, il n'existe à ce jour pas de traitement étiologique de l'arthrose. Cette absence de traitement est attribuable au manque de compréhension des processus pathologiques, de la difficulté de diagnostics précoces, et de la diversité des cas cliniques.

La prise en charge de l'arthrose dépend de l'avancée de la maladie. Les patients présentant des arthroses légères à modérées peuvent, dans un premier temps, se voir proposer une prise en charge non-pharmacologique. Celle-ci se concentre sur la sensibilisation du patient sur la maladie et les habitudes à prendre pour limiter sa progression. Il est ainsi préconisé d'avoir une bonne hygiène de vie, en évitant le surpoids et en pratiquant une activité physique régulière.^[27,28]

Une prise en charge pharmacologique est souvent mise en place en parallèle des mesures de prévention, et consiste principalement en l'administration d'anti-inflammatoires et

d'antalgiques (e.g., paracétamol).^[29] Ces médicaments peuvent être administrés par voie systémique ou intra-articulaire. D'autres approches peuvent être utilisées, notamment l'administration d'anti-arthrosique symptomatique d'action lente (e.g., glucosamine, CS) ou l'injection d'AH à haute masse molaire (i.e., viscosupplementation). Cependant leur efficacité est remise en cause par de nombreuses études.^[30]

Enfin, en cas d'échec des précédents traitements, et dans le cas des arthroses les plus avancées, une approche chirurgicale est envisagée, allant du lavage articulaire sous arthroscopie jusqu'à la mise en place d'une prothèse (arthroplastie). Cette dernière procédure, très invasive, améliore la mobilité et diminue la douleur du patient.^[31] Néanmoins la durée de vie des prothèses, d'environ 15 à 20 ans, limite leur utilisation chez des jeunes patients.^[32,33]

Dans ce contexte, de nouvelles pistes thérapeutiques sont envisagées pour stopper voire inverser le processus pathologique de l'arthrose. Ces nouvelles stratégies thérapeutiques regroupent, entre autres, la délivrance de principes actifs,^[34] la thérapie génique,^[35] et la thérapie cellulaire à base de CSMs.^[36] Parmi ces nouvelles pistes, la thérapie cellulaire de l'arthrose est particulièrement prometteuse, et sera développée dans la suite de ce manuscrit.

2. La thérapie cellulaire comme traitement potentiel de l'arthrose

2.1 Généralités

Les CSMs sont des cellules multipotentes, capables de se renouveler, de migrer vers un tissu endommagé (i.e., tropisme), de se différencier ou encore de sécréter différents facteurs immunomodulateurs et pro-régénératifs (Figure 3).^[37] Elles sont identifiées par leur faculté à adhérer au plastique, l'expression de certains marqueurs de surfaces spécifiques (i.e., CD73, CD90, CD105), l'absence de certains marqueurs de surfaces spécifiques (e.g., CD14, CD19, CD45, HLA-DR), et leur capacité à se différencier en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes.^[38] La présence de CSMs a été démontrée dans de nombreux tissus (e.g., moelle osseuse, tissu adipeux), où elles participent au remplacement des cellules vieillissantes et au maintien de l'homéostasie tissulaire.^[39]

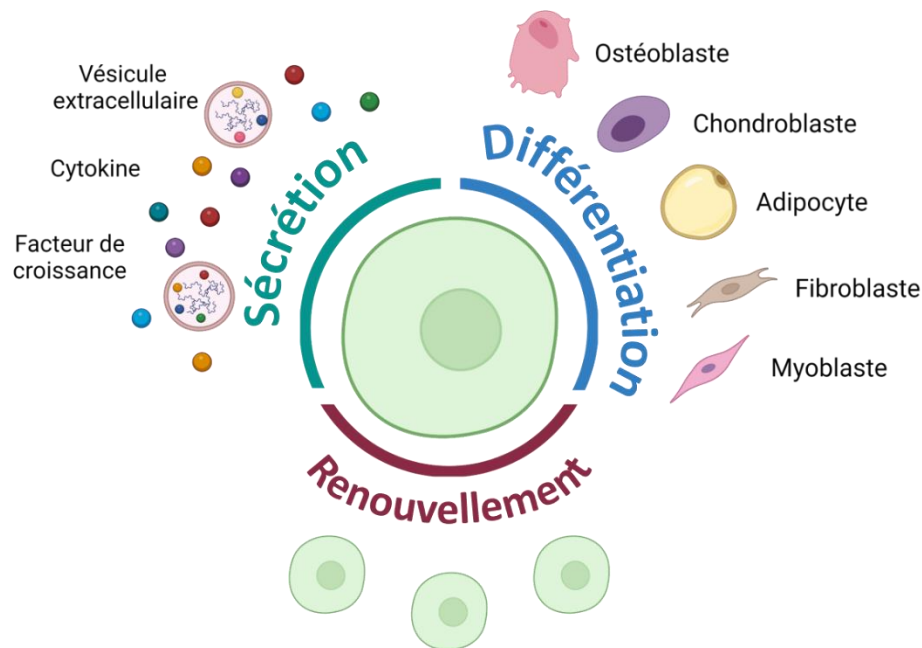


Figure 3 : Propriétés de renouvellement, de différenciation et de sécrétion des CSMs.

En raison de leur faculté de différenciation et de sécrétion, les CSMs ont été envisagées comme outil thérapeutique potentiel pour de nombreuses maladies notamment les maladies auto-immunes (e.g., lupus, maladie de Crohn),^[40] cardiovasculaires (e.g., maladies coronariennes),^[41] ou ostéoarticulaires (e.g., arthrose).^[36,42] Elles sont généralement prélevées à partir de tissus adipeux ou de la moelle osseuse.^[43] De nombreux essais cliniques sur des thérapies cellulaires à base de CSMs ont été conduits, et ont démontré la faisabilité et la sécurité de ces thérapies pour des applications aussi diverses que le traitement de cardiomyopathies, le traitement de la maladie de Crohn ou encore de le traitement de la polyarthrite rhumatoïde.^[44,45] Il a d'ailleurs été suggéré que l'absence d'effets indésirables graves serait en partie due au caractère non-immunogène des CSMs, et permettrait d'envisager l'utilisation de cellules allogéniques.

2.2 Effet thérapeutique des CSMs par la sécrétion de facteurs pro-régénératifs et immunomodulateurs

Les CSMs ont longtemps été utilisées en tant que progéniteurs de chondrocytes afin de combler des défauts du cartilage.^[42,46-48] Au-delà de la dégradation du cartilage, l'arthrose implique une inflammation du tissu synovial et une sclérose de l'os sous-chondral. Dans ce contexte, les CSMs sont dorénavant envisagées comme outil thérapeutique en regard de leur capacité de sécrétion de facteurs pro-régénératifs et immunomodulateurs. Ces propriétés de

sécrétions sont détaillées dans une partie dédiée dans la revue de la littérature « Harnessing cell-material interactions to control stem cell secretion for osteoarthritis treatment » qui constitue la dernière partie du chapitre 1.

Au vu du potentiel thérapeutique des CSMs, de nombreux essais cliniques ont été menés pour évaluer l'efficacité de l'injection intra-articulaire de CSMs pour le traitement de l'arthrose.^[49,50] Ces études ont montré une amélioration globale de la mobilité des patients, associée à une réduction de la douleur, pouvant aller jusqu'à 2 ans post-injection.^[51] L'efficacité thérapeutique est d'autant plus marquée lorsque les études excluent les patients âgés et/ou présentant une arthrose très avancée.^[52] Ces résultats très encourageants tendent à valider le potentiel thérapeutique de l'injection intra-articulaire de CSMs pour des cas d'arthroses légères à modérées.

Cependant ces études ne sont pas exemptes de certaines limites. En effet, certaines études ne comprennent pas l'évaluation de l'effet des cellules sur la régénération du cartilage et de l'inflammation au sein de la capsule synoviale. De plus, il existe une grande disparité entre les études, concernant la nature des CSMs (e.g., autologues ou allogéniques), leur origine (e.g., tissu adipeux, moelle osseuse), les doses de cellules administrées (allant de 10^6 à 10^8 M de cellules), ou encore les protocoles d'administrations (e.g., solution saline, solution d'AH).^[51,53] A l'avenir, il sera nécessaire d'uniformiser ces différents critères afin de confirmer le potentiel thérapeutique des CSMs pour le traitement de l'arthrose.

2.3 Limites de l'injection intra-articulaire de CSMs pour le traitement de l'arthrose

L'efficacité thérapeutique de cette stratégie est à ce jour limitée par la disparition rapide des cellules au niveau du site d'injection. En effet, il a été montré que seulement 13% des CSMs injectées en intra-articulaire chez la souris sont retrouvées dans l'articulation après 1 mois.^[54] Cette baisse locale du nombre de cellules peut être le résultat d'une mortalité cellulaire suite à l'injection. En effet, lors de l'injection, les cellules subissent des forces de cisaillement qui, si elles sont trop importantes, peuvent altérer la membrane des cellules et induire leur mort.^[55,56] De plus, une fois injectées au sein de l'articulation arthrosique, les CSMs se trouvent dans un milieu pro-inflammatoire, et sont soumises à de nombreuses contraintes mécaniques, pouvant également entraîner une mortalité cellulaire importante. La diminution

du nombre de cellules au cours du temps peut aussi être le résultat d'une fuite des cellules hors du site d'injection. Cette fuite des cellules peut être attribuable au trou induit par l'injection ou la tendance des CSMs à migrer vers les tissus environnants.^[54,57] La migration des CSMs vers d'autres tissus (e.g., muscle, tissu adipeux, cœur, poumons, moelle osseuse) pose la question du contrôle de leur devenir cellulaire,^[54] et pourrait constituer un frein au développement clinique des injections intra-articulaires de CSMs.

Dans ce contexte, l'utilisation de biomatériaux injectables, et surtout d'hydrogels, a été proposée en vue d'améliorer la thérapie cellulaire de l'arthrose. Ces hydrogels permettraient d'améliorer la délivrance des CSMs, à la fois en les protégeant des forces d'injection, en favorisant leur rétention au niveau du site d'injection, et en leur fournissant un environnement favorable pour leur survie au sein de l'articulation arthrosique.

3. Hydrogels : utilisation et conception

3.1 Généralités

Les hydrogels sont des biomatériaux généralement composés d'un réseau tridimensionnel de polymères hydratés. Ils résultent de la formation de ponts (nœuds de réticulation) entre différentes chaînes macromoléculaires (Figure 4). Les hydrogels sont utilisés dans le cadre de nombreuses applications notamment en tant que dispositifs médicaux (e.g., lentilles de contact, implants), en tant que vecteurs pour la délivrance de molécules thérapeutiques, et en tant que MEC synthétiques pour la culture et la délivrance de cellules. Cette polyvalence peut être expliquée par leur nature organique, leur forte teneur en eau, et leurs propriétés mécaniques comparables aux tissus biologiques. De plus, la diversité des méthodes de synthèse et de conception permet de facilement ajuster leurs propriétés en fonction de l'application voulue. Parmi ces différentes applications possibles, nous détaillerons dans la suite de ce manuscrit l'utilisation d'hydrogels en tant que MEC synthétiques.

Les hydrogels attirent particulièrement l'attention pour la conception de MEC synthétiques en raison de leur capacité à reproduire la plupart des propriétés physiques et biochimiques du microenvironnement cellulaire. Ils permettent de cultiver des cellules en 3D, d'améliorer la délivrance de cellules, ou de développer des stratégies d'ingénierie tissulaire. Ces applications impliquent l'utilisation de polymères et de mécanismes de réticulation non toxiques afin d'obtenir des hydrogels cytocompatibles.

Afin d'éviter d'avoir recours à des modifications chimiques potentiellement cytotoxiques, des polymères présentant des propriétés de gélification naturelles ont été historiquement utilisés pour la conception d'hydrogels cytotocompatibles. Dans la suite de ce chapitre, ces différents polymères seront détaillés.

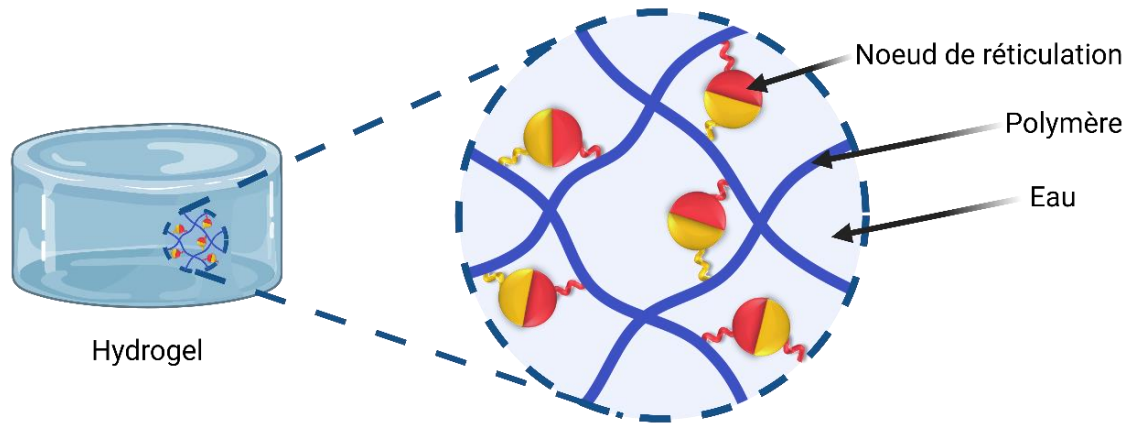


Figure 4 : Représentation schématique d'un hydrogel.

3.2 Les polymères aux propriétés de gélification naturelles

Les polymères sont des macromolécules constituées d'un ou plusieurs motifs moléculaires qui se répètent, appelés monomères. Les polymères peuvent être composés d'un seul type de monomère (homopolymères) ou plusieurs (copolymères). Ils varient aussi en fonction de leur origine : naturelle ou synthétique.

Certains polymères ont été largement utilisés en raison de leur facilité à former des hydrogels, par simple modification des conditions environnementales. En effet, ils peuvent réticuler sous l'influence de stimuli spécifiques (e.g., présence de sels, pH, température). Ces mécanismes de réticulation se produisent par formation de liaisons non covalentes, notamment par interactions ioniques, par liaisons hydrogènes ou encore par effets hydrophobes. En raison du caractère non covalent des nœuds de réticulation, le réseau peut se réorganiser sous la contrainte afin de dissiper l'énergie. Ces hydrogels présentent donc souvent un comportement viscoélastique et une capacité d'auto-réparation. Parmi les polymères présentant des propriétés de gélification naturelles, l'alginate, le collagène, la gélatine, les dérivés de cellulose et le poly-N-isopropylacrylamide (PNIPAAm) sont couramment utilisés pour la conception d'hydrogels (Figure 5).

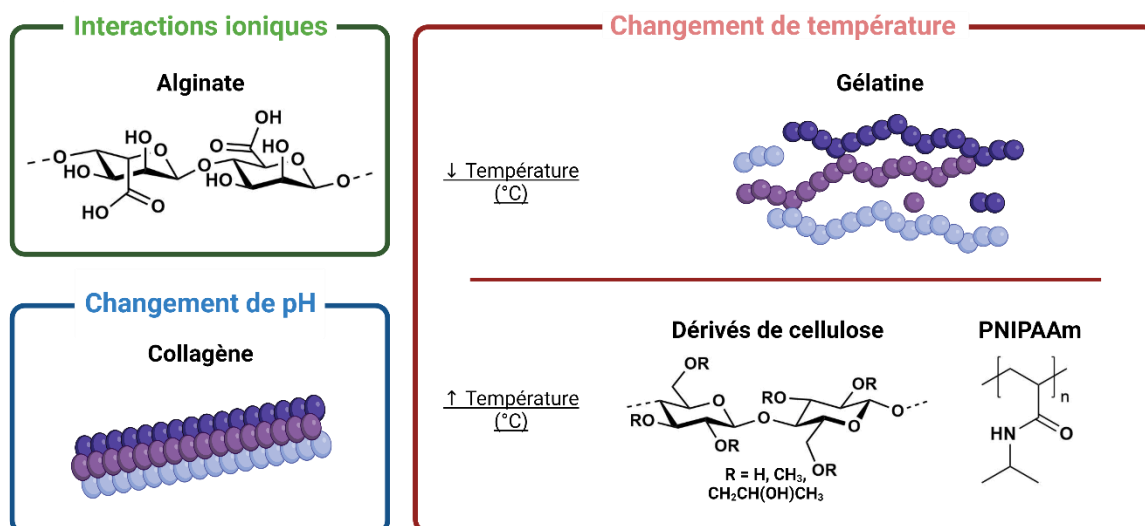


Figure 5 : Exemples de polymères présentant des propriétés de gélification naturelles.

Alginate

L'alginate est un polysaccharide linéaire anionique, isolé à partir d'algues brunes. L'alginate est un copolymère composé de blocs d'acides D-mannuroniques et d'acides L-guluroniques liés par des liaisons β -1-4. L'alginate possède la faculté de réticuler en présence de cations divalents (e.g., Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+}) par interactions ioniques. Etant donné que seuls les acides L-guluroniques sont responsables de ces interactions ioniques, il est possible de modifier les propriétés mécaniques des hydrogels à base d'alginate en jouant sur la concentration en cations divalents ou sur le rapport acide L-guluronique/acide D-mannuronique.^[58] L'alginate peut également être modifié chimiquement via ses groupements acides carboxyliques pour introduire des peptides favorisant l'adhésion cellulaire.^[59] L'alginate est un polymère approuvé par la « Food and Drug Administration » facilitant son utilisation pour des études cliniques. Certains hydrogels à base d'alginate sont d'ailleurs disponibles commercialement (e.g., AlgiMatrix™).^[60] Il est cependant important de noter que ce polymère ne se dégrade que sur de très longs termes, ce qui peut limiter son intérêt pour certaines applications.

Collagène

Le collagène est le composant structural majoritaire de la MEC. Cette protéine est constituée par des chaînes polypeptidiques organisées en triple hélice formant une fibrille. Le collagène est extrait de tissus d'animaux (e.g., os, peau). Les différents collagènes sont organisés par type, sur la base de leur structure fibrillaire. Parmi les différents types de collagène, le collagène de type I est le plus présent chez l'homme (peau, organes, os), tandis que le collagène de type II est un composant majoritaire du cartilage articulaire. Grâce à sa structure

fibrillaire, le collagène peut former des hydrogels à pH physiologique. Pour produire ce type d'hydrogels, le collagène doit préalablement être dissout en milieu acide (pH 3-4) et conservé à basse température, avant d'être neutralisé pour gélifier.^[61] En plus de sa biodégradabilité (par l'action des collagénases), le collagène possède l'avantage de présenter naturellement de nombreux motifs d'adhésions cellulaire (e.g., RGD). L'utilisation du collagène souffre cependant d'une variabilité importante de la masse molaire du polymère selon les procédés d'extraction, entraînant des différences de solubilité et de viscosité.^[62] Il est aussi difficile de produire des hydrogels à base de collagène présentant une rigidité supérieure à 1 kPa sans modifier chimiquement la protéine.^[63] Ces modifications peuvent alors impacter la dégradabilité, la contraction, ou les propriétés biochimiques de ces hydrogels.^[63]

Gélatine

La gélatine est obtenue par hydrolyse du collagène. Cette hydrolyse (acide ou basique) a pour but de rompre une partie des structures fibrillaires (en triple hélices) du collagène en plus petites chaînes protéiques, dont la masse molaire dépend du type et du temps de traitement. Grâce à cette hydrolyse partielle des structures en triple hélices, la gélatine présente l'avantage d'être soluble dans l'eau tout en conservant les avantages associés au collagène (i.e., biodégradabilité, présence de motifs d'adhésions cellulaire). La gélatine supporte également les modifications chimiques notamment via ses fonctions amines primaires ou acides carboxyliques.^[64] La gélatine est un polymère thermosensible facilitant ainsi la formation d'hydrogels. A froid, des liaisons hydrogènes peuvent se former entre les différentes chaînes protéiques, formant alors un réseau tridimensionnel. En chauffant (> 20-25 °C), ces liaisons se rompent, entraînant une dissolution de la gélatine. La gélification à froid est difficilement exploitable pour la conception de MEC synthétiques, où la température est nécessairement fixée à 37 °C.

Dérivés de cellulose

La cellulose est le polysaccharide le plus abondant sur Terre, composant majoritaire de la paroi des cellules végétales. C'est un homopolymère composé de chaînes linéaires de monomères de glucose liés par des liaisons osidiques β -1-4. Du fait de la présence de nombreuses liaisons hydrogènes intra- et inter-chaînes, la cellulose n'est pas soluble dans l'eau. Pour faciliter sa solubilisation dans l'eau, certains de ses groupements hydroxyles peuvent être modifiés via des procédés d'éthérifications, produisant des dérivés tels que la méthylcellulose,

l'hydroxypropylméthylcellulose ou la carboxyméthylcellulose.^[65] Parmi ces dérivés de cellulose, la méthylcellulose et l'hydroxypropylméthylcellulose sont couramment utilisées pour la conception d'hydrogels, du fait de leur caractère thermosensible. En chauffant (entre 40 et 60 °C), des effets hydrophobes se forment entre les chaînes de polymères, et une gélification est observée.^[65,66] Afin de répondre aux contraintes du milieu physiologique, où la température est fixée (37 °C), cette température critique de gélification peut être diminuée en jouant sur la concentration ou la substitution des dérivés de cellulose. L'utilisation de ces polymères présente cependant certaines limites. Ils sont difficilement solubles dans l'eau, et la solution des précurseurs d'hydrogels est souvent très visqueuse. Les effets hydrophobes entraînent également la formation d'hydrogels opaques.^[67] Enfin, en plus de difficilement supporter des modifications chimiques, les dérivés de cellulose ne sont pas dégradés *in vivo*.^[61]

Poly-N-isopropylacrylamide

Le PNIPAAm, est le polymère vinylique le plus couramment utilisé pour l'encapsulation de cellules. Les polymères vinyliques sont issus de la polymérisation de monomères vinyliques ($\text{CH}_2=\text{CHR}$) et sont donc constitués d'une répétition du motif ($\text{CH}_2-\text{C}(\text{HR})-$). Le PNIPAAm, un dérivé de polyacrylamide, est un polymère thermosensible. A faible température, ce polymère est soluble dans l'eau. A partir d'une température supérieure à 30-32 °C, des effets hydrophobes se produisent formant ainsi un hydrogel.^[68] La formation de ces hydrogels est donc compatible avec les conditions imposées par le milieu physiologique. Comme de nombreux polymères synthétiques, le PNIPAAm présente l'avantage de supporter aisément et de façon contrôlée les modifications chimiques.^[69] Il reste néanmoins limité par une opacité importante, de faibles propriétés mécaniques et une absence de biodégradabilité.^[70]

Malgré leur facilité de conception et d'utilisation, ces différents hydrogels présentent certaines limites. Leurs propriétés mécaniques sont dépendantes du mécanisme de réticulation, et sont donc difficilement modulables. De plus, ces hydrogels ne peuvent être conçus qu'à partir de certains polymères spécifiques, ne permettant pas d'ajuster leur composition.

Certains polymères, ne présentant pas de propriétés de gélification naturelles, sont également très intéressants pour la conception d'hydrogels. Parmi ces polymères, l'AH est particulièrement utilisé en raison de sa biodégradabilité et de sa bioactivité. En effet, l'AH est

impliqué dans divers processus biologiques, comme l'embryogenèse, l'inflammation, et la réparation tissulaire.^[71] Les cellules peuvent notamment interagir avec l'AH via certains marqueurs de surfaces spécifiques tel que CD44 et RHAMM.^[72,73] L'utilisation de ces polymères nécessite alors de les modifier chimiquement avec des molécules réactives permettant la réticulation.

3.3 Conception d'hydrogels via la modification chimique de polymères

Selon les molécules réactives greffées, les polymères peuvent réticuler via des interactions non-covalentes, des liaisons covalentes ou des liaisons dynamiques covalentes (Figure 6).

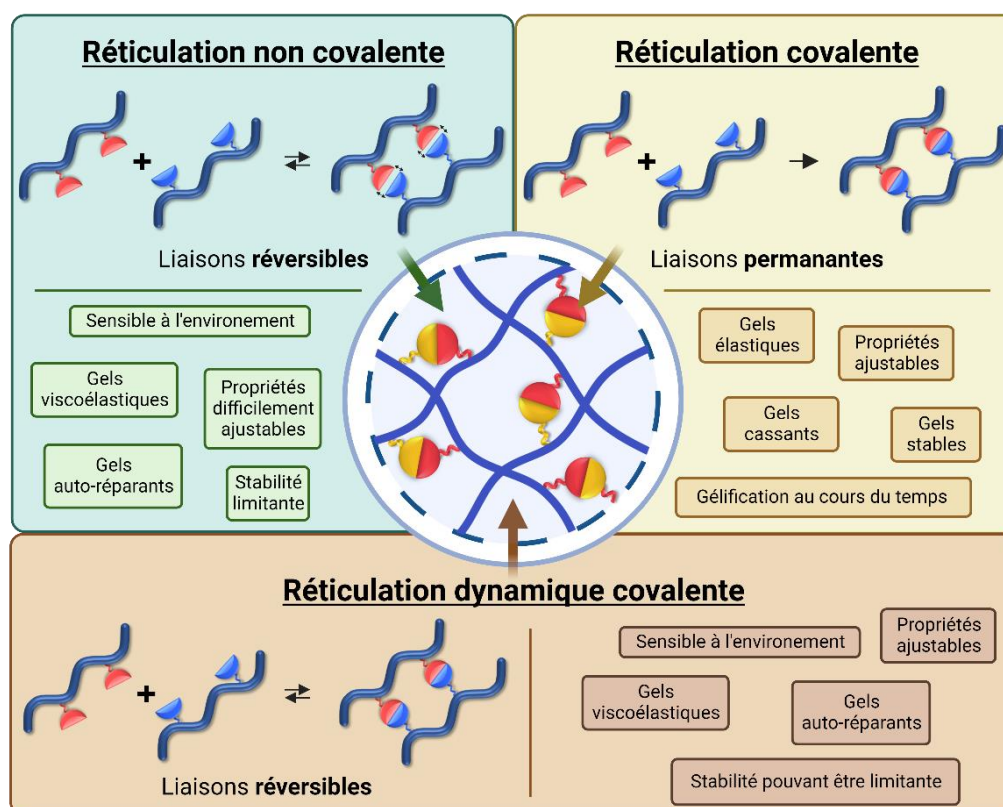


Figure 6 : Systèmes de réticulation envisageables pour la conception d'hydrogels.

3.3.1 Réticulation non covalente

De manière générale, en raison du caractère réversible des liaisons non covalentes, les hydrogels conçus à partir d'une réticulation non covalente présentent un comportement viscoélastique, rhéofluidant et auto-réparants.^[74] A ce jour, la plupart des stratégies de réticulation non covalentes reposent sur l'utilisation d'interactions supramoléculaires.^[75] Ces interactions sont fondées sur des affinités fortes entre motifs moléculaires via des effets hydrophobes, des liaisons de van der Waals et/ou des liaisons hydrogènes. Parmi les interactions supramoléculaires utilisées pour la conception d'hydrogels non covalents, on

trouve principalement les interactions « host-guest ». Ces interactions reposent sur l'utilisation de molécules « hôtes », notamment les macromolécules cycliques telles que les cyclodextrines (e.g., α -, β -, γ -) ou les cucurbit[n]uriles.^[76,77] Ces molécules s'arrangent en une structure spécifique, en forme de cône, renfermant une cavité apolaire et hydrophobe en son centre. Du fait de cet arrangement spatial, une molécule hydrophobe d'une taille adéquate peut alors se loger dans cette cavité et se complexer.^[76] Parmi les combinaisons « host-guest » décrites dans la littérature, le couple β -cyclodextrine-adamantane est le plus utilisé pour la conception d'hydrogels.^[78] D'autres couples peuvent être utilisés, tels que le couple β -cyclodextrine-cholestérol,^[79] ou cucurbit[8]uriles-naphthol.^[80] Il est possible d'ajuster les propriétés physicochimiques des hydrogels en faisant varier la structure chimique de l'un des deux composés,^[81] ou en utilisant des molécules pouvant changer de conformation sous l'effet de stimuli (e.g., lumière).^[82] Les hydrogels réticulés par interactions « host-guest » présentent généralement une stabilité limitée dans le temps en raison de la réversibilité de leur mode de réticulation.^[74] De plus, les macromolécules communément utilisées pour les réticulations supramoléculaires (e.g., cyclodextrine modifiée) nécessitent des procédés de synthèse complexes et onéreux, limitant l'essor de ces stratégies de réticulation.^[78]

3.3.2 Réticulation covalente

Les hydrogels formés d'un réseau de liaisons covalentes présentent un comportement élastique et une stabilité accrue par rapport aux hydrogels formés par des liaisons non covalentes.^[83] Ces hydrogels sont aussi caractérisés par un temps de gélification, qui est dû au temps nécessaire pour la formation des liaisons covalentes entre les chaînes.

La formation de liaisons covalentes requiert classiquement l'utilisation de catalyseurs ou de conditions spécifiques qui ne sont pas compatibles avec la conception d'hydrogels en tant que MEC synthétiques. Pour répondre à cette problématique, l'utilisation de réactions dites clicks et bioorthogonales sont dorénavant envisagées. Le concept de chimie click a été développé par Sharpless, au début des années 2000, dans le cadre de réactions utilisées pour la ligation chimique. Les réactions clicks doivent remplir un certain nombre de critères notamment (i) être modulaires, (ii) avoir un haut rendement chimique, (iii) ne générer que des sous-produits non toxiques, (iv) être stéréospécifiques, (v) être stables à température ambiante en présence d'eau et d'oxygène, (vi) ne pas nécessiter de solvants ou alors se faire dans l'eau, (vii) utiliser des réactifs facilement disponibles, et (viii) être économes en atomes.^[84] Ce

concept de chimie click a été complété au milieu des années 2000 par Bertozzi, avec le concept de bioorthogonalité. Les réactions bioorthogonales sont des réactions qui peuvent se produire en milieu biologique, sans interférer avec les processus biologiques.^[85] L'introduction des concepts de chimie click et de bioorthogonalité ont profondément changé la façon dont les réactions chimiques sont pensées et utilisées dans le cadre d'applications biomédicales, en particulier pour la conception d'hydrogels, justifiant pleinement le prix Nobel de chimie de l'année 2022. Les nombreux critères définissant une réaction click et bioorthogonale limitent cependant le nombre de réactions disponibles.

Dans la suite de cette sous-partie, seront détaillées les réactions covalentes qui nous semblent intéressantes pour la conception d'hydrogels, incluant la ligation de Staudinger, les réactions photo-click, l'addition de Michael, la réaction de Diels-Alder à demande électronique inversée (IEDDA), et la cycloaddition azoture-alcyne promue par tension de cycle (SPAAC).

La ligation de Staudinger

La réaction de Staudinger a été découverte en 1919 et consiste en la réaction entre un azoture organique ($R-N_3$) et une phosphine ($R-PH_3$) pour former un iminophosphorane. Cette réaction a été adaptée par le groupe de Bertozzi pour se produire en milieu biologique (Figure 7).^[85] Bien que la ligation de Staudinger soit la première réaction identifiée comme bioorthogonale, celle-ci n'a que peu été utilisée pour la conception d'hydrogels. En effet, son utilisation est limitée par une cinétique de réaction lente, ainsi que la faible stabilité du groupement phosphine (e.g., triphénylphosphine) en présence d'eau.^[86] De plus cette réaction implique le relargage de méthanol qui peut s'avérer cytotoxique.^[87]

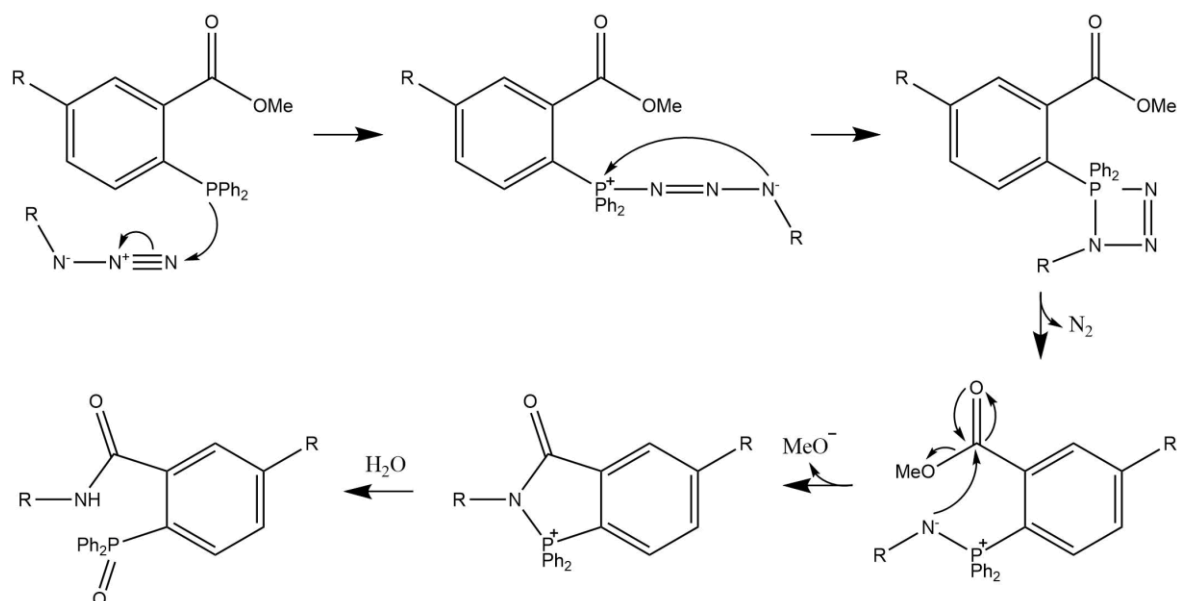


Figure 7 : Mécanisme général de la ligation de Staudinger

Les réactions photo-click

Les réactions photo-click permettent la formation de liaisons covalentes en présence de radiations lumineuses (souvent des rayonnements ultraviolets). Parmi les différentes réactions photo-click disponibles (e.g., photo-SPAAC, tétrazole-ène, thiol-yne),^[88] la réaction thiol-ène est la plus utilisée pour la conception d'hydrogels. Cette réaction consiste en la réaction entre un thiol et un alcène pour former une liaison thioéther.^[88,89] La formation de cette liaison est déclenchée par l'activation lumineuse d'un photo-initiateur (e.g., Irgacure 2959, riboflavine) qui génère la formation d'un groupement radicalaire thiyle (à partir du thiol). Ce groupement thiyle se lie ensuite à un alcène, qui pourra transférer le radical pour régénérer un groupement thiyle à partir d'un thiol (Figure 8). Cette réaction permet la formation d'hydrogels avec une rigidité facilement ajustable (allant de 0.5 à 30 kPa).^[90]

Bien que très utilisée, cette réaction présente certaines limites. En effet, cette réaction ne se produit pas toute seule et nécessite l'ajout d'une molécule (i.e., photo-initiateur). Une fois activé, le photo-initiateur génère des radicaux libres potentiellement cytotoxiques.^[91] Enfin, cette réaction ne respecte pas les critères de bioorthogonalité en raison de l'utilisation de fonctions thiols qui sont naturellement présentes dans le monde biologique.^[86]

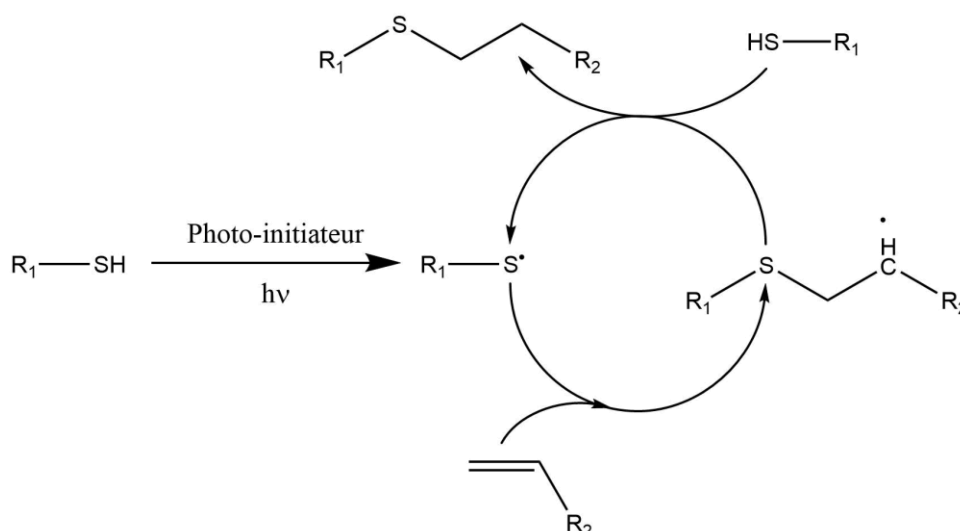


Figure 8 : Mécanisme général de la réaction photo-click entre un thiol et un alcène

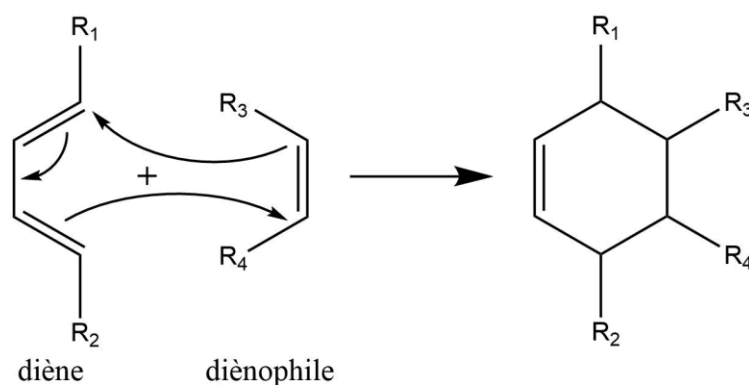
L'addition de Michael

L'addition de Michael est une réaction consistant en l'addition d'un nucléophile (e.g., thiol, carbanion) sur un électrophile (e.g., composé carbonylé α,β -insaturé) pour former un adduit de Michael. Contrairement à la photo-réticulation, cette réaction présente l'avantage de ne pas nécessiter l'ajout d'une molécule. La réaction spontanée entre un thiol et un maléimide est la réaction par addition de Michael la plus rapportée dans la littérature pour la formation d'hydrogels cytocompatibles.^[92] Elle a été appliquée à de nombreux polymères (e.g. PEG, dextrans, collagène), permettant la production d'hydrogels avec une large gamme de rigidité allant de 1 à 30 kPa.^[92-94] Cette réaction n'est cependant pas idéale pour la conception d'hydrogels en raison de la stabilité limitée de chacune des deux molécules réactives en conditions physiologiques de pH et de température, et de la réactivité des thiols envers les composés biologiques.

La réaction de Diels-Alder à demande électronique inversée (IEDDA)

L'IEDDA consiste en la conjugaison d'un diène avec un diénophile (Figure 9). Cette réaction est favorisée lorsque le diène est substitué par des groupements attracteurs d'électrons (généralement un dérivé de la tétrazine) et que le diénophile est substitué par des groupements donateurs d'électrons (e.g., méthyle). Cette réaction a pu être appliquée à différents polymères, dont la gélatine^[95] et l'AH.^[96] Parmi les combinaisons disponibles, le couple méthylphényltétrazine-norbornène a notamment permis la formation rapide (5-10 minutes) d'hydrogels stables et présentant un gonflement minimal à partir d'une concentration en polymère inférieure à 1%.^[96] Cependant, lors de l'utilisation d'un

groupement dérivé de la tétrazine, l'IEDDA produit une molécule de N₂ pouvant entraîner la formation de bulles dans les hydrogels. La formation de bulles peut gêner leur utilisation en créant des hétérogénéités des structures et en altérant la transparence des hydrogels. La formation de bulles étant favorisée à haute densité de réticulation, l'utilisation de l'IEDDA se limite à la production d'hydrogels de faible densité de réticulation, et donc de faible rigidité (< 5 kPa).



R_1, R_2 : groupement attracteur d'électrons R_3, R_4 : groupement donneur d'électrons

Figure 9 : Mécanisme général de la réaction de l'IEDDA

La cycloaddition azoture-alcyne promue par tension de cycle (SPAAC)

Historiquement, la conjugaison d'un azoture avec un alcyne pour obtenir un groupement triazole, aussi appelé cycloaddition de Huisgen, s'effectuait en chauffant le mélange à 100 °C, produisant de manière lente un mélange d'isomère 1,4 et 1,5.^[97] La cycloaddition de Huisgen a par la suite été améliorée par Sharpless au début des années 2000, via l'utilisation de cuivre(I) comme catalyseur, accélérant la cinétique de réaction à température ambiante et la rendant stéréospécifique.^[98] Cette réaction de cycloaddition azoture-alcyne catalysée par du cuivre(I) (CuAAC) fut la première définie par Sharpless comme réaction click. Cependant la présence d'un catalyseur cytotoxique a empêché l'essor de cette stratégie de conjugaison pour les applications dans le domaine biomédicale. Dans cette optique, le groupe de Bertozzi a développé une stratégie de cycloaddition permettant de s'affranchir du catalyseur Cu(I).^[99] Pour cela, un cycloalcyne à cycle tendu (e.g., cyclooctyne) est utilisé, favorisant sa réaction spontanée avec l'azoture (Figure 10). Cette réaction, appelée cycloaddition azoture-alcyne promue par tension de cycle (SPAAC), est certes plus lente que celle catalysée par du Cu(I), mais remplit l'ensemble des critères de la chimie click et de bioorthogonalité. Afin d'améliorer la réactivité de l'alcyne, différents dérivés de cyclooctynes ont été synthétisés, notamment par

l'ajout de groupements électroattracteurs (e.g., fluor) ou l'augmentation de la tension de cycle (e.g., ajout de groupements benzène). Ces modifications peuvent cependant diminuer la solubilité des composants.

La dibenzocyclooctyne et la bicyclononyne (BCN) sont les cyclooctynes les plus couramment utilisées pour la formation d'hydrogels à base de SPAAC. En greffant ces cyclooctynes sur des polymères, des hydrogels à base d'AH, de polyéthylène glycol (PEG) ou de polypeptides ont pu être obtenus. Il a été rapporté que les hydrogels à base de SPAAC se forment généralement rapidement (< 15 min), peuvent présenter une gamme de rigidité allant de 0.1 à 10 kPa, et sont cytotocompatibles.^[100] Les hydrogels de SPAAC, notamment ceux à base d'AH ont cependant montré certaines limites, telles qu'un gonflement excessif et une dégradation rapide (en moins d'une semaine).^[101,102]

La SPAAC est l'une des rares réactions chimiques à répondre à l'ensemble des critères de la chimie click et de la bioorthogonalité, Pour cette raison, nous avons choisi d'explorer l'utilisation de la SPAAC comme nouvel outil pour la conception d'hydrogels covalents.

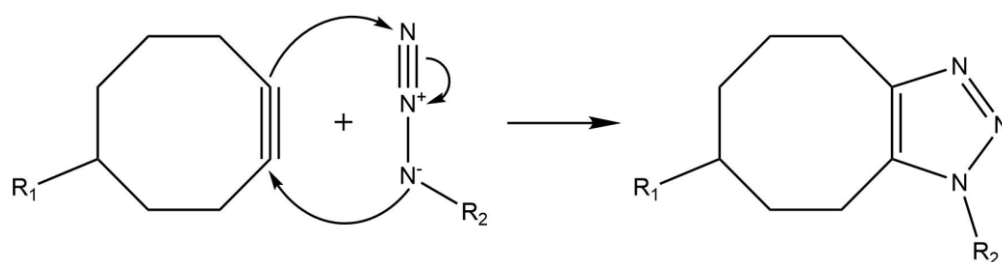


Figure 10 : Mécanisme général de la réaction de SPAAC

3.3.3 Réticulation dynamique covalente

Les réactions dynamiques covalentes forment des liaisons covalentes qui ont la particularité de pouvoir se former et se dissocier selon un équilibre chimique. La réversibilité des liaisons dynamiques covalentes permet aux hydrogels dynamiques covalents de se réorganiser sous la contrainte et de dissiper l'énergie. Ces hydrogels présentent donc un comportement viscoélastique et une capacité d'auto-réparation. En raison de leurs propriétés physico-chimiques intéressantes, les hydrogels dynamiques covalents sont de plus en plus utilisés en tant que MEC synthétiques. Parmi les stratégies de réticulations dynamiques covalentes disponibles pour la conception d'hydrogels dynamiques, on trouve les liaisons disulfures, la réaction de Diels-Alder, les bases de Schiff, et les liaisons esters de boronate.

Les liaisons disulfures

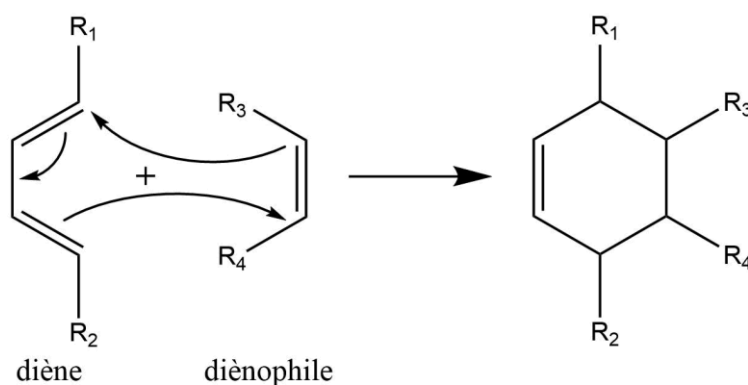
Les liaisons disulfures sont obtenues par réactions entre deux groupements thiols. Ces liaisons peuvent se former par oxydation et se dissocier en groupements thiols par réduction. En plus d'être sensible aux phénomènes d'oxydoréductions (e.g., présence d'oxygène), cette réaction est sensible à la lumière et au pH.^[103,104] Les fonctions thiols sont également peu stables en conditions physiologiques, et peuvent interagir avec différentes molécules biologiques (e.g., protéines). Pour toutes ces raisons, les hydrogels à bases de liaisons disulfures ne sont que très peu utilisés.

La réaction de Diels-Alder

La réaction de Diels-Alder est une réaction de conjugaison entre un diène et un alcène (Figure 11). Cette conjugaison est favorisée lorsque le diène est substitué par des groupements donateurs d'électrons (e.g., méthyle, éther) et que le diénophile est substitué par des groupements attracteurs d'électrons (e.g., carbonyle).^[105,106] La réversibilité de la réaction est dépendante de la température, la dissociation de l'adduit étant favorisée à température élevée (vers 100 °C).^[105] En conséquence, les hydrogels réticulés par Diels-Alder présentent, en conditions physiologiques, des propriétés physicochimiques proches de celles des hydrogels covalents (e.g., élasticité).

Classiquement, cette réaction se produit entre un groupement furane et un groupement maléimide. Elle peut se produire en conditions physiologiques et produit des hydrogels cytocompatibles. Les hydrogels réticulés par cette réaction de Diels-Alder présentent généralement un gonflement important et une stabilité limitée. Ce comportement est attribuable à la mauvaise stabilité des précurseurs, notamment le maléimide. En effet, suite à la dissociation des nœuds de réticulation, le maléimide libre peut alors subir une hydrolyse, l'empêchant de réagir de nouveau avec le diène pour reformer l'adduit.^[107,108] De plus, cette réaction est limitée par sa cinétique de réaction relativement lente (parfois plus d'une heure).^[109,110]

Pour augmenter la cinétique de réaction, des diènes plus riches en électrons, tels que le méthylfurane ou le fulvène, ont été utilisés, permettant des temps de gélifications de moins d'1 minute.^[108,111] Cependant, ces réactions sont d'autant plus réversibles, accentuant la faible stabilité et le gonflement des hydrogels.^[108]



R_1, R_2 : groupement donneur d'électrons R_3, R_4 : groupement attracteur d'électrons

Figure 11 : Mécanisme général de la réaction de Diels-Alder

Les bases de Schiff

Les bases de Schiff (i.e., liaisons imines, hydrazones, oximes) sont issues de la condensation réversible entre une amine et un carbonyle (Figure 12a). L'équilibre de la réaction est dépendant des groupements précurseurs utilisés. Des liaisons imines peuvent être formées en conditions physiologiques par réaction entre une amine et un carbonyle. Ces liaisons sont cependant facilement rompues en présence d'eau ou d'un autre nucléophile, déplaçant l'équilibre de réaction vers les formes dissociées. La réaction entre une hydrazine (i.e., $R-NH-NH_2$) et un carbonyle permet la formation de liaisons hydrazones, et de favoriser l'équilibre de réaction vers la condensation des précurseurs. Cet équilibre de réaction peut être encore plus déplacé vers les formes liées via l'utilisation de la réaction entre un groupement oxyamine (i.e., $R-O-NH_2$) et carbonyle pour former des liaisons oximes (Figure 12b). Les différences observées entre les équilibres de réaction sont dues à une différence d'effets mésomères, stabilisant de façon plus ou moins importante les liaisons formées (imine < hydrazone < oxime).^[112] Au-delà de la nature de la fonction amine, la nature du groupement carbonyle peut aussi influencer l'équilibre de réaction. En effet, il a été montré que, comparé à un aldéhyde aliphatique, un benzaldéhyde favorise la stabilisation de la liaison hydrazone.^[113]

Ces différentes bases de Schiff ont été étudiées pour le développement d'hydrogels dynamiques covalents. Cette stratégie de réticulation permet la formation d'hydrogels cytocompatibles, viscoélastiques et aux propriétés mécaniques contrôlables. En jouant sur la nature des précurseurs, il est notamment possible de contrôler précisément leurs propriétés mécaniques, telles que leur viscoélasticité et leur dégradabilité.^[113,114] Par exemple, en

fonctionnalisant un PEG avec un aldéhyde aliphatique ou un benzaldéhyde, le groupe de Kristi Anseth a pu obtenir des hydrogels basés sur des liaisons hydrazones avec une gamme de temps de relaxation (i.e., temps nécessaire à un matériau viscoélastique pour dissiper la contrainte) allant de 2000 à 20000 secondes.^[115]

Bien que les hydrogels réticulés par des bases de Schiff soient de plus en plus utilisés, ils présentent néanmoins certains défauts. La plupart des hydrogels décrits dans la littérature présentent une stabilité limitée, nécessitant une co-réticulation covalente pour être stables dans le temps.^[115] Cette stabilité limitée peut être le résultat de la forte sensibilité au pH et aux phénomènes d'oxydoréductions des précurseurs à pH neutre.^[116,117] Enfin ces réactions ne sont pas bioorthogonales puisque les amines primaires et les carbonyles sont des fonctions réactives présentes dans le monde biologique.

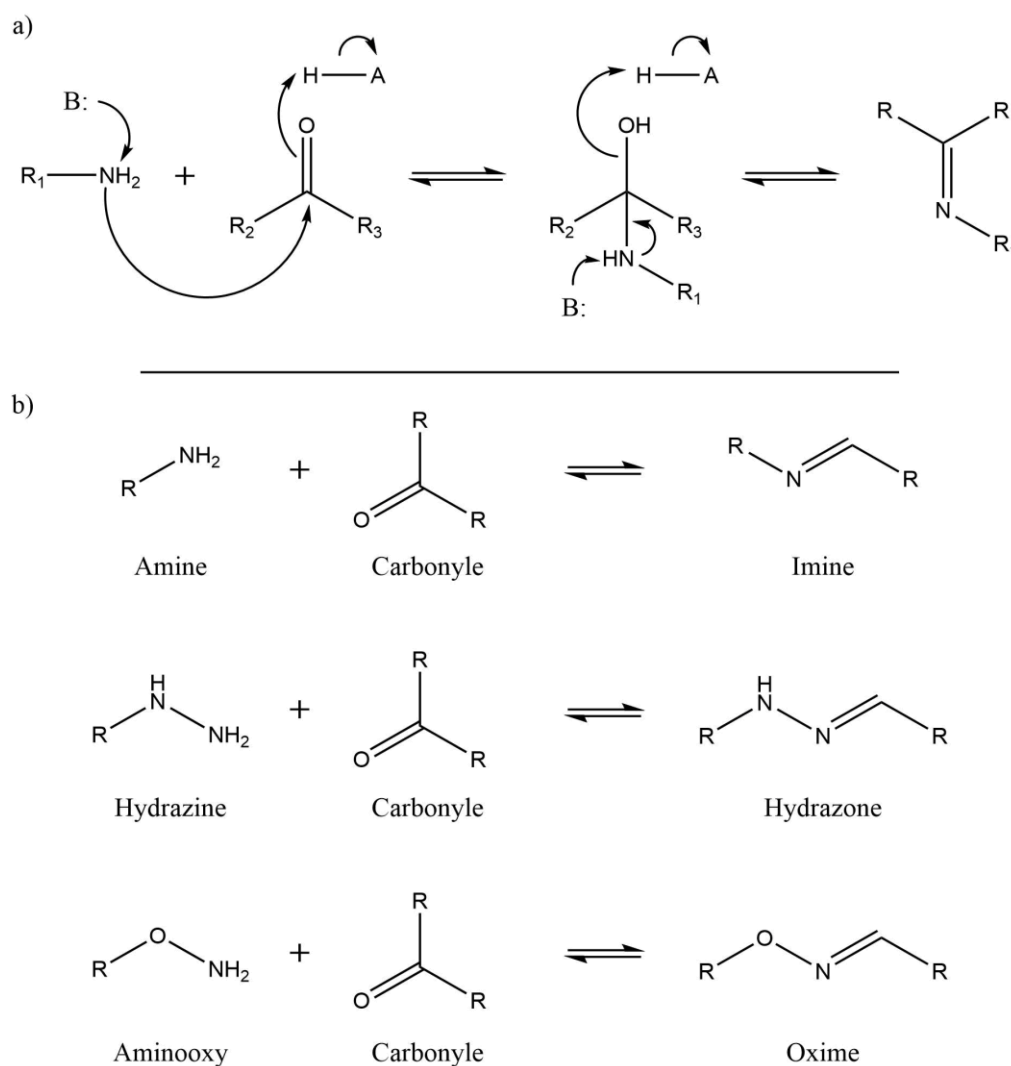


Figure 12 : Formation de bases de Schiff.

a) mécanisme général de la condensation entre une amine et un carbonyle. b) Formation de liaisons imine, hydrazone ou oxime.

Les esters de boronate

Un ester de boronate est une fonction chimique issue de la condensation réversible entre un dérivé d'acide boronique (principalement un acide phénylboronique [PBA]) et un diol (Figure 13). La formation d'ester de boronate comme méthode de réticulation se démarque des autres réactions dynamiques covalentes par la stabilité de ses précurseurs en conditions physiologiques. De plus, bien que les composants biologiques présentent des diols (e.g., polysaccharides), la réactivité des dérivés d'acide boronique avec les diols naturels est considérée comme faible.^[118] Pour cette raison, cette réaction peut être considérée comme bioorthogonale. L'inconvénient majeure de cette réaction est qu'elle est favorisée à pH basique, limitant ainsi la conception d'hydrogels à base d'esters de boronate en conditions physiologiques.^[104,119]

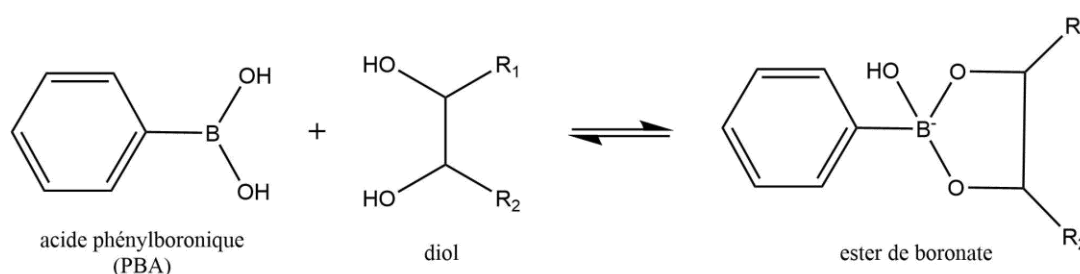


Figure 13 : Formation d'ester de boronate via la complexation entre un acide boronique et un diol.

Récemment, des nouveaux dérivés de PBA (e.g., fluoro-PBA, PBA de type Wulff, benzoxaborole) ont été utilisés en association avec des diols présentant une forte affinité pour les acides boroniques (e.g., sorbitol, dopamine), et ont permis la formation d'hydrogels en conditions physiologiques.^[120–123] Ces hydrogels se forment quasiment instantanément, sont cytocompatibles, et présentent les caractéristiques des hydrogels dynamiques (i.e., viscoélasticité, injectabilité, auto-réparation). Il est à noter que parmi les différents hydrogels viscoélastiques, ceux réticulés via des esters de boronate montrent les plus courts temps de relaxation (< 10 secondes).^[124]

Comme l'ensemble des hydrogels dynamiques covalents, les hydrogels à base d'esters de boronate présentent une stabilité limitée et un gonflement important.^[121,125,126] Leurs propriétés mécaniques (e.g., élasticité, temps de relaxation) sont également difficilement modulables.^[122,127] Dans le cadre de doctorat, nous avons choisi de relever le défi de concevoir des hydrogels dynamiques covalents à base d'esters de boronate stables et sans gonflement en conditions physiologiques.

4. Vers l'étude des interactions cellules-matériaux

4.1 D'un modèle de culture 2D à 3D

La plupart de nos connaissances actuelles sur les processus cellulaires ont été obtenues grâce à des modèles de culture cellulaire en deux dimensions (2D). Ces travaux ont notamment mis en évidence l'influence des propriétés physiques et biochimiques des hydrogels sur le comportement et les fonctions des cellules. Dans une étude pionnière datant de la fin des années 1990, Pelham et Wang ont mis en évidence l'influence de la rigidité du substrat sur le comportement de cellules épithéliales.^[128] Lorsque les cellules étaient cultivées sur une surface de 15 kPa, les cellules étaient moins étalées et plus mobiles que des cellules cultivées sur une surface de 70 kPa. Par la suite, d'autres ont montré que le devenir cellulaire de CSMs était dépendant de la rigidité du substrat sur lequel elles sont cultivées.^[129] Ces phénomènes de mécanotransduction sont médiés par certaines structures telles que les canaux salins ou les intégrines. Ces dernières sont des récepteurs permettant l'adhésion cellulaire aux protéines de la MEC (e.g., fibronectine, vitronectine, collagènes).^[124,130] Via les intégrines, les cellules exercent des forces de tractions (i.e., contraction de l'actomyosine) permettant de ressentir les variations des propriétés mécaniques et biochimiques de la MEC.^[131]

Bien qu'intéressant, ces résultats ne reflètent pas nécessairement le comportement naturel des cellules. En 2D, les cellules sont aplaties le long de surfaces très rigides (i.e., plastique), ne recevant que des signaux bidirectionnels.^[63,132] In vivo, la plupart des cellules se trouvent dans un environnement en trois dimensions (3D), recevant des signaux tridirectionnelles.^[133,134] Dans leur travaux pionniers, Tanaka et al. ont montré l'importance d'une culture en 3D pour favoriser la différenciation chondrogénique de cellules embryonnaires pluripotentes.^[135] Ces travaux ont remis en question le modèle classique de culture cellulaire en 2D vers une culture en 3D plus proche de l'environnement natif des cellules. Dans ce contexte, les hydrogels se sont imposés comme un outil idéal pour la culture de cellules en 3D et l'étude des processus cellulaires.^[136]

4.2 Influence des interactions cellules-matériaux

Les récents progrès en outils de synthèse permettent aujourd'hui d'envisager la conception d'hydrogels aux propriétés mécaniques et biochimiques ajustables. Ces matériaux permettent l'étude de l'influence des interactions entre cellules et matériaux sur le comportement des

cellules. Les paramètres récemment étudiés sont les paramètres physiques (e.g., rigidité, dégradabilité, viscoélasticité) et les paramètres biochimiques (e.g., nature du polymère, peptides).

4.2.1 Influence des paramètres physiques

Influence de la rigidité

Alors que l'influence de la rigidité a largement été étudiée en 2D, son influence dans des modèles de culture 3D est encore mal connue. Il a été montré que la rigidité influence la morphologie des CSMs, avec la présence de cellules étirées dans des hydrogels « mous » (i.e., 1 kPa) et sphériques dans des hydrogels « durs » (i.e., 20 kPa).^[90]

De nombreux travaux se sont concentrés sur l'étude de l'influence de la rigidité sur la différenciation des CSMs. En comparant des hydrogels de PEG de 5 kPa et 15 kPa, une étude a mis en évidence l'intérêt d'utiliser des hydrogels « mous » pour favoriser la différenciation de CSMs en chondrocytes plutôt qu'en chondrocytes hypertrophiques.^[137] L'équipe de David Mooney a quant à elle étudié l'influence de la rigidité sur la différenciation des CSMs en adipocytes ou ostéoblastes.^[138,139] Ils ont montré que des hydrogels « mous » (i.e., 1-5 kPa) favorisent la différenciation des CSMs vers la voie adipogénique, tandis que des hydrogels plus « durs » (i.e., 20-30 kPa) favorisent la différenciation ostéogénique.

Influence de la dégradabilité

En développant des hydrogels à base de polymères biodégradables, ou présentant des motifs biodégradables, certains auteurs ont pu étudier l'influence de la dégradabilité de la MEC sur le comportement cellulaire.^[140] Il a notamment été montré que, lors de l'encapsulation de cellules souches neurales dans un hydrogel, la présence de fonctions dégradables était indispensable pour maintenir l'expression de marqueurs souches tels que *Nestin* et *SOX-2*.^[141]

En intégrant un peptide dégradable au sein d'un hydrogel de PEG, des auteurs ont observé une augmentation de l'étalement et de la prolifération de CSMs en fonction de la dégradabilité de l'hydrogel.^[142] Ce phénomène a aussi été observé par le groupe de Jason Burdick.^[143] Ils ont aussi montré que la différenciation ostéogénique des CSMs était favorisée lorsque l'hydrogel pouvait être dégradé.^[143]

Influence de la viscoélasticité

Récemment, l'influence d'un troisième paramètre physique a attiré l'attention de certains chercheurs : la viscoélasticité.^[130] La viscoélasticité est une composante majeure de la MEC naturelle,^[144] dont le rôle sur le comportement cellulaire a récemment été étudié in vitro.^[124,139,145,146] Il a par exemple été montré que des CSMs pouvaient migrer au sein d'hydrogels d'alginate viscoélastiques tandis qu'elles restaient confinées dans des hydrogels plus élastiques.^[147] Les CSMs présentent aussi un étalement plus important lorsqu'elles sont encapsulées dans un hydrogel viscoélastique plutôt que dans un hydrogel élastique.^[146]

Une étude pionnière de Chaudhuri et al. a mis en évidence l'effet du temps de relaxation du microenvironnement cellulaire sur le comportement des CSMs.^[139] Les auteurs ont observé qu'une diminution du temps de relaxation d'un hydrogel, de > 3000 secondes à 70 secondes, entraînait l'augmentation de l'étalement et de la prolifération cellulaire, et favorisait la différenciation ostéogénique. Cette étude a par la suite été suivie par d'autres travaux confirmant le rôle de la viscoélasticité sur l'adhésion, l'étalement et la différenciation des CSMs.^[81,148]

Ces travaux ont donc mis en évidence l'influence des propriétés physiques sur divers processus cellulaires. L'étude de leurs effets doit encore être complétée afin de comprendre les mécanismes cellulaires sous-jacents. Pour élucider ces processus, le développement d'hydrogels aux propriétés mécaniques ajustables est alors nécessaire. Parmi les pistes potentielles, le cofacteur de transcription yes-associated protein/transcriptional coactivator PDZ binding motif (YAP/TAZ) pourrait notamment être impliqué dans la régulation de la mécanotransduction.^[90,124] Il a aussi été récemment suggéré que les différences observées pourraient être attribuées à un confinement cellulaire plus ou moins important.^[130]

4.2.2 Influence des paramètres biochimiques

Influence de la nature du polymère

Grâce à la présence de motifs d'interactions avec les cellules, des polymères bioactifs comme l'AH ou la gélatine sont considérés comme très pertinents pour la conception d'hydrogels et de MEC synthétiques. Si quelques travaux ont porté sur l'effet de la nature du polymère, les conclusions restent difficiles à formuler.^[149,150] En effet, il est difficile de produire des hydrogels dont seule la composition en polymère varie, indépendamment des propriétés mécaniques.^[151]

Influence des peptides

L'influence des protéines de la MEC (fibronectine, vitronectine, laminine) a également fait l'objet d'études, le plus souvent basées sur l'utilisation de peptides synthétiques reproduisant leurs sites d'adhésion.^[152] Parmi la variété de peptides couramment utilisés, nous pouvons citer le motif peptidique « RGD », qui est le site d'adhésion de la fibronectine et de la vitronectine, et qui se lie aux intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$.^[152] Il a été montré que fonctionnaliser un hydrogel avec le peptide RGD permettait l'adhésion de CSMs à la MEC synthétique, prolongeant ainsi la survie et la rétention des CSMs in vivo.^[153,154] Ce peptide augmente aussi la prolifération des CSMs,^[155] et favorise la différenciation ostéogénique ou chondrogénique des CSMs.^[137,138]

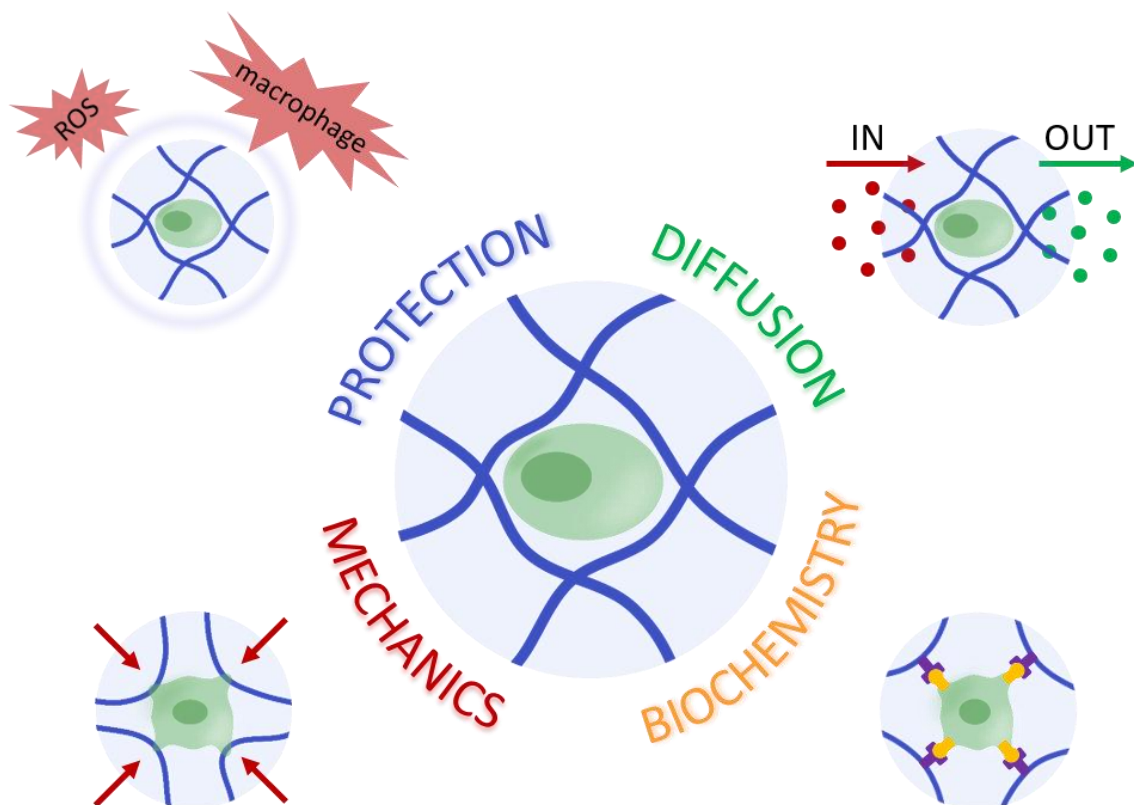
Le peptide GFOGER est quant à lui utilisé pour mimer le collagène de type I, et se lie à l'intégrine $\alpha_2\beta_1$. Ce peptide permet d'améliorer la survie des CSMs in vivo, de moduler leur expression génique et leur sécrétion, et d'améliorer leur capacité de régénération osseuse.^[154]

4.3 Influence des interactions cellules-matériaux sur la sécrétion des CSMs

De nombreuses études ont été consacrées à l'effet des interactions cellules-matériaux sur la survie, l'étalement, la prolifération et la différenciation des CSMs.^[130,156] En revanche, il existe à ce jour peu de travaux concernant l'influence des interactions cellules-matériaux sur les propriétés de sécrétion des CSMs. Les connaissances actuelles au sujet de l'effet des propriétés mécaniques et biochimiques sur le sécrétome des CSMs est détaillé dans la partie suivante, adaptée d'une revue de la littérature intitulée « Harnessing cell-material interactions to control stem cell secretion for osteoarthritis treatment », qui sera soumise dans le journal *Biomaterials*.

Article I

Harnessing cell-material interactions to control stem cell secretion for osteoarthritis treatment



L'article sera soumis dans le journal *Biomaterials*

Abstract

Osteoarthritis (OA) is the most common debilitating joint disease, yet there is no curative treatment for OA to date. Delivering mesenchymal stromal cells (MSCs) as therapeutic cells to mitigate the inflammatory symptoms associated with OA is attracting increasing attention. In principle, MSCs could respond to the pro-inflammatory microenvironment of an OA joint by the secretion of anti-inflammatory, immunomodulatory and anti-apoptotic factors, therefore limiting pain, as well as the disease development. However, the microenvironment of MSCs is known to greatly affect their survival and bioactivity, and using tailored biomaterial scaffolds could be key to the success of intra-articular MSC-based therapies. The aim of this review is to identify and discuss essential characteristics of biomaterial scaffolds to best promote MSC secretory functions in the context of OA. First, a brief introduction to the OA physiopathology is provided, followed by an overview of the MSC secretory functions, as well as the current limitations of MSC-based therapy. Then, we review the current knowledge on the effects of cell-material interactions on MSC secretion. These considerations allow us to define rational guidelines for next-generation biomaterial design to improve the MSC-based therapy of OA.

Résumé

L'arthrose est la maladie articulaire la plus fréquente. Malgré son impact socioéconomique, il n'existe à ce jour toujours pas de traitements curatifs de la maladie. Parmi les nouvelles pistes thérapeutiques, l'injection de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) a été envisagée pour atténuer les symptômes associés à l'arthrose. En effet, en réponse à l'environnement pro-inflammatoire d'une articulation arthrosique, les CSMs pourraient sécréter des facteurs anti-arthrosiques qui diminueraient la douleur voire ralentiraient la progression de la maladie. Étant donné que les fonctions des CSMs sont connues pour être dépendantes de leur microenvironnement, l'utilisation de biomatériaux pourrait être clé pour améliorer la thérapie cellulaire. Ainsi, l'objectif de cette revue est d'identifier et de discuter des propriétés essentielles d'un biomatériau pour favoriser la sécrétion des CSMs dans le contexte de l'arthrose. Cette revue est composée d'une brève introduction sur la physiopathologie de l'arthrose suivie d'un compte rendu sur la capacité de sécrétion des CSMs et des limites de la thérapie à base de CSMs. Cette revue aborde ensuite l'état des connaissances actuelles sur l'influence des interactions cellules-matériaux sur la sécrétion des CSMs. Cette vue d'ensemble nous a par la suite permis de définir différents critères de conception pour l'amélioration de la thérapie cellulaire de l'arthrose assistée par un biomatériau.

1. Introduction

Osteoarthritis (OA) is the most common debilitating joint disease, affecting 10-20% of the population worldwide^[1]. It has important socio-economic repercussions with its high prevalence and disabling symptoms, resulting in a total healthcare cost currently estimated to be €400 billion per year in Europe^[2]. Previously described as a consequence of aging, it is now established that many factors can induce OA, such as genetic predisposition, abnormal joint biomechanics, traumatic injury, load excess, repetitive joint use, overweight or abnormal bone density^[3]. Current OA treatments depend on its severity. For low- to mild-stage OA, the administration of painkillers, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), as well as intra-articular injections of hyaluronic acid (HA) or corticosteroids, can help alleviate the pain. However, these short-lasting treatments do not prevent the progression of the disease. Regarding end-stage OA, the total joint arthroplasty is the gold standard treatment despite being an invasive and expensive surgical procedure^[4]. To date, there is no curative treatment to OA, which inevitably progress toward the complete destruction of diseased joint tissues.

Treating patients with cells that can respond to tissue or fluid alterations by secreting therapeutic factors is appealing. In addition to their differentiation capacities^[5,6], mesenchymal stromal cells (MSCs) have attracted much attention as therapeutic cells for their capacity to respond to a pro-inflammatory microenvironment by the local release of anti-inflammatory, immunomodulatory and anti-apoptotic factors. It was shown that MSCs can mitigate the symptoms of a variety of inflammatory and inflammation-related disorders^[7], including OA^[8]. However, the conventional delivery of MSCs (in saline) leads to limited cell survival upon injection, cell leakage out of the target tissue/organ, and uncontrolled cell fate^[9,10]. It is now commonly accepted that a microenvironment that supports the survival and bioactivity of transplanted cells is key to the therapeutic success. Thus, properly designing a biomaterial scaffold for the intra-articular delivery of cells is instrumental for the future translation of MSC-based OA therapy.

Hydrogels are often considered to be the most relevant class of biomaterials for cell encapsulation and delivery, as they can recapitulate most of the physicochemical features of a natural cell microenvironment^[11,12]. Hydrogels can also provide cytoprotection and immunoisolation by creating a barrier against immune cells, with the hope of avoiding the use of long-term immunosuppressive therapy^[13]. For the encapsulation and delivery of MSCs,

several fundamental parameters need to be considered, including hydrogel cytocompatibility, injectability and permeability. More importantly, the recent progress in the understanding of cell-matrix interactions provide new fundamental resources for the design of hydrogels able to guide the secretions of encapsulated MSCs, and potentially maximize their therapeutic effects.

The aim of this review is to identify key parameters in biomaterial design to best promote and guide MSC paracrine functions for OA treatment. First, focusing on the pathophysiology of OA and the progress of MSC-based therapies, we will review the most recent literature on MSC secretion, and highlight several factors of particular interest for OA therapy. Then, we will explore the question of the influence of cell-material interactions on encapsulated MSC secretion, allowing us to identify specific mechanical and biochemical properties that promote MSC secretion. These considerations will allow us to define guidelines for the rational design of an injectable hydrogel to deliver and improve the therapeutic efficacy of inflammation-responsive MSCs.

2. Pathophysiology of OA

The most common sites of OA are the diarthrodial joints (e.g., knee, hip, digits). These joints are mainly composed of two adjacent bones, each covered by a layer of articular cartilage, together surrounded and maintained by a synovial membrane^[14]. OA is mainly diagnosed by radiological imaging, and is characterized by articular cartilage degradation, cartilage space narrowing, synovial inflammation, subchondral bone sclerosis, and the formation of osteophytes (i.e., bone spurs), together leading to pain and loss of joint mobility^[15–17]. Interestingly, magnetic resonance imaging (MRI) can also be used to reveal structural changes of the soft joint tissues (e.g., meniscus, ligament, synovial membrane) even before radiological OA evidences such as cartilage space narrowing, empathizing the fact that OA is a whole joint disease^[18–21].

OA pathological processes have been extensively investigated^[22–25]; yet, identifying all of the triggering factors and underlying mechanisms of the disease progression is still a challenge. As one of the main symptoms of OA, articular cartilage degradation has been deeply characterized. At the tissue level, a loss of glycosaminoglycans, proteoglycans, collagens and non-collagenous proteins is observed^[26–29], together with an increase in water content

resulting in cartilage matrix swelling. The expansion of the deep, calcified cartilage zone is observed, progressively taking over upper cartilage layers^[30,31]. Fissures eventually appear, accompanied by exfoliation, leading to a loss of articular cartilage tissue. At the cellular level, chondrocytes, which are mature, non-proliferative cells responsible for cartilage matrix production, endure the disruption of their pericellular matrix, to which the cells are anchored via surface receptors such as integrins, annexins, CD44 or discoidin domain-containing receptor 2 (DDR2)^[32,33]. This leads to the expression of proteinases such as serine protease HTRA1, matrix metalloproteases (MMP-3 & -13) and aggrecanases (ADAMTS-4 and -5), that can actively degrade the matrix^[34-37]. With the cartilage matrix degradation, the basal O₂ tension (< 1%) in the avascular deep cartilage tends to increase, altering the protecting effect of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α), which is a transcriptional regulator that is known to promote cell secretion and survival^[38,39]. As the cartilage matrix degradation progresses, degradation products such as damage-associated molecular patterns (DAMPs, or alarmins) are produced and can reach other chondrocytes or cells in the surrounding tissues (e.g., synovial membrane), further triggering and amplifying catabolic processes. In particular, synoviocytes can release proinflammatory cytokines and reactive oxygen species (ROS), maintaining via a feedback loop the chondrocytes in their catabolic state^[14,40,41]. Among the pro-inflammatory mediators, nuclear factor- κ B (NF κ B) plays a central role in stress-induced pathways, enhancing the expression of HIF-2 α , which targets genes associated with cartilage destruction and hypertrophic phenotype, such as MMP-13, COL10A1, VEGFA or RUNX2^[42-44]. Regarding secreted factors, numerous inflammatory cytokines are found at increased levels in the synovial fluid of OA patients, such as tumor necrosis factors (TNFs), interleukins (e.g., IL-1, -6, -8, -15), CC-chemokines ligand 5 and 19 (CCL-5, -19), which play a role in the promotion of abnormal cartilage degradation and in the alteration of the chondrocyte phenotype^[45-48]. Moreover, the inflammatory state of OA favors the cellular infiltration of the synovial membrane by macrophages and T-cells, which can participate to the cartilage matrix degradation and chondrocyte apoptosis^[49,50]. The inflammation level in OA is fluctuating, with alternating dormant (low level) and acute (high level) phases^[51]. The causes of this phenomenon, called flare, remains unclear to date. In addition to the various biological pathways involved in OA, recent findings at the transcriptomic level indicate distinct molecular signatures of OA in cohorts of patients, suggesting a diversity of cellular responses to pathological triggers, and highlighting the complexity of the disease^[52]. With complex

biological processes, involving inflammation, mechanical and metabolic factors, OA is now commonly considered to be a multifaceted and multifactorial disease^[53]. In this context, intra-articular cell therapy, using MSCs in particular, has emerged as one possible approach to mitigate OA and its flare-up, with the hope to ultimately treat the disease.

3. MSC-based therapy for OA: Progress and challenges

Adult MSCs have been identified in various tissues (e.g., adipose tissue, bone marrow, peripheral blood) where they were shown to participate to tissue homeostasis. In addition to their self-renewal and their differentiation capacities, adult MSCs can secrete a multitude of bioactive molecules, ranging from soluble cytokines to growth factors and hormones^[54,55]. In an injured or inflammatory microenvironment, MSCs can adopt a pro-regenerative phenotype, secreting paracrine immunomodulatory and trophic factors^[56,57]. In response to pro-inflammatory cytokines (e.g., TNF- α , IL-1 β), MSCs can initiate a cross-talk with immune cells (e.g., T-cells, monocytes, macrophages) via their secretome. Of particular interest for their immunomodulation property, prostaglandin E2 (PGE2), nitric oxide (NO), indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and TNF-inducible gene-6 (TSG-6), have been shown to be secreted by MSCs to regulate the activity of immune cells and the polarization of macrophages^[58,59]. For instance, PGE2 induces a shift from a pro-inflammatory to an anti-inflammatory macrophage phenotype, resulting in an increased secretion of IL-10 and an inhibition of various pro-inflammatory cytokines such as TNF- α ^[60]. MSCs are also able to secrete vascular endothelial growth factor (VEGF), glial-derived neurotrophic factor (GDNF) or hepatocyte growth factor (HGF), in order to stimulate resident cells and create a pro-regenerative microenvironment^[55]. In addition to soluble factors, MSCs can exert their immunomodulatory ability through the secretion of extracellular vesicles (EVs)^[61,62], which are small particles carrying numerous cellular components (e.g., proteins, nucleic acids, lipids) with overall anti-fibrotic^[63], anti-apoptotic^[64], and anti-inflammatory^[65] properties. The therapeutic potential of MSCs has led to the investigation of secretion-mediated MSC therapy in the context of a variety of conditions associated with inflammatory disorders, including wound healing^[66], cardiovascular disease^[67], and graft-versus-host disease^[7]. Most of the completed clinical trials involving MSCs confirmed the feasibility and the safety of MSC-based therapies, encouraging further research especially for the treatment of inflammatory and degenerative diseases^[7].

From an OA perspective, MSCs could respond to the diverse pathological stimuli of an osteoarthritic joint (Figure 1). The secretion of immunomodulatory factors (e.g., PGE2, NO, IDO, TSG 6) seems to be highly relevant to regulate the infiltration of immune cells and the inflammation, in particular that of the synovial membrane. Moreover, MSCs could secrete HGF and basic fibroblast growth factor (bFGF), which have been identified as key mediators of the anti-fibrotic response of MSCs^[68,69], and were shown to reduce OA chondrocyte dedifferentiation^[68]. Furthermore, MSCs could prevent cartilage degradation through the secretion of thrombospondin-1 (THBS1)^[70], transforming growth factor (TGF) β -induced protein^[71], and EVs^[72]. Finally, MSCs could, in theory, respond proportionally to the fluctuating inflammatory signals, over long periods of time, offering an ideal flare-responsive treatment to prevent the disease progression. In general, MSC secretome can exert anti-apoptotic, anti-fibrotic, anti-hypertrophic and immunomodulatory activities^[73], which are all appealing properties to influence OA progression.

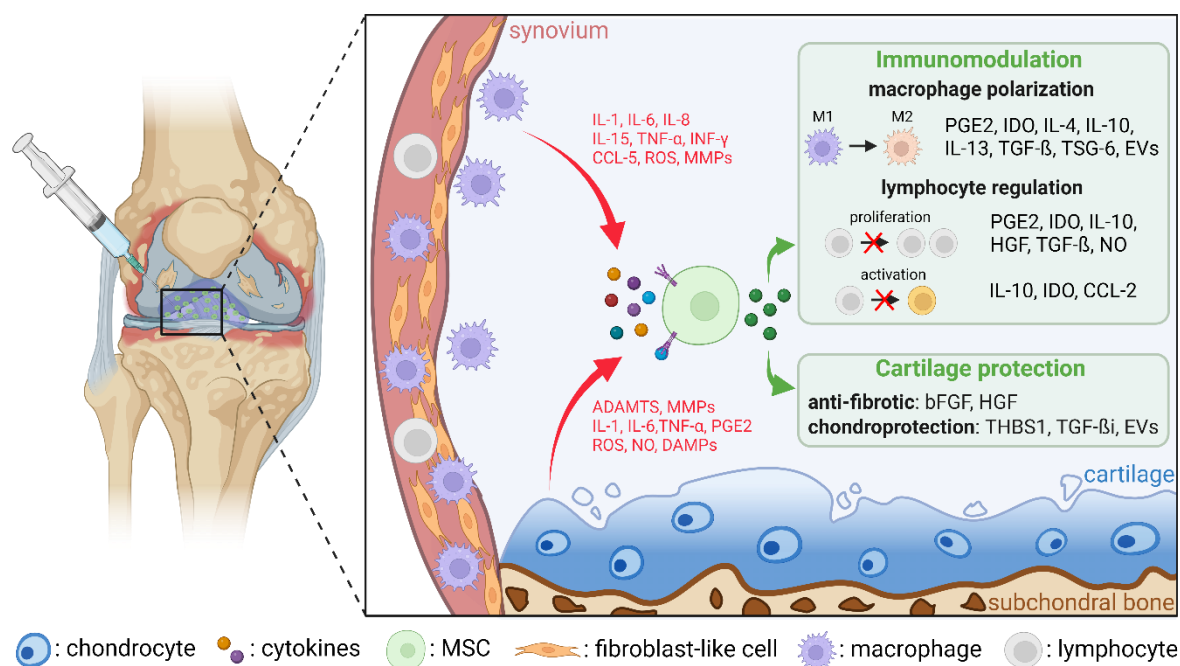


Figure 1: MSC secretion as a promising approach to prevent OA.

While the field of articular regenerative medicine has been focused for decades on using MSCs as an alternative source of chondrocytes for cartilage repair^[74–77], the recent observation that MSCs can exert a therapeutic effect through the secretion of soluble factors and/or EVs prompted the community to consider the intra-articular injection of MSCs as a new therapeutic approach. Several clinical trials have been performed to assess the regenerative and immunomodulatory potential of MSCs for OA treatment, and were listed in a recent

review^[8]. In general, pain relief and mobility improvement were observed. However, as reported in the context of other pathologies, conventional intra-articular injections of MSCs in saline suffer from several limitations. Upon injection, MSCs endure shear forces that typically damage cell membrane lowering cell viability^[9]. MSCs tend also to leak from the injection site toward the surrounding tissues^[10,78], leading to fewer and fewer cells effectively exerting their therapeutic functions at the delivery site over time. Finally, following intra-articular injection, cell fate is no longer controlled, which could hinder clinical translation. In this context, biomaterial scaffolds are more and more considered as key components to improve MSC-based therapies owing to their ability to provide a more suitable microenvironment to the delivered cells^[11]. Beyond improving cell survival and location, the recent progress in materials design now allow to foresee the use of scaffolds tailored to maximize MSC therapeutic potential for OA treatment. Yet, developing material-assisted cell therapy requires to fully understand the effects of cell-material interactions on MSC secretion.

4. Cell-material interactions and MSC secretion

The field of material-assisted cell therapy for OA is yet in its infancy, and could greatly benefit from both the extensive knowledge in other fields of regenerative medicine, and the most recent in vitro discoveries about cell-material interactions. In this section, we discuss the effects of cell-material interactions on factor secretion by MSCs (Table 1).

Table 1. Effects of cell-material interactions on factor secretion by MSCs

Investigated characteristics	Materials	Cell types	Results		Ref
			In vitro	In vivo	
Structure	Random vs aligned electrospun PCL ^a fibers in 2D	Rat ASCs ^b	- More immunomodulatory factors secreted on aligned fibers - Promotion of macrophage polarization and endothelial cell proliferation by conditioned medium from MSCs on aligned fibers	- The conditioned medium retrieved from MSCs seeded on aligned fibers accelerated wound healing in a rat model.	[79]
	Random vs aligned electrospun	Human ASCs	- More immunomodulatory factors secreted on aligned fibers		[80]

	PLA ^c fibers in 2D		- Correlation with increased FAK ^d activation and YAP/TAZ ^e signaling		
	Nanoporous (10 nm) vs microporous (125 μm) alginate hydrogels in 3D	Rat BMSCs ^f	- Secretion and cell-cell interactions promoted on microporous scaffolds - Involvement of N-cadherin in the heightened secretion		[81,82]
	Porous PEG ^g microgels in 3D (13 μm vs 110 μm vs 190 μm)	Human BMSCs	- Higher cell-cell interactions and cytokine secretion with increased porosity		[83]
	Gelatin scaffolds in 3D (400 μm vs 500 μm vs 600 μm)	Human BMSCs	- Cell-cell interactions and secretion maximized by medium pore size (≈500 μm)		[84]
Stiffness	PAAm ^h hydrogels in 2D 0.5 kPa vs 200 kPa	Human MSCs	- More immunomodulatory factors and trophic factors secreted on soft hydrogels - Involvement of cytoskeletal rearrangement		[85]
	PAAm hydrogels in 2D 0.15 kPa vs 10 kPa	Human ASCs	- More angiogenic factors secreted on soft hydrogels - Correlation between matrix stiffness, secretion and intracellular ROS ⁱ level		[86]
	Fibrin hydrogels in 3D 2 kPa vs 45 kPa	Human BMSCs (spheroids)	- VEGF ^l secretion promoted by stiff hydrogels - PGE2 ^m secretion promoted by soft hydrogels		[87]
	Alginate hydrogels in 3D 2 kPa vs 35 kPa	Human BMSCs	- More immunomodulatory factors secreted by TNF-α ⁿ -stimulated MSCs in soft hydrogels - Correlation with TNF-α receptors clustering	- Production and chemotaxis of monocytes from MSCs enhanced by soft matrix, in a mouse model.	[88]

Viscoelasticity	Purely elastic vs viscoelastic alginate hydrogels in 3D	Human BMSCs	- Elevated VEGF and endothelial cell proliferation with conditioned medium from MSCs in viscoelastic hydrogels	- Bone regeneration promoted by MSCs in viscoelastic hydrogels, in a rat calvarial defect model	[89]
			- Elevated <i>COX-2</i> and <i>TSG-6</i> gene expression and PGE2 secretion in viscoelastic hydrogels		[90]
Biochemical cues	HPMC ^o vs alginate hydrogels in 3D	Human ASCs	- Elevated IDO ^p , PGE2, HGF ^q secretion in HPMC vs alginate		[91]
	Collagen VS gelatin hydrogels with or without laminin in 3D	Human BMSCs	- Upregulated secretion of more than 20 cytokines in collagen Hydrogels (e.g., VEGF, HGF, TGF-β1) - Further upregulation with laminin inside collagen hydrogel		[92]
	Collagen scaffold, with or without chondroitin sulfate in 3D	Mice BMSCs	- Elevated <i>COX-2</i> , <i>iNOS</i> ^r and <i>TGF-β</i> gene expression with chondroitin sulfate	- Reduced leukocytes infiltration by MSCs encapsulated in collagen and chondroitin sulfate, when subcutaneously implanted in a rat model	[93]
	QK peptide immobilized in alginate hydrogels in 3D	Human BMSCs	- Endothelial cell proliferation promoted by conditioned medium from MSCs in QK-modified hydrogels		[89]
	RGD peptide immobilized in alginate hydrogels in 3D	Human BMSCs (spheroids)	- VEGF secretion and cell proliferation promoted by RGD-modified hydrogels		[94]
	RGD vs GFOGER peptide immobilized in PEG hydrogels in 3D	Human BMSCs	- Elevated VEGF, IL ^s -6 and IL-8 secretion in GFOGER-modified hydrogels compared to RGD	- Greater bone repair with MSCs in GFOGER-modified hydrogels, in a mice radial defect model compared to RGD	[95]

	RGD vs RRETAWA peptide immobilized in PEG hydrogels in 3D	Human BMSCs	- Elevated BMP-2 ^t secretion in RRETAWA-modified hydrogels - Greater proliferation in RGD-modified hydrogels		[96]
	HAVDI peptide immobilized in PEG hydrogels	Human BMSCs	- Upregulated secretion of more than 70 cytokines for MSCs in HAVDI-modified hydrogels showed		[83]
	HAVDI peptide immobilized in alginate hydrogels	Rat BMSCs	- Upregulation of several cytokines (e.g. VEGF, IL-10) for IGF ^u -stimulated MSCs in HAVDI-modified hydrogels - Myoblast migration promoted conditioned medium from IGF-stimulated MSCs in HAVDI-modified hydrogels		[82]

^aPCL, polycaprolactone; ^bASCs, adipose tissue-derived MSCs; ^cPLA, polylactic acid; ^dFAK, focal adhesion kinase; ^eYAP/TAZ, yes-associated protein/transcriptional coactivator with PDZ-binding motif; ^fBMSCs, bone marrow-derived MSCs; ^gPEG, polyethylene glycol; ^hPAAm, polyacrylamide; ⁱROS, reactive oxygen species; ^jCOX-2, cyclooxygenase-2; ^kTSG-6, TNF-inducible gene-6; ^lVEGF, vascular endothelial growth factor; ^mPGE2 prostaglandin E2; ⁿTNF- α , tumor necrosis factor- α ; ^oHPMC, hydroxypropylmethylcellulose; ^pIDO, indoleamine 2,3-dioxygenase; ^qHGF, hepatocyte growth factor; ^riNOS, nitric oxide synthase; ^sIL, interleukin; ^tBMP-2, bone morphogenic protein-2; ^uIGF, insulin-like growth factor.

4.1 Biomaterial physical properties and MSC secretion profile

4.1.1 Materials allowing cell spreading and cell-cell interactions enhance MSC secretion

Recent progress in material design allow for tuning different physical characteristics of synthetic scaffolds, such as fiber orientation or porosity, thereby enabling the investigation of their relationship to MSC behavior and immunomodulatory properties^[97–99]. For example, using electrospinning, fibrous polycaprolactone or polylactic acid scaffolds can be produced with either random or aligned fibers, allowing for the investigation of the effect of fiber alignment^[79,80]. It was shown that the conditioned medium retrieved from MSCs seeded on aligned fibers contained higher concentrations of potentially therapeutic factors, such as PGE2, NO or HGF, and was able to direct macrophages toward an anti-inflammatory phenotype^[79]. The observed higher immunomodulatory functions of MSCs correlated with the

activation of focal adhesion kinase (FAK) and the yes-associated protein/transcriptional coactivator with PDZ-binding motif (YAP/TAZ) pathways^[80,100]. On the contrary, the elongation of MSCs cultured on random fibers is restricted, preventing FAK activation and hampering MSCs secretion. Together, these results indicate that MSCs seeded on aligned fibers can adopt a more stretched conformation, resulting in the activation of FAK signaling pathway and the nuclear translocation of YAP/TAZ, which in turns triggers the upregulation of various anti-inflammatory and trophic cytokines.

While pore size plays an obvious role in the diffusion of molecules, with small pores potentially limiting the diffusion of soluble factors^[101], several studies have also shown an impact of porosity on cell mechanotransduction and behavior. In this context, new techniques, such as freeze-drying and 3D printing, have been developed to tune the porosity of biomaterials^[102–104]. Using a freeze-drying approach, Qazi et al. designed two distinct alginate hydrogels with similar stiffness (20 kPa), having either nanometric (5 nm) or micrometric (120 μm) pores^[81]. After having confirmed that soluble factors were not entrapped in the nanoporous scaffold, the authors observed that MSCs embedded in a microporous scaffold displayed a higher secretion of almost all of the investigated cytokines (e.g., VEGF, HGF, IL-10). The authors further highlighted the role of N-cadherin, a cell-cell adhesion protein, in the heightened secretion activity. MSCs encapsulated in nanoporous hydrogels expressed less N-cadherin than those encapsulated in microporous scaffolds, which resulted in an overall decrease of cytokines secretion. Later on, the authors showed that stimulating MSCs with insulin-like growth factor 1 (IGF 1), which is known to affect MSC functions, amplified MSC secretion only in microporous materials, despite a diffusivity similar to that of the nanoporous scaffold tested^[82]. They concluded that microenvironments that allow for cell-cell interactions, and microporous scaffolds in particular, sensitize MSCs to external stimuli (e.g., growth factors) and enhance their paracrine response. In a similar study, Caldwell et al. investigated the role of scaffold porosity in cell secretion, using co-assembled PEG microgels with three distinct levels of microporosity (13 μm vs 110 μm vs 190 μm)^[83]. In the most porous hydrogels, MSCs resided as cell clusters, thereby increasing cell-cell interactions and displaying higher concentrations of secreted cytokines. This further confirmed that increasing the porosity of a scaffold in which MSCs are encapsulated can favor cell-cell interactions, thereby enhancing their secretion capacity. It is worth noting that, when increasing porosity, cell density must be

carefully considered, at the risk of limiting cell-cell interactions and thereby cell secretion. Indeed, using 3D-printed collagen scaffolds with distinct pore sizes (400 μm vs 500 μm vs 600 μm), it was shown that MSCs in scaffolds with medium pore size (500 μm) properly aggregated between struts, while MSCs in the most porous scaffolds preferentially adhered to the polymer rather than forming clusters^[84]. The latter cell behavior resulted in a distinct secretion profile, with MSCs displaying lower secretion of several cytokines, such as VEGF and bFGF.

Overall, developing materials that promote specific cell adhesion patterns (e.g., oriented fibers) or cell-cell interactions (e.g., adjusted porosity) seems highly relevant to increase MSC secretion. Besides these two parameters, stiffness has been investigated as one of the key physical cues to influence the composition of the MSC secretome.

4.1.2 Soft hydrogels enhance immunomodulatory properties

The elastic modulus, or Young's modulus, is a measure of stiffness that reflects the ability of a material to resist to deformation upon an applied force. The influence of material stiffness on MSC proliferation or cell fate has been widely investigated. In particular, it was demonstrated that stiffer scaffolds promote MSC osteogenic differentiation while softer scaffolds promote proliferation and chondrogenic differentiation^[105–107]. However, only few studies explored the effect of material stiffness on MSC secretome; and, among them, most of the studies were conducted using 2D culture models^[85,86,108,109]. In addition, it is known that stiffness also influences other cell functions, such as cell viability and proliferation, affecting the results on secretion and making it difficult to draw proper conclusions. For example, MSCs encapsulated in poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) hydrogels with different shear elastic moduli showed distinct secretion profiles but also distinct proliferation rates, hampering the comprehension of the relationship between stiffness and secretion activity^[110].

Overall, soft scaffolds (≤ 5 kPa) showed a tendency to increase MSCs secretion compared to stiff scaffolds in 2D culture conditions. Ji et al. cultured MSCs, in the absence of pro-inflammatory factors, on top of two distinct polyacrylamide (PAAm) hydrogels (0.5 kPa vs 200 kPa) functionalized with fibronectin, and observed a greater secretion of immunomodulatory and trophic factors (e.g., PGE2, TSG-6, IDO, HGF or bFGF), as well as a greater expression of stemness markers (e.g., Stro-1), with the softer hydrogels^[85]. The

authors attributed this difference to distinct actin polymerization and cytoskeletal organization: on soft PAAm hydrogels, MSCs exhibited a rounded shape associated with a low cytoskeletal tension; whereas, on stiff hydrogels, cells were more elongated and displayed stress fibers. MSCs seeded on stiff hydrogels were further treated with an inhibitor of either actin polymerization (latrunculin A) or cytoskeletal tension (blebbistatin), both leading to the secretion of more soluble factors and an upregulation of stemness markers. The authors concluded that soft hydrogels may enhance MSC secretion through a greater maintenance of cell stemness. Using similar hydrogels, others correlated the reduction of cytoskeletal tension on soft surfaces with a higher concentration of intracellular ROS^[86]. They showed that the mechano-regulated overexpression of ROS activates the HIF-1 α pathway, which in turn promotes cell secretion and survival (Figure 2)^[111]. This mechanism is reminiscent of the effect of hypoxic preconditioning of MSCs, which induces a greater secretion activity compared to normoxic conditions in a ROS-dependent manner^[112,113].

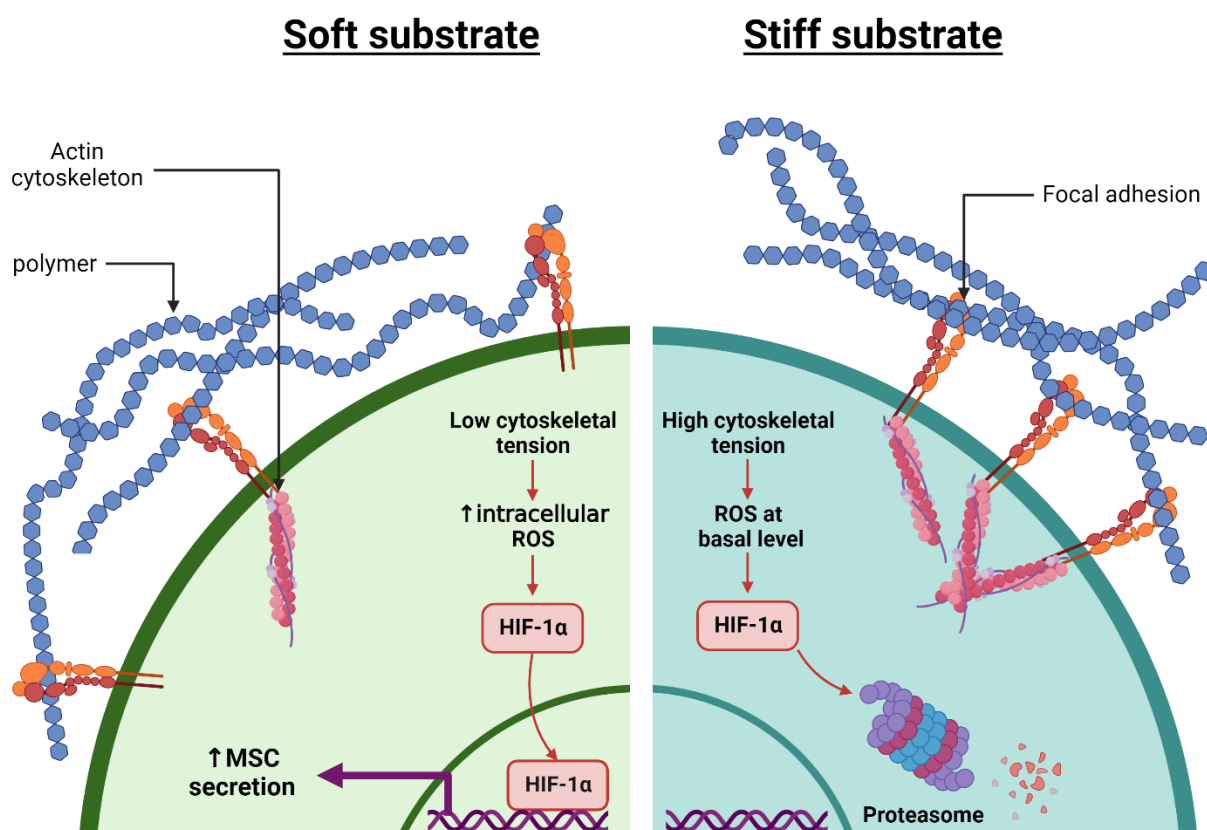


Figure 2: Proposed mechanism of the influence of stiffness on MSC secretion through the activation of HIF-1 α (Adapted from Yang et al.)^[86].

Although limited to few studies, the influence of stiffness on the secretome of MSCs cultured in 3D has also been reported^[87,88,90,110]. MSCs embedded in interpenetrating network

hydrogels with shear elastic modulus of either 500 or 2500 Pa, showed no difference in their capacity to secrete PGE2 in the absence of pro-inflammatory factors^[90]. This may be attributed to the limited range of shear elastic modulus studied, which may not have allowed to induce significant changes in cell behavior. Interestingly, Murphy et al. showed that MSC spheroids embedded in fibrin hydrogels that were either relatively soft (2 kPa) or stiff (45 kPa), exhibited distinct secretion profiles^[87]. MSCs encapsulated in stiff hydrogels secreted preferentially VEGF, while MSCs in soft hydrogels secreted more PGE2. This outcome is extremely relevant for diseases such as OA, where the secretion of anti-inflammatory factors is crucial but that of pro-angiogenic factors might not be appropriate. In another study, the expression of a series of genes (e.g., IL-6, IL-8, TSG-6, VEGF) related to the paracrine functions of MSCs was evaluated after TNF α stimulation, comparing alginate hydrogels with a stiffness of either 2 or 35 kPa^[88]. While the expression of angiogenesis-related genes (i.e., VEGF, ANGPT1) did not differ with stiffness, an upregulation of the expression of some immunomodulation-related genes (e.g., TSG-6, IL-6 and IL-8) could be observed with soft hydrogels. The authors further demonstrated that a soft matrix favors the clustering of TNF α receptors, thereby increasing the binding of TNF- α and the activation of the transcriptional NF κ B pathway, resulting in the upregulation of immunomodulation-related gene expression. More importantly, these two studies showed a similar increase in immunomodulatory factor secretion by MSCs encapsulated in soft scaffolds, with hydrogels differing in nature (fibrin vs alginate) but having similar levels of stiffness (both studies compared 2 kPa and \approx 40 kPa). This seems to indicate that these results were the sole effect of changing stiffness in 3D culture, independently of the nature of the polymer. It is noteworthy that these results hardly fit with the aforementioned effects of fiber orientation on MSC secretion. Indeed, while fiber alignment was said to increase cell elongation and subsequently cell secretion, here the use of soft hydrogels led to rounder cells, which also enhanced cell secretion. This discrepancy may result from the different natures of the scaffolds (fibers vs hydrogels), as well as differences in composition, mechanical properties or specific cell-material interactions. It is also plausible that the two distinct mechanisms simply lead to similar results. Obviously, more work will be needed to fully unravel the role of stiffness and elongation in MSC secretion, as well as the underlying mechanisms.

4.1.3 Stress-relaxing materials enhance MSC secretion

While the influence of stiffness on cell behavior has become broadly recognized, the impact of the material viscoelasticity is still ambiguous. The viscoelasticity is the ability of a material to display both elastic and viscous properties, thereby dissipating the energy upon deformation in a time-dependent manner (i.e., stress relaxation)^[114]. It is a major feature of the natural extracellular matrix (ECM)^[115], and its role in cell mechanotransduction has been recently investigated *in vitro*^[116–118]. Viscoelasticity has been correlated with different cellular mechanisms such as cytoskeletal rearrangement, proliferation, differentiation and adhesion^[118,119]. However, little is known about the interplay between viscoelasticity and MSC secretion activity. To produce viscoelastic materials, hydrogels in particular, polymers are usually crosslinked by non-covalent or dynamic covalent bonds that allow for network reorganization upon deformation^[120,121]. Viscoelasticity is typically characterized by a stress relaxation time, which is the time it takes for a material to dissipate the stored energy after deformation. Hung et al. produced two distinct alginate hydrogels, one ionically-crosslinked (viscoelastic hydrogel) and the other one covalently-crosslinked (elastic hydrogel), displaying similar shear elastic moduli but distinct stress relaxation profiles^[122]. The conditioned medium retrieved from MSCs cultured in the viscoelastic hydrogel contained more VEGF than that from MSCs cultured in the purely elastic hydrogel, which in turn promoted higher endothelial cell proliferation in 2D culture conditions. This example highlights the role of viscoelasticity in the therapeutic potential of MSCs. Using similar alginate-based hydrogels, Vining et al. investigated the effect of stress relaxation on the expression of three immunomodulation-related genes (e.g., COX-2, IL-1RN and TSG-6) by TNF α stimulated MSCs^[123]. The authors showed that a fast-relaxing hydrogel led to the upregulation of COX-2 and TSG-6 genes in combination with a higher secretion of PGE2, by the encapsulated MSCs. These preliminary results revealed the major role of stress relaxation in MSC secretion capacity.

In general, modifying the physicochemical properties of a scaffold can greatly affect molecular diffusion, thereby impacting secretion measurements performed on supernatants. Yet, most studies have not assessed molecular diffusion, calling for caution regarding conclusions. Overall, porosity, stiffness and relaxation time seem to stand out as key parameters to tune MSC secretion. Porosity seems to mostly passively promote cell-cell interactions, which upregulates secretion, while soft and viscoelastic matrices can be more easily remodeled by

encapsulated cells, triggering specific signaling pathways. Scaffold degradability is yet another factor. While it has widely been shown to influence cell behavior (e.g., migration, spreading, fate), only one study explored the role of degradability in MSC paracrine activity, showing a concomitant increase in degradability and secretion^[124,125]. This paves the way toward new research on the underlying mechanisms between cell confinement, degradability, and cell secretion.

4.2 Biochemical cues to promote MSC secretion

4.2.1 Polymer composition plays a role yet to be explored

MSCs naturally interact with their surroundings, thus affecting their functions. Despite the extensive work on the effects of the mechanical properties of materials on MSC behavior^[118,126,127], the influence of scaffold composition on MSC secretion is still largely unknown. To date, a single study directly compared the effect of hydrogels made of two distinct polysaccharides (i.e., HPMC and alginate) on the secretion of MSCs^[91]. The authors observed higher amounts of various factors of interest (i.e., IDO, PGE2 and HGF) in the supernatants of cells encapsulated in HPMC hydrogels vs alginate hydrogels. Unfortunately, the two hydrogels differed in their crosslinking mechanisms, as well as in their mechanical and diffusion properties, which does not allow to conclude specifically on the influence of the nature of the polymer. To provide further insights on the influence of scaffold composition on MSC secretion, Drzeniek et al. developed collagen- and gelatin-based hydrogels displaying similar mechanical properties. Using a cytokine array, they showed that MSCs encapsulated in collagen-based hydrogels, in comparison to MSCs in gelatin-based hydrogels, secreted higher amounts of cytokines, including VEGF, HGF and TGF- β 1^[92]. Moreover, incorporating laminin in the collagen-based hydrogels further increased the secretion of VEGF, bFGF and leukemia inhibitory factor. Another study investigated the effect of collagen scaffolds, with and without chondroitin sulfate, and reported that the production of NO and PGE2 increased in the presence of chondroitin sulfate^[93]. This potentially highlights the beneficial use of glycosaminoglycans (GAGs) to enhance MSCs secretion. Tuning cell-material interactions with bioactive polymers is a promising way to enhance and guide cell secretion. Yet, this avenue of research remains to be explored.

4.2.2 RGD and HAVDI peptides increase MSC survival and secretion

Designing biomaterials to mimic specific cell-ECM or cell-cell interactions is widely accepted as an effective approach to control cell behavior. MSCs both exert traction forces on ECM and interact with other cells through surface receptors, which regulate intracellular signaling pathways^[128]. Thus, synthetic peptides inspired from natural ECM or cell surface receptor, are more and more often grafted onto scaffolds to recapitulate natural interactions^[129–131]. While the role of adhesive peptides in MSC proliferation^[132] and fate^[106,133] has been highlighted, their influence on MSC secretion is still largely unexplored. Various peptides have been investigated as means to modulate MSCs secretion. Recently, it was shown that modifying a hydrogel (e.g., PEG, chitosan, alginate) with the RGD peptide, which mimics fibronectin and binds to various integrin receptors, can prolong the survival and retention of encapsulated MSCs in vivo^[101,134], as well as enhance VEGF secretion^[94]. Other integrin-binding peptides, such as GFOGER (found in type I collagen) or RRETAWA (found in fibronectin), have been shown to promote the osteo-reparative functions of MSCs^[95,96]. Specifically, the GFOGER peptide, which binds to various β 1-containing integrins, was found to increase the secretion of angiogenic and immunomodulatory factors (e.g., VEGF, IL-6, IL 8), promoting macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype and improving bone repair in vivo. The RRETAWA peptide, which binds to the α 5 β 1 integrin, was found to play an important role in the upregulation of BMP-2 secretion. These results emphasize the role of ECM-activated integrins in the potential therapeutic activity of MSCs. Alternatively, specific transmembrane receptors could also be activated to boost MSC secretion. For instance, by mimicking the VEGF receptor-binding region, the QK peptide could enhance the secretion of proangiogenic factors by the MSCs and the proliferation of endothelial cells^[122]. Overall, these studies provide appealing insights on the enhancement of MSC secretion by controlling cell-ECM interaction.

Several studies have also highlighted the upregulated secretion of MSCs when cultured as spheroids rather than in 2D, which was attributed to specific cell-cell interactions^[135–138]. These interactions are mediated by transmembrane proteins involved in intercellular communication, and in particular the N-Cadherin protein. Thus, promoting N-Cadherin interactions was explored as a means to increasing MSC secretion. HAVDI is a peptide sequence found in the first extracellular domain of the N-cadherin transmembrane that can be used to recapitulate the N-cadherin protein binding site. To confirm that the HAVDI peptide

can mimic N-Cadherin and influence MSC secretion, Caldwell et al. encapsulated MSCs in PEG hydrogels, with or without immobilized HAVDI peptide, and measured the secretion of eighty cytokines^[83]. MSCs embedded in the HAVDI-modified hydrogels showed an increased production of almost all quantified cytokines (e.g., IL-10, TGF- β 1, GDNF, VEGF), notably reaching a 10-fold increase in the secretion of more than thirty of them. Using HAVDI-modified alginate hydrogels, others corroborated this upregulation on several secreted cytokines of interest (e.g., VEGF, IL-10)^[82]. These results demonstrate the capacity of immobilized peptides to trigger intracellular mechanisms on isolated cells that are equivalent to the mechanisms resulting from cell-cell interactions in spheroids. To date, incorporating the HAVDI peptide is one of the most promising approaches to maximize the secretion of anti-inflammatory and trophic factors by MSCs.

In general, using biochemical cues, especially binding peptides, to activate specific immunomodulatory signaling pathways constitutes a promising approach to enhance the therapeutic efficacy of MSCs. But many questions remain. Most of the reported studies focused on the secretion of a small number of cytokines, showing a global reduction or increase. However, depending on the disease, the secretion of only a specific set of molecules will most likely be necessary for an appropriate therapeutic effect. The feasibility of guiding MSCs toward such specific secretion with biomaterials in a therapeutic context has yet to be shown. This will require wider and more systematic secretome analyses, possibly benefiting from the recent development of omics technologies.

5. Guidelines for a rational material-assisted OA cell therapy

In this section, we discuss the properties of the ideal biomaterial for a material-assisted MSC therapy for OA. Beyond cytocompatibility, designing a delivery vehicle for intra-articular MSC therapy requires to carefully consider the practical aspects of the surgical procedure, the specificity of an intra-articular cell therapy, and all of the aforementioned cell-material interactions coming into play.

Primarily, the considered materials must enable safe and easy cell encapsulation, necessitating non-toxic chemical tools. Regarding hydrogels, this requires the use of cytocompatible crosslinking mechanisms that are efficient under physiological pH and temperature, without the need for purification. “Click” reactions often meet these criteria and

are therefore powerful tools for hydrogel design^[139–141]. Ideally, these reactions should also be bioorthogonal, which means that they should not alter or not be altered by biological components and biochemical processes^[142]. Bioorthogonal “click” reactions constitute a short list of chemical reactions (e.g., inverse electron-demand Diels-Alder, Strain-promoted azide-alkyne cycloaddition), extensively studied in the field of 3D cell culture and regenerative medicine^[143,144]. These tools offer the advantage to be widely applicable to any natural or synthetic polymers, provide highly tunable materials, and allow for the additional grafting of peptides, drugs and fluorophores. However, using innovative chemical tools comes at the cost of slow clinical translation, requiring dissuasive yet necessary years of validation prior to application. This explains why the current clinical studies focusing on material-assisted cell therapy for OA rarely looked for optimal material design, in favor of scaffolds already on the market. For instance, high molecular weight HA solutions have long been investigated and used as viscosupplements^[145], and have therefore been envisioned as potential delivery vehicles for the intra-articular injection of MSCs^[146–149]. The association of MSCs and HA led to a reduction of inflammation and a postponement of OA^[150,151]; yet, viscous HA solutions lack stability and can hardly be tuned in terms of composition, mechanical properties and specific cell-material interactions, limiting researchers in their rational design. In this context, the ideal material for optimal intra-articular MSC therapy will likely take advantage of the most advanced synthetic tools (Figure 3).

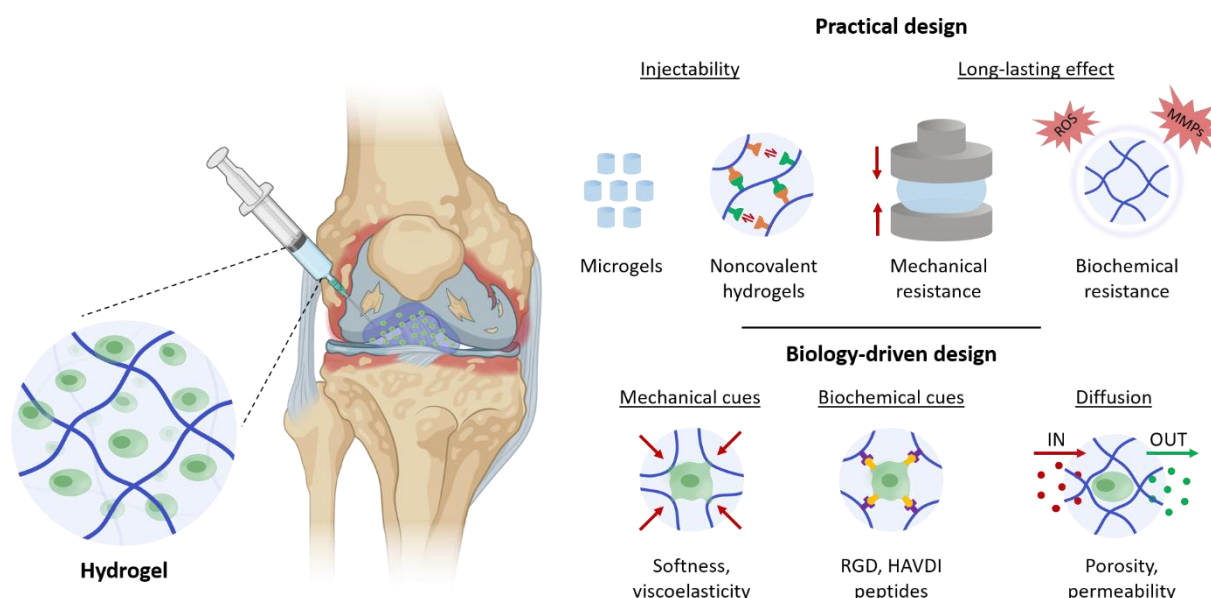


Figure 3: Guidelines for an intra-articular, material-assisted cell therapy of OA.

Regarding the practical aspects of the surgical procedure, the newly designed material should ideally be delivered in a minimally-invasive manner, to avoid open surgery and limit the risks of complications. This requires the use of either injectable materials, i.e., materials that can be formed ahead of surgery and yet be injectable via a fine-gauge needle, or in-situ forming materials, i.e., materials whose viscous precursors can be injected. Pre-formed injectable materials may be more appropriate and practical as they would allow clinicians to load syringes in advance and use them when desired, without the risk of cell sedimentation or untimely gelation. Suitable injectable hydrogels can be designed using non-covalent (often mistakenly referred to as “physical”)^[152] or dynamic covalent crosslinking^[153]. Alternatively, micro-encapsulation techniques can be used to obtain sufficiently small objects to circumvent any injection issue^[154,155]. Micro-encapsulation also minimizes the distance between the encapsulated MSCs and the host environment. In addition to enabling minimally-invasive surgery, injectable materials have attracted attention to improve cell survival upon injection by reducing the shear forces cells are subjected to^[156]. Despite limited and sometimes contradictory literature on this subject, this opens interesting perspectives for cell therapy improvement. Once injected and formed in vivo, the material is expected to physically maintain cells at the injection site, limiting cell leakage and therefore maximizing their local therapeutic effect.

When considering an MSC therapy, the duration of the treatment must be carefully considered. In the context of OA, long-lasting therapeutic effects are desired, with cells responding specifically and periodically to inflammatory flares over months to years. This necessitates materials that are stable for long periods of time, resistant to an inflammatory environment containing enzymes (e.g., matrix metalloproteinases) and ROS, and able to endure the repeated and high mechanical loads constantly exerted on joints. Designing such materials could benefit from the most recent developments in the design of self-healing hydrogels, which have the ability to dissipate energy via temporary bond breaking and network rearrangement^[157], and tough hydrogels, which most often make use of interpenetrating networks to reach mechanical strength equivalent to that of cartilage^[158]. Designing a long-lasting material that promotes the desired cell-material interactions may be challenging because the presence of degrading enzymes may exclude the use of bioactive polymers, such as hyaluronic acid and collagen, for long-term stability. If successful, such a stable material would provide a suitable environment for cell therapy, allowing for prolonged

therapeutic effect and avoiding repeated intra-articular injections. The permeability of the biomaterial must also be taken into consideration in view of a factor-secreting MSC therapy. For efficient OA flare mitigation, the hydrogel must allow the diffusion of molecules over a large range of molecular weights (from ≈ 300 Da to 70 kDa). This includes the diffusion of nutrients and pro-inflammatory molecules from the outside to the inside of the hydrogel, as well as the diffusion of the therapeutic factors secreted by the encapsulated cells toward the surrounding diseased tissues. However, scaffold permeability has not been clearly put into question for MSC delivery to date. It could be anticipated that injecting a large volume of hydrogel may partially hamper the paracrine activity of MSCs; and encapsulating cells into smaller particles might then be more appropriate. While the two approaches have yet to be compared, it was already shown that MSCs encapsulated in microgels can be effectively stimulated with inflammatory factors (TNF α and INF- γ) to adopt an immunomodulatory phenotype *in vitro*^[159]. Finally, controlling cell fate is also crucial for long-lasting effects. Regarding factor secretion, undifferentiated MSCs have been shown to secrete more immunomodulatory factors than chondrocytes and chondrogenically primed MSCs^[160], leading to better outcomes on models of osteochondral defect^[161,162]. Thus, for long-lasting factor secretion, the undifferentiated phenotype of MSCs must be maintained. While it is known that microenvironment dictates cell fate^[115,163,164], little is known about the influence of scaffold properties on cell stemness maintenance, calling for further investigations.

From the basic knowledge on cell-material interactions presented in this review, we can enounce some interesting material features to enhance the factor-secreting cell therapy of OA. In terms of composition, chondroitin sulfate has been correlated with the modulation of MSC immunomodulatory properties. Thus, despite their possible accelerated degradation in the inflammatory environment, GAGs might be more suitable than other polymers as primary building blocks. Considering integrin binding and activation, two peptide sequences, RGD and HAVDI, have been shown to promote cell survival and mimic cell-cell interactions, respectively, and improve MSC therapeutic ability. Although more work on adhesive peptides in the context of OA cell therapy is expected, these two sequences can already be considered. As an alternative to the HAVDI peptide, it is worth noting that cell-cell interactions can be promoted by the encapsulation of spheroids, possibly obviating the need for peptide immobilization and the complex synthetic strategies that come along with it. Regarding the mechanical properties of the envisioned scaffold, we can hypothesize that, for a given

biomaterial, it exists an optimal stiffness and/or viscoelasticity to promote appropriate factor secretion by MSCs. Current knowledge suggests that MSC secretion ability is governed by how easily cells can remodel their microenvironment and/or interact with other cells, highlighting the preferable use of soft (≤ 5 kPa) and possibly fast-relaxing hydrogels, which may be compatible with the required capacity to endure repeated loads. Interestingly, the effect of soft and fast-relaxing materials on MSC secretion seems to correlate with elevated concentrations of intracellular ROS, echoing the mechanism by which hypoxia enhances MSC survival and secretion^[111–113,165]. Caution should be taken here, as a high dose of ROS is also known to lead to more cell death^[166,167]. This highlights the overall need for the right amount of stress on MSCs to maximize their therapeutic effect without affecting basic biological functions. Finally, in addition to soluble factors, MSCs exert their therapeutic functions through the secretion of EVs, which may add new design criteria to the list. The influence of the material composition and matrix mechanics on the secretion, diffusion and therapeutic ability of EVs is largely unknown, opening new avenues of research. As preliminary insights for future material design, it is worth mentioning that HA as a polymer has been correlated with the regulation of EV internalization by fibroblast-like synoviocytes^[168]. It was also suggested that increasing the stress relaxation of a hydrogel could facilitate the diffusion of EVs throughout the hydrogel network^[169]. These preliminary studies suggest that material design could enhance the therapeutic efficacy of encapsulated EVs, and therefore enhance that of EVs secreted by encapsulated MSCs.

6. Limits and perspectives

A careful analysis of the literature allowed us to unveil what could be the future of material design for material-assisted OA cell therapy. Yet, while the knowledge on MSC secretion and cell-material interactions is burgeoning, our understanding remains limited. The mechanisms behind OA development are complex, and far from being fully unraveled. Various factors (e.g., PGE2, IDO, NO, TSG-6) have been identified as anti-inflammatory, but there are few factors identified as specifically anti OA to date^[70,71]. In this context, modulating factor secretion via cell-material interactions may be illusive. Also, if some immunomodulatory and trophic factors appear to be relevant for OA, angiogenic and osteogenic factors must be avoided; yet, there is little evidence that systems can be tailored for the secretion of specific factors, with most studies reporting a global increase or decrease of all of the investigated

cytokines. This makes specific cytokine secretion a major challenge for OA treatment; and cytokine arrays will have to be carefully and systematically carried out to confirm and adjust the effect of any newly designed material. More importantly, maximizing at any costs the secretion of factors by MSCs under inflammatory conditions could eventually lead to detrimental overshooting treatments, emphasizing the need for controlling the dose secreted in time and space, which is beyond current technological capabilities. This also highlights the need for materials that can help cells to stop secreting factors between inflammation flares, which has not been investigated in the context of OA. Finally, regarding the investigation of the desired biological outcomes, results must be carefully put into perspective with other biological mechanisms that could alter our understanding, such as cell viability, proliferation and differentiation, all known to be highly dependent on scaffold properties. Thus, only systematically mapping all of the critical biological processes will allow to draw the careful conclusions required to move toward the clinic. Overall, unprecedented collaborations between material scientists, biologists and clinicians will be needed to tackle a biomedical challenge that is yet to be truly explored.

7. Conclusion

In this review, we have highlighted how biomaterial design could be a key to successful translate MSC-based OA therapy to the clinic. We particularly emphasized the need to better understand and control cell-material interactions, along with more practical aspects such as the injectability of the delivery system. Interestingly, these concepts can be easily transposed to MSC therapy for any other immune or inflammatory disorder. However, the question of disease-specific MSC secretion remains to be addressed, and the community still has to answer whether paracrine functions should and/or can be precisely tuned. Until then, MSCs will be used as another “therapeutic black box”, limiting their translation and applications. While tremendous efforts need to be made, the successful design of material-assisted cell therapies will open the way to more futuristic programmable cell therapy, where cell bioengineering combined with innovative delivery vehicles will allow cell secretion on demand, controlled in time and space.

8. References

- [1] S. R. Jafarzadeh, D. T. Felson, *Arthritis Rheumatol.* 2018, 70176, 185.
- [2] J. H. Salmon, A. C. Rat, J. Sellam, M. Michel, J. P. Eschard, F. Guillemin, D. Jolly, B. Fautrel, *Osteoarthr. Cartil.* 2016, 24, 1500.
- [3] J. W. J. Bijlsma, F. Berenbaum, F. P. J. G. Lafeber, *Lancet* 2011, 377, 2115.
- [4] N. de l'Escalopier, P. Anract, D. Biau, *Ann. Phys. Rehabil. Med.* 2016, 59, 227.
- [5] A. I. Caplan, *J. Orthop. Res.* 1991, 9, 641.
- [6] M. F. Pittenger, D. E. Discher, B. M. Péault, D. G. Phinney, J. M. Hare, A. I. Caplan, *npj Regen. Med.* 2019, 4, 22.
- [7] Y. Shi, Y. Wang, Q. Li, K. Liu, J. Hou, C. Shao, Y. Wang, *Nat. Rev. Nephrol.* 2018, 14, 493.
- [8] F. Hached, C. Vinatier, C. Le Visage, H. Gondé, J. Guicheux, G. Grimandi, A. Billon-Chabaud, *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 2017, 31, 730.
- [9] A. A. Foster, L. M. Marquardt, S. C. Heilshorn, *Curr. Opin. Chem. Eng.* 2017, 15, 15.
- [10] K. Toupet, M. Maumus, J.-A. Peyrafitte, P. Bourin, P. L. E. M. van Lent, R. Ferreira, B. Orsetti, N. Pirot, L. Casteilla, C. Jorgensen, D. Noël, *Arthritis Rheum.* 2013, 65, 1786.
- [11] S. R. Caliani, J. A. Burdick, *Nat. Methods* 2016, 13, 405.
- [12] C. M. Madl, S. C. Heilshorn, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2018, 20, 21.
- [13] S. Mazzitelli, L. Capretto, F. Quinci, R. Piva, C. Nastruzzi, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2013, 65, 1533.
- [14] S. R. Goldring, M. B. Goldring, *Nat. Rev. Rheumatol.* 2016, 12, 632.
- [15] T. D. Spector, C. Cooper, *Osteoarthr. Cartil.* 1993, 1, 203.
- [16] K. B. Gupta, J. Duryea, B. N. Weissman, *Radiol. Clin. North Am.* 2004, 42, 11.
- [17] S. A. Mazzuca, K. D. Brandt, P. A. Dieppe, M. Doherty, B. P. Katz, K. A. Lane, *Arthritis Rheum.* 2001, 44, 1786.
- [18] D. Hayashi, A. Guerhazi, C. K. Kwok, *Curr. Rheumatol. Rep.* 2014, 16, 391.
- [19] D. Hayashi, F. W. Roemer, A. Guerhazi, *Ann. Phys. Rehabil. Med.* 2016, 59, 161.
- [20] A. Guerhazi, H. Alizai, M. D. Crema, S. Trattinig, R. R. Regatte, F. W. Roemer, *Osteoarthr. Cartil.* 2015, 23, 1639.
- [21] A. Guerhazi, F. W. Roemer, I. K. Haugen, M. D. Crema, D. Hayashi, *Nat. Rev. Rheumatol.* 2013, 9, 236.

- [22] S. Glyn-Jones, A. J. R. Palmer, R. Agricola, A. J. Price, T. L. Vincent, H. Weinans, A. J. Carr, *Lancet* 2015, 386, 376.
- [23] B. Xia, Di Chen, J. Zhang, S. Hu, H. Jin, P. Tong, *Calcif. Tissue Int.* 2014, 95, 495.
- [24] L. Roseti, G. Desando, C. Cavallo, M. Petretta, B. Grigolo, *Cells* 2019, 8, 1305.
- [25] E. G. J. Ripmeester, U. T. Timur, M. M. J. Caron, T. J. M. Welting, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2018, 6, 1.
- [26] S. Chen, P. Fu, H. Wu, M. Pei, *Cell Tissue Res.* 2017, 370, 53.
- [27] T. J. McKee, G. Perlman, M. Morris, S. V. Komarova, *Sci. Rep.* 2019, 9, 1.
- [28] T. M. Quinn, H. J. Häuselmann, N. Shintani, E. B. Hunziker, *Osteoarthr. Cartil.* 2013, 21, 1904.
- [29] A. J. Sophia Fox, A. Bedi, S. A. Rodeo, *Sport. Heal. A Multidiscip. Approach* 2009, 1, 461.
- [30] D. B. Burr, *Osteoarthr. Cartil.* 2004, 12, 20.
- [31] D. B. Burr, M. B. Schaffler, *Microsc. Res. Tech.* 1997, 37, 343.
- [32] R. F. Loeser, *Matrix Biol.* 2014, 39, 11.
- [33] T. Pap, J. Bertrand, *Nat. Rev. Rheumatol.* 2013, 9, 43.
- [34] S. Honsawek, S. Malila, P. Yuktanandana, A. Tanavalee, B. Deepaisarnsakul, J. Parvizi, *Rheumatol. Int.* 2013, 33, 435.
- [35] N. H. Lim, E. Meinjohanns, M. Meldal, G. Bou-Gharios, H. Nagase, *Osteoarthr. Cartil.* 2014, 22, 862.
- [36] L. Troeberg, H. Nagase, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 2012, 1824, 133.
- [37] P. Verma, K. Dalal, *J. Cell. Biochem.* 2011, 112, 3507.
- [38] C. Maes, E. Araldi, K. Haigh, R. Khatri, R. Van Loveren, A. J. Giaccia, J. J. Haigh, G. Carmeliet, E. Schipani, *J. Bone Miner. Res.* 2012, 27, 596.
- [39] S. Hu, C. Zhang, L. Ni, C. Huang, D. Chen, K. Shi, H. Jin, K. Zhang, Y. Li, L. Xie, M. Fang, G. Xiang, X. Wang, J. Xiao, *Cell Death Dis.* 2020, 11, 481.
- [40] R. Liu-Bryan, R. Terkeltaub, *Nat. Rev. Rheumatol.* 2015, 11, 35.
- [41] C. R. Scanzello, S. R. Goldring, *Bone* 2012, 51, 249.
- [42] S. Yang, J. Kim, J.-H. Ryu, H. Oh, C.-H. Chun, B. J. Kim, B. H. Min, J.-S. Chun, *Nat. Med.* 2010, 16, 687.
- [43] T. Saito, A. Fukai, A. Mabuchi, T. Ikeda, F. Yano, S. Ohba, N. Nishida, T. Akune, N. Yoshimura, T. Nakagawa, K. Nakamura, K. Tokunaga, U. Chung, H. Kawaguchi, *Nat. Med.* 2010, 16, 678.

- [44] L. J. Sandell, *Nat. Rev. Rheumatol.* 2012, 8, 77.
- [45] M. B. Goldring, S. R. Goldring, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2010, 1192, 230.
- [46] K. Takebe, M. Rai, E. Schmidt, L. Sandell, *Osteoarthr. Cartil.* 2015, 23, 454.
- [47] C. R. Scanzello, E. Umoh, F. Pessler, C. Diaz-Torne, T. Miles, E. DiCarlo, H. G. Potter, L. Mandl, R. Marx, S. Rodeo, S. R. Goldring, M. K. Crow, *Osteoarthr. Cartil.* 2009, 17, 1040.
- [48] J. M. Cuellar, G. J. Scuderi, V. G. Cuellar, S. R. Golish, D. C. Yeomans, *J. Bone Jt. Surgery-American Vol.* 2009, 91, 2313.
- [49] M. B. Goldring, M. Otero, *Curr Opin Rheumatol.* 2011, 23, 471.
- [50] J. Bondeson, S. D. Wainwright, S. Lauder, N. Amos, C. E. Hughes, *Arthritis Res. Ther.* 2006, 8, 1.
- [51] N. Joshi, J. Yan, S. Levy, S. Bhagchandani, K. V. Slaughter, N. E. Sherman, J. Amirault, Y. Wang, L. Riegel, X. He, T. S. Rui, M. Valic, P. K. Vemula, O. R. Miranda, O. Levy, E. M. Gravallesse, A. O. Aliprantis, J. Ermann, J. M. Karp, *Nat. Commun.* 2018, 9, 1.
- [52] C. Yuan, Z. Pan, K. Zhao, J. Li, Z. Sheng, X. Yao, H. Liu, X. Zhang, Y. Yang, D. Yu, Y. Zhang, Y. Xu, Z.-Y. Zhang, T. Huang, W. Liu, H. Ouyang, *Bone Res.* 2020, 8, 38.
- [53] C. G. Boer, K. Hatzikotoulas, L. Southam, L. Stefánsdóttir, Y. Zhang, R. Coutinho de Almeida, T. T. Wu, J. Zheng, A. Hartley, M. Teder-Laving, A. H. Skogholt, C. Terao, E. Zengini, G. Alexiadis, A. Barysenka, G. Bjornsdottir, M. E. Gabrielsen, A. Gilly, T. Ingvarsson, M. B. Johnsen, H. Jonsson, M. Kloppenburg, A. Luetge, S. H. Lund, R. Mägi, M. Mangino, R. R. G. H. H. Nelissen, M. Shivakumar, J. Steinberg, H. Takuwa, L. F. Thomas, M. Tuerlings, G. C. Babis, J. P. Y. Cheung, J. H. Kang, P. Kraft, S. A. Lietman, D. Samartzis, P. E. Slagboom, K. Stefansson, U. Thorsteinsdottir, J. H. Tobias, A. G. Uitterlinden, B. Winsvold, J.-A. Zwart, G. Davey Smith, P. C. Sham, G. Thorleifsson, T. R. Gaunt, A. P. Morris, A. M. Valdes, A. Tsezou, K. S. E. Cheah, S. Ikegawa, K. Hveem, T. Esko, J. M. Wilkinson, I. Meulenbelt, M. T. M. Lee, J. B. J. van Meurs, U. Styrkársdóttir, E. Zeggini, *Cell* 2021, 184, 4784.
- [54] M. Gnecci, P. Danieli, G. Malpasso, M. C. Ciuffreda, *In Methods in Molecular Biology*, 2016, pp. 123–146.
- [55] O. Levy, R. Kuai, E. M. J. Siren, D. Bhere, Y. Milton, N. Nissar, M. de Biasio, M. Heinelt, B. Reeve, R. Abdi, M. Alturki, M. Fallatah, A. Almalik, A. H. Alhasan, K. Shah, J. M. Karp, *Sci. Adv.* 2020, 6, 1.
- [56] A. I. Caplan, D. Correa, *Cell Stem Cell* 2011, 9, 11.
- [57] A. I. Caplan, J. E. Dennis, *J. Cell. Biochem.* 2006, 98, 1076.

- [58] D. Polchert, J. Sobinsky, G. Douglas, M. Kidd, A. Moadsiri, E. Reina, K. Genrich, S. Mehrotra, S. Setty, B. Smith, A. Bartholomew, *Eur. J. Immunol.* 2008, 38, 1745.
- [59] N. Song, M. Scholtemeijer, K. Shah, *Trends Pharmacol. Sci.* 2020, 41, 653.
- [60] C. Manferdini, F. Paoella, E. Gabusi, L. Gambari, A. Piacentini, G. Filardo, S. Fleury-Cappellesso, A. Barbero, M. Murphy, G. Lisignoli, *Osteoarthr. Cartil.* 2017, 25, 1161.
- [61] R. Kalluri, V. S. LeBleu, *Science (80-.)*. 2020, 367, 1.
- [62] Z. G. Zhang, B. Buller, M. Chopp, *Nat. Rev. Neurol.* 2019, 15, 193.
- [63] T. Li, Y. Yan, B. Wang, H. Qian, X. Zhang, L. Shen, M. Wang, Y. Zhou, W. Zhu, W. Li, W. Xu, *Stem Cells Dev.* 2013, 22, 845.
- [64] S. Bruno, C. Grange, F. Collino, M. C. Deregibus, V. Cantaluppi, L. Biancone, C. Tetta, G. Camussi, *PLoS One* 2012, 7, 1.
- [65] B. Zhang, Y. Yin, R. C. Lai, S. S. Tan, A. B. H. Choo, S. K. Lim, *Stem Cells Dev.* 2014, 23, 1233.
- [66] J. Dittmer, B. Leyh, *Int. J. Oncol.* 2014, 45, 1789.
- [67] S. H. Ranganath, O. Levy, M. S. Inamdar, J. M. Karp, *Cell Stem Cell* 2012, 10, 244.
- [68] M. Maumus, C. Manferdini, K. Toupet, J. A. Peyrafitte, R. Ferreira, A. Facchini, E. Gabusi, P. Bourin, C. Jorgensen, G. Lisignoli, D. Noël, *Stem Cell Res.* 2013, 11, 834.
- [69] H. Suga, H. Eto, T. Shigeura, K. Inoue, N. Aoi, H. Kato, S. Nishimura, I. Manabe, K. Gonda, K. Yoshimura, *Stem Cells* 2009, 27, 238.
- [70] M. Maumus, C. Manferdini, K. Toupet, P. Chuchana, L. Casteilla, M. Gachet, C. Jorgensen, G. Lisignoli, D. Noël, *Front. Immunol.* 2017, 8, 1.
- [71] M. Ruiz, K. Toupet, M. Maumus, P. Rozier, C. Jorgensen, D. Noël, *Biomaterials* 2020, 226, 119544.
- [72] S. Cosenza, M. Ruiz, K. Toupet, C. Jorgensen, D. Noël, *Sci. Rep.* 2017, 7, 16214.
- [73] P. Mancuso, S. Raman, A. Glynn, F. Barry, J. M. Murphy, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2019, 7, 1.
- [74] U. Nöth, A. F. Steinert, R. S. Tuan, *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2008, 4, 371.
- [75] A. R. Armiento, M. J. Stoddart, M. Alini, D. Eglin, *Acta Biomater.* 2018, 65, 1.
- [76] L. Zhang, J. Hu, K. A. Athanasiou, *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 2009, 37, 1.
- [77] J. Yang, Y. S. Zhang, K. Yue, A. Khademhosseini, *Acta Biomater.* 2017, 57, 1.
- [78] D. M. Jensen, *Am. J. Gastroenterol.* 2018, 113, 1570.
- [79] N. Su, P. L. Gao, K. Wang, J. Y. Wang, Y. Zhong, Y. Luo, *Biomaterials* 2017, 141, 74.

- [80] S. Wan, X. Fu, Y. Ji, M. Li, X. Shi, Y. Wang, *Biomaterials* 2018, 171, 107.
- [81] T. H. Qazi, D. J. Mooney, G. N. Duda, S. Geissler, *Biomaterials* 2017, 140, 103.
- [82] T. H. Qazi, D. J. Mooney, G. N. Duda, S. Geissler, *Biomaterials* 2020, 230, 1.
- [83] A. S. Caldwell, V. V. Rao, A. C. Golden, K. S. Anseth, *Biomaterials* 2020, 232, 119725.
- [84] T. H. Qazi, L. Tytgat, P. Dubruel, G. N. Duda, S. Van Vlierberghe, S. Geissler, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2019, 5, 5348.
- [85] Y. Ji, J. Li, Y. Wei, W. Gao, X. Fu, Y. Wang, *Biomater. Sci.* 2019, 7, 5292.
- [86] H. Yang, N. M. J. Cheam, H. Cao, M. K. H. Lee, S. K. Sze, N. S. Tan, C. Y. Tay, *Adv. Healthc. Mater.* 2019, 8, e1900929.
- [87] K. C. Murphy, J. Whitehead, D. Zhou, S. S. Ho, J. K. Leach, *Acta Biomater.* 2017, 64, 176.
- [88] S. W. Wong, S. Lenzini, M. H. Cooper, D. J. Mooney, J. W. Shin, *Sci. Adv.* 2020, 6, aaw0158.
- [89] S. H. Lim, H.-Q. Mao, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009, 61, 1084.
- [90] K. H. Vining, A. Stafford, D. J. Mooney, *Biomaterials* 2019, 188, 187.
- [91] F. Hached, C. Vinatier, P. G. Pinta, P. Hulin, C. Le Visage, P. Weiss, J. Guicheux, A. Billon-Chabaud, G. Grimandi, *Stem Cells Int.* 2017, 2017, 6.
- [92] N. M. Drzeniek, A. Mazzocchi, S. Schlickeiser, S. D. Forsythe, G. Moll, S. Geißler, P. Reinke, M. Gossen, V. S. Gorantla, H.-D. Volk, S. Soker, *Biofabrication* 2021, 13, 045002.
- [93] B. Corradetti, F. Taraballi, S. Minardi, J. Van Eps, F. Cabrera, L. W. Francis, S. A. Gazze, M. Ferrari, B. K. Weiner, E. Tasciotti, *Stem Cells Transl. Med.* 2016, 5, 670.
- [94] S. S. Ho, K. C. Murphy, B. Y. K. Binder, C. B. Vissers, J. K. Leach, *Stem Cells Transl. Med.* 2016, 5, 773.
- [95] A. Y. Clark, K. E. Martin, J. R. García, C. T. Johnson, H. S. Theriault, W. M. Han, D. W. Zhou, E. A. Botchwey, A. J. García, *Nat. Commun.* 2020, 11, 114.
- [96] S. Xin, C. A. Gregory, D. L. Alge, *Acta Biomater.* 2020, 101, 227.
- [97] K. R. Hixon, T. Lu, S. A. Sell, *Acta Biomater.* 2017, 62, 29.
- [98] J. Xue, D. Pisignano, Y. Xia, *Adv. Sci.* 2020, 7, 2000735.
- [99] S. H. Lim, H.-Q. Mao, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009, 61, 1084.
- [100] C. Lin, K. Xu, Y. He, B. Tao, Z. Yuan, K. Li, X. Li, Z. Xia, K. Cai, *Biomater. Sci.* 2020, 8, 4779.
- [101] A. Skardal, S. V. Murphy, K. Crowell, D. Mack, A. Atala, S. Soker, *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* 2017, 105, 1986.

- [102] L. J. Eggermont, Z. J. Rogers, T. Colombani, A. Memic, S. A. Bencherif, Trends Biotechnol. 2020, 38, 418.
- [103] W. Sun, B. Starly, A. C. Daly, J. A. Burdick, J. Groll, G. Skeldon, W. Shu, Y. Sakai, M. Shinohara, M. Nishikawa, J. Jang, D.-W. Cho, M. Nie, S. Takeuchi, S. Ostrovidov, A. Khademhosseini, R. D. Kamm, V. Mironov, L. Moroni, I. T. Ozbolat, Biofabrication 2020, 12, 022002.
- [104] S. V. Murphy, A. Atala, Nat. Biotechnol. 2014, 32, 773.
- [105] W. S. Toh, T. C. Lim, M. Kurisawa, M. Spector, Biomaterials 2012, 33, 3835.
- [106] J. Lee, O. Jeon, M. Kong, A. A. Abdeen, J.-Y. Shin, H. N. Lee, Y. Bin Lee, W. Sun, P. Bandaru, D. S. Alt, K. Lee, H. Kim, S. J. Lee, S. Chaterji, S. R. Shin, E. Alsberg, A. Khademhosseini, Sci. Adv. 2020, 6, eaaz5913.
- [107] N. Huebsch, P. R. Arany, A. S. Mao, D. Shvartsman, O. A. Ali, S. A. Bencherif, J. Rivera-Feliciano, D. J. Mooney, Nat. Mater. 2010, 9, 518.
- [108] M. Nasser, Y. Wu, Y. Danaoui, G. Ghosh, Mater. Sci. Eng. C 2019, 102, 75.
- [109] F. P. Seib, M. Prewitz, C. Werner, M. Bornhäuser, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009, 389, 663.
- [110] L. Cai, R. E. Dewi, A. B. Goldstone, J. E. Cohen, A. N. Steele, Y. J. Woo, S. C. Heilshorn, Adv. Healthc. Mater. 2016, 5, 2758.
- [111] Z. Fábíán, Stem Cells Int. 2019, 2019, 1.
- [112] D. E. Lee, N. Ayoub, D. K. Agrawal, Stem Cell Res. Ther. 2016, 7, 37.
- [113] H. H. Qin, C. Filippi, S. Sun, S. Lehec, A. Dhawan, R. D. Hughes, Stem Cell Res. Ther. 2015, 6, 237.
- [114] O. Chaudhuri, Biomater. Sci. 2017, 5, 1480.
- [115] O. Chaudhuri, L. Gu, D. Klumpers, M. Darnell, S. A. Bencherif, J. C. Weaver, N. Huebsch, H. P. Lee, E. Lippens, G. N. Duda, D. J. Mooney, Nat. Mater. 2016, 15, 326.
- [116] M. Cantini, H. Donnelly, M. J. Dalby, M. Salmeron - Sanchez, Adv. Healthc. Mater. 2020, 9, 1901259.
- [117] S. Tang, H. Ma, H. Tu, H. Wang, P. Lin, K. S. Anseth, Adv. Sci. 2018, 5, 1800638.
- [118] O. Chaudhuri, J. Cooper-White, P. A. Janmey, D. J. Mooney, V. B. Shenoy, Nature 2020, 584, 535.
- [119] A. R. Cameron, J. E. Frith, J. J. Cooper-White, Biomaterials 2011, 32, 5979.
- [120] L. Teng, Y. Chen, Y. G. Jia, L. Ren, J. Mater. Chem. B 2019, 7, 6705.

- [121] X. Zhao, N. Huebsch, D. J. Mooney, Z. Suo, *J. Appl. Phys.* 2010, 107, 063509.
- [122] B. P. Hung, T. Gonzalez-Fernandez, J. B. Lin, T. Campbell, Y. Bin Lee, A. Panitch, E. Alsberg, J. K. Leach, *Biomaterials* 2020, 245, 1.
- [123] K. H. Vining, A. Stafford, D. J. Mooney, *Biomaterials* 2019, 188, 187.
- [124] R. J. Wade, J. A. Burdick, *Mater. Today* 2012, 15, 454.
- [125] S. Khetan, M. Guvendiren, W. R. Legant, D. M. Cohen, C. S. Chen, J. A. Burdick, *Nat. Mater.* 2013, 12, 458.
- [126] C. Loebel, R. L. Mauck, J. A. Burdick, *Nat. Mater.* 2019, 18, 883.
- [127] S. Kumar, *Nat. Mater.* 2014, 13, 918.
- [128] K. H. Vining, D. J. Mooney, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2017, 18, 728.
- [129] M. P. Lutolf, J. A. Hubbell, *Nat. Biotechnol.* 2005, 23, 47.
- [130] N. Huettner, T. R. Dargaville, A. Forget, *Trends Biotechnol.* 2018, 36, 372.
- [131] J. Lam, T. Segura, *Biomaterials* 2013, 34, 3938.
- [132] F. Karimi, A. J. O'Connor, G. G. Qiao, D. E. Heath, *Adv. Healthc. Mater.* 2018, 7, 1701324.
- [133] N. Huebsch, P. R. Arany, A. S. Mao, D. Shvartsman, O. A. Ali, S. A. Bencherif, D. J. Mooney, *Nat. Mater.* 2010, 9, 518.
- [134] J. Dhillon, S. A. Young, S. E. Sherman, G. I. Bell, B. G. Amsden, D. A. Hess, L. E. Flynn, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* 2019, 107, 571.
- [135] Z. Cesarz, K. Tamama, *Stem Cells Int.* 2016, 2016, 1.
- [136] V. Miceli, M. Pampalone, S. Vella, A. P. Carreca, G. Amico, P. G. Conaldi, *Stem Cells Int.* 2019, 2019, 1.
- [137] S. Sart, A. C. Tsai, Y. Li, T. Ma, *Tissue Eng. - Part B Rev.* 2014, 20, 365.
- [138] E. J. Lee, S. J. Park, S. K. Kang, G. H. Kim, H. J. Kang, S. W. Lee, H. B. Jeon, H. S. Kim, *Mol. Ther.* 2012, 20, 1424.
- [139] E. Kim, H. Koo, *Chem. Sci.* 2019, 10, 7835.
- [140] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chemie Int. Ed.* 2001, 40, 2004.
- [141] J. E. Hein, J. C. Tripp, L. B. Krasnova, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2009, 48, 8018.
- [142] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* 2011, 44, 666.
- [143] C. M. Madl, S. C. Heilshorn, *Adv. Funct. Mater.* 2018, 28, 1706046.
- [144] M. R. Arkenberg, H. D. Nguyen, C.-C. Lin, *J. Mater. Chem. B* 2020, 8, 7835.
- [145] V. Legré-Boyer, *Orthop. Traumatol. Surg. Res.* 2015, 101, S101.

- [146] C. Feng, X. Luo, N. He, H. Xia, X. Lv, X. Zhang, D. Li, F. Wang, J. He, L. Zhang, X. Lin, L. Lin, H. Yin, J. He, J. Wang, W. Cao, R. Wang, G. Zhou, W. Wang, *Tissue Eng. - Part A* 2018, 24, 219.
- [147] J. M. Murphy, D. J. Fink, E. B. Hunziker, F. P. Barry, *Arthritis Rheum.* 2003, 48, 3464.
- [148] X. Lv, J. He, X. Zhang, X. Luo, N. He, Z. Sun, H. Xia, V. Liu, L. Zhang, X. Lin, L. Lin, H. Yin, D. Jiang, W. Cao, R. Wang, G. Zhou, W. Wang, *Cell Transplant.* 2018, 27, 1111.
- [149] M. Sato, K. Uchida, H. Nakajima, T. Miyazaki, A. Guerrero, S. Watanabe, S. Roberts, H. Baba, *Arthritis Res. Ther.* 2012, 14, R31.
- [150] E.-R. Chiang, H.-L. Ma, J.-P. Wang, C.-L. Liu, T.-H. Chen, S.-C. Hung, *PLoS One* 2016, 11, e0149835.
- [151] D. Xing, J. Wu, B. Wang, W. Liu, W. Liu, Y. Zhao, L. Wang, J. J. Li, A. Liu, Q. Zhou, J. Hao, J. Lin, *Int. J. Rheum. Dis.* 2020, 2020, 1.
- [152] C. B. Rodell, A. L. Kaminski, J. A. Burdick, *Biomacromolecules* 2013, 14, 4125.
- [153] T. C. Tseng, L. Tao, F. Y. Hsieh, Y. Wei, I. M. Chiu, S. H. Hsu, *Adv. Mater.* 2015, 27, 3518.
- [154] F. Nativel, D. Renard, F. Hached, P.-G. Pinta, C. D'Arros, P. Weiss, C. Le Visage, J. Guicheux, A. Billon-Chabaud, G. Grimandi, *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 1952.
- [155] D. Dhamecha, R. Movsas, U. Sano, J. Menon, *Int. J. Pharm.* 2019, 569, 118627.
- [156] B. A. Aguado, W. Mulyasmita, J. Su, K. J. Lampe, S. C. Heilshorn, *Tissue Eng. - Part A* 2012, 18, 806.
- [157] S. Talebian, M. Mehrali, N. Taebnia, C. P. Pennisi, F. B. Kadumudi, J. Foroughi, M. Hasany, M. Nikkhah, M. Akbari, G. Orive, A. Dolatshahi - Pirouz, *Adv. Sci.* 2019, 6, 1801664.
- [158] S. Fuchs, K. Shariati, M. Ma, *Adv. Healthc. Mater.* 2020, 9, 1.
- [159] A. S. Mao, B. Özkale, N. J. Shah, K. H. Vining, T. Descombes, L. Zhang, C. M. Tringides, S. W. Wong, J. W. Shin, D. T. Scadden, D. A. Weitz, D. J. Mooney, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2019, 116, 15392.
- [160] A. E. Ryan, P. Lohan, L. O. Flynn, O. Treacy, X. Chen, C. Coleman, G. Shaw, M. Murphy, F. Barry, M. D. Griffin, T. Ritter, 2014, 22, 655.
- [161] I. Akgun, M. C. Unlu, O. A. Erdal, T. Ogut, M. Erturk, E. Ovali, F. Kantarci, G. Caliskan, Y. Akgun, 2015, 135, 251.
- [162] Y. Park, C. Ha, J. Kim, *Am. J. Sports Med.* 2019, 47, 451.
- [163] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, D. E. Discher, *Cell* 2006, 126, 677.
- [164] C. Yang, M. W. Tibbitt, L. Basta, K. S. Anseth, *Nat. Mater.* 2014, 13, 645.

- [165] J. Paquet, M. Deschepper, A. Moya, D. Logeart-Avramoglou, C. Boisson-Vidal, H. Petite, *Stem Cells Transl. Med.* 2015, 4, 809.
- [166] S. Ryter, H. Kim, A. Hoetzel, J. Park, K. Nakahira, X. Wang, A. Choi, *Antioxid. Redox Signal.* 2007, 9, 49.
- [167] M. Redza-Dutordoir, D. A. Averill-Bates, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2016, 1863, 2977.
- [168] E. Ragni, C. Perucca Orfei, P. De Luca, G. Lugano, M. Viganò, A. Colombini, F. Valli, D. Zacchetti, V. Bollati, L. de Girolamo, *Stem Cell Res. Ther.* 2019, 10, 109.
- [169] S. Lenzini, R. Bargi, G. Chung, J.-W. Shin, *Nat. Nanotechnol.* 2020, 15, 217.

CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT D'UNE PLATEFORME D'HYDROGELS POUR L'ETUDE D'INTERACTIONS CELLULES-MATERIAUX

1. Rationnel pour le développement d'une plateforme d'hydrogels

Au cours de la dernière décennie, de nombreux travaux ont été consacrés à l'étude de l'influence de la MEC sur le comportement cellulaire en utilisant des biomatériaux synthétiques. Grâce au développement de nouveaux biomatériaux compatibles avec la culture cellulaire, ces recherches ont rapidement évoluées vers des modèles de culture 3D, plus proches de l'environnement natif des cellules. Du fait de leur modularité et de leur faculté à reproduire les propriétés physicochimiques et biochimiques du microenvironnement cellulaire, les hydrogels sont particulièrement utilisés pour la conception de MEC synthétiques. Cependant, ces propriétés sont souvent indissociables, et les outils disponibles à ce jour ne permettent pas d'étudier leur influence sur le comportement cellulaire de façon indépendante.

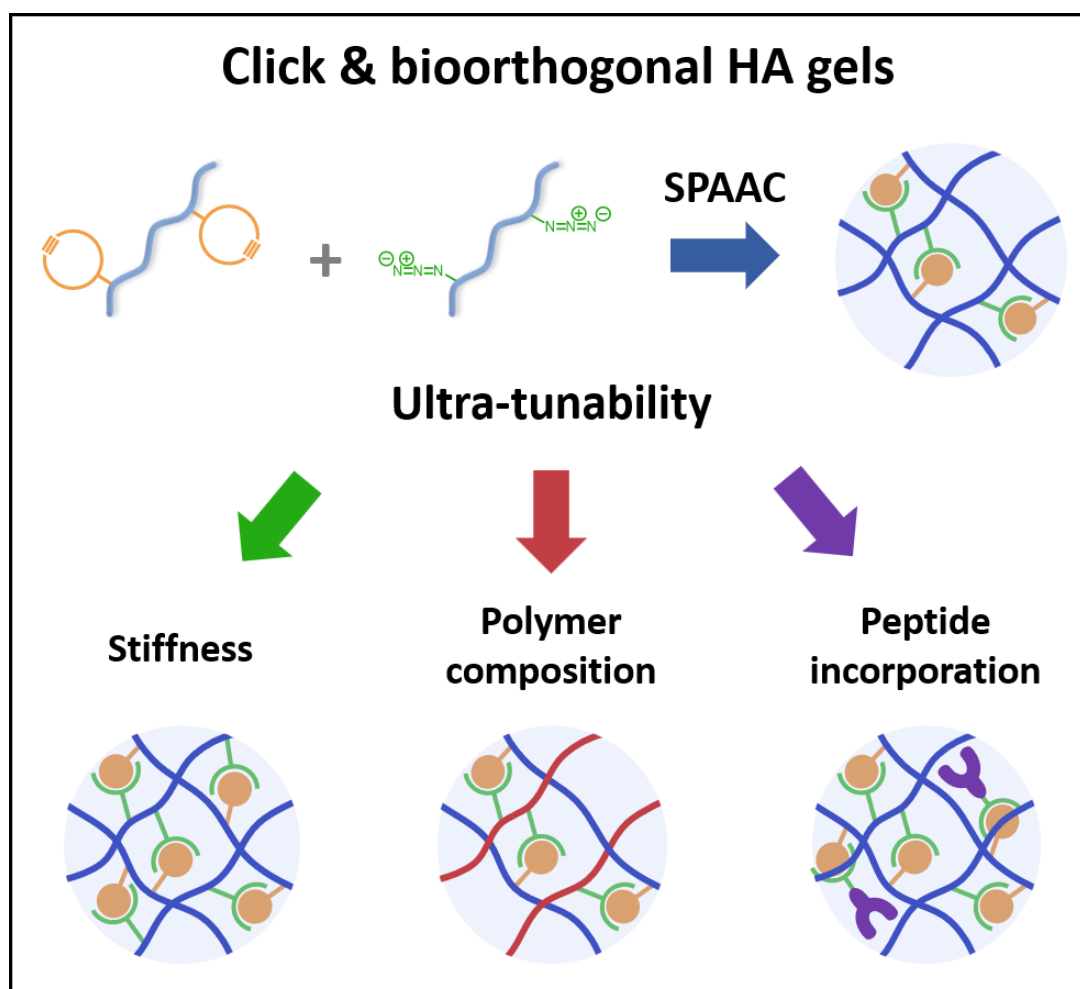
Dans ce contexte, nous avons envisagé de développer une plateforme d'hydrogels avec des propriétés mécaniques et biochimiques ajustables de façon indépendante. En plus de ces propriétés ajustables, et afin de favoriser leur utilisation par le plus grand nombre, nous avons développé cette plateforme en prenant en compte des considérations pratiques (e.g., facilité de synthèse, facilité de stérilisation) et des caractéristiques indispensables pour la culture cellulaire 3D (e.g., cytocompatibilité, stabilité, absence de gonflement). Pour cela, deux stratégies de réticulations distinctes ont été envisagées afin d'étudier séparément l'influence de la rigidité et de la viscoélasticité : (i) la cycloaddition entre un azoture et un alcyne pour la conception d'hydrogels élastiques ; et (ii) la formation d'esters de boronate permettant la production d'hydrogels viscoélastiques. Ces deux stratégies de réticulation ont été appliquées à différents polysaccharides, notamment à l'acide hyaluronique et à l'alginate, afin d'évaluer l'influence de la nature du polymère. Enfin, la composition des hydrogels a pu être davantage ajustée grâce à la fonctionnalisation de peptides biomimétiques (e.g., RGD).

2. Articles expérimentaux

Les résultats expérimentaux obtenus ont fait l'objet de deux articles scientifiques. Le premier article, soumis dans le journal *Bioactive Materials*, porte sur la conception d'hydrogels ultra-modulables réticulés via la réaction SPAAC. Le second article, soumis dans le journal *Biomaterials Science*, est consacré au développement et d'hydrogels réticulés via la formation d'esters de boronate.

Article II

Click and Bioorthogonal Hyaluronic Acid Hydrogels as an Ultra-Tunable Platform for the Investigation of Cell-Material Interactions



Abstract

The cellular microenvironment plays a major role in the biological functions of cells. Thus, biomaterials, especially hydrogels, which can be design to mimic the cellular microenvironment, are being increasingly used for cell encapsulation, delivery, and 3D culture, with the hope of controlling cell functions. Yet, much remains to be understood about the effects of cell-material interactions, and advanced synthetic strategies need to be developed to independently control the mechanical and biochemical properties of hydrogels. To address this challenge, we designed a new hyaluronic acid (HA)-based hydrogel platform using a click and bioorthogonal strain-promoted azide-alkyne cycloaddition (SPAAC) reaction. This approach facilitates the synthesis of hydrogels that are easy to synthesize and sterilize, have minimal swelling, are stable long term, and are cytocompatible. It provides bioorthogonal HA gels over an uncommonly large range of stiffness (0.5–45 kPa), all forming within 1 to 15 minutes. More importantly, our approach offers a versatile one-pot procedure to independently tune the hydrogel composition (e.g., polymer and adhesive peptides). Using this platform, we investigate the independent effects of polymer type, stiffness, and adhesion on the secretory properties of human adipose-derived stromal cells (hASCs) and demonstrate that HA can enhance the secretion of immunomodulatory factors by hASCs.

Résumé

En raison leur faculté à recréer les propriétés physicochimiques et biochimiques du microenvironnement cellulaire, les hydrogels sont de plus en utilisés pour la conception de matrices extracellulaires synthétiques. Cependant, ces propriétés sont souvent indissociables, et les outils disponibles à ce jour ne permettent pas d'étudier leur influence de façon indépendante. Dans ce contexte, nous avons développé une plateforme d'hydrogels à base d'acide hyaluronique réticulé via une réaction click et bioorthogonale : la cycloaddition azoture-alcyne promue par tension de cycle (SPAAC). Cette stratégie a permis la conception d'hydrogels cytocompatibles, stables, se formant entre 1 et 15 minutes, présentant une large gamme de rigidité (0.5–45 kPa), et à la composition ajustable (e.g., nature du polymère, peptide d'adhésion). Grâce à cette plateforme, nous avons pu étudier l'influence de la rigidité, de la nature du polymère et de la présence de peptides sur les propriétés de sécrétion de cellules souches humaines dérivées du tissu adipeux (hASCs). Cette étude a notamment révélé le rôle de l'AH pour l'augmentation de la capacité de sécrétion des hASCs.

1. Introduction

Using synthetic biomaterials to study cell-material interactions is a booming area of research. Over the past decade, extensive work has been dedicated to deciphering the role of the extracellular matrix (ECM) in cell behavior using synthetic materials as model ECMs. These investigations rapidly evolved from 2D to more representative 3D interactions thanks to the development of new generations of cell-friendly materials. In particular, innovative hydrogels have attracted increasing attention because of their ability to recapitulate the hydrated nature, composition, and mechanical properties of natural ECM. Yet, independently tuning the physicochemical and biochemical properties of cytocompatible hydrogels remains a challenge. Consequently, while the influence of mechanical properties (e.g., stiffness), which are the easiest to tune from a material perspective, have been largely studied^[1-3], much work remains to be done on the effect of biochemical cues (e.g., polymer composition and biomimetic peptides) on cell behavior. More importantly, the influence of these parameters is often questioned separately due to the limited tunability of existing systems, impairing our ability to screen and combine desired conditions. Thus, building a new hydrogel platform to investigate cell-material interactions would require combining ease of synthesis, sterilizability, and a customizable range of gelation time with features necessary for 3D cell culture (e.g., cytocompatibility, absence of swelling, and long-term stability) with independently tunable mechanical and biochemical properties.

When developing a new hydrogel platform, hyaluronic acid (HA) is particularly relevant because it is a natural component of the ECM, commercially available and affordable, and is relatively easy to chemically modify^[4,5]. However, most common HA crosslinking strategies require multiple and complex synthetic steps^[6], and external stimuli or small molecule reagents that are not entirely compatible with physiological conditions^[7,8], or have inherent limitations, such as poor mechanical properties and slow gelation rate^[9]. To address these issues, researchers have been exploring new crosslinking strategies that follow two major chemistry concepts: click chemistry and bioorthogonality. Ideally, click reactions are reactions that are efficient under mild conditions, and by extension, under physiological temperature and pH, and that do not produce byproducts, eliminating the need for purification^[10]. Bioorthogonality refers to chemical reactions that do not alter, or are not altered by, biological components and biochemical processes^[11,12]. Together, these two concepts encompass a

short list of chemical reactions (e.g., Diels-Alder, inverse electron-demand Diels-Alder, and strain-promoted azide-alkyne cycloaddition [SPAAC]) that are considered ideal for hydrogel design^[13]. However, most of the click and bioorthogonal reactions investigated to date produced hydrogels with inherent limitations such as a slow gelation rate (e.g., Diels-Alder)^[14] or a limited range of mechanical properties (e.g., inverse electron-demand Diels-Alder)^[15].

To our knowledge, there has been only one report of HA-only hydrogels that use SPAAC, where the authors used a complex synthetic route involving organic solvents and compounds that are not commercially available^[16]. The resulting hydrogels had slow gelation rates, requiring high polymer content (> 100 min for 1% [w/v] polymer content), with extremely limited stability in culture medium (< 4 days). Other groups combined HA and PEG crosslinkers in various SPAAC-based strategies, however, these strategies required the use of high molecular weight HA (2 MDa)^[17], which is difficult to sterilize, or high polymer content (10% [w/v])^[18], which typically increases the viscosity of hydrogel precursors, both leading to hydrogels with a limited range of stiffness (\approx 100 to 1000 Pa) and unwanted swelling^[17-19]. Other polysaccharides, such as alginate or cellulose, have also been used as polymer backbones to synthesize SPAAC hydrogels, leading to hydrogels with limited mechanical properties or stability^[20,21]. Therefore, designing a new HA-based hydrogel platform ideal for investigating cell-material interactions required a new click and bioorthogonal crosslinking strategy.

In this study, we investigated the use of the SPAAC chemistry between a cyclooctyne and an azide as a click and bioorthogonal crosslinking mechanism to synthesize tunable HA hydrogels (Figure 1). We successfully functionalized HA with either a cyclooctyne (bicyclononyne, BCN) or an azide (N_3) via a single-step synthesis and obtained HA-only hydrogels that form within minutes at low polymer content. By carefully investigating the influence of the crosslinking density on the hydrogel properties, we were able to design a variety of fast-forming and stable HA hydrogels over a large range of stiffness (0.5 to 45 kPa), including gels with minimal to no swelling (0.5 to 5 kPa). We demonstrated the cytocompatibility (> 95% viable cells after 7 days) and use of these new HA hydrogels for 3D cell culture using L929 murine fibroblast cells and human adipose-derived stromal cells (hASCs). We also showed that, independent of a chosen stiffness, the composition of SPAAC HA-based hydrogels can be tuned by immobilizing biomimetic peptides or co-crosslinking additional glycosaminoglycans (e.g., chondroitin sulfate), making these hydrogels a versatile platform to investigate cell-material interactions.

Moreover, to demonstrate the usefulness of this platform, we investigated how the composition and stiffness of the hydrogels influence the secretions of encapsulated hASCs, which are central to their use as therapeutic cells^[22,23]. Our results showed that HA advantageously increases the secretion of a series of immunomodulatory factors by hASCs cultured under pro-inflammatory conditions, paving the way for new cell-material investigations and the potential development of next-generation, material-assisted cell therapies.

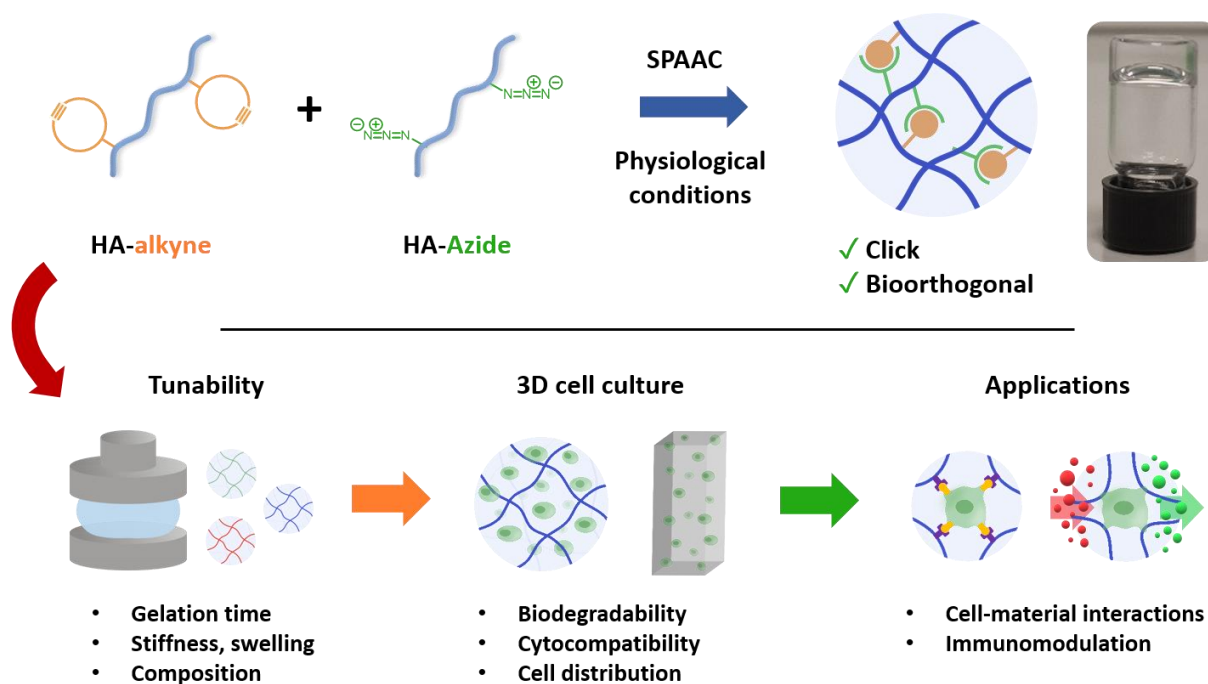


Figure 1: Designing ultra-tunable hyaluronic acid (HA)-based hydrogels via strain-promoted azide-alkyne cycloaddition (SPAAC) crosslinking for the investigation of cell-material interactions.

In this study, we investigated the tunability and cytocompatibility of a new click and bioorthogonal HA hydrogel platform and demonstrated its use for investigating the effects of cell-material interactions on stem cell immunomodulatory properties.

2. Experimental Section/Methods

2.1 Materials

Sodium hyaluronate was purchased from Lifecore Biomedical (USA). Chondroitin sulfate C sodium salt (CS) was purchased from Carbosynth (USA). Alginate (Protanal LF10/60) was purchased from FMC Corporation (USA). 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) and 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM) were purchased from TCI Chemicals (Belgium). Azido-PEG2-amine was purchased from Broadpharm

(USA). Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (without Ca & Mg), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Penicillin/Streptomycin (P/S), Alexa Fluor 568 phalloidin, Hoechst 33258, and the Live/Dead Kit were purchased from ThermoFischer Scientific. L929 cells were purchased from ATCC (USA). Fetal Bovine serum (FBS) was purchased from Dominique Dutscher. Otherwise stated, all other reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2 Methods

2.2.1 Polysaccharide modification

Synthesis of HA-N₃: HA-N₃ was synthesized by adapting a previously described protocol^[15]. Typically, HA (100 mg) with various molecular weights (100 kDa and 300 kDa) was dissolved in MES buffer pH 5.5 (9 mL) at room temperature while stirring. DMT-MM (0.69 mg; 1 eq) was added and allowed to react for 30 min. Then, azido-PEG2-amine (22 mg; 0.5 eq) was dissolved in MES buffer pH 5.5 (1mL), added dropwise to the polymer solution, and allowed to react for 3 days at room temperature while stirring. To tune the DS, a similar procedure was followed with adjusted equivalents of DMT-MM (34 mg; 0.5 eq) and azido-PEG2-amine (11 mg; 0.25 eq). The solution was dialyzed against 0.1 M DPBS for 1 day, then against deionized water for 2 days, before filter sterilization, lyophilization, and storage at -20 °C. The DS of HA-N₃ was determined using ¹H NMR (400 MHz, D₂O) after subtracting the signals from unmodified HA between 3.1 ppm and 4.4 ppm. CS-N₃ and alginate-N₃ were functionalized using the same procedure.

Synthesis of HA-BCN: HA-BCN was synthesized as described above with some modifications. HA (100 mg) with various molecular weights (100 kDa and 300 kDa) was dissolved in MES buffer pH 5.5 (9 mL) at room temperature while stirring. DMT-MM (27 mg; 0.4eq) was added and allowed to react for 30 min. BCN (16 mg; 0.2eq) was dissolved in DMSO (1 mL) prior to dropwise addition. The solution was allowed to react for 3 days at room temperature while stirring. To tune the DS, a similar procedure was followed with adjusted equivalents of DMT-MM (14 mg; 0.2 eq) and BCN (8 mg; 0.1 eq). The solution was dialyzed against 0.1 M DPBS containing 2% DMSO overnight, 0.1 M DPBS for 8 hours, and deionized water for 2 days, prior to filter sterilization, lyophilization, and storage at -80 °C. The DS was determined by ¹H NMR (400 MHz, D₂O). CS-BCN and alginate-BCN were functionalized using the same procedure.

Synthesis of fluorescent CS: CS or CS-N₃ was functionalized with a fluorophore using a procedure similar to that described in section 4.2.1. Polysaccharide modification. Briefly, the polymer (50 mg) was dissolved in MES buffer pH 5.5 (4.5 mL) at room temperature while stirring. DMT-MM (3 mg) was added and allowed to react for 30 min. Alexa Fluor™ 488 hydrazide (0.5 mg) was dissolved in DMSO (0.5 mL) prior to dropwise addition. The solution was allowed to react for 3 days in the dark at room temperature while stirring. The solution was dialyzed against 0.1 M DPBS containing 2% DMSO overnight, then 0.1 M DPBS for 8 hours, and deionized water for 2 days, prior to filter sterilization, lyophilization, and storage at -20 °C.

2.2.2 Hydrogel formation and characterization

Hydrogel formation: Hydrogels were obtained by separately dissolving HA-BCN and HA-N₃ in the desired medium (e.g., PBS or DMEM with serum), prior to mixing them together in a chosen volume ratio. The initial concentrations and volume ratios of the two components were calculated to control both the final total concentration of polysaccharides and the BCN:N₃ molar ratio.

Gelation time evaluation: Rheological characterization was performed using a HAAKE™ MARS™ (ThermoFisher Scientific) equipped with a 20-mm titanium upper plate and a Peltier plate to control the temperature. All oscillatory time sweep experiments were performed at a constant stress of 1 Pa and at a constant frequency of 0.1 Hz (within the linear viscoelastic region). Pre-hydrogel solutions were prepared as described in section 4.2.2. Hydrogel formation and characterization, and measurements were performed immediately after mixing the hydrogel precursors. Gelation time experiments were conducted at 37 °C with a solvent trap to prevent evaporation. Gel points were determined as the time when the shear storage modulus (G') value equals that of the shear loss modulus (G'').

Stiffness evaluation: A volume of 200 µL of pre-hydrogel solution was cast between two glass plates separated by a 1-mm silicon spacer and left at 37 °C overnight in a humid atmosphere for complete gelation. Hydrogels were then punched (2 mm in diameter) and subjected to unconfined compression tests using a Microtester® (CellScale), with measurements performed under 20% strain. Young's modulus was calculated according to the manufacturer recommendations and the standard expression: $E = \text{stress}/\text{strain} = (F/A)/(\Delta l/l_0)$, where E is the Young's modulus; F, the force applied to the gel; A, the area on which the force is applied; Δl ,

the displacement, and I_0 , the initial thickness. For each formulation, 3 distinct hydrogels were prepared and punched in at least 4 locations.

Stability and biodegradability studies: 200 μL of various pre-hydrogel solutions were transferred to pre-weighted Eppendorf tubes and left at 37 °C overnight for complete gelation. The hydrogel-containing tubes were weighed, and 800 μL of PBS (37 °C) was added. At specific time points (0, 1, 2, 4, 6, and 24 hours; then 3, 7, 14, 21, 42, and 63 days), the supernatant was removed before weighing the hydrogel. A biodegradability study was then conducted on three formulations of interest for their stability by adding 800 μL of hyaluronidase (100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ in PBS; 37 °C) on top of the stable hydrogels. The three formulations investigated were the following: (i) 1 kPa HA hydrogel (1% HA w/v; DS: HA-BCN, 15%; HA- N_3 , 40%; BCN: N_3 ratio of 4:1); (ii) 2.5 kPa HA hydrogel (1% HA (w/v); DS: HA-BCN, 15%; HA- N_3 , 40%; BCN: N_3 ratio of 1:4); and (iii) 5 kPa HA hydrogel (1.5% HA (w/v); DS: HA-BCN, 7%; HA- N_3 , 40%; BCN: N_3 ratio of 1:1). At specific time points (0, 2, 6, and 24 hours; then 2, 3, 4, and 7 days), the supernatant was removed before weighing the hydrogel. The reported mass ratio represents the hydrogel mass at a specific time point divided by its initial mass.

GAG enrichment evaluation: Fluorescent CS or fluorescent CS- N_3 was dissolved at 0.1% (w/v) in PBS. Then, HA- N_3 was dissolved at 1% (w/v) in PBS containing either fluorescent CS or fluorescent CS- N_3 . Each of the two HA- N_3 solutions were mixed with a 1% (w/v) HA-BCN solution in a volume ratio corresponding to an HA-BCN:HA- N_3 molar ratio of 4:1. 100 μL of the forming HA gels containing either fluorescent CS or fluorescent CS- N_3 were transferred to a 96-well plate and allowed to gel overnight at room temperature. 100 μL of PBS was added on top of each fluorescent hydrogel before monitoring fluorescent CS release: at specific time points (0, 2, 8, and 24 hours; then 3 and 7 days), the supernatant was removed and the fluorescence of both the hydrogel and the supernatant was measured (Ex: 485 nm, Em: 535 nm; Tristar 2S plate reader, Berthold Technologies). The results were normalized to the initial hydrogel fluorescence.

2.2.3 Biological investigations

Cell culture and encapsulation: Murine fibroblastic L929 cells were amplified in DMEM medium supplemented with 10% FBS and 1% P/S. As previously described^[24], hASCs were isolated from lipoaspirates of patients with their informed consent and amplified in Promocell growth medium supplemented with 1% P/S. hASCs were used between passage 2 and 5. For

cell encapsulation, HA-BCN and HA-N₃ were first dissolved in DMEM medium supplemented with 10% FBS and 1% P/S. Cells were then pelleted and resuspended in the HA-N₃ solution. The solutions of HA-BCN and HA-N₃/cells were mixed in a calculated volume ratio to obtain the desired total HA concentration (1% w/v), the desired BCN:N₃ molar ratio (1:4), and a final cell concentration of 10⁶ cells/mL. Cell-containing pre-hydrogel solutions (100 µL) were rapidly transferred to inserts (8 µm pore; Sarstedt) and allowed to gel for 30 min at 37 °C before adding cell medium. The medium was changed every 2–3 days.

Viability and metabolic assays: Cell viability and metabolic activity were assessed at day 0, 3, and 7 using LIVE/DEAD™ staining and the CCK-8 assay, respectively. For LIVE/DEAD™ staining, gels were transferred to an 8-well chamber slide (IBIDI) and incubated with Calcein AM and ethidium homodimer per the manufacturer's recommendations. Images were acquired via confocal microscopy (A1RS, Nikon). Cell viability was calculated as the number of living cells divided by the total number of cells. Cell distribution was calculated as the number of cells per 125 µm gel section divided by the total cell number in a 500 µm volume of gel. Regarding the metabolic activity assay, gels were transferred to a 48-well plate and incubated for 2 hours with a CCK-8 solution per the manufacturer's recommendations. The absorbance of the supernatant at 460 nm was measured (Tristar 2S plate reader, Berthold Technologies), and the results were normalized to the absorbance measured on D0. The viability and metabolic activity experiments were performed on 3 distinct batches of polymers (i.e., HA-BCN and HA-N₃).

One-pot peptide immobilization: HA-BCN, HA-N₃, and the RGD-N₃ peptide (N₃-KGS₂SGRGRGDSP; GenScript) were first dissolved in DMEM medium supplemented with 10% FBS and 1% P/S. The solutions of HA-BCN and RGD-N₃ were mixed and allowed to react for 30 minutes at 37 °C. The solutions of HA-BCN (with or without RGD-N₃) and HA-N₃ were mixed in a calculated volume ratio to obtain the desired total HA concentration (1% w/v) and the desired BCN:N₃ molar ratio (4:1). 200 µL of the RGD-containing pre-hydrogel solutions were rapidly transferred to a 24-well plate and allowed to gel for 30 min at 37 °C before cell seeding (30 000 hASCs/well) on top of the hydrogel. After 1 day of cell culture, hydrogels were washed with PBS to remove non-adherent cells, then fixed with 4% paraformaldehyde and permeabilized with 0.1% Triton X-100. Cells were then labeled with Alexa Fluor 568 phalloidin (dilution of 1:200) and Hoechst 33258 (dilution of 1:50 000). Images of cells adhering to the

gels were acquired using confocal imaging (A1RS, Nikon), prior to adhesion quantification expressed as number of nuclei per cm².

Evaluation of hASC secretions: hASCs were amplified before FBS deprivation overnight and encapsulated as described in section 2.2.3. Biological investigations. Cells were encapsulated in one of the five following formulations: (i) 1 kPa HA hydrogel (1% HA (w/v); DS: HA-BCN, 15%; HA-N₃, 40%; BCN:N₃ ratio of 4:1); (ii) 5 kPa HA hydrogel (1.5% HA (w/v); DS: HA-BCN, 7%; HA-N₃, 40%; BCN:N₃ ratio of 1:1); (iii) 1 kPa RGD HA hydrogel (1% HA (w/v); DS: HA-BCN, 15%; HA-N₃, 40%; BCN:N₃ ratio of 4:1; RGD-N₃: 300 μM); (iv) 1 kPa CS HA hydrogel (1% HA (w/v); DS: HA-BCN, 15%; HA-N₃, 40%; BCN:N₃ ratio of 4:1; CS-N₃: 0.1%); or (v) 1 kPa alginate hydrogel (0.5% alginate (w/v); DS: alginate-BCN, 8%; alginate-N₃, 30%; BCN:N₃ ratio of 1:1). 100 μL of the cell-containing pre-hydrogel solutions were rapidly transferred to a 96-well plate and allowed to gel for 30 min at 37 °C. The gels were then transferred to a 48-well plate before adding culture medium. After 4 hours, the medium was removed, and cells were stimulated with medium containing 50 ng/mL of human tumor necrosis factor α (TNF-α) and human interferon-γ (INF-γ) (Miltenyi Biotec). After 3 days of stimulation, the release of soluble factors in the supernatant was evaluated. The presence of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) in the supernatant was evaluated based on the measurement of its enzymatic activity (i.e., tryptophan-to-kynurenine conversion) using an Ehrlich test as previously described^[25]. The Prostaglandin E2 (PGE2) content was evaluated using an ELISA kit (Cayman Chemical) following the manufacturer's instructions. The level of interleukin-6 (IL-6) was evaluated using an ELISA kit (DuoSet[®], R&D Systems) following the manufacturer's instructions.

2.3 Statistical analysis

All data are shown as mean ± standard deviation. Statistical analysis was carried out using GraphPad to evaluate statistical significance via Student's t-test or one-way ANOVA with Tukey's post hoc test.

3. Results and Discussion

3.1 SPAAC hydrogel components can be synthesized in a single step

We hypothesized that SPAAC chemical reagents (i.e., strained cycloalkyne and azide) could be advantageously combined with HA for the design of click and bioorthogonal HA hydrogels that are easy to synthesize, tune, and use for 3D cell culture. Regarding the cyclooctyne, we chose to investigate the use of the Bicyclo[6.1.0]nonyne (BCN) over the commonly used dibenzocyclooctyne (DBCO) for its higher hydrophilicity and good balance between stability and reactivity^[26]. For ease of use, the synthetic route of hydrogel precursors must be accessible and straightforward, with limited use of organic solvents and few synthetic/purification steps. Here, the two HA hydrogel components, namely HA-BCN and HA-N₃, were each synthesized in a single step using commercially available compounds via a standard amidation procedure (i.e., DMT-MM activation) under mild aqueous conditions of reaction and purification (Figure 2a). We successfully synthesized HA-BCN and HA-N₃ as confirmed by ¹H NMR (Figure 2b). More importantly, adjusting reagent equivalents allowed us to tune the degree of substitution (DS) of each functional group, from 7% ± 1% to 15% ± 1% for HA-BCN, and from 21% ± 2% to 40% ± 3% for HA-N₃ (Figure 2c). Relatively low DS were targeted for BCN grafting due to the relative water solubility of the cyclooctyne, which could hamper filter sterilization for any DS > 20%. Interestingly, the use of DMT-MM as a coupling agent allowed us to obtain a higher BCN substitution yield (≥ 70%) than previously reported with the commonly used EDC reagent (≈ 25%)^[27]. The synthesis of HA-N₃ and HA-BCN had good batch-to-batch reproducibility and could be applied over a range of MWs (from 100 to 300 kDa) without differences in substitution (Figure S1). This range of MWs allows for filter sterilization, ensuring the synthesized polymers can be easily sterilized. Overall, we showed that the proposed strategy for the synthesis of SPAAC hydrogel precursors follows green chemistry principles (e.g., aqueous conditions, room temperature, single-step reactions, efficiency, and safety) and is reproducible and easy to implement, making it broadly applicable.

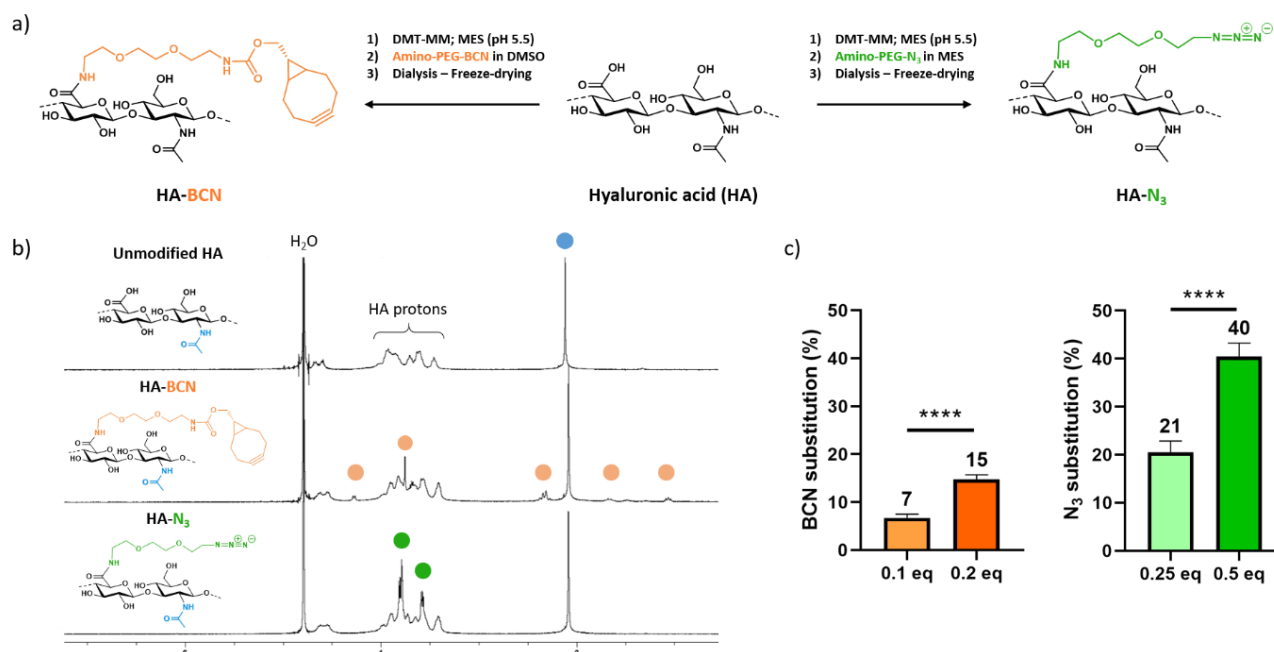


Figure 2: Single-step synthesis of SPAAC precursors for the design of HA-based hydrogels.

a) Single-step reaction conditions used for the synthesis of bicyclonyne (BCN)-modified and azide (N₃)-modified HA. b) Representative ¹H NMR (400 MHz, D₂O) of HA, HA-BCN, and HA-N₃ confirming the successful chemical modification of HA. The 3 protons of the N-acetyl group of HA (blue circle, 2.1 ppm) served as a reference to calculate the degrees of substitution of HA-BCN (orange circles, including 2 protons at 1.1 ppm, 2 protons at 2.4 ppm, and 2 protons at 4.3 ppm) and HA-N₃ (green circles, accounting for 13 protons between 3.3–4.1 ppm). c) Tunable degrees of substitution of HA-BCN and HA-N₃ using defined reagent equivalents. Data are shown as mean ± SD (N = 3 distinct polymer batches) with statistical significance determined by Student's t-test (****p < 0.0001).

3.2 SPAAC hydrogels are fast gelling and offer a broad range of stiffness

Controlling the gelation kinetics of a gel is key to its broad application. For 3D cell culture, a relatively fast gelation (< 10 min) is required to prevent cell sedimentation^[15], yet a quasi-instantaneous gelation (< 1 min) is not practical and can lead to inhomogeneous cell distribution. Gelation kinetics is related to the crosslinking reaction rate, the number of reactive functions per polymer chain, and the overall concentration of potential cross-links to be formed^[28–30]. While the crosslinking reaction rate is determined by the reactivity of the chosen functional groups, the two other parameters can be adjusted by varying the polymer MW, DS, and content, as well as the molar ratio between reactive functions. Therefore, we carefully investigated the influence of these four variables on the gelation time of HA-based hydrogels formed via SPAAC. Of note, the overall concentration of potential cross-links is equivalent to the theoretical maximal crosslinking density. For simplicity, we will use the term “crosslinking density” throughout the text to designate both the concentration of potential cross-links (before gelation) and the theoretical maximal crosslinking density (after gelation).

Using dynamic shear rheological measurements on 1% (w/v) HA gels (HA-BCN: DS of 7%; HA-N₃: DS of 40%) at a fixed crosslinking density (1.4 mM), we showed that increasing the MW of HA from 100 kDa to 300 kDa significantly reduced the gelation time from 8.8 ± 0.2 min to 3.1 ± 0.4 min (Figure 3a). While the effect of polymer entanglement cannot be entirely excluded, these results mainly highlight the influence of the number of reactive groups per polymer chain on gelation kinetics, as previously observed^[15,31]. To further confirm this result, we showed that increasing the DS of 100 kDa HA-BCN from 7% to 15% while keeping the crosslinking density (1.4 mM) constant significantly decreased the gelation time from 8.8 ± 0.2 min to 5.6 ± 0.2 min (Figure 3b). These results highlight the advantage of working with tunable side-chain functionalized polymers over end-functionalized polymers, such as PEG, to tune the gelation time.

Following these experiments, we investigated the effects of the polymer content and the BCN:N₃ molar ratio, both of which are directly linked to the crosslinking density, on gelation time. As expected, we showed that the gelation time is strongly influenced by the polymer content, with an increase in overall modified HA concentration from 0.5% to 1.5% (w/v), leading to a decrease in gelation time from 10 ± 0.4 min to less than 1 min (Figure 3c). Interestingly, we demonstrated that getting closer to a BCN:N₃ molar ratio of 1:1, which maximizes the crosslinking density, reduces the gelation time to a low of 2.8 ± 0.1 min for 1% (w/v) HA gels (HA-BCN: DS of 7%; HA-N₃: DS of 40%) (Figure 3d). By plotting the gelation time of a large panel of hydrogel formulations as a function of their crosslinking densities, we further demonstrated that increasing the overall crosslinking density is key to reducing the gelation rate (Figure 3e). More importantly, most of the formulations that we investigated gelled between 1 and 10 min, including some at ultra-low polymer content (typically 0.5% w/v), making SPAAC one of the fastest click crosslinking reactions ever reported for the synthesis of HA hydrogels. Overall, we identified formulations that offer a range of gelation times suitable for a variety of biomedical applications, including 3D cell culture^[15].

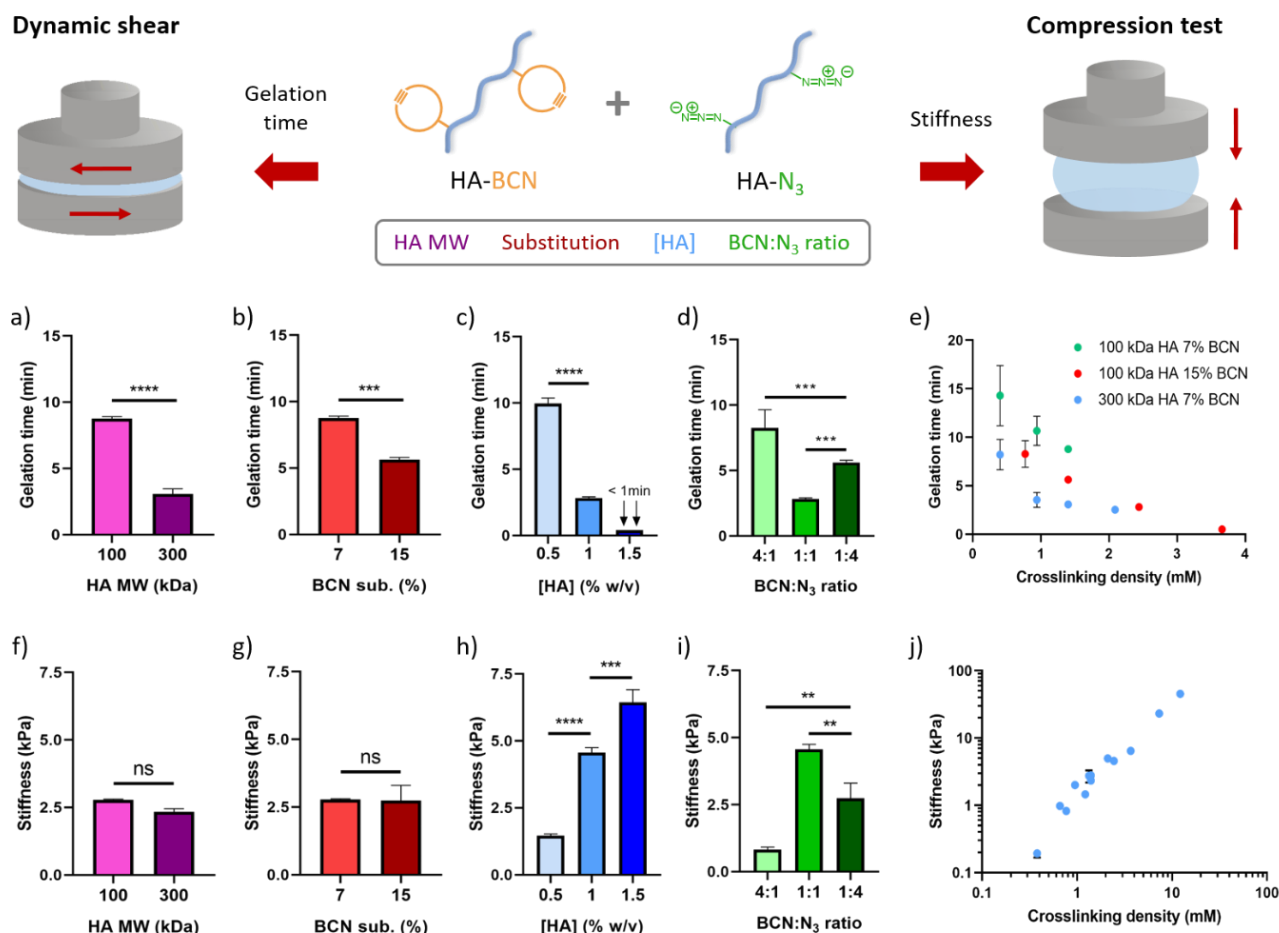


Figure 3: Mechanical characterization of SPAAC HA-based hydrogels.

The influence of a) HA MW, b) BCN DS, c) concentration of HA, and d) BCN:N₃ ratio on hydrogel gelation time, evaluated using dynamic shear rheometry. e) Relationship between hydrogel gelation time and crosslinking density, revealing the role of MW and crosslinking density on gelation kinetics. The influence of f) HA MW, g) BCN substitution, h) concentration of HA, and i) BCN:N₃ ratio on hydrogel stiffness, evaluated via compression testing. j) Overall plot of hydrogel stiffness vs crosslinking density, demonstrating a linear relationship. Data are shown as mean ± SD (n = 3) with statistical significance determined using Student's t-test or one-way ANOVA with a Tukey's post hoc test (ns : not significant, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, and ****p < 0.0001).

While customizing the gelation time mainly serves a practical purpose, the stiffness of a gel has been shown to directly impact cell and tissue behaviors^[1,2,32]. This makes stiffness an important parameter to control for the investigation of cell-material interactions. Thus, designing hydrogels that are tunable over a wide range of stiffness is desirable. The crosslinking density, which in this study is the density of junctions formed within a gel, is known to contribute to hydrogel stiffness^[33,34] and could vary with the polymer MW, DS, and content, as well as the molar ratio between reactive functions. Using compression measurements on 1% (w/v) HA gels at a fixed crosslinking density (1.4 mM) and fixed DS

(HA-BCN: 7%; HA-N₃: 40%), we showed that varying HA MW (from 100 to 300 kDa) did not affect stiffness (Figure 3f), consistent with a previous study^[15]. At a fixed crosslinking density (1.4 mM), our results also showed that the stiffness of SPAAC gels is independent of the DS (7% vs 15%) (Figure 3g). Along with our results on gelation time, these findings suggest that tuning the MW and/or DS of HA is a simple way to tune the gelation time of an HA-based hydrogel without altering its stiffness. Next, we evaluated the influence of the crosslinking density on stiffness by varying the polymer content or the BCN:N₃ molar ratio. As expected, at a fixed MW (100 kDa) and fixed DS (HA-BCN: 7%; HA-N₃: 40%), increasing the polymer content from 0.5% to 1.5% (w/v) in HA gels led to an increase in stiffness from 1.5 ± 0.1 kPa to 6.4 ± 0.5 kPa (Figure 3h). We further tuned the hydrogel crosslinking density by varying the BCN:N₃ molar ratio. As observed for gelation time, maximizing the crosslinking density by using a BCN:N₃ molar ratio of 1:1 maximized the stiffness of HA gels for a given set of HA precursors; and molar ratios of 4:1, 1:4, and 1:1 led to stiffness values of 0.8 ± 0.1 kPa, 2.7 ± 0.6 kPa, and 4.6 ± 0.2 kPa, respectively (Figure 3i). Markedly, plotting the stiffness of various hydrogel formulations as a function of their crosslinking densities revealed a linear relationship between crosslinking density and stiffness over several orders of magnitude, independently of the MW and DS of HA (Figure 3j). This relationship allowed us to easily determine the crosslinking density required to produce a gel with a desired stiffness. As a proof of concept, we showed that low MW HA (typically 20 kDa) can be combined with 100 kDa HA to increase the overall polymer content (i.e., the crosslinking density) without affecting the viscosity of the precursor solution, producing HA-based hydrogels with a stiffness (45.3 ± 3.5 kPa) rarely seen before (Figure S2). In general, using SPAAC as a crosslinking mechanism allowed us to design a new HA-based hydrogel platform with independently controlled gelation time and stiffness suitable to biomedical applications.

3.3 SPAAC hydrogels are stable with tunable swelling behavior

Hydrogel swelling and stability are important parameters to consider for 3D cell culture and tissue engineering purposes. Swelling and shrinking behaviors typically alter the mechanical properties of a gel, thus affecting cell-material interactions. Similarly, an unstable hydrogel that degrades within hours to days under regular culture conditions is not appropriate for cell culture. Thus, a stable hydrogel with minimal to no swelling/shrinking is desirable. To study the swelling and stability of SPAAC HA gels, we monitored their mass after immersing them in

PBS at 37 °C. First, we investigated the role of MW and DS of HA on hydrogel swelling/shrinking. At a fixed crosslinking density (1.4 mM), we observed no difference in swelling/shrinking when varying the MW (100 vs 300 kDa) and DS (HA-BCN: 7% vs 15%) of HA (Figure 4a,b, and S3a,b), together excluding the contribution of the number of reactive functions per polymer chain to the swelling/shrinking of SPAAC hydrogels.

We then investigated the BCN:N₃ molar ratio at a fixed total HA concentration of 1% or 1.5% (w/v), which resulted in inverted bell curves of shrinking/swelling behavior as a function of the HA content and BCN:N₃ molar ratio. We found that approaching an equimolar ratio of BCN:N₃ led to more shrinking, while extreme BCN:N₃ ratios (i.e., 8:1 and 1:8) led to swelling (Figure 4c, S3c and S3d). Moreover, increasing the polymer content from 1% to 1.5% (w/v) led to more swelling, no matter the BCN:N₃ molar ratio. We expected this result as HA is a negatively charged and hygroscopic polymer that commonly induces hydrogel swelling in a wet environment due to osmotic pressure^[35–37]. Overall, our results demonstrate that the swelling/shrinking behavior of SPAAC HA-based hydrogels depends solely on the HA content and crosslinking density, and finely tuning the crosslinking density for a given HA content can counterbalance osmotic pressure to produce HA gels with the desired swelling/shrinking property. Based on this new understanding, we identified several formulations for which SPAAC crosslinking density and HA concentration balanced each other to produce minimally- to non-swelling HA-based hydrogels, including some at ultra-low polymer content (0.5% [w/v]) (Figure 4d).

Most of the SPAAC HA-based hydrogel formulations that we investigated reached their swelling/shrinking equilibrium within 3 days and were then stable over at least 2 months (Figure S3) while remaining biodegradable under enzymatic degradation (Figure 4e), making them suitable for long-term cell culture. To date, there has been only one report of stable, minimally-swelling, click and bioorthogonal HA gels^[15]. These gels were obtained via inverse electron-demand Diels-Alder crosslinking, which induced the formation of nitrogen bubbles within the gels and produced gels with a low stiffness (\approx 0.5 to 3 kPa). In addition, previously reported SPAAC HA-based hydrogels all showed swelling and/or a lack of stability over time^[16–18], emphasizing the importance of developing a new hydrogel platform with tunable swelling behavior.

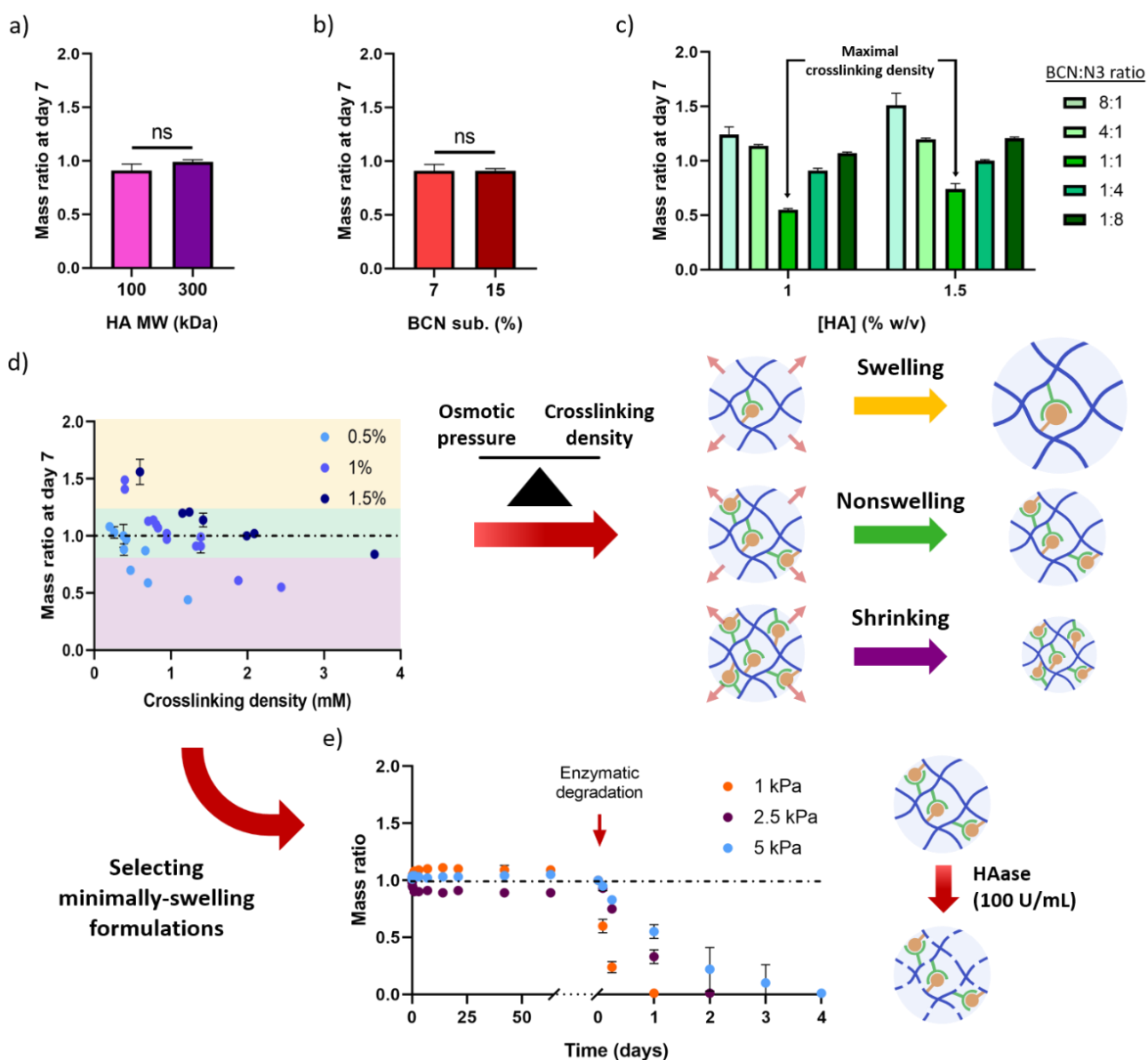


Figure 4: Stability and swelling characteristics of SPAAC HA-based hydrogels.

The influence of a) the MW and b) the BCN substitution of HA on hydrogel mass ratio at day 7. c) The influence of both HA concentration and BCN:N₃ ratio on hydrogel mass ratio at day 7. d) Relationship between hydrogel swelling, hydrogel crosslinking density, and HA concentration, highlighting swelling (yellow arrow), minimally- to non-swelling (green arrow), and shrinking (purple arrow) hydrogel formulations. e) The enzymatic degradation of three SPAAC HA-based hydrogel formulations of interest (stable long term and minimally- to non-swelling with distinct stiffness) using hyaluronidase (100 U·mL⁻¹), confirming the biodegradability of the newly designed hydrogels. Data are shown as mean ± SD (n = 3), with statistical significance determined by Student's t-test (ns : not significant).

Overall, we demonstrated that SPAAC can serve as an adequate crosslinking strategy to design click and bioorthogonal hydrogels that are easy to synthesize and use. A complete physicochemical characterization of this new system allowed us to obtain a series of HA-based

hydrogels that form within minutes, are stable and non-swelling while remaining biodegradable, and offer a range of stiffness suitable to in vitro applications, overcoming the limitations of current hydrogels.

3.4 SPAAC hydrogels are cytocompatible

Conventional crosslinking reactions (e.g., carbodiimide and photocrosslinking) can impair cell viability, limiting their use for 3D cell culture^[8,38]. Because of this limitation, developing new click and bioorthogonal crosslinking strategies for cell encapsulation is of particular interest. We evaluated the cytocompatibility of SPAAC HA-based hydrogels using a model cell line recommended by ISO10993-5 standards (L929 murine fibroblasts) and hASCs, which are of interest for tissue engineering and cell therapy. A 1% HA hydrogel formulation (DS: HA-BCN: 15%; HA-N₃: 40%; BCN:N₃ ratio of 1:4) with fast gelation (5.6 ± 0.2 min), minimal shrinking, long-term stability, and a stiffness of 2.5 kPa was used to assess the cytocompatibility of the new system. Three distinct polymer batches of HA-BCN and HA-N₃ were used to confirm the safety of the proposed synthetic approach. We first confirmed that these hydrogels displayed similar swelling/stability profiles in PBS and in culture medium with the presence of cells, and that they maintained their mechanical properties (≈ 2.5 kPa) over 7 days of cell culture (Figure S4).

We then assessed cell viability via live/dead staining and confocal microscopy, as well as metabolic activity using a metabolic assay (CCK-8). Encapsulated L929 cells had a cell viability of $> 95\%$ with no significant change over 7 days (Figure 5a and b). At day 7, we observed a 7.4 ± 0.6 -fold increase of the metabolic activity compared to day 0, consistent with cell proliferation (Figure 5c), which is common at day 7 of culturing L929 cells^[7,39]. In addition, over 7 days of cell culture, encapsulated hASCs were $> 95\%$ viable (Figure 5d and e) with constant metabolic activity (Figure 5f), which was expected^[40,41]. The constant metabolic activity is due to the lack of a specific stimulus (e.g., proliferation or differentiation medium) in the chosen hASC culture conditions, as well as the lack of adhesion in the investigated gels, as evidenced by the round shape of the encapsulated hASCs^[42]. Finally, to demonstrate the efficient mixing of cells and hydrogel precursor solutions, we evaluated cell distribution in the 1% HA gels after complete gelation (2 hours) using confocal imaging. For both L929 cells and hASCs, the number of cells per volume was not significantly different between hydrogel sections (250 μm), signaling the absence of cell sedimentation and suggesting a homogenous cell distribution

throughout the gels (Figure 5g and h). This finding further confirmed that a gelation time of ≈ 5 to 10 min is most appropriate for cell encapsulation and 3D cell culture, as previously suggested^[15]. Therefore, our results showed that using SPAAC as a click and bioorthogonal crosslinking strategy facilitates homogeneous and harmless cell encapsulation.

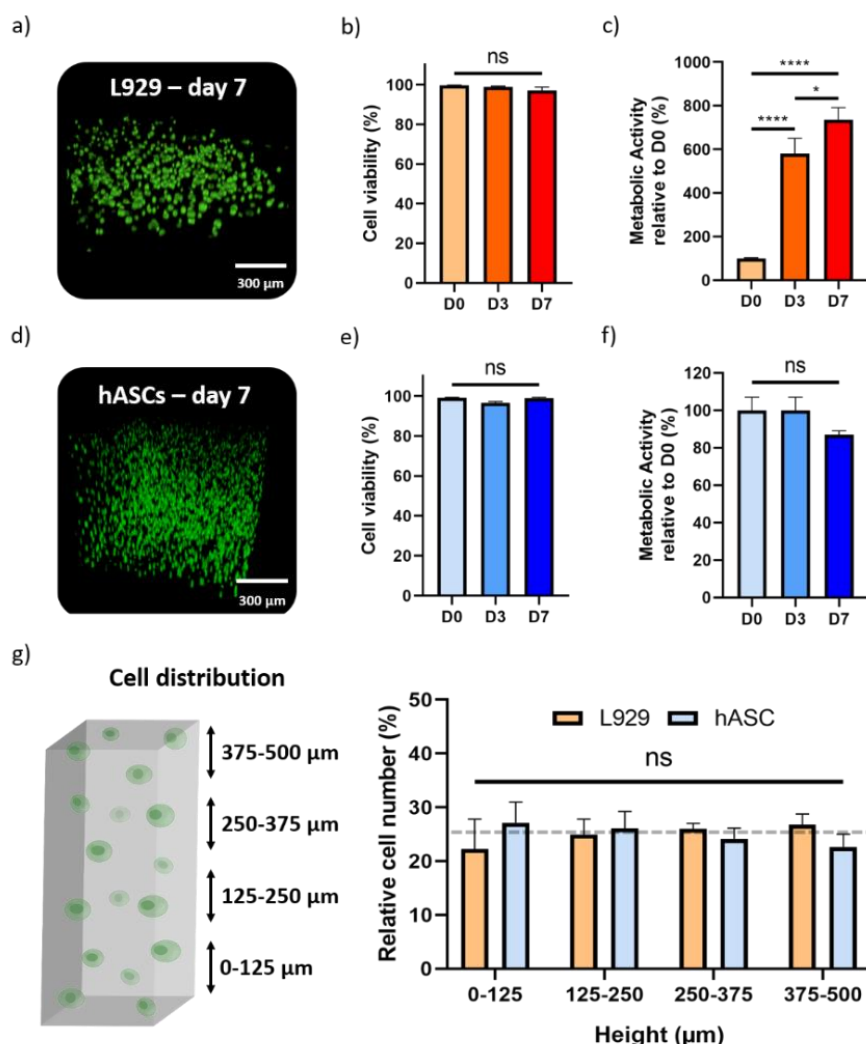


Figure 5: Cell viability and distribution in SPAAC HA-based hydrogels.

a) Representative 3D view, b) cell viability, and c) metabolic activity of encapsulated L929 cells during 7 days of 3D cell culture. d) Representative 3D view, e) cell viability, and f) metabolic activity of encapsulated hASCs during 7 days of 3D cell culture. g) Relative cell distribution within the hydrogel, showing homogenous encapsulation for both cell types used (the dashed line indicates the expected relative cell number in each of the four bins, which is 25%). Data are shown as mean \pm SD ($n = 3$) with statistical significance determined using one-way ANOVA with a Tukey's post hoc test (ns : not significant, $*p < 0.05$ and $****p < 0.0001$).

3.5 SPAAC hydrogels allow for straightforward composition modifications

While the role of hydrogel mechanical properties (e.g., stiffness and viscoelasticity) on the behavior of cells has been extensively reviewed^[2,43], the roles of biochemical cues remain to

be explored. A tunable hydrogel platform that allows for the straightforward incorporation of additional molecules of interest without affecting its mechanical properties would thus facilitate these investigations. Here, we hypothesized that the composition of the new SPAAC hydrogels could be modified via a versatile one-pot procedure in three different ways: first, by replacing HA with another polysaccharide of interest (i.e., polymer switching), such as alginate as a non-bioactive polymer control (Figure 6a); second, by immobilizing azide-modified biomimetic peptides (i.e., peptide grafting) to promote cell adhesion (Figure 6b); and third, by co-crosslinking additional glycosaminoglycans (GAG) such as chondroitin sulfate (CS) for GAG enrichment (Figure 6c).

To investigate polymer switching, we used a synthetic strategy similar to that of SPAAC HA gels to design SPAAC alginate gels by mixing alginate-BCN and alginate-N₃. By optimizing the polymer content, we obtained two alginate hydrogel formulations that were non-swelling and stable for more than 2 months, including after hyaluronidase treatment (Figure S5), with the same stiffness (1 and 3 kPa) as that of the chosen SPAAC HA hydrogel formulations (Figure 6a). Being able to modify the polymer backbone of otherwise identical hydrogels (e.g., crosslinking mechanisms, swelling, and mechanical properties) could facilitate future investigations of the effect of individual polymers on cell behavior.

We then investigated the feasibility of incorporating an adhesive peptide (RGD) or of co-crosslinking CS, which have both been shown to play important roles in the regulation of mesenchymal stromal cells (MSC) functions, including MSC secretion and chondrogenesis^[44,45]. A commercially available azide-modified RGD peptide (300 μM) was incorporated into a 1% HA gel by simply mixing the peptide solution with one of the two precursors (i.e., HA-BCN) 30 min prior to regular gel formation. This one-pot strategy allowed us to adjust the number of incorporated molecules without an additional synthetic and purification step. To confirm the immobilization and bioactivity of the incorporated adhesive peptide, we assessed 2D cell adhesion using hASCs and cytoskeletal/nuclei (phalloidin/hoechst) staining. After several washes, most cells were washed off in the absence of RGD, whereas immobilizing RGD allowed hASCs to adhere and remain on top of the gel (Figure 6b). To immobilize CS in SPAAC HA gels, CS was first functionalized with azide functions (CS-N₃) via a similar synthetic procedure to that of HA-N₃. CS-N₃ (0.1%) was then dissolved with HA-N₃ prior to mixing with an HA-BCN solution. To confirm CS co-crosslinking, we

compared the release of an azide-modified CS vs unmodified CS from SPAAC HA gels using fluorescently labeled polymers. Monitoring the fluorescence of immersed CS-containing gels, we observed that only the relative amount of incorporated CS-N₃ remained constant over time (104.8% ± 4.6% at day 7), while unmodified CS diffused out of the gel (16.2% ± 1.8% at day 7) (Figure 6c). These results indicated successful CS co-crosslinking and GAG enrichment. Overall, this one-pot incorporation procedure is broadly applicable to any polymer or peptide and allowed us to further tune the hydrogel composition in a simple way.

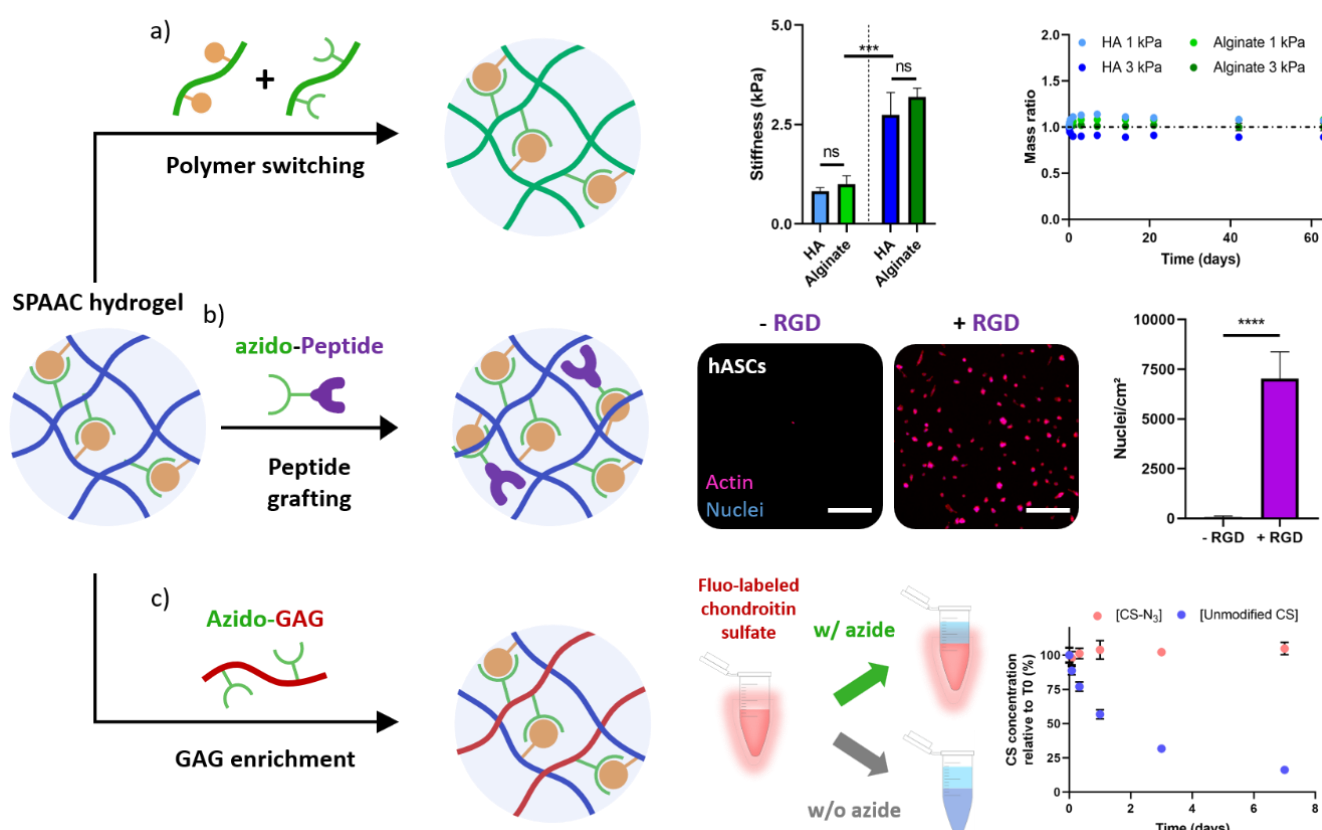


Figure 6: Versatility of the new SPAAC hydrogel platform with an easily tunable hydrogel composition. a) SPAAC can be applied to other polymers, such as alginate, to compare hydrogels with similar stiffness and stability but differing composition. b) SPAAC allows peptide grafting to promote cell adhesion, as demonstrated with an azido-RGD peptide immobilization. c) SPAAC facilitates the enrichment of HA hydrogels with other glycosaminoglycans (GAGs), as demonstrated by the monitoring of CS-N₃ retention over 7 days. Data are shown as mean ± SD (n = 3) with statistical significance determined using Student's t-test or one-way ANOVA with a Tukey's post hoc test (ns : not significant, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 and ****p < 0.0001).

3.6 SPAAC HA-based hydrogels influence hASC secretions

MSCs naturally interact with their microenvironment and respond strongly to physical and biochemical variations in their surroundings. But while it may be possible to guide the cell fate

or immunomodulatory potential of MSCs by synthetically tuning hydrogels to influence cell-material interactions^[3,43], much remains to be done to understand these interactions and their effects on MSC secretory ability. To date, the few studies that have investigated the influence of hydrogel stiffness on MSC immunomodulatory potential showed that soft scaffolds (≤ 5 kPa) tend to increase MSC secretory ability^[46–49]; however, the influence of hydrogel composition on cell secretions remains largely unexplored.

Using our new SPAAC hydrogels, we independently evaluated the effects of stiffness (1 vs 5 kPa), adhesion (RGD vs no RGD), and polymer type (HA vs HA+CS vs alginate) on MSCs' ability to secrete immunomodulatory factors in response to a pro-inflammatory environment. Specifically, hASCs were encapsulated in our different hydrogels and cultured under

pro-inflammatory conditions (TNF α and INF- γ) for 3 days. We then analyzed the supernatants to quantify the presence of three soluble factors known to mitigate inflammation: indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), prostaglandin E2 (PGE2), and interleukin-6 (IL-6) (Figure 7a)^[22,50]. Our results showed that IDO activity (tryptophan-to-kynurenine conversion) and PGE2 and IL-6 levels were consistent across our different hydrogels, suggesting that tuning HA hydrogel stiffness (1 vs 5 kPa) or enriching gels with CS did not affect hASC secretions (Figure 7b, c, and d). This is the first report of the potential lack of effect of CS enrichment on hASC paracrine functions. Regarding the effect of changes in stiffness, our results are consistent with a previous study that showed that varying the shear elastic modulus of covalently crosslinked hydrogels between 0.25 kPa and 2.5 kPa did not affect the secretion of PGE2 by encapsulated MSCs^[51].

Regarding adhesion, our data showed that the chemical immobilization of the adhesive RGD peptide to a soft HA hydrogel (1 kPa) did not significantly alter the secretion of IDO and IL-6 by the encapsulated MSCs (Figure 7b, d); however, immobilizing RGD did decrease the secretion of PGE2 (3.16 ± 0.48 ng/mL vs 6.28 ± 0.94 ng/mL) (Figure 7c). Our finding that RGD did not alter IL-6 secretion is consistent with another study, where the encapsulation of MSCs in a PEG hydrogel containing RGD vs a non-adhesive scrambled control (RDG) did not lead to significant differences in the secretion of IL-6, IL-8, and VEGF^[52]. Moreover, the observed reduced secretion of PGE2 may have resulted from an early stage of cell differentiation triggered by cell adhesion, as differentiated cells are known to secrete fewer

immunomodulatory factors than undifferentiated MSCs^[53]. The reduction of PGE2 could also have been the result of decreased stress due to adhesion to the matrix, as stress has been previously correlated with increased PGE2 secretion via the NF- κ B pathway^[54].

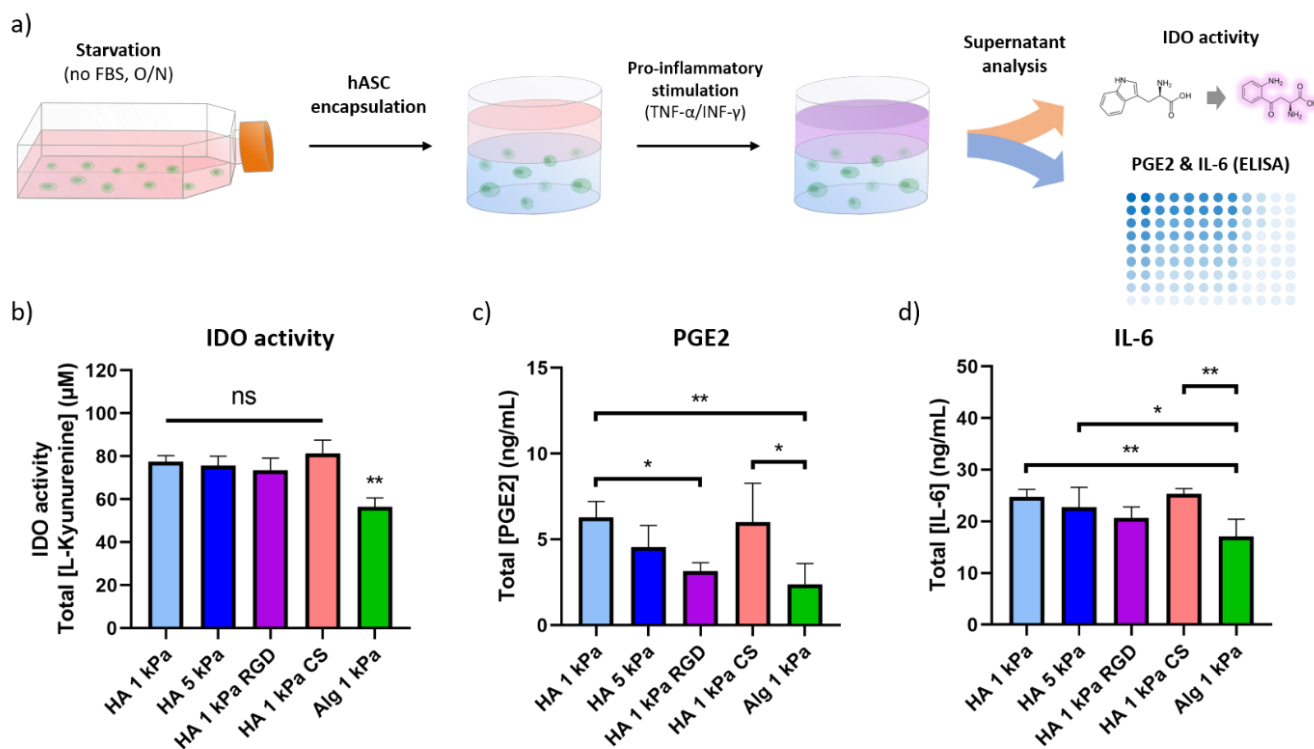


Figure 7: The ultra-tunable SPAAC hydrogel platform revealed that HA has a positive effect on encapsulated MSC secretions, while CS has no effect.

a) Schematic of the procedure: hASCs are deprived of FBS overnight prior to being encapsulated in hydrogels and stimulated with pro-inflammatory cytokines (TNF- α and INF- γ). After 3 days, the supernatant is collected to evaluate b) the presence of IDO via its enzymatic activity, and the levels of c) PGE2 and d) IL-6. Data are shown as mean \pm SD ($n = 4$), with statistical significance determined using one-way ANOVA with a Tukey's post hoc test (ns : not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Interestingly, compared to a HA hydrogel control, when hASCs were encapsulated in a SPAAC alginate hydrogel (1 kPa), the supernatant showed significantly reduced IDO activity ($55.47 \pm 4.2 \mu\text{M}$ vs $77.58 \pm 2.81 \mu\text{M}$) and significantly reduced levels of PGE2 ($2.4 \pm 1.2 \text{ ng/mL}$ vs $6.28 \pm 0.94 \text{ ng/mL}$) and IL-6 ($17.11 \pm 3.34 \text{ ng/mL}$ vs $24.74 \pm 1.43 \text{ ng/mL}$). While we could not fully exclude distinct diffusion properties, the two hydrogels had similar mechanical properties with similar crosslinking densities, suggesting that the altered secretion in alginate gels may be the result of distinct polymer structures and cell-material interactions. Unlike alginate, HA is a bioactive polymer and is known to interact with cells through receptors such as CD44 and RHAMM^[5,55]. While HA is most often considered and used as a polymer of interest for its biological relevance, this is the first time an HA gel has been reported to have a positive effect

on MSC secretions based on a direct comparison to a non-HA-based hydrogel. While beyond the scope of this article, our results call for further investigations of potential pathways activated by HA, possibly leading to tailored HA-based materials for improved biomedical applications, such as stem cell therapy. Overall, the versatility of our new SPAAC hydrogel platform, where composition and stiffness can be easily adjusted without compromising gelation time and stability, has provided us with a new avenue to investigate cell-material interactions.

4. Conclusion

Using SPAAC as a click and bioorthogonal crosslinking strategy, we successfully developed a practical and easily tunable HA-based hydrogel platform. Our unique hydrogels are easy to synthesize and sterilize, have a controlled gelation rate and long-term stability with minimal swelling, are cytocompatible, and are ultra-tunable in terms of mechanical properties (i.e., stiffness ranging at least 2 orders of magnitude) and biochemical properties (i.e., polymer composition and adhesion). As such, these hydrogels can easily be tailored for a variety of biomedical applications and translational research, including 3D cell culture to investigate cell-material interactions. Using this new platform, we demonstrated for the first time that HA can enhance the secretion of immunomodulatory factors by encapsulated hASCs, potentially laying the foundation for a new generation of material-assisted cell therapies.

5. References

- [1] J. Lee, O. Jeon, M. Kong, A.A. Abdeen, J.-Y. Shin, H.N. Lee, Y. Bin Lee, W. Sun, P. Bandaru, D.S. Alt, K. Lee, H. Kim, S.J. Lee, S. Chaterji, S.R. Shin, E. Alsberg, A. Khademhosseini, Combinatorial screening of biochemical and physical signals for phenotypic regulation of stem cell-based cartilage tissue engineering, *Sci. Adv.* 6 (2020) eaaz5913. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz5913>.
- [2] N. Huebsch, P.R. Arany, A.S. Mao, D. Shvartsman, O.A. Ali, S.A. Bencherif, D.J. Mooney, Harnessing Traction-Mediated Manipulation of the Cell-Matrix Interface to Control Stem Cell Fate, *Nat. Mater.* 9 (2010) 518–526. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/nmat2732>.
- [3] C.M. Madl, S.C. Heilshorn, Engineering Hydrogel Microenvironments to Recapitulate the Stem Cell Niche, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 20 (2018) 21–47. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-062117-120954>.
- [4] J.A. Burdick, G.D. Prestwich, Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications, *Adv. Mater.* 23 (2011) 41–56. <https://doi.org/10.1002/adma.201003963>.

- [5] A. Aruffo, I. Stamenkovic, M. Melnick, C.B. Underhill, B. Seed, CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate, *Cell*. 61 (1990) 1303–1313. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90694-A](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90694-A).
- [6] C. Loebel, C.B. Rodell, M.H. Chen, J.A. Burdick, Shear-thinning and self-healing hydrogels as injectable therapeutics and for 3D-printing, *Nat. Protoc.* 12 (2017) 1521–1541. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.053>.
- [7] K. Flegeau, C. Toquet, G. Rethore, C. d'Arros, L. Messenger, B. Halgand, D. Dupont, F. Autrusseau, J. Lesoeur, J. Veziere, P. Bordat, A. Bresin, J. Guicheux, V. Delplace, H. Gautier, P. Weiss, In Situ Forming, Silanized Hyaluronic Acid Hydrogels with Fine Control Over Mechanical Properties and In Vivo Degradation for Tissue Engineering Applications, *Adv. Healthc. Mater.* 9 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1002/adhm.202000981>.
- [8] N.E. Fedorovich, M.H. Oudshoorn, D. van Geemen, W.E. Hennink, J. Alblas, W.J.A. Dhert, The effect of photopolymerization on stem cells embedded in hydrogels, *Biomaterials*. 30 (2009) 344–353. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.09.037>.
- [9] C.M. Madl, S.C. Heilshorn, Rapid Diels-Alder Cross-linking of Cell Encapsulating Hydrogels, *Chem. Mater.* 31 (2019) 8035–8043. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.9b02485>.
- [10] H.C. Kolb, M.G. Finn, K.B. Sharpless, Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions, *Angew. Chemie Int. Ed.* 40 (2001) 2004–2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004::AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5).
- [11] E.M. Sletten, C.R. Bertozzi, From Mechanism to Mouse: A Tale of Two Bioorthogonal Reactions, *Acc. Chem. Res.* 44 (2011) 666–676. <https://doi.org/10.1021/ar200148z>.
- [12] S.L. Scinto, D.A. Bilodeau, R. Hincapie, W. Lee, S.S. Nguyen, M. Xu, C.W. am Ende, M.G. Finn, K. Lang, Q. Lin, J.P. Pezacki, J.A. Prescher, M.S. Robillard, J.M. Fox, Bioorthogonal chemistry, *Nat. Rev. Methods Prim.* 1 (2021) 1–30. <https://doi.org/10.1038/s43586-021-00028-z>.
- [13] C.M. Madl, S.C. Heilshorn, Bioorthogonal Strategies for Engineering Extracellular Matrices, *Adv. Funct. Mater.* 28 (2018) 1706046–1706067. <https://doi.org/10.1002/adfm.201706046>.
- [14] H. Tan, J.P. Rubin, K.G. Marra, Direct synthesis of biodegradable polysaccharide derivative hydrogels through aqueous Diels-Alder chemistry, *Macromol. Rapid Commun.* 32 (2011) 905–911. <https://doi.org/10.1002/marc.201100125>.
- [15] V. Delplace, P.E.B. Nickerson, A. Ortin-Martinez, A.E.G. Baker, V.A. Wallace, M.S. Shoichet, Nonswelling, Ultralow Content Inverse Electron-Demand Diels–Alder Hyaluronan Hydrogels with Tunable Gelation Time: Synthesis and In Vitro Evaluation, *Adv. Funct. Mater.* 30 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1002/adfm.201903978>.

- [16] A. Takahashi, Y. Suzuki, T. Suhara, K. Omichi, A. Shimizu, K. Hasegawa, N. Kokudo, S. Ohta, T. Ito, In situ cross-linkable hydrogel of hyaluronan produced via copper-free click chemistry, *Biomacromolecules*. 14 (2013) 3581–3588. <https://doi.org/10.1021/bm4009606>.
- [17] S.S. Han, H.Y. Yoon, J.Y. Yhee, M.O. Cho, H.E. Shim, J.E. Jeong, D.E. Lee, K. Kim, H. Guim, J.H. Lee, K.M. Huh, S.W. Kang, In situ cross-linkable hyaluronic acid hydrogels using copper free click chemistry for cartilage tissue engineering, *Polym. Chem.* 9 (2018) 20–27. <https://doi.org/10.1039/c7py01654a>.
- [18] S. Fu, H. Dong, X. Deng, R. Zhuo, Z. Zhong, Injectable hyaluronic acid/poly(ethylene glycol) hydrogels crosslinked via strain-promoted azide-alkyne cycloaddition click reaction, *Carbohydr. Polym.* 169 (2017) 332–340. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.04.028>.
- [19] J. Christoffersson, C. Aronsson, M. Jury, R. Selegård, D. Aili, C.F. Mandenius, Fabrication of modular hyaluronan-PEG hydrogels to support 3D cultures of hepatocytes in a perfused liver-on-a-chip device, *Biofabrication*. 11 (2019). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aaf657>.
- [20] C.T. Moody, S. Palvai, Y. Brudno, Click cross-linking improves retention and targeting of refillable alginate depots, *Acta Biomater.* 112 (2020) 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.05.033>.
- [21] M. Nouri-Felekori, N. Nezafati, M. Moraveji, S. Hesaraki, T. Ramezani, Bioorthogonal hydroxyethyl cellulose-based scaffold crosslinked via click chemistry for cartilage tissue engineering applications, *Int. J. Biol. Macromol.* 183 (2021) 2030–2043. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.005>.
- [22] N. Song, M. Scholtemeijer, K. Shah, Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: Mechanisms and Therapeutic Potential, *Trends Pharmacol. Sci.* 41 (2020) 653–664. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.06.009>.
- [23] Y. Shi, Y. Wang, Q. Li, K. Liu, J. Hou, C. Shao, Y. Wang, Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases, *Nat. Rev. Nephrol.* 14 (2018) 493–507. <https://doi.org/10.1038/s41581-018-0023-5>.
- [24] C. Merceron, S. Portron, C. Vignes-Colombeix, E. Rederstorff, M. Masson, J. Lesoeur, S. Sourice, C. Siquin, S. Collic-Jouault, P. Weiss, C. Vinatier, J. Guicheux, Pharmacological modulation of human mesenchymal stem cell chondrogenesis by a chemically oversulfated polysaccharide of marine origin: Potential application to cartilage regenerative medicine, *Stem Cells*. 30 (2012) 471–480. <https://doi.org/10.1002/stem.1686>.
- [25] F. Hached, C. Vinatier, P.G. Pinta, P. Hulin, C. Le Visage, P. Weiss, J. Guicheux, A. Billon-Chabaud, G. Grimandi, Polysaccharide hydrogels support the long-term viability of encapsulated human mesenchymal stem cells and their ability to secrete immunomodulatory factors, *Stem Cells Int.* 2017 (2017) 6–8. <https://doi.org/10.1155/2017/9303598>.

- [26] J. Dommerholt, F.P.J.T. Rutjes, F.L. van Delft, Strain-Promoted 1,3-Dipolar Cycloaddition of Cycloalkynes and Organic Azides, *Top. Curr. Chem.* 374 (2016) 1–20. <https://doi.org/10.1007/s41061-016-0016-4>.
- [27] R. Selegård, C. Aronsson, C. Brommesson, S. Dånmark, D. Aili, Folding driven self-assembly of a stimuli-responsive peptide-hyaluronan hybrid hydrogel, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06457-9>.
- [28] W.H. Stockmayer, Theory of molecular size distribution and gel formation in branched polymers: II. General cross linking, *J. Chem. Phys.* 12 (1944) 125–131. <https://doi.org/10.1063/1.1723922>.
- [29] K.S. Anseth, C.N. Bowman, Kinetic Gelation model predictions of crosslinked polymer network microstructure, *Chem. Eng. Sci.* 49 (1994) 2207–2217. [https://doi.org/10.1016/0009-2509\(94\)E0055-U](https://doi.org/10.1016/0009-2509(94)E0055-U).
- [30] A.L. Kjøniksen, B. Nyström, Effects of polymer concentration and cross-linking density on rheology of chemically cross-linked poly(vinyl alcohol) near the gelation threshold, *Macromolecules.* 29 (1996) 5215–5222. <https://doi.org/10.1021/ma960094q>.
- [31] W. Cao, J. Sui, M. Ma, Y. Xu, W. Lin, Y. Chen, Y. Man, Y. Sun, Y. Fan, X. Zhang, The preparation and biocompatible evaluation of injectable dual crosslinking hyaluronic acid hydrogels as cytoprotective agents, *J. Mater. Chem. B.* 7 (2019) 4413–4423. <https://doi.org/10.1039/c9tb00839j>.
- [32] A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney, D.E. Discher, Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification, *Cell.* 126 (2006) 677–689. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>.
- [33] S. Lin, L. Gu, Influence of crosslink density and stiffness on mechanical properties of type I collagen gel, *Materials (Basel).* 8 (2015) 551–560. <https://doi.org/10.3390/ma8020551>.
- [34] K. Kato, Y. Ikeda, K. Ito, Direct Determination of Cross-Link Density and Its Correlation with the Elastic Modulus of a Gel with Slidable Cross-Links, *ACS Macro Lett.* 8 (2019) 700–704. <https://doi.org/10.1021/acsmacrolett.9b00238>.
- [35] C.B. Rodell, N. Dusaj, C.B. Highley, J.A. Burdick, Injectable and Cytocompatible Tough Double Network Hydrogels through Tandem Supramolecular and Covalent Crosslinking, *Adv. Mater.* 28 (2016) 8419–8424. <https://doi.org/10.1002/adma.201602268>.Injectable.
- [36] X.Z. Shu, Y. Liu, Y. Luo, M.C. Roberts, G.D. Prestwich, Disulfide cross-linked hyaluronan hydrogels, *Biomacromolecules.* 3 (2002) 1304–1311. <https://doi.org/10.1021/bm025603c>.
- [37] L.J. Smith, S.M. Taimoory, R.Y. Tam, A.E.G. Baker, N. Bintah Mohammad, J.F. Trant, M.S. Shoichet, Diels-Alder Click-Cross-Linked Hydrogels with Increased Reactivity Enable 3D Cell Encapsulation, *Biomacromolecules.* 19 (2018) 926–935. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01715>.

- [38] J.Y. Lai, Biocompatibility of chemically cross-linked gelatin hydrogels for ophthalmic use, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 21 (2010) 1899–1911. <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4035-3>.
- [39] A. Blaeser, D.F. Duarte Campos, M. Weber, S. Neuss, B. Theek, H. Fischer, W. Jahnen-Dechent, Biofabrication Under Fluorocarbon: A Novel Freeform Fabrication Technique to Generate High Aspect Ratio Tissue-Engineered Constructs, *Biores. Open Access.* 2 (2013) 374–384. <https://doi.org/10.1089/biores.2013.0031>.
- [40] Y. Dong, Y. Liu, Y. Chen, X. Sun, L. Zhang, Z. Zhang, Y. Wang, C. Qi, S. Wang, Q. Yang, Spatiotemporal regulation of endogenous MSCs using a functional injectable hydrogel system for cartilage regeneration, *NPG Asia Mater.* 13 (2021) 71. <https://doi.org/10.1038/s41427-021-00339-3> NPG.
- [41] K. Flegeau, O. Gauthier, G. Rethore, F. Autrusseau, A. Schaefer, J. Lesoeur, J. Veziere, A. Brésin, H. Gautier, P. Weiss, Injectable silanized hyaluronic acid hydrogel/biphasic calcium phosphate granule composites with improved handling and biodegradability promote bone regeneration in rabbits, *Biomater. Sci.* 9 (2021) 5640–5651. <https://doi.org/10.1039/d1bm00403d>.
- [42] A.K. Kudva, F.P. Luyten, J. Patterson, RGD-functionalized polyethylene glycol hydrogels support proliferation and in vitro chondrogenesis of human periosteum-derived cells, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A.* 106 (2018) 33–42. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36208>.
- [43] O. Chaudhuri, J. Cooper-White, P.A. Janmey, D.J. Mooney, V.B. Shenoy, Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour, *Nature.* 584 (2020) 535–546. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2612-2>.
- [44] S.S. Ho, K.C. Murphy, B.Y.K. Binder, C.B. Vissers, J.K. Leach, Increased Survival and Function of Mesenchymal Stem Cell Spheroids Entrapped in Instructive Alginate Hydrogels, *Stem Cells Transl. Med.* 5 (2016) 773–781. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0211>.
- [45] E.A. Aisenbrey, S.J. Bryant, The role of chondroitin sulfate in regulating hypertrophy during MSC chondrogenesis in a cartilage mimetic hydrogel under dynamic loading, *Biomaterials.* 190–191 (2019) 51–62. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.028>.
- [46] Y. Ji, J. Li, Y. Wei, W. Gao, X. Fu, Y. Wang, Substrate stiffness affects the immunosuppressive and trophic function of hMSCs: Via modulating cytoskeletal polymerization and tension, *Biomater. Sci.* 7 (2019) 5292–5300. <https://doi.org/10.1039/c9bm01202h>.
- [47] H. Yang, N.M.J. Cheam, H. Cao, M.K.H. Lee, S.K. Sze, N.S. Tan, C.Y. Tay, Materials Stiffness-Dependent Redox Metabolic Reprogramming of Mesenchymal Stem Cells for Secretome-Based Therapeutic Angiogenesis, *Adv. Healthc. Mater.* 8 (2019) e1900929. <https://doi.org/10.1002/adhm.201900929>.

- [48] K.C. Murphy, J. Whitehead, D. Zhou, S.S. Ho, J.K. Leach, Engineering fibrin hydrogels to promote the wound healing potential of mesenchymal stem cell spheroids, *Acta Biomater.* 64 (2017) 176–186. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.10.007>.
- [49] S.W. Wong, S. Lenzini, M.H. Cooper, D.J. Mooney, J.W. Shin, Soft extracellular matrix enhances inflammatory activation of mesenchymal stromal cells to induce monocyte production and trafficking, *Sci. Adv.* 6 (2020) aaw0158. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw0158>.
- [50] X. Zhao, Y. Zhao, X. Sun, Y. Xing, X. Wang, Q. Yang, Immunomodulation of MSCs and MSC-Derived Extracellular Vesicles in Osteoarthritis, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020) 1–14. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.575057>.
- [51] K.H. Vining, A. Stafford, D.J. Mooney, Sequential modes of crosslinking tune viscoelasticity of cell-instructive hydrogels, *Biomaterials.* 188 (2019) 187–197. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.013>.
- [52] A.Y. Clark, K.E. Martin, J.R. García, C.T. Johnson, H.S. Theriault, W.M. Han, D.W. Zhou, E.A. Botchwey, A.J. García, Integrin-specific hydrogels modulate transplanted human bone marrow-derived mesenchymal stem cell survival, engraftment, and reparative activities, *Nat. Commun.* 11 (2020) 114. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14000-9>.
- [53] Y. Park, C. Ha, J. Kim, Comparison of Undifferentiated Versus Chondrogenic Predifferentiated Mesenchymal Stem Cells Derived From Human Umbilical Cord Blood for Cartilage Repair in a Rat Model, *Am. J. Sports Med.* 47 (2019) 451–461.
- [54] J. Ylöstalo, T. Bartosh, K. Coble, D. Prockop, Human mesenchymal stem/stromal cells (hMSCs) cultured as spheroids are self-activated to produce prostaglandin E2 (PGE2) that directs stimulated macrophages into an anti-inflammatory phenotype, *Stem Cells.* 30 (2012) 2283–2296. <https://doi.org/10.1002/stem.1191>.
- [55] S. Misra, V. Hascall, R. Markwald, S. Ghatak, Interactions between hyaluronan and its receptors (CD44 , RHAMM) regulate the activities of, *Front. Immunol.* 6 (2015) 201. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00201>.

Supporting Information

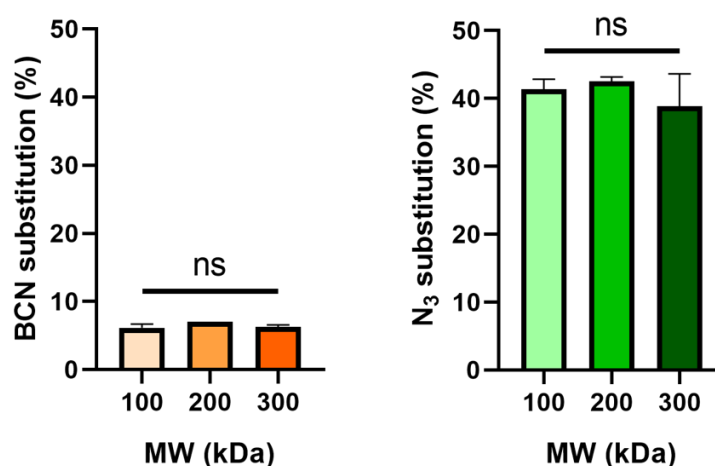


Figure S1: Reproducibility of the synthesis of the two SPAAC HA precursors, namely HA-BCN (left) and HA-N₃ (right), over a range of HA MWs (100 kDa to 300 kDa).

Degrees of substitution were determined via ¹H-NMR. Data are shown as mean ± SD (n = 3) with statistical significance determined by Student's t-test (ns : not significant).

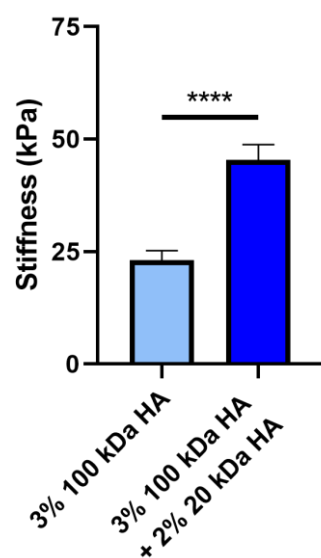


Figure S2: Reaching high stiffness with SPAAC HA-based hydrogels.

*Chemically modified low MW HA (20 kDa) was mixed with a formulation of SPAAC HA precursor (100 kDa) validated for fast gelation (< 5 min). This strategy greatly increased the polymer content, and therefore the crosslinking density, while maintaining the low viscosity of the precursor solution, leading to the formation of HA hydrogels with high stiffness (23.06 ± 2.15 kPa vs 45.35 ± 3.44 kPa). Data are shown as mean ± SD (n = 3) with statistical significance determined using Student's t-test (****p < 0.0001).*

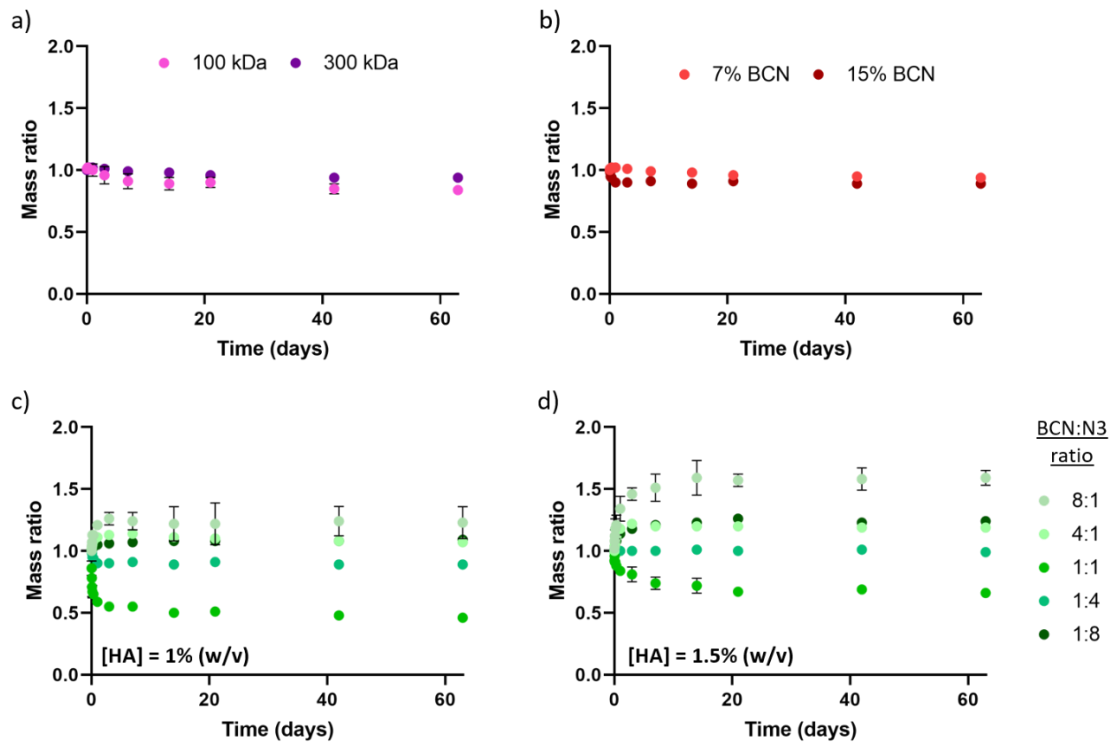


Figure S3: Swelling/stability study of SPAAC HA-based hydrogels.

Effects of a) the MW of HA and b) the degree of substitution of HA-BCN on hydrogel mass ratio over time, showing various swelling/shrinking profiles over the first 3 days prior to long-term stability (at least two months). c) and d) show the influence of the BCN:N₃ molar ratio on hydrogel swelling/shrinking behavior for total HA contents of 1% and 1.5% (w/v), respectively.

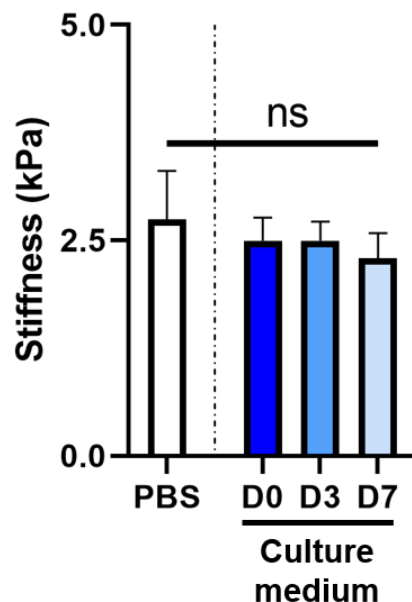


Figure S4: Cell encapsulation and culture medium do not affect the stiffness of SPAAC HA hydrogels. The stiffness of SPAAC HA-based hydrogels formed in PBS was compared to that of similar hydrogels formed in the presence of cells and in culture medium after 0, 3, and 7 days of cell culture. Data are shown as mean \pm SD ($n = 3$) with statistical significance determined using one-way ANOVA with a Tukey's post hoc test (ns : not significant).

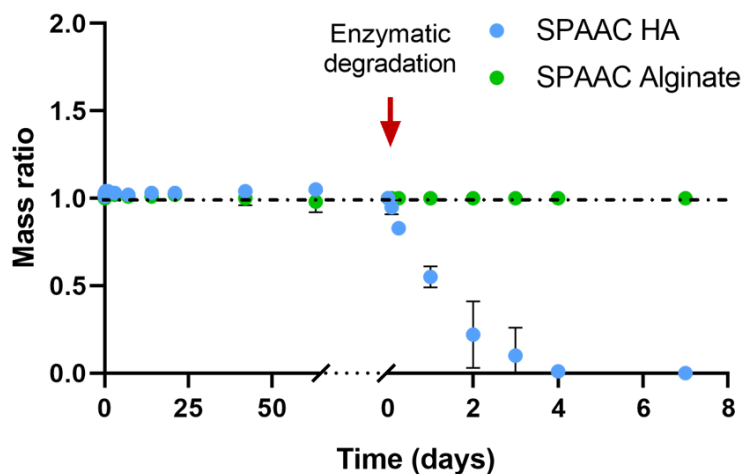
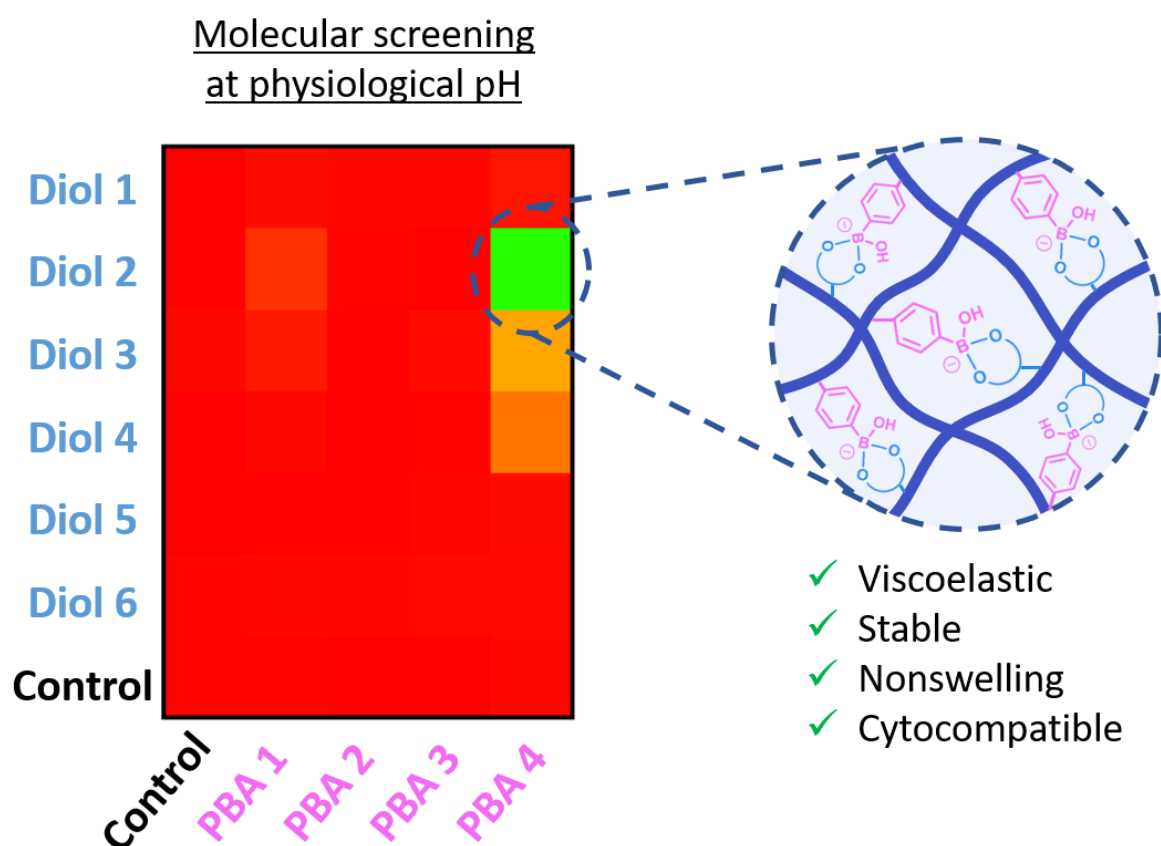


Figure S5: Accelerated enzymatic degradation study (hyaluronidase; 100 U.mL^{-1}) of SPAAC HA gels vs SPAAC alginate gels.

Before the enzymatic treatment, the two types of gels showed comparable stiffness, lack of swelling, and long-term stability. Enzymatic degradation was then only observed with SPAAC HA gels, as expected. Data are shown as mean \pm SD ($n = 3$).

Article III

A New Boronate Ester-Based Crosslinking Strategy Allows the Design of Nonswelling and Long-Term Stable Dynamic Covalent Hydrogels



Article soumis dans le journal *Biomaterials Science*

Abstract

Dynamic hydrogels are viscoelastic materials that can be designed to be self-healing, malleable, and injectable, making them particularly interesting for a variety of biomedical applications. For the design of dynamic hydrogels, dynamic covalent reactions are attracting increasing attention because they can be applied to natural polymers, such as hyaluronic acid (HA), to produce hydrogels that best mimic the composition and mechanical properties of the natural extracellular matrix. However, dynamic covalent hydrogels tend to swell, and often have a stability limited to days. Boronate ester-based hydrogels, which result from the dynamic covalent reaction between a phenylboronic acid (PBA) derivative and a diol, are based on stable precursors, and can therefore address these limitations. Yet, boronate ester formation hardly happens at physiological pH, limiting their use for biomedical applications. Seeking for a PBA/diol couple allowing to produce HA-based dynamic covalent hydrogels at physiological pH, we performed a molecular screening of PBA derivatives in association with a variety of diols. The combination of Wulff-type PBA (wPBA) and glucamine stood out as a unique couple to obtain the desired hydrogels. We showed that optimized wPBA/glucamine hydrogels are minimally- to non-swelling, stable long term (over months), tunable in terms of mechanical properties, and cytocompatible. We further characterized their viscoelastic and self-healing properties, highlighting their potential for applications spanning from 3D cell culture and bioprinting to drug delivery.

Résumé

En raison de leur caractère viscoélastique, auto-réparant et rhéofluidifiant, les hydrogels dynamiques sont attrayants pour de nombreuses applications biomédicales. Pour la conception de ces hydrogels dynamiques, les réactions dynamiques covalentes présentent l'avantage d'être applicables à différents polymères naturels tels que l'acide hyaluronique (AH). Néanmoins ces hydrogels dynamiques covalents sont souvent peu stables et ont tendance à gonfler. En raison de la stabilité de leurs précurseurs, les liaisons esters de boronate, issues de la condensation réversible entre un dérivé d'acide phénylboronique (PBA) et un diol, semblent intéressantes pour la conception d'hydrogels dynamiques covalents stables. Cependant ces liaisons se forment difficilement à pH physiologique. Afin de trouver un couple permettant la formation d'hydrogels d'AH à pH physiologique, nous avons ainsi effectué un criblage de plusieurs PBA et de molécules présentant des diols. Ainsi des hydrogels

à base d'esters de boronate ont pu être formé en combinant un PBA de type Wulff et la glucamine. Ces hydrogels sont viscoélastiques, auto-réparants, cytocompatibles, et ont été optimisés pour être stables (pendant plusieurs mois) et présenter un gonflement minimal. Grâce à ces caractéristiques, ces hydrogels semblent de bons candidats pour diverses applications telles que la culture cellulaire 3D, la délivrance de principes actifs ou la bioimpression.

1. Introduction

Hydrogels, which are hydrated polymer networks, are widely used as scaffolds for a variety of biomedical applications, including drug/cell delivery, 3D cell culture and tissue engineering. While many hydrogels are based on covalent crosslinking (e.g., radical polymerization, thiol-ene chemistry), covalent hydrogels are inherently brittle and not injectable, hindering their clinical translation for drug/cell delivery.^[1] Their elastic properties also do not fully reproduce the viscoelastic properties of natural tissues,^[2] limiting their use as synthetic extracellular matrices (ECMs) for 3D cell culture. In this context, dynamic hydrogels are receiving growing attention for their viscoelastic properties, which make these hydrogels malleable and injectable,^[3] and allow them to better mimic the mechanical properties of living tissues.^[2]

Dynamic hydrogels can be obtained using non-covalent interactions (e.g., hydrogen bonding, ionic bonding, supramolecular interactions) or dynamic covalent reactions.^[1,3-5] Hydrogels based on non-covalent interactions, such as hydrogen bonding or ionic bonding, are commonly obtained by using polymers with natural crosslinking properties (e.g., alginate with calcium ions); however, these hydrogels are necessarily limited in terms of polymer composition. Non-covalent hydrogels based on supramolecular interactions require the synthesis of complex and expensive precursors,^[6] making them hardly accessible. In contrast, dynamic covalent hydrogels are usually based on well-established dynamic covalent reactions (e.g., Schiff base formation, disulfide formation, Diels-Alder reaction), and are obtained after the straightforward grafting of small molecules on a chosen polymer. This allows for the design of relatively affordable dynamic hydrogels, with tunable composition and mechanical properties.^[7] However, dynamic covalent reactions often rely on the use of precursors that have a limited stability at physiological pH, such as thiol, carbonyl or maleimide groups.^[8-10] Based on stable precursors, boronate ester formation is a promising alternative for the design of dynamic covalent hydrogels.^[11,12]

A boronate ester results from the reversible condensation of a boronic acid derivative (typically, a phenylboronic acid [PBA]) with a diol (Figure 1a). One main drawback of this reaction is that it is commonly favored at basic pH; and reaction equilibria of common PBA/diol couples at neutral pH are typically shifted toward the dissociated molecules. As a consequence, boronate ester-based hydrogels hardly form under physiological

conditions,^[13,14] possibly explaining why there has been only few examples in the literature. Inspired by early works on PBA-based sugar purification techniques,^[15,16] new classes of PBAs, including benzoxaboroles (BX) and Wulff-type PBAs (wPBA), have recently been developed to promote PBA/diol crosslinking at physiological pH. The reported PBA/diol couples with effective gelation under physiological conditions include: BX with fructose or glucono- δ -lactone,^[17] BX with nopoldiol,^[18] BX with nitrodopamine,^[19] FluoroPBA with glucono- δ -lactone,^[20] and wPBA with glucono- δ -lactone.^[21] These hydrogels presented several limitations, such as a complex and multi-step synthesis,^[22] the use of precursors with limited solubility or stability,^[19,20] a narrow range of mechanical properties,^[17] important swelling,^[18,23] or a stability limited to days.^[12,21,24–26] Thus, the design of boronate ester-based hydrogels that are easy to synthesize, minimally- to non-swelling, stable long term (over weeks), tunable in terms of mechanical properties, and cytocompatible, remains a challenge. This challenge is particularly true for hydrogels composed of natural polymers, such as hyaluronic acid (HA), as most of the reported systems were based on synthetic polymers. This prompted us to search for a new strategy to produce boronate ester-based hydrogels, using HA as a polymer of interest.

In this study, we investigated a large variety of PBA/diol couples as potential precursors for the synthesis of boronate ester-based HA hydrogels under physiological conditions of pH and temperature. We first modified HA with a series of PBA derivatives and diols via single-step syntheses. Among the 24 PBA/diol couples tested, the combination of wPBA and glucamine stood out for its unique ability to form hydrogels under physiological conditions of pH and temperature. We then optimized wPBA/glucamine hydrogel formulations in terms of HA molecular weight (MW), degrees of substitution (DS), polymer content and wPBA:glucamine molar ratio, to produce two dynamic covalent hydrogels with minimal swelling and long-term stability in culture medium (over at least 2 months), exhibiting distinct elastic properties (G' of ≈ 100 vs ≈ 1000 Pa, at 1 Hz). Using dynamic shear rheology, we showed that these new hydrogels form within seconds, and we confirmed that they possess the typical characteristics of dynamic covalent hydrogels, including frequency-dependent shear moduli, stress relaxation, and self-healing properties. Finally, using a model cell line (i.e., L929 murine fibroblasts) and human adipose tissue-derived stromal cells (hASCs), we demonstrated the

cytocompatibility of the new hydrogels (> 95% viable cells after 7 days of culture). Together, our results highlight the potential of wPBA/glucamine hydrogels for biomedical applications.

2. Experimental section

2.1 Materials

Sodium hyaluronate was purchased from Lifecore Biomedical. Alginate (Protanal LF10/60) was purchased from FMC Corporation. 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM), 5-Amino-2-(hydroxymethyl)phenylboronic acid cyclic monoester, 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose hydrochloride, 2-amino-2-deoxy-D-galactopyranose hydrochloride and D-glucamine were purchased from TCI Chemicals. 1-amino-1-deoxy-D-galactitol hydrochloride and 1-amino-1-deoxy-D-fructose hydrochloride were purchased from Carbosynth. 6-(aminomethyl)-3-pyridylboronic acid was purchased from Advanced ChemBlocks. Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (without Ca & Mg), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Penicillin/Streptomycin, Live/Dead and Picogreen Kit were purchased from ThermoFischer Scientific. L929 cells were purchased from ATCC. Fetal Bovine serum (FBS) was purchased from Dominique Dutscher. Growth medium was purchased from Promocell. Otherwise stated, all other reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

2.2 Methods

2.2.1 *Small molecule synthesis*

Synthesis of Wulff-type phenylboronic acid: The detailed synthetic procedure of wPBA is available as supplementary information, with the corresponding NMR spectra (Figure S1 and S2). Briefly, tert-butyl(4-aminobutyl)carbamate (38.80 mmol, 7.30 g), which was synthesized in house, was dissolved in methanol (30 mL). 2-formylphenylboronic acid (38.80 mmol, 5.82 g) was added and allowed to react overnight under stirring at room temperature. Then, sodium borohydride (32.08 mmol) was added at 0 °C, and allowed to react at room temperature until bubbles disappeared. Organic layers were extracted using dichloromethane (DCM), then dried over Na₂SO₄, and concentrated under reduced pressure to obtain 2-(((4-((tert-butoxycarbonyl)amino)butyl)amino)methyl) phenyl)boronic acid (protected wPBA) (yield = 95%). Finally, (2-(((4-aminobutyl)amino) methyl)phenyl)boronic acid (wPBA) was obtained by deprotecting the primary amine of the protected wPBA (2.62 mmol in 5 mL

methanol) with hydrogen chloride gas (from sulfuric acid over NaCl) at 0 °C under argon atmosphere. Organic layers were extracted using dichloromethane (DCM), then dried over Na₂SO₄, to obtain wPBA (1.89 mmol, yield = 72%).

Synthesis of iditolamine: Iditolamine was synthesized as previously described,^[27] with some modifications. Briefly, to a solution of 1-deoxy-1-nitro-iditol (0.47 mmol) in 10 mL of methanol, Pd/C (10% [w/w]) and trifluoroacetic acid (100 µL) were added. The reaction mixture was stirred at room temperature and H₂ was bubbled through the suspension for 15 min. Then the reaction mixture was heated at 100 °C under microwave irradiations for 1 hour. This sequence was repeated until total consumption of the starting material determined by TLC monitoring (SiO₂, EtOAc/MeOH/NH₃ 50/50/1). The catalyst was then filtered over a celite pad. The filtrate was concentrated under vacuum and purified by flash column chromatography using silica gel with a EtOH/H₂O gradient as eluent (100/0 to 10/90) leading to the iditolamine TFA salt (0.23 mmol, yield = 49%). NMR data are provided as supplementary information (Figure S3 and S4).

Synthesis of HA-PBAs: The investigated PBAs were 2-aminophenylboronic acid (2PBA), 3-aminophenylboronic acid (3PBA), 4-aminophenylboronic acid (4PBA), 2-aminopyrimidine-5-boronic acid (PymBA), 6-(aminomethyl)-3-pyridylboronic acid (PydBA) and 5-Amino-2-(hydroxymethyl)phenylboronic acid cyclic monoester (Benzoxaborole, BX). HA-2PBA, HA-3PBA, HA-4PBA, HA-PymBA, HA-PydBA and HA-BX were synthesized, as follows: HA (100 mg) was dissolved in MES buffer pH 5.5 (9 mL) under stirring at room temperature. DMT-MM (34 mg; 0,5 eq relative to carboxylic acid) was added and allowed to react for 30 min. Then, a chosen PBA (0.25 eq relative to carboxylic acid) was dissolved in DMSO (1mL) and added dropwise to the polymer solution. The solution was dialyzed against 0.1 M DPBS for 1 day, then against deionized water for 2 days, before filter sterilization, lyophilization, and storage at -20 °C. DS were determined by ¹H NMR (400 MHz, D₂O) and elemental analysis.

Synthesis of HA-wPBA: HA-wPBA was synthesized, as follows: HA (100 mg) was dissolved in MES buffer pH 5.5 (10 mL) under stirring at room temperature. DMT-MM (69 mg; 1 eq relative to carboxylic acid) was added and allowed to react for 30 min. Then, 2-(4-aminobutyl) aminomethylphenylboronic acid (Wulff-type PBA, wPBA) (28 mg; 0.5 eq relative to carboxylic acid) was added to the polymer solution. The solution was dialyzed against 0.1 M DPBS for 1 day, then against deionized water for 2 days, before filter sterilization, lyophilization, and

storage at -20 °C. DS was determined by ^1H NMR (400 MHz, D_2O) and elemental analysis. A similar procedure was applied for the synthesis of alginate-wPBA.

Synthesis of HA-diol: The investigated diols were tris(hydroxyméthyl)aminomethane (tris), 3-amino-1,2-propanediol (aminopropanediol), 2-amino-1,3-propanediol (serinol), 2-amino-2-deoxy-D-glucopyranose (glucosamine), 2-amino-2-deoxy-D-galactopyranose (galactosamine), 1-amino-1-deoxy-D-fructose (fructosamine), 1-amino-1-deoxy-D-galactitol (dulcitolamine), 1-amino-1-deoxy-D-sorbitol (glucamine) and 1-amino-1-deoxy-D-iditol (iditolamine) and 4-(2-aminoethyl)benzene-1,2-diol (dopamine). HA-diol was synthesized, as follows: HA (100 mg) was dissolved in MES buffer pH 5.5 (10 mL) under stirring at room temperature. DMT-MM (69 mg; 1 eq relative to carboxylic acid) was added and allowed to react for 30 min. Then, a chosen amino diol (0.5 eq relative to carboxylic acid) was added to the polymer solution. The solution was dialyzed against 0.1 M DPBS for 1 day, then against deionized water for 2 days, before filter sterilization, lyophilization, and storage at -20 °C. DS were determined by unreacted amine dosage (2,4,6-Trinitrobenzenesulfonic acid; TNBSA) and elemental analysis. A similar procedure was applied for the synthesis of alginate-glucamine.

Synthesis of fluorescent HA-glucamine: HA-glucamine (50 mg) was dissolved in MES buffer pH 5.5 (4.5 mL), under stirring at room temperature. 3 mg of DMT MM (large excess relative to hydrazide) were added and allowed to react for 30 min. Then, Alexa Fluor™ 488 hydrazide or Alexa Fluor™ 647 hydrazide (0.5 mg) was dissolved in DMSO (0.5 mL), added to the polymer solution, and allowed to react in the dark for 3 days, under stirring at room temperature. The solution was dialyzed against 0.1 M DPBS with 2% DMSO for 24 h, then 0.1 M DPBS for 8 hours, and deionized water for 48 hours, prior to filter-sterilization, lyophilization and storage at -20 °C.

2.2.2 Hydrogel formation and characterization

Hydrogel formation and screening: Hydrogels were obtained by separately dissolving an HA-PBA and an HA-diol, either in PBS or culture medium, prior to mixing them together in a chosen volume ratio, at room temperature. The initial concentrations and volume ratios of the two components were calculated based on the desired final HA content and PBA:diol molar ratio. The screening of PBA/diol couples was carried out at 1% (w/v) HA content, with a PBA:diol molar ratio of 1:1.

Rheological characterization: Oscillatory shear experiments were performed using a HAAKE™ MARS™ (ThermoFischer Scientific) equipped with a 20-mm titanium upper plate at 37 °C with a solvent trap to prevent evaporation. Pre-hydrogel solutions were prepared as described above, and measurements were performed immediately after the mixing of the two hydrogel precursors. Frequency sweep experiments were performed at a constant stress of 1 Pa. Time sweep experiments were conducted at a constant stress of 1 Pa and a constant frequency of 1 Hz (within the linear viscoelastic region). Self-healing experiments were performed at a constant frequency of 1 Hz, with alternated strain of 1 Pa and 250 Pa (soft formulation), or 1 Pa and 1200 Pa (stiff formulation). Stress relaxation experiments were carried out using an ARES (TA Instruments, France) controlled strain rheometer equipped with a plastic cone-and-plate geometry (diameter: 25 mm; angle: 0.0996 rad; truncation: 54 µm) and a Peltier temperature controller. Samples were covered with paraffin oil to prevent evaporation during measurements. Stress relaxation tests were performed for up to 14 h at 37°C and 5% strain (strain rise time of 10 s). The hydrogel formulation used for the general characterization of the rheological properties of wPBA/glucamine hydrogels was composed of 300 kDa HA (DS: HA-wPBA, 24%; HA-glucamine, 32%), with an HA content of 1% (w/v) and a wPBA/glucamine molar ratio of 1:1. Two formulations were then selected and characterized: a “soft hydrogel” formulation, composed of 300 kDa HA (DS: HA-wPBA, 24%; HA-glucamine, 52%), with an HA content of 1% (w/v) and a wPBA/glucamine molar ratio of 1:1; and a “stiff hydrogel” formulation, composed of 100 kDa HA (DS: HA-wPBA, 40%; HA-glucamine, 52%), with an HA content of 2.5% (w/v) and a wPBA/glucamine molar ratio of 1:1.

Stability and biodegradability studies: Hydrogel stability was investigated, either in PBS or serum-containing medium, as previously described.^[28] Biodegradability was investigated in PBS, using hyaluronidase (100 U.mL⁻¹), as previously described.^[28] The reported mass ratio represents the hydrogel mass at a specific time divided by its initial mass.

2.2.3 Biological investigations

Cell culture and encapsulation: L929 murine fibroblast cells were amplified in DMEM medium supplemented with 10% FBS and 1% penicilline/streptomycin. Human ASCs were isolated from lipoaspirates as previously described,^[29] and amplified in growth medium supplemented with 1% penicilline/streptomycin. Human ASCs were used between passages 2 and 5. For cell encapsulation, HA-wPBA and HA-glucamine were first separately dissolved in DMEM medium

supplemented with 10% FBS and 1% penicilline/streptomycin. Cells were then pelleted and resuspended in the HA-glucamine solution (serum-containing medium) prior to mixing with the HA-wPBA solution (serum-containing medium). The number of resuspended cells, and the volumes of HA-wPBA and HA-glucamine/cells were calculated to obtain the desired final HA content (1% and 2.5% [w/v]) and wPBA:glucamine molar ratio (1:1), with a final cell density of 10^6 cells.mL⁻¹. The culture medium was changed every 2-3 days.

Viability, metabolic activity and proliferation assays: Cell viability, metabolic activity and DNA content were assessed at day 0, 3 and 7, using LIVE/DEAD™ staining, the CCK-8 assay, and Picogreen™ assay, respectively. For LIVE/DEAD™ staining, hydrogels were formed in an 8 well chamber slide (IBIDI) and incubated with Calcein AM and ethidium homodimer as per manufacturer's recommendations. Images were acquired via confocal microscopy (A1RS, Nikon). Cell viability was calculated as the number of living cells divided by the total cell number (i.e., sum of living and dead cells). Regarding the metabolic activity assay, hydrogels were formed in a 48-well plate and incubated for 2 hours with a CCK-8 solution as per the manufacturer's recommendations. The absorbance at 460 nm of the supernatant was measured (Tristar 2S plate reader, Berthold Technologies), and the results were normalized to the initial absorbance. After the metabolic activity assay, DNA content were dosed using the Picogreen™ assay as recommended by the manufacturer's recommendations.

2.3 Statistical analysis

All data are shown as mean \pm standard deviation. Statistical analysis was carried out using GraphPad to evaluate statistical significance via Student's t-test or one-way ANOVA with Tukey's post hoc test.

3. Results

3.1 Synthesis of boronate ester-based hydrogel precursors

With the aim to screen PBA/diol couples, we selected a large variety of commercially available PBA derivatives and diols, all presenting a primary amine for their straightforward grafting onto HA via amidation (Figure 1a and 1b). Regarding PBA derivatives, we selected the 2PBA, 3PBA, 4PBA, PymBA, PydBA and BX (full names are provided in the material section). Available amino diols were mainly monosaccharide derivatives, including glucosamine, galactosamine, fructosamine, dulcitolamine and glucamine. Tris, aminopropanediol, serinol and dopamine

were also investigated. Two additional aminated molecules were synthesized in-house, namely wPBA (Figure S1 and S2) and iditolamine (Figure S3 and S4). Aminated molecules were grafted onto 300 kDa HA. For the direct comparison of PBA/diol couples, synthetic conditions were systematically optimized to match the DS of the various HA-PBA components, and those of HA-diol components. We successfully synthesized HA-2PBA, HA-4PBA, HA-BX and HA wPBA at a similar DS of $\approx 24\%$, as confirmed by ^1H NMR (Figure 1c and S5). Unlike the other HA-PBA syntheses, the synthesis of HA-wPBA in aqueous conditions did not require the addition of 10% (v/v) of DMSO, highlighting the higher hydrophilicity of wPBA as a practical advantage. As a consequence, wPBA also uniquely allowed to reach higher DS (tested up to 60%) without polymer precipitation. HA-3PBA repeatedly precipitated at any DS above 10%, and was therefore not included in the following experiments. We also did not succeed in functionalizing HA with PymBA or PydBA under the selected synthetic conditions; these two molecules were therefore not further investigated. In parallel, we successfully matched the DS of various HA-diol components (i.e., HA-glucosamine, HA-galactosamine, HA-fructosamine, HA-dulcitolamine, HA-glucamine, HA-iditolamine) to $\approx 32\%$, as confirmed by unreacted amine dosage (TNBS) and elemental analysis (Figure 1c and S6). Other amino diols failed to be grafted onto HA (i.e., tris, aminopropanediol and serinol) or produced unstable precursors (i.e., HA-dopamine), and were therefore not further investigated.

3.2 Boronate ester-based hydrogel design

To screen PBA/diol crosslinking couples at physiological pH, all selected HA-PBA and HA-diol components were separately dissolved in PBS at a fixed HA concentration of 1% (w/v), and systematically mixed two-by-two in an equimolar PBA:diol ratio. A preliminary macroscopic observation revealed the unique ability of the wPBA/glucamine couple to form a hydrogel under physiological conditions of pH and temperature, in a quasi-instantaneous manner. Dynamic shear rheological measurements (frequency sweeps) further suggested the successful formation of a dynamic covalent hydrogel with the newly-identified couple, as indicated by a shear elastic modulus (G' at 1 Hz) of 174 Pa that is 10- to 100-fold higher than that of any of the other PBA/diol combinations (Figure 1d).

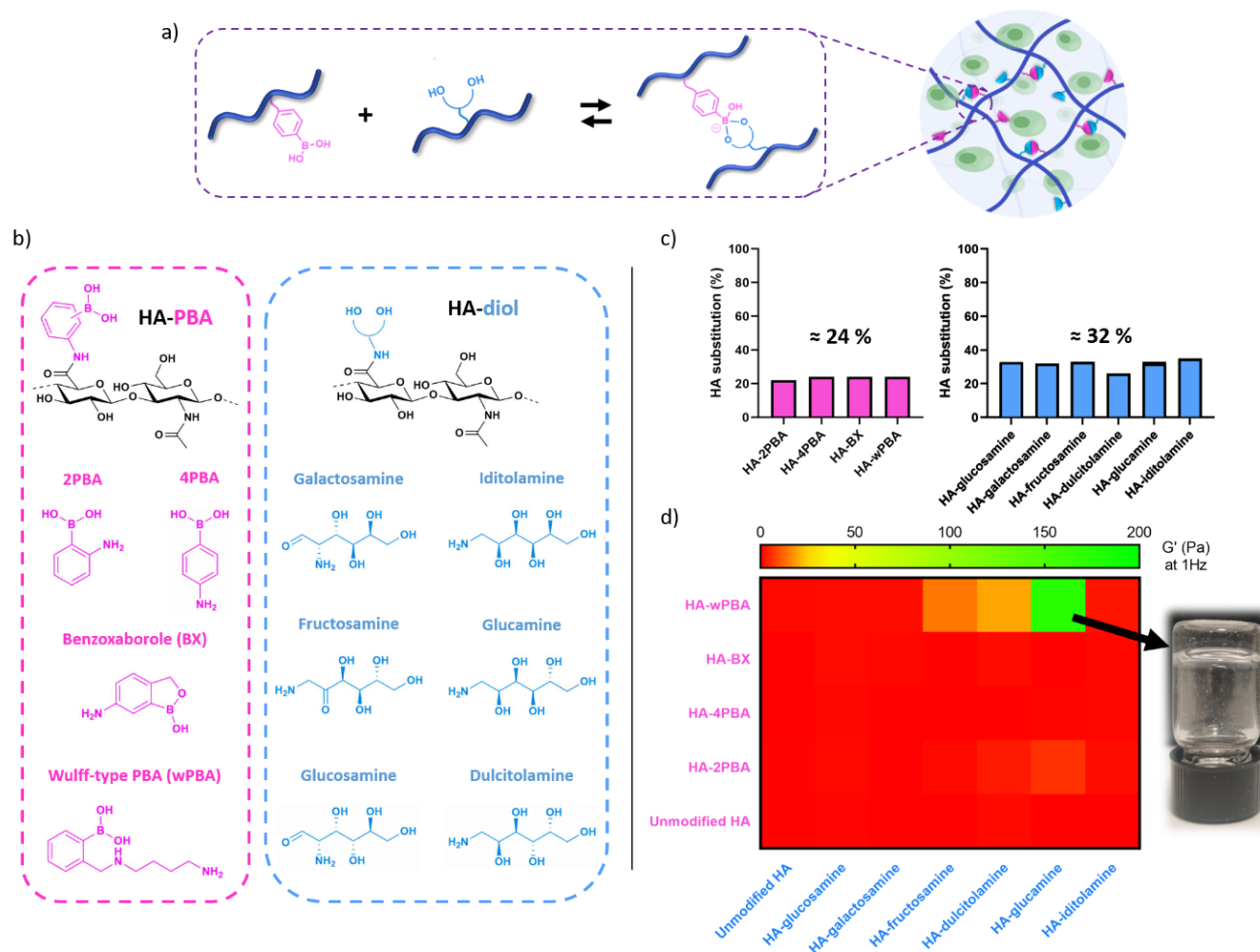


Figure 1: Identification of a new crosslinking couple for the design of boronate ester-based hydrogels under physiological conditions of pH and temperature.

a) Schematic of the reversible reaction between a phenylboronic acid derivative and a diol, which produces boronate ester functions used for dynamic covalent crosslinking. b) Libraries of aminated PBAs (in pink) and amino diols (in blue) investigated to produce hyaluronic acid (HA) hydrogels. c) The matching degrees of substitution (DS) of HA-PBAs (in pink) and HA-diols (in blue), determined by ^1H NMR and unreacted amine dosage, respectively. d) Heat map of PBA/diol couple screening, revealing the unique ability of the wPBA/glucamine couple to form a hydrogel at physiological pH. The figure presents the shear storage moduli (G' at 1 Hz) of the various couples, determined via dynamic shear rheology (frequency sweeps) at 37 °C.

The formation of hydrogels, yet much softer, was also observed when mixing HA-wPBA with HA-fructosamine (G' of 19 Pa) or HA-dulcitolamine (G' of 14 Pa). Overall, wPBA was the only PBA derivative that efficiently led to hydrogel formation under physiological conditions of pH and temperature. Interestingly, applying wPBA/glucamine crosslinking to another polysaccharide (i.e., alginate) also led to successful dynamic hydrogel formation (Figure S7), suggesting that wPBA/glucamine is a universal crosslinking couple for dynamic hydrogel design. To our knowledge, this is the first report of the use of wPBA/glucamine as a

crosslinking couple to produce boronate ester-based hydrogels under physiological conditions of pH and temperature. This new crosslinking reaction will be the focus of the next sections.

3.3 Rheological characterization of wPBA/glucamine-based hydrogels

We first characterized the general rheological properties of wPBA/glucamine hydrogels via dynamic shear rheology, using the same HA hydrogel formulation as in the screening experiment (see method section for formulation details). We confirmed the quasi-instantaneous gelation (within seconds) of the hydrogel, which was indicated by G' (1 Hz) values superior to G'' (1 Hz) values from the beginning of the measurements in a time sweep experiment (Figure 2a). These data also revealed a time to equilibrium of ≈ 10 -20 min before reaching plateaus in shear moduli. We then performed frequency sweep experiments to characterize the dynamic covalent nature of the hydrogel. The boronate ester-based hydrogel had the typical frequency-dependent rheological behavior of dynamic covalent hydrogels, which is similar to that of a macromolecular solution (Figure 2b).^[12,20] More specifically, at low frequencies (i.e., $\omega < 0.05$ Hz), measurement intervals exceeded the crosslinks reorganization time, providing enough time for the hydrogel network to reorganize and dissipate the stored deformation energy, which resulted in an apparent liquid-like behavior ($G' < G''$). Conversely, at high frequencies (i.e., $\omega > 0.5$ Hz), the network no longer had the time to dissipate the energy via crosslinks reorganization within the measurement intervals, exhibiting a solid-like behavior ($G' > G''$). The G'/G'' crossover frequency (ω_c) can be used to estimate hydrogel relaxation time (τ_r), which reflects the time to dissipate the energy upon deformation, where $\tau_r = 1/\omega_c$.^[19,26] The τ_r of the hydrogel was estimated to be of 33 s ($\omega_c \approx 0.03$ Hz), which reflects a fast relaxation compared to other classes of viscoelastic hydrogels, such as ionically crosslinked alginate hydrogels ($\tau_r = 100$ -1000 s)^[30] and hydrazone-based hydrogels ($\tau_r = 1000$ -10000 s).^[7,31] Such a fast relaxation time translates into high malleability, which is desirable in numerous biomedical applications, including drug/cell delivery.

We then systematically investigated the effects of the HA MW, DS, and content, as well as the wPBA:glucamine molar ratio, on the rheological properties of the hydrogels. The G' value at a fixed frequency of 1 Hz was used as an arbitrary value for comparison (G'' values can be found in Figure S8). To evaluate the effect of HA MW, we matched the DS of 100 kDa and 300 kDa HA precursors, with wPBA DS of 24% and glucamine DS of 32%. Contrary to 300 kDa HA, 100 kDa HA precursors did not form a hydrogel at an HA concentration of 1% (w/v) and a

wPBA:glucamine molar ratio of 1:1. Higher DS (HA wPBA, 40%; HA-glucamine, 52%) were required to obtain 100 kDa HA-based hydrogels. With similar higher DS, 300 kDa HA hydrogels had unexpectedly lower shear elastic moduli (G') than 100 kDa hydrogels (72 vs 140 Pa), suggesting that increasing HA MW could lead to a decrease in the shear elastic modulus of boronate ester-based hydrogels (Figure 2c). Increasing the precursor DS of 300 kDa hydrogels, which increased the crosslinking density, also counterintuitively led to a lower shear elastic modulus (Figure 2d). Previous reports on purely covalent HA hydrogels have shown that their stiffness (Young's modulus) is mainly independent of HA MW, and that it increases when increasing the crosslinking density.^[28] Our data suggest that the relationships between MW, crosslinking density and elastic properties differ between covalent and dynamic covalent HA hydrogels. When increasing HA MW and DS, we observed a noticeable increase in the viscosity of the hydrogel precursor solutions. This may reflect some polymer entanglement and restricted polymer motion, possibly hindering boronate ester-based crosslinking.

Finally, we investigated the effects of the HA content and wPBA:glucamine molar ratio, which are directly linked to the crosslinking density, on the rheological properties of the hydrogels. 100 kDa HA hydrogels at 1, 2 and 3% (w/v) exhibited shear elastic moduli (G' at 1 Hz) of 140 Pa, 659 Pa and 1 267 Pa, respectively, demonstrating that the shear elastic modulus of boronate ester-based hydrogels increases with polymer content (Figure 2e). Experiments on the effect of the wPBA:glucamine molar ratio showed that getting closer to an equimolar ratio, which maximizes the crosslinking density, maximized G' values (140 Pa) (Figure 2f).

Overall, our results confirmed the dynamic nature of the new boronate ester-based hydrogels, as well as their fast relaxation time, which reflects malleability. We also showed that their rheological properties are a function of the crosslinking density, but may be altered by the viscosity of the precursor solutions.

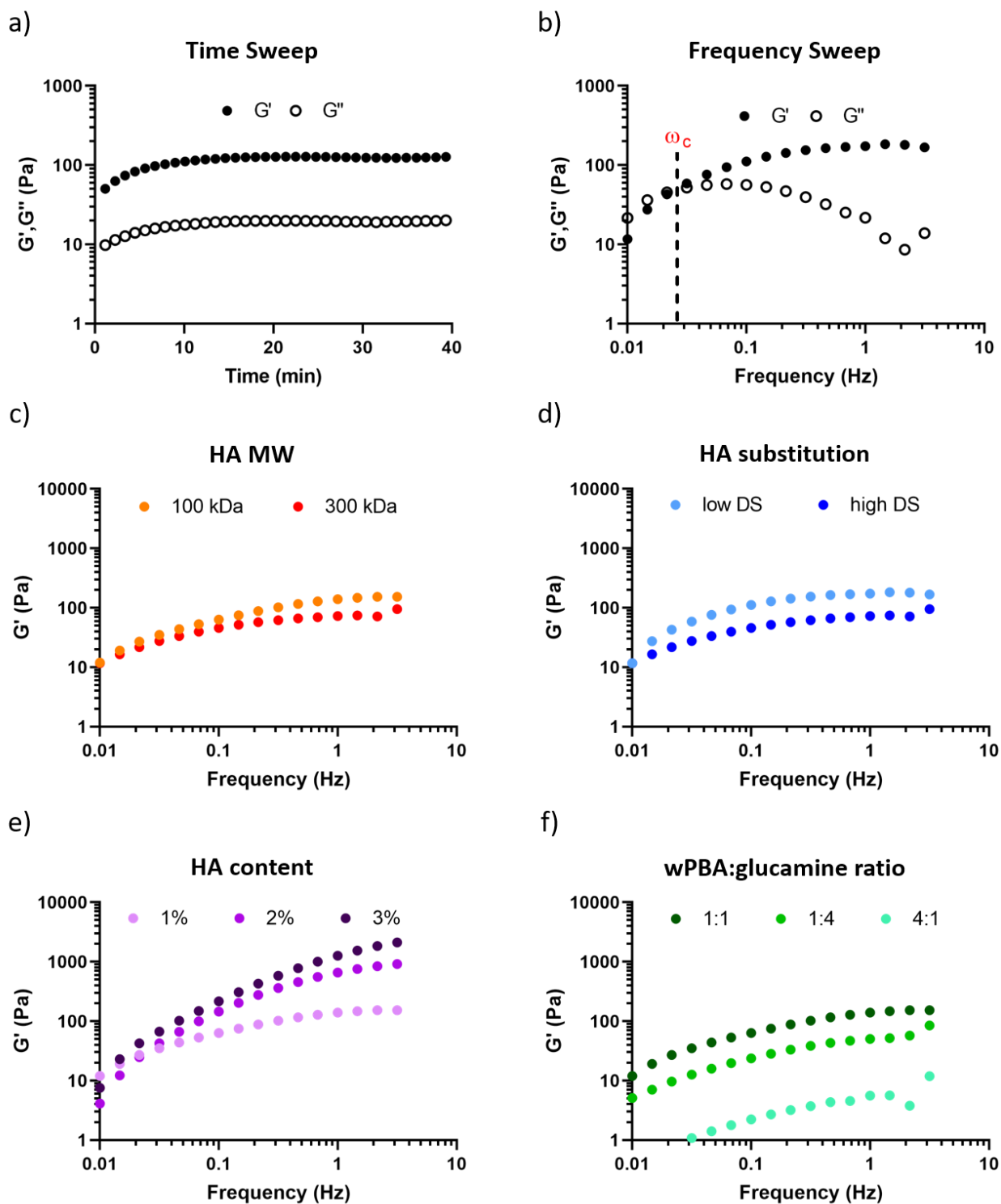


Figure 2: Rheological properties of boronate ester-based hydrogels composed of HA-wPBA and HA-glucamine.

a) Time sweep experiment 1% (w/v) 300 kDa HA (DS: HA-wPBA, 24%; HA-glucamine, 32%; equimolar ratio) revealing a quasi-instantaneous gelation, and b) Frequency sweep experiment confirming the dynamic nature of the hydrogel. The influence of c) HA MW, d) HA precursor DS (low substitution: wPBA DS of 24% and glucamine DS of 32%; high substitution: wPBA DS of 40% and glucamine DS of 52%), e) HA content, and f) wPBA:glucamine molar ratio on hydrogel elastic modulus, evaluated using dynamic shear rheology.

3.4 Swelling/stability profiles of wPBA/glucamine-based hydrogels

Stability and lack of swelling are two essential features of hydrogels to consider for usability. Due to the dynamic nature of boronate ester crosslinks, which makes them prone to cleavage, producing boronate ester-based hydrogels that are nonswelling and stable over weeks in wet conditions remains a challenge.^[12,21,24–26] While some authors used secondary covalent crosslinking to stabilize the hydrogels,^[32] this strategy makes the systems more complex, and necessarily alters their viscoelastic properties, therefore affecting their malleability and/or injectability. With the aim to identify nonswelling and stable hydrogel formulations, we systematically investigated the effects of the HA MW, DS, and content, as well as the wPBA:glucamine molar ratio, on the hydrogel swelling and stability. Following overnight stabilization, the hydrogels were immersed in PBS at 37 °C to mimic physiological conditions of pH and temperature, prior to monitoring their mass over time. These experiments provided two pieces of information: the initial degree of shrinking/swelling of the hydrogels after overnight crosslinking stabilization, and their long-term stability in wet conditions.

Comparing hydrogels with matching DS (HA wPBA, 40%; HA-glucamine:52%), HA content (1% [w/v]), and wPBA:glucamine molar ratio (1:1), we observed that increasing HA MW from 100 to 300 kDa decreased the initial hydrogel shrinking, with mass ratios before immersion of 0.51 ± 0.05 and 0.93 ± 0.04 , respectively (Figure 3a). We then evaluated the influence of DS, at a fixed HA content (1% [w/v]) and a fixed molar ratio (1:1), by comparing low DS (HA-wPBA, 24%; HA-glucamine, 32%) and high DS (HA wPBA, 40%; HA-glucamine, 52%). After overnight stabilization, hydrogels with low DS showed no initial shrinking (mass ratio of 1.01 ± 0.01) while hydrogels with high DS showed some minimal shrinking (mass ratio of 0.93 ± 0.04) (Figure 3b). However, once immersed, only hydrogels with high DS remained stable over 1 month. Hydrogels with low DS gradually swelled over 7 days (up to a mass ratio of 1.72 ± 0.04), before progressively dissolving. As DS is related to the crosslinking density, hydrogel swelling could result from an insufficient crosslinking density to counterbalance osmotic forces.

We then evaluated the influence of the polymer content on hydrogel swelling, comparing 100 kDa HA hydrogels (high DS) with HA contents of 1%, 2% or 3% (w/v). Increasing the polymer content from 1 to 3% (w/v) led to reduced initial shrinking, with mass ratios of 0.51 ± 0.05 and 1.00 ± 0.01 , respectively (Figure 3d). We observed a similar trend with 300 kDa HA hydrogels

(Figure S9). This increase in initial swelling (or reduced shrinking) with increased HA concentration could be attributed to the hydrophilicity of HA that induces osmotic forces, as previously reported.^[10,33] Regarding stability, all three hydrogels showed minimal variations in mass over 1 month.

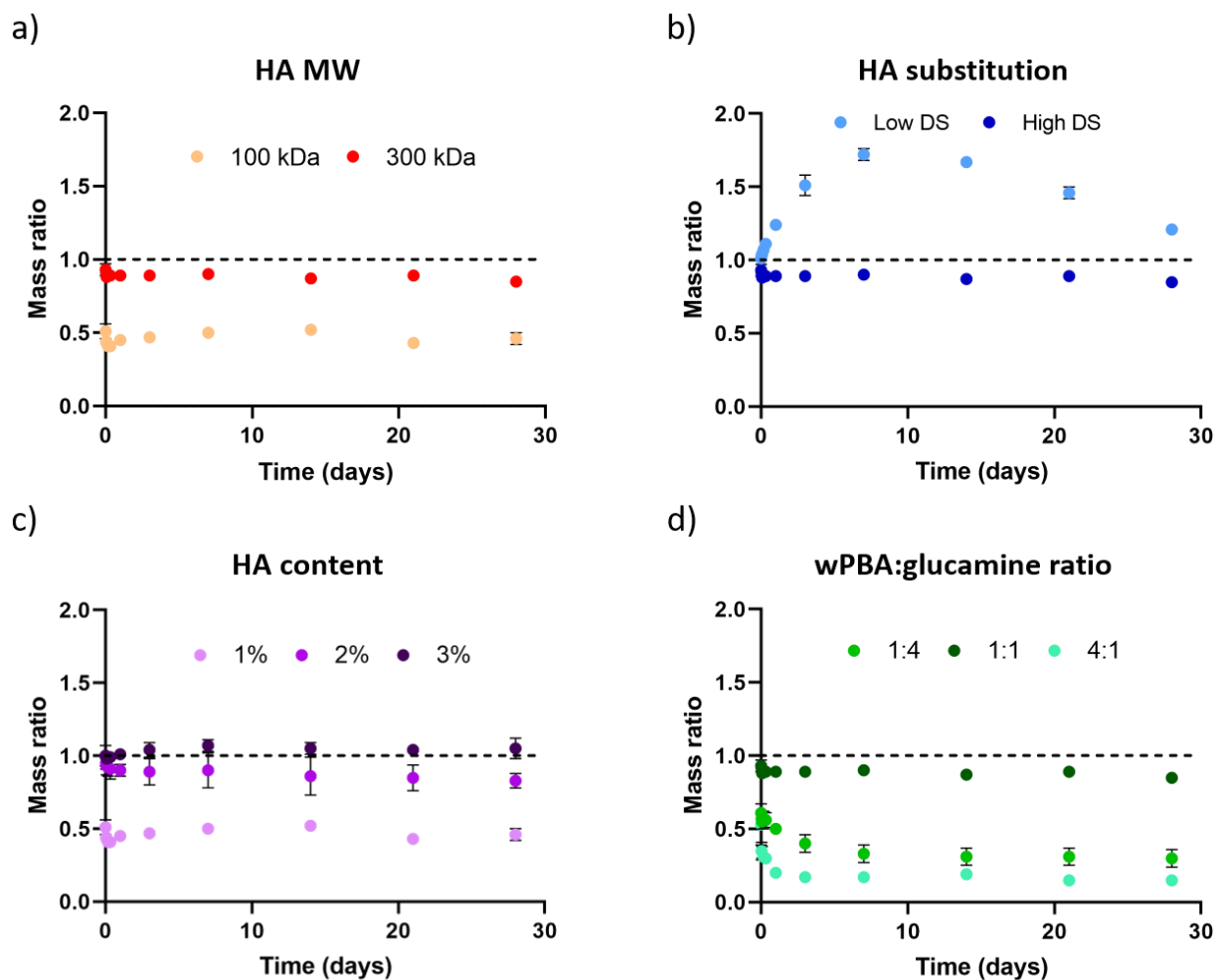


Figure 3: Swelling and stability characteristics of boronate ester-based HA hydrogels.

The influence of a) HA MW, b) HA DS, c) HA content, and d) wPBA:glucamine molar ratio on hydrogel stability/swelling behavior. Results on HA DS compare low DS (HA-wPBA, 24%; HA-glucamine, 32%) and high DS (HA wPBA, 40%; HA-glucamine, 52%). Data are shown as mean \pm SD ($n = 3$).

Finally, we investigated the influence of the wPBA:glucamine molar ratio on the swelling/stability properties. Our results revealed the unexpected importance of the use of an equimolar ratio for the formation of hydrogels that do not considerably shrink. After overnight stabilization, at a fixed total HA concentration (1% [w/v]), an excess of any of the two reactive molecules (i.e., wPBA:glucamine molar ratio of 1:4 or 4:1) led to important hydrogel shrinking (mass ratios of 0.61 ± 0.02 and 0.53 ± 0.14 , respectively). On the contrary, the hydrogel

formulation with an equimolar ratio showed minimal shrinking (mass ratio of 0.93 ± 0.04) (Figure 3e). This phenomenon remains to be elucidated.

Overall, most of the wPBA/glucamine hydrogel formulations that we investigated were stable long term under physiological conditions of pH and temperature, and some of them had minimal to no initial shrinking. The competing influences of the different parameters on the initial shrinking remain difficult to unravel, calling for further fundamental mechanistic investigations.

3.5 Optimization of stable and nonswelling boronate ester-based hydrogels

Based on these investigations, we designed two boronate ester-based hydrogel formulations, which we named “soft” and “stiff” (see method section for formulation details), that are both nonswelling and stable over at least two months, with shear elastic moduli (G' at 1 Hz) of 132 ± 12 Pa and 1035 ± 73 Pa, respectively (Figure 4a, c and d). We showed that the two hydrogels are also stable in serum-containing medium (i.e., DMEM with 10% FBS), with swelling/stability profiles similar to those of hydrogels prepared in PBS. To our knowledge, this is the first report of boronate ester-based hydrogels that are nonswelling and stable long term in vitro. Using accelerated conditions of enzymatic degradation (i.e., hyaluronidase treatment), we confirmed that these HA hydrogels are biodegradable, with distinct degradation rates: the soft hydrogel was degraded within one day, while the stiff hydrogel reached complete degradation after two weeks (Figure 4b). The two formulations exhibited specific frequency-dependent profiles, and only the stiff formulation had a G'/G'' crossover observable in the investigated range of frequency (0.01-5 Hz). The τ_r of the stiff formulation ($\omega_c = 0.04$ Hz) was calculated to be 25 s, while that of the soft formulation would exceed 100 s ($\omega_c < 0.01$ Hz). To further characterize the relaxation time of the two hydrogels, we performed direct stress relaxation tests. The soft and stiff hydrogels showed complete stress relaxation, and had half relaxation times ($\tau_{r1/2}$) of 2 and 0.7 s, respectively (Figure 4d). These experiments showed times to complete relaxation of ≈ 44 s and ≈ 131 s, for the soft and stiff hydrogels, respectively, in the same range as those obtained in the frequency sweep experiments. For dynamic covalent hydrogels, relaxation time is believed to be intrinsically related to the crosslinking mechanism, at the molecular level.^[34] However, despite the use of the same dynamic crosslinking reaction, the two hydrogels differed in their relaxation times. The design of the soft and stiff hydrogels required the use of distinct HA MWs (300 kDa and 100 kDa,

respectively) and polymer contents (1% and 3% [w/v], respectively), indicating a possible role of these two parameters in the relaxation time, as previously suggested.^[30] Dynamic covalent crosslinking mechanisms, where covalent bonds are continuously forming and breaking, are known to produce hydrogels with self-healing properties.^[35]

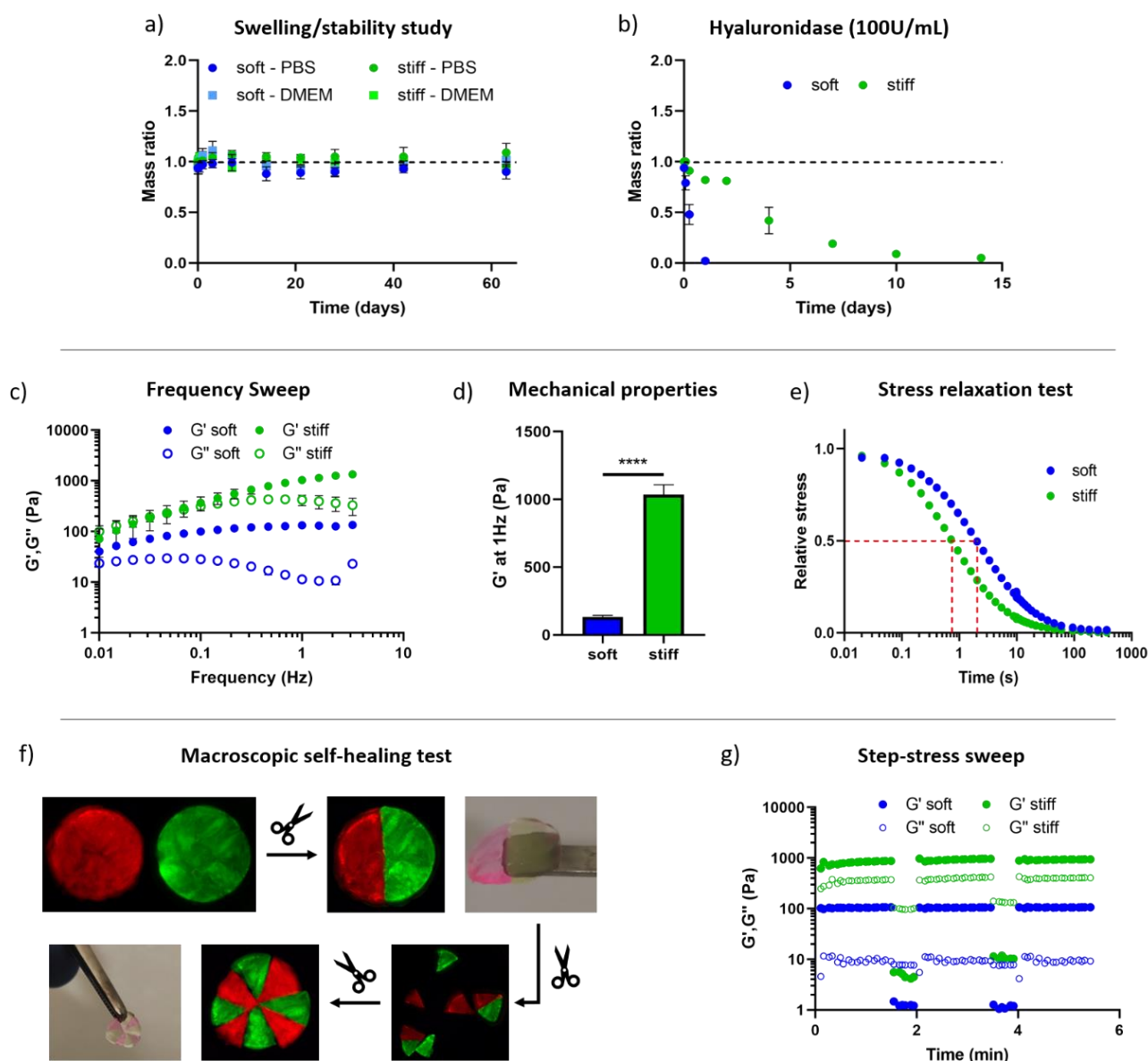


Figure 4: Design of nonswelling and stable boronate ester-based hydrogels, with distinct rheological properties.

a) Stability study of the soft and stiff hydrogels immersed in PBS or culture medium, confirming that they are nonswelling and stable long term. b) Enzymatic degradation study (hyaluronidase, $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) of the soft and stiff hydrogels, showing degradation in one day and two weeks, respectively. Data are shown as mean \pm SD ($n = 3$). c) Frequency sweep experiments on the soft and stiff hydrogels, and d) the obtained shear elastic moduli (G') at 1Hz. Data are shown as mean \pm SD ($n = 3$). e) Relaxation tests, confirming the fast relaxation of the two hydrogels. f) Macroscopic and g) rheological confirmation of the self-healing properties of the two dynamic hydrogels after network disruption.

To confirm the self-healing capacity of the new boronate ester-based hydrogels, two discs of fluorescently-labelled hydrogels were formed before being cut in half and joined with each other (Figure 4f). After 5 minutes, the recomposed hydrogel could be lifted and was able to support its own weight. The healed hydrogel could be further cut into fragments and reassembled into a single hydrogel. To further demonstrate the self-healing property, we performed a step-stress sweep test, through oscillatory shear cycles of alternated low (1 Pa) and high (1200 Pa) stress. When a high stress was applied, G' values of both hydrogels dropped of several orders of magnitude, below the G'' values, as an indication of network disruption (Figure 4g). Switching back to low stress led to the instantaneous recovery of the initial G' values of the hydrogels, indicative of rapid self-healing.

3.6 Cytocompatibility of boronate ester-based hydrogels

To evaluate the cytocompatibility of wPBA/glucamine hydrogels, we assessed the viability (live/dead staining), metabolic activity (CCK-8 assay) and DNA content (Picogreen assay) of encapsulated murine L929 fibroblast cells (following ISO recommendations for cytocompatibility validation) and hASCs (Figure 5a). For both hydrogel formulations, encapsulated L929 cells had a viability of > 95% over 7 days (Figure 5b). Confocal imaging at day 7 showed the presence of numerous cell clusters, suggesting cell proliferation within the hydrogels, which is commonly observed with proliferative cell lines.^[36] CCK-8 assays corroborated this observation, with 17.2 ± 0.3 -fold and 13.9 ± 0.2 -fold increases (relative to day 0) in cell metabolic activity at day 7, for the soft and stiff hydrogels, respectively (Figure 5c). Regarding the DNA content, it increased by $411\% \pm 127\%$ over 7 days in soft hydrogels, while its increase in stiff hydrogels was not significant (Figure 5d). This difference may be the result of the higher elastic modulus and polymer content of the stiff hydrogels, which may result in increased cell confinement and thus limit cell proliferation.^[2] Similar biological investigations were then performed on encapsulated hASCs. Live/dead staining and confocal imaging revealed a high cell viability (> 95%) over 7 days in the two hydrogels (Figure 5e). Over the 7-day experiment, the metabolic activity and DNA content of encapsulated hASCs remained constant in the stiff hydrogels, while both biological readouts a slight but significant increase in the soft hydrogels ($161\% \pm 15\%$ and $125.8\% \pm 6.7\%$, respectively). These results suggest a modest proliferation of the encapsulated hASCs (Figure 5f and g). We previously observed a similar limited proliferation of hASCs in other HA

hydrogels, which can be related to a lack of a specific stimulus (e.g., proliferation or differentiation medium) and/or adhesive motifs in the hydrogels.^[37] Finally, we confirmed that cells were homogeneously distributed throughout the hydrogels, as evidenced by similar relative cell number in each hydrogel section (Figure S10). Overall, using cell types of two different origins (murine vs human) and three biological readouts, we showed that the newly developed hydrogels are cytocompatible and can be used for 3D cell culture.

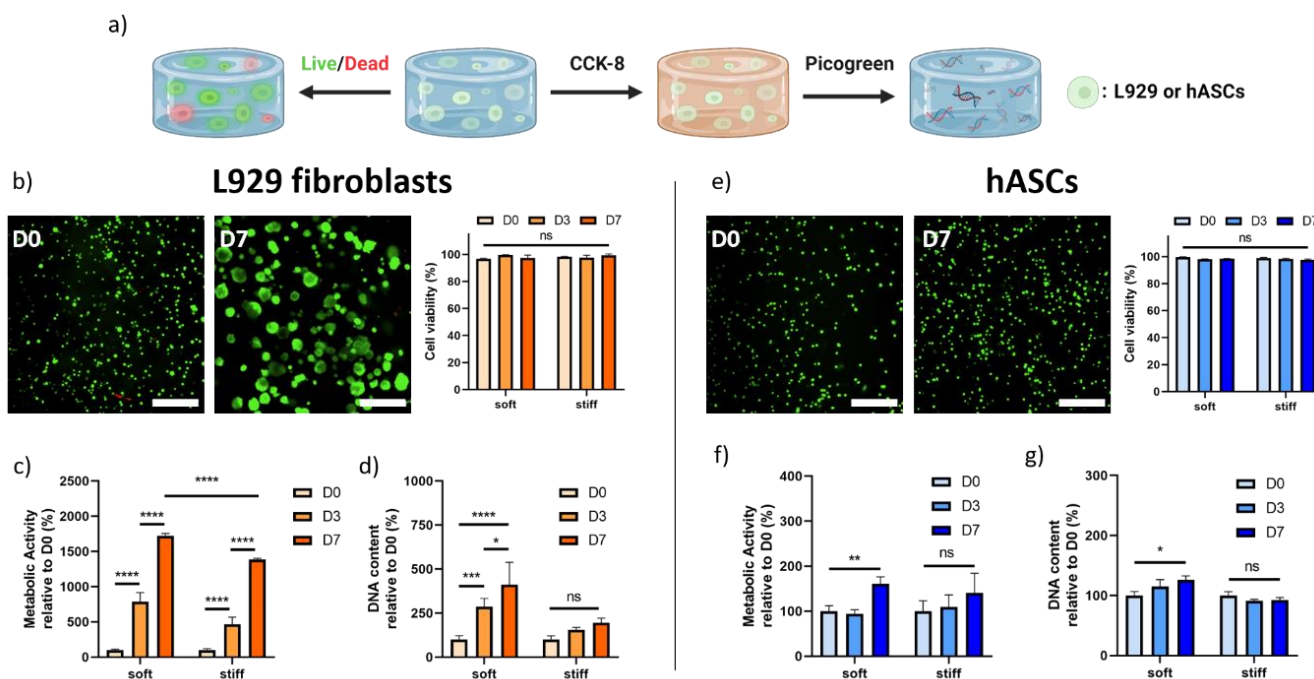


Figure 5: Cytocompatibility of the soft and stiff boronate ester-based hydrogels.

a) The viability of two cell types (L929 fibroblasts and hASCs) was assessed using three distinct methods: Live/Dead staining, metabolic assay (CCK-8), and DNA quantification (Picogreen). *b)* Representative stack views of L929 cells encapsulated in soft hydrogels, and the evaluation of their viability in the soft and stiff hydrogels (scale bar = 300 μ m). *c)* Metabolic activity and *d)* DNA content of L929 encapsulated in the two hydrogels, monitored over 7 days of culture. *e)* Representative stack views of hASCs encapsulated in soft hydrogels, and the evaluation of their viability in the soft and stiff hydrogels (scale bar = 300 μ m). *f)* Metabolic activity and *g)* DNA content of hASCs encapsulated in the two hydrogels, monitored over 7 days of culture. Data are shown as mean \pm SD ($n = 4$) with statistical significance determined using one-way ANOVA with a Tukey's post hoc test (ns : not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$).

4. Discussion

Boronate ester formation is one of the few dynamic covalent reactions identified to date for the design of viscoelastic hydrogels.^[4,5] Compared to crosslinking via Schiff base formation (e.g., imine, hydrazone, oxime), which has been extensively studied,^[1,7] boronate ester crosslinking and its use in biomedical applications remain marginal, possibly suffering from a

general lack of efficiency at physiological pH. In this study, we showed that combining wPBA and glucamine is a convenient way to produce dynamic hydrogels under physiological conditions. More importantly, among all of the investigated combinations, only the wPBA/glucamine couple presented the necessary binding affinity to produce HA hydrogels (with the possible exception of the combination of wPBA with dulcitolamine or fructosamine). While the exact mechanism behind boronate ester formation is still debated in some aspects, it is now recognized that it is strongly influenced by (i) the pKa of the boronic acid, and (ii) the reactivity of the diol toward the boronic acid.^[16,38,39]

A boronic acid exists under a neutral form and an anionic form (boronate), both in ionic equilibrium (with a typical pKa of ≈ 9). Due to its tetrahedral (sp^3) hybridization, the boronate ion is more stable and considered less reactive toward diols than the neutral form. Accordingly, the esterification process is believed to happen preferentially through the addition of diols on the trigonal (sp^2) boronic acid, to form an unstable boronic ester (sp^2).^[16] Boronic ester formation generates ring strain, thus favoring hybridization into a more stable, tetrahedral boronate ester (sp^3). As such the pKa of a boronic ester is lower than that of the corresponding boronic acid.^[16,38] Yet, it is often not low enough to favor boronate ester formation at physiological pH. Decreasing the pKa of a boronic acid, and therefore decreasing that of the corresponding boronic ester, is one possible approach to favor boronate ester formation at physiological pH. To date, two classes of boronic acid derivatives with low pKa values have attracted particular attention: BX (pKa = 7.2) and wPBA (pKa = 5.5).^[38,40] The decreased pKa of BX is the result of the ring strain induced by the intramolecular B-O coordination, which is released upon conversion from an sp^2 to an sp^3 structure, and therefore favors the anionization. As for wPBA, the reduced pKa is attributed to the proximity of the positively charged ammonium ion from the o-aminomethyl group.^[41] More specifically, it has been suggested that the o-aminomethyl group favors boronate ester formation through an intramolecular mechanism (i.e., loose-bolt postulate), where an inserted solvent molecule is lost, temporarily generating a reactive intermediate (i.e., trigonal boronic acid) that promotes diol complexation.^[41] In our study, both BX and wPBA were tested. wPBA is the only boronic acid derivative that showed appreciable interactions with diols at physiological pH, confirming the potential of PBAs with a low pKa to promote effective binding and crosslinking. We also showed that the water solubility of wPBA advantageously allows to reach higher crosslinking

density, favoring hydrogel formation and stability. Interestingly, none of the investigated combinations with BX led to hydrogel formation, suggesting much lower binding affinities, and further advocating for the use of wPBA. However, this observation goes against a previous study that convincingly demonstrated effective crosslinking when combining BX and fructosamine,^[42] possibly calling for further investigations.

Beyond the role of sp^2 to sp^3 conversion, effective boronate ester formation is also strongly influenced by the structure of the diol, which is translated into a binding affinity and a measurable association constant.^[16,43] The main improving factor for a higher association constant is the presence of a 1,2-cis or 1,3-cis diol in a coplanar conformation.^[43] Typically, the catechol group was shown to have one of the highest association constant (830 M^{-1}),^[43] which is attributed to its coplanar vicinal diol. In this regard, we tried to functionalize HA with dopamine, a molecule that displays both a catechol group and a primary amine for straightforward immobilization onto HA. Unfortunately, we did not succeed in obtaining HA-dopamine with satisfactory DS and stability as a consequence of the well-described catechol oxidation.^[44] Commercially available polyols are almost exclusively monosaccharide derivatives. However, natural monosaccharides (e.g., glucose, galactose, fructose) have relatively low abundance of cis-diols, which are mostly present under the minor furanose form of the monosaccharides (abundance ranging from 0.14% to 25%).^[45] This translates into low binding affinities, in the range of 4.6 M^{-1} to 160 M^{-1} .^[43] Among the natural monosaccharides, fructose has the highest abundance of furanose (25%) and thus the highest affinity toward boronic acid (160 M^{-1}).^[45] This supports the fact that, in our study, fructosamine was the only monosaccharide to allow, to some degree, gelation with wPBA. We also investigated a series of amino alditols, which are reduced aminosugars differing only in their stereochemical configurations, including dulcitolamine (2S, 3R, 4S, 5R), glucamine (2S, 3R, 4R, 5R), and iditolamine (2S, 3R, 4R, 5S). Among them, only the use of glucamine, which corresponds to an aminated sorbitol, led to effective gelation, which was observed only with wPBA. This clearly highlights a specific interaction between wPBA and glucamine, independent of any 1,2-cis or 1,3-cis diol, based on the particular stereochemical configuration of glucamine. These results also echo the relatively high binding affinity of sorbitol toward PBAs.^[43] Interestingly, the sequence of asymmetric carbons (2S, 3R, 4R, 5R) of sorbitol and glucamine is similar to that of glucono- δ -lactone, which was recently shown to allow gelation in combination with 4PBA,^[34]

Fluoro-PBA,^[20] BX,^[17] and wPBA.^[34] However, while an extensive NMR study has shown that a series of three specific hydroxyl groups of sorbitol (i.e., C2, C3, and C5) are involved in boronate ester formation,^[46] a different binding site of glucono- δ -lactone was suggested by others.^[34] Thus, although beyond the scope of this study, the specific mechanism of boronate ester formation between wPBA and glucamine remains to be elucidated. A recent study showed an important discrepancy between the measured binding affinity of small molecules and actual macromolecular crosslinking,^[26] calling for caution in such investigation.

Over the last decade, several PBA/diol couples have been proposed for the design of dynamic covalent hydrogels.^[17–21,26] Yet, none of the reported systems was shown to be nonswelling and stable long term. In particular, boronate ester-based hydrogels made of PEG either showed rapid degradation (within hours)^[21,26] or required complementary covalent crosslinking for stabilization.^[19] We demonstrated that optimized wPBA/glucamine hydrogels made of HA are nonswelling and stable under culture conditions. While a specific binding affinity between wPBA and glucamine cannot be fully excluded, it is possible that the use of HA as a polymer backbone favored the stabilization of the dynamic hydrogels owing to the great number of reactive functions per chain compared to telechelic polymers such as PEG. The physicochemical characterization of the newly-developed system left some grey area and open questions, including the mechanisms behind the influence of the HA MW and concentration on the formation, shrinking, and rheological properties of the hydrogels. More generally, despite a variety of PBA/diol couples proposed to date, boronate ester-based hydrogels still only offer limited ranges of elastic properties (G' of 100 to 1000 Pa) and relaxation times (within tens of seconds). More work is therefore needed to expand their rheological properties, which will inevitably include computational modeling to fully unravel the relationship between PBA/diol interactions and the resulting hydrogel properties.

5. Conclusion

Based on a wide screening of molecules, we identified a new boronic acid/diol couple, namely wPBA and glucamine, with the ability to form dynamic covalent HA-based hydrogels under physiological conditions of pH and temperature. After careful investigation of the physicochemistry of this new system, we were able to produce two HA-based hydrogels that are nonswelling and stable over at least 2 months in culture medium, with distinct shear elastic moduli. We further confirmed their viscoelastic behavior and fast relaxation, as well as their

cytocompatibility. These new dynamic covalent HA-based hydrogels could be used in a variety of biomedical applications, ranging from 3D cell culture and bioprinting, to the minimally-invasive delivery of drugs and therapeutic cells.

6. [Bibliography](#)

- [1] H. Wang, S. C. Heilshorn, *Adv. Mater.* 2015, 27, 3717.
- [2] O. Chaudhuri, J. Cooper-White, P. A. Janmey, D. J. Mooney, V. B. Shenoy, *Nature* 2020, 584, 535.
- [3] Z. Tong, L. Jin, J. M. Oliveira, R. L. Reis, Q. Zhong, Z. Mao, C. Gao, *Bioact. Mater.* 2021, 6, 1375.
- [4] L. Teng, Y. Chen, Y. G. Jia, L. Ren, *J. Mater. Chem. B* 2019, 7, 6705.
- [5] M. J. Webber, M. W. Tibbitt, *Nat. Rev. Mater.* 2022, 7, 541.
- [6] C. Loebel, C. B. Rodell, M. H. Chen, J. A. Burdick, *Nat. Protoc.* 2017, 12, 1521.
- [7] B. M. Richardson, D. G. Wilcox, M. A. Randolph, K. S. Anseth, *Acta Biomater.* 2019, 83, 71.
- [8] X. Wu, C. He, Y. Wu, X. Chen, *Biomaterials* 2016, 75, 148.
- [9] S. Kirchhof, F. P. Brandl, N. Hammer, A. M. Goepferich, *J. Mater. Chem. B* 2013, 1, 4855.
- [10] L. J. Smith, S. M. Taimoory, R. Y. Tam, A. E. G. Baker, N. Bintah Mohammad, J. F. Trant, M. S. Shoichet, *Biomacromolecules* 2018, 19, 926.
- [11] C. C. Deng, W. L. A. Brooks, K. A. Abboud, B. S. Sumerlin, *ACS Macro Lett.* 2015, 4, 220.
- [12] Y. Chen, D. Diaz-Dussan, D. Wu, W. Wang, Y. Y. Peng, A. B. Asha, D. G. Hall, K. Ishihara, R. Narain, *ACS Macro Lett.* 2018, 7, 904.
- [13] S. H. Hong, S. Kim, J. P. Park, M. Shin, K. Kim, J. H. Ryu, H. Lee, *Biomacromolecules* 2018, 19, 2053.
- [14] R. Guo, Q. Su, J. Zhang, A. Dong, C. Lin, J. Zhang, *Biomacromolecules* 2017, 18, 1356.
- [15] M. Dowlut, D. G. Hall, *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 4226.
- [16] J. A. Peters, *Coord. Chem. Rev.* 2014, 268, 1.

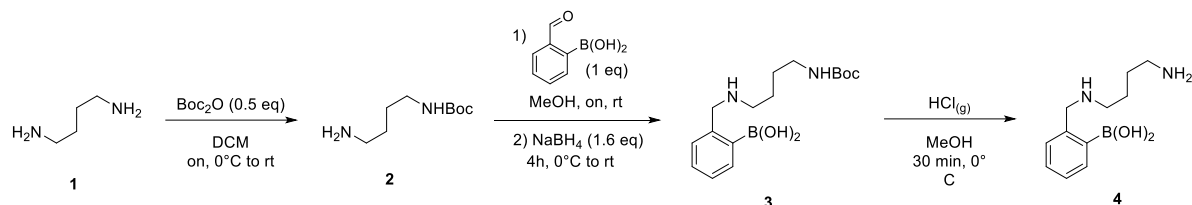
- [17] T. Figueiredo, V. Cosenza, Y. Ogawa, I. Jeacomine, A. Vallet, S. Ortega, R. Michel, J. D. M. Olsson, T. Gerfaut, J. G. Boiteau, J. Jing, C. Harris, R. Auzély-Velty, *Soft Matter* 2020, 16, 3628.
- [18] D. Wu, W. Wang, D. Diaz-Dussan, Y. Y. Peng, Y. Chen, R. Narain, D. G. Hall, *Chem. Mater.* 2019.
- [19] S. Tang, H. Ma, H. C. Tu, H. R. Wang, P. C. Lin, K. S. Anseth, *Adv. Sci.* 2018, 5, 1.
- [20] V. Yesilyurt, M. J. Webber, E. A. Appel, C. Godwin, R. Langer, D. G. Anderson, *Adv. Mater.* 2016, 28, 86.
- [21] B. Marco-Dufort, J. Willi, F. Vielba-Gomez, F. Gatti, M. W. Tibbitt, *Biomacromolecules* 2021, 22, 146.
- [22] D. Tarus, E. Hachet, L. Messenger, B. Catargi, V. Ravaine, R. Auzély-Velty, *Macromol. Rapid Commun.* 2014, 35, 2089.
- [23] Y. Wu, J. Wang, L. Li, X. Fei, L. Xu, Y. Wang, J. Tian, Y. Li, *J. Colloid Interface Sci.* 2021, 584, 484.
- [24] X. Deng, R. Attalla, L. P. Sadowski, M. Chen, M. J. Majcher, I. Urosev, D. C. Yin, P. R. Selvaganapathy, C. D. M. Filipe, T. Hoare, *Biomacromolecules* 2018, 19, 62.
- [25] J. Lee, J. H. Ko, K. M. Mansfield, P. C. Nauka, E. Bat, H. D. Maynard, *Macromol. Biosci.* 2018, 18, 1.
- [26] Y. Xiang, S. Xian, R. C. Ollier, S. Yu, B. Su, I. Pramudya, M. J. Webber, *J. Control. Release* 2022, 348, 601.
- [27] B. Pribulová, M. Petrušová, H. Smrtičová, L. Petruš, *Carbohydr. Res.* 2012, 363, 62.
- [28] V. Delplace, P. E. B. Nickerson, A. Ortin-Martinez, A. E. G. Baker, V. A. Wallace, M. S. Shoichet, *Adv. Funct. Mater.* 2020, 30, 1.
- [29] C. Merceron, S. Portron, C. Vignes-Colombeix, E. Rederstorff, M. Masson, J. Lesoeur, S. Sourice, C. Sinquin, S. Collic-Jouault, P. Weiss, C. Vinatier, J. Guicheux, *Stem Cells* 2012, 30, 471.
- [30] O. Chaudhuri, L. Gu, D. Klumpers, M. Darnell, S. A. Bencherif, J. C. Weaver, N. Huebsch, H. P. Lee, E. Lippens, G. N. Duda, D. J. Mooney, *Nat. Mater.* 2016, 15, 326.

- [31] M. Cantini, H. Donnelly, M. J. Dalby, M. Salmeron - Sanchez, *Adv. Healthc. Mater.* 2020, 9, 1901259.
- [32] S. Tang, H. Ma, H. Tu, H. Wang, P. Lin, K. S. Anseth, *Adv. Sci.* 2018, 5, 1800638.
- [33] C. B. Rodell, N. Dusaj, C. B. Highley, J. A. Burdick, *Adv. Mater.* 2016, 28, 8419.
- [34] B. Marco-Dufort, R. Iten, M. W. Tibbitt, *J. Am. Chem. Soc.* 2020, 142, 15371.
- [35] P. Bertsch, M. Diba, D. J. Mooney, S. C. G. Leeuwenburgh, *Chem. Rev.* 2022.
- [36] K. Flegeau, C. Toquet, G. Rethore, C. d'Arros, L. Messenger, B. Halgand, D. Dupont, F. Autrusseau, J. Lesoeur, J. Veziere, P. Bordat, A. Bresin, J. Guicheux, V. Delplace, H. Gautier, P. Weiss, *Adv. Healthc. Mater.* 2020, 9, 1.
- [37] V. Delplace, N. Lagneau, B. Halgand, F. Loll, J. Guicheux, C. Le Visage, *Tissue Eng. - Part A* 2022, 28, S146.
- [38] B. M. Dufort, M. W. Tibbitt, *Mater. Today Chem.* 2019, 12, 16.
- [39] M. Van Duin, J. A. Peters, A. P. G. Kieboom, H. Van Bekkum, *Tetrahedron* 1984, 40, 2901.
- [40] D. G. Hall, *Boronic Acids: Preparation and Applications in Organic Synthesis and Medicine*, Vol. 53, 2005.
- [41] X. Sun, B. M. Chapin, P. Metola, B. Collins, B. Wang, T. D. James, E. V. Anslyn, *Nat. Chem.* 2019, 11, 768.
- [42] T. Figueiredo, J. Jing, I. Jeacomine, J. Olsson, T. Gerfaud, J. Boiteau, C. Rome, C. Harris, R. Auzely, *Biomacromolecules* 2019.
- [43] G. Springsteen, B. Wang, *Tetrahedron* 2002, 58, 5291.
- [44] E. Herlinger, R. F. Jameson, W. Linert, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1995, 259.
- [45] X. Wu, Z. Li, X. X. Chen, J. S. Fossey, T. D. James, Y. B. Jiang, *Chem. Soc. Rev.* 2013, 42, 8032.
- [46] J. C. Norrild, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 2001, 719.

Supplementary information

Synthesis of wPBA

General synthetic pathway



Reagents, solvents and reaction conditions

Di-tert-butylcarbonate (Boc_2O), 1,4-diaminobutane, sodium tetraborohydride (NaBH_4) were all provided by Acros-Fisher. 2-(Formyl)phenylboronic acid and methanol (MeOH) were respectively supplied by Apollo Scientific and Merck (Darmstadt, Germany). Sulfuric acid (H_2SO_4) and sodium chloride (NaCl) were provided by VWR. The MB SPS 800 dry solvent system was used to dry dichloromethane. The reactions were carried out in glassware vessels which were either flame dried under vacuum or placed under argon stream for several minutes. Reactions were also performed under rigorous anhydrous conditions and argon stream/positive pressure of argon. Flash column chromatography was carried out using automatic Reveleris Büchi apparatus. Silica cartridges (4 g till 330 g, Büchi) were used with high purity grade of silica ($40\ \mu\text{m}$).

Reaction monitoring and characterization

All reactions were monitored by TLC on commercially available precoated plates (Kieselgel 60 F254), and the compounds were visualized with KMnO_4 solution [KMnO_4 (3 g), K_2CO_3 (20 g), NaOH (5% aq.; 5 mL), H_2O (300 mL)] and heating or by UV (254 nm) when possible.

Intermediate and final products were characterized by ^1H and ^{13}C NMR as well as ESI-TOF-HRMS.

NMR studies

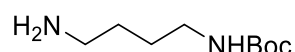
Intermediate and final products were characterized by ^1H and ^{13}C NMR. Spectra were recorded on a Bruker Avance 300 spectrometer fitted with a 5 mm i.d. BBO probe carefully tuned to the recording frequency of 300.13 MHz (for ^1H) and 75.47 MHz (for ^{13}C), the temperature of the probe was set at room temperature (around 293-294 K), on a Bruker Avance 400 spectrometer fitted with a 5 mm i.d. BBFO+ probe carefully tuned to the recording frequency of 400.13 MHz

(for ^1H) and 100.61 MHz (for ^{13}C). The spectra are referenced to the solvent in which they were run (7.26 ppm for ^1H CDCl_3 and 77.16 ppm for ^{13}C CDCl_3 , 2.50 ppm for ^1H $\text{DMSO}-d_6$ and 39.52 ppm for ^{13}C $\text{DMSO}-d_6$). Chemical shifts (δ) are given in ppm, and coupling constants (J) are given in Hz with the following splitting abbreviations: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, qt = quintet, sx = sextuplet, sp = septuplet, m = massif and br = broad. All assignments were confirmed with the aid of two-dimensional ^1H , ^1H (COSY), or ^1H , ^{13}C (HSQC, HMBC) experiments using standard pulse programs.

ESI-TOF-HRMS investigations

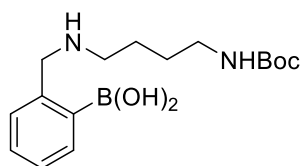
Intermediate and final products were characterized by electrospray (ESI)-time of flight (TOF) high resolution mass spectrometry (HRMS) measurements a Xevo G2-XS QTOF spectrometer (Waters, USA) in both positive and negative modes by direct introduction.

Synthesis of tert-Butyl (4-aminobutyl)carbamate :



To a solution of diaminobutane (115.60 mmol, 10.36 mL) in dry DCM (100 mL) is added a solution of di-tert-butylcarbonate (57.80 mmol, 12.60 g) in dry DCM (90 mL) dropwise at 0°C . Reaction mixture is stirred at 0°C for 1h, then at room temperature overnight. The solution is diluted with DCM (200 mL). Iced-cold water is added and organic layers are extracted with DCM (3 times). Organic layers are washed with brine, dried over Na_2SO_4 and concentrated under reduced pressure. The crude is purified by flash chromatography on silica gel (DCM/MeOH, 10/0 to 8/2, 1% Et_3N) to afford compound 2 (46.24 mmol, 8.69 g) with 40% yield. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 4.80 (bs, 1H), 3.06-3.08 (m, 2H), 2.66-2.69 (m, 2H), 2.13 (bs, 2H), 1.42-1.51 (m, 4H), 1.39 (s, 9H) ; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): 156.1 (CO), 79.1 (CIV), 41.6 (Cal), 40.4 (Cal), 30.49 (Cal), 28.5 (Cal), 28.5 (Cal), 28.5 (Cal), 27.5 (Cal) ; ESI(+)-TOF-HRMS m/z for $\text{C}_9\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2$ [M + H] $^+$: theoretical 189.1604, observed : 189.1603.

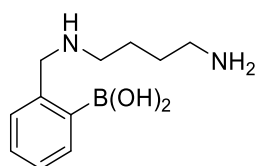
Synthesis of (2-(((4-((tert-Butoxycarbonyl)amino)butyl)amino)methyl)phenyl)boronic acid :



To a solution of tert-butyl(4-aminobutyl)carbamate (38.80 mmol, 7.30 g) in methanol (30 mL), is added 2-formylphenylboronic acid (38.80 mmol, 5.82 g) at room temperature, under argon

atmosphere. The reaction mixture is stirred overnight at room temperature. Sodium borohydride (62.08 mmol, 2.35 g) is added carefully at 0°C. After total addition, the reaction mixture is stirred at room temperature until bubbles disappearance. Water and dichloromethane are added to the mixture. Organic layers are extracted with dichloromethane, dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to give compound 3 (37.05 mmol, 11.93 g) without further purification with 95% yield. ¹H NMR (400 MHz, MeOD): 7.43-7.45 (m, 1H), 7.13-7.21 (m, 3H), 4.00 (s, 2H), 3.10 (t, 2H), 2.85-2.89 (m, 2H), 1.71-1.79 (m, 2H), 1.50-1.57 (qt, 2H), 1.44 (s, 9H) ; ¹³C NMR (100 MHz, MeOD): 158.5 (CO), 144.8 (Car), 142.4 (Car), 131.6 (Car), 128.2 (Car), 127.6 (Car), 124.1 (Car), 79.9 (CIV), 55.0 (Cal), 48.6 (Cal), 40.8 (Cal), 28.8 (Cal), 28.8 (Cal), 28.8 (Cal), 28.6 (Cal), 25.2 (Cal) ; ESI(+)-TOF-HRMS m/z for C₁₈H₃₂N₂O₄B** [M + H]⁺ : theoretical 350.2487, observed : 350.2491.

Synthesis of (2-(((4-aminobutyl)amino)methyl)phenyl)boronic acid (wPBA):



To a solution of (2-(((4-((tert-butoxycarbonyl)amino)butyl)amino)methyl)phenyl)boronic acid (2.62 mmol, 0.84 g) in methanol (5 mL), hydrochloric acid gas is bubbled (from sulfuric acid over NaCl) at 0°C under argon atmosphere. Half an hour later, methanol is evaporated. The crude is dissolved in distilled water (15 mL) and an aqueous solution of sodium hydroxide (1 M) is added until pH 11. Water is co-evaporated with toluene. The crude is dissolved in dichloromethane, dried over Na₂SO₄ and concentrated under reduced pressure to afford the wished monomer 4 (1.89 mmol, 0.42 g) with 72% yield. ¹H NMR (400 MHz, MeOD): 7.40-7.43 (m, 1H), 7.15-7.23 (m, 3H), 4.03 (s, 2H), 2.96-3.00 (m, 2H), 2.89-2.93 (m, 2H), 1.82-1.90 (m, 2H), 1.69-1.77 (m, 2H) ; ¹³C NMR (100 MHz, MeOD): 144.4 (Car), 142.7 (Car), 131.5 (Car), 128.4 (Car), 127.6 (Car), 124.1 (Car), 55.2 (Cal), 48.2 (Cal), 40.4 (Cal), 26.7 (Cal), 24.7 (Cal) ; ESI(+)-TOF-HRMS m/z for C₁₁H₁₆N₂B* [M + H]⁺ : theoretical 186.1451, observed : 186.1443.

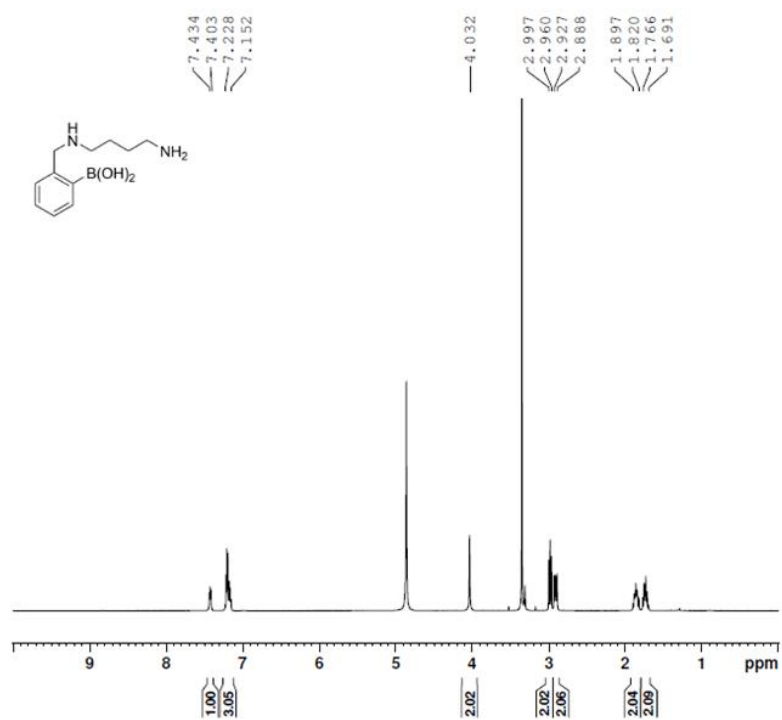


Figure S1: ^1H NMR spectrum of wPBA in MeOD.

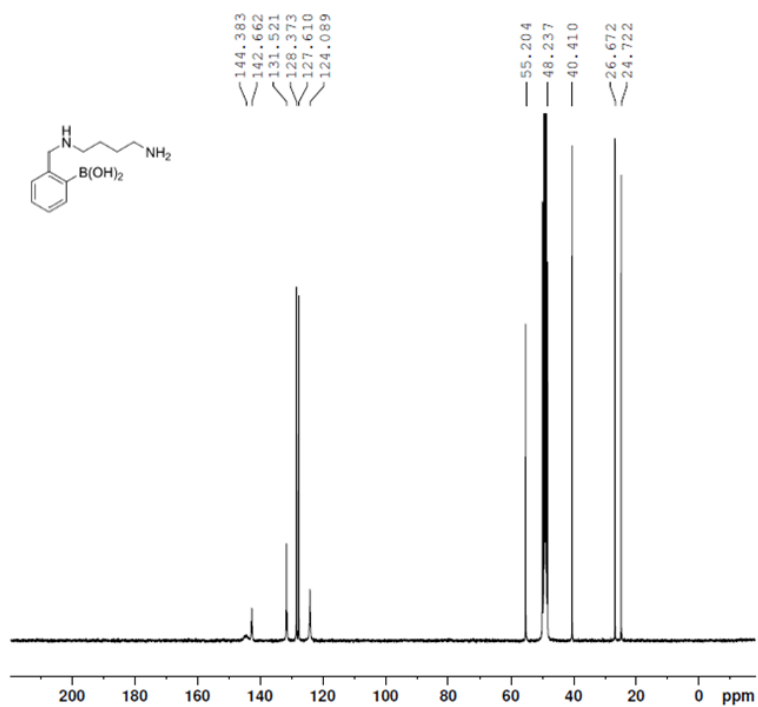


Figure S2: ^{13}C NMR spectrum of wPBA in MeOD.

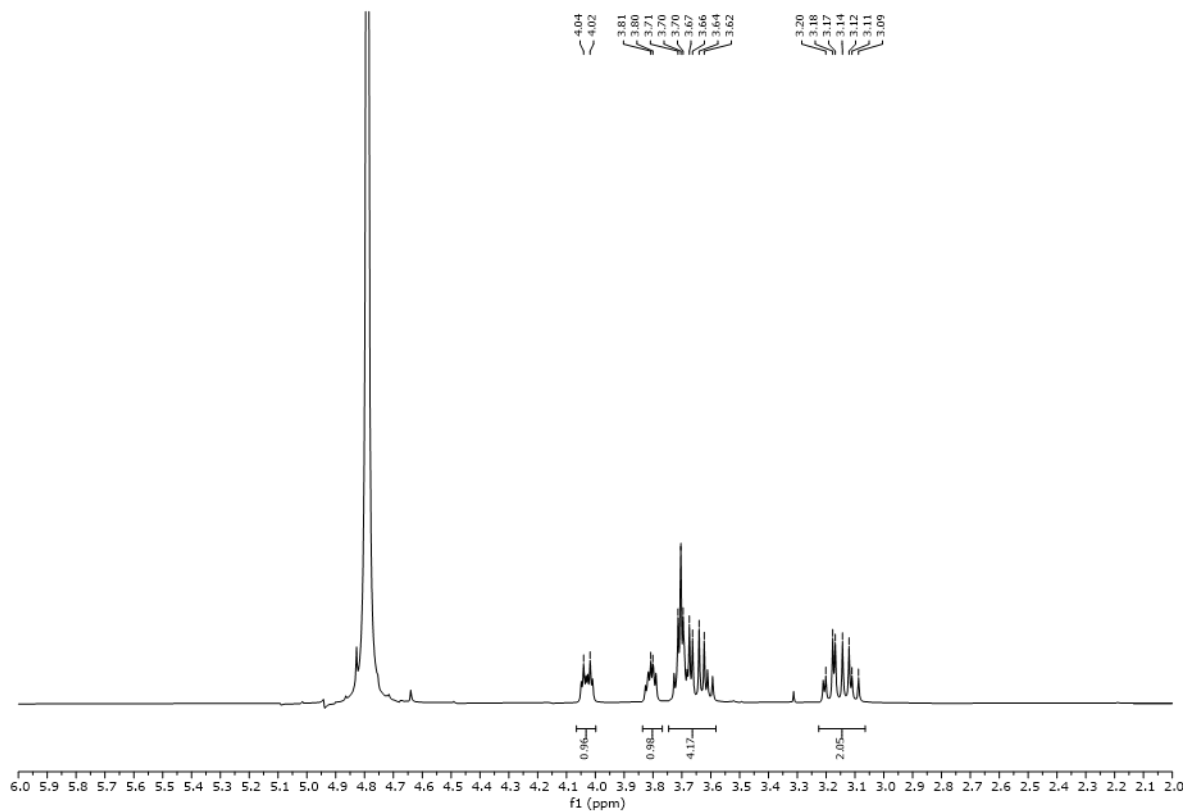


Figure S3: ^1H NMR spectrum of iditolamine in D_2O .

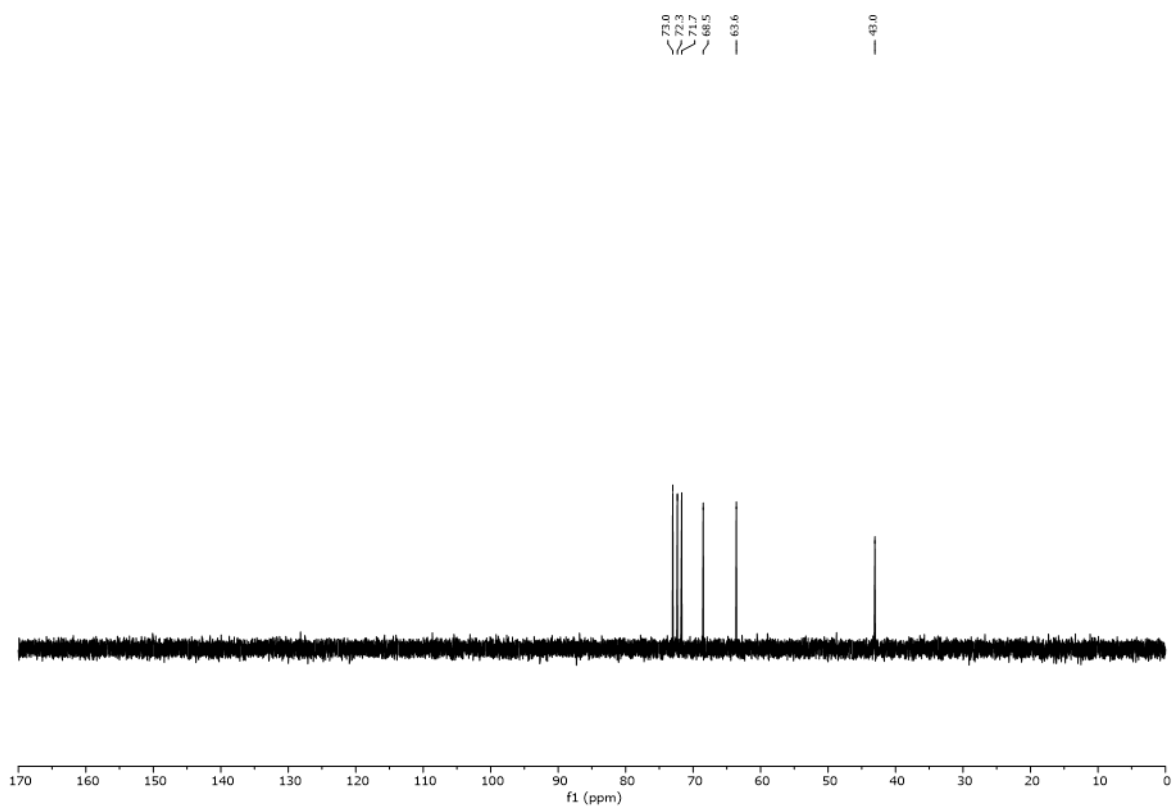


Figure S4: ^{13}C NMR spectrum of iditolamine in D_2O .

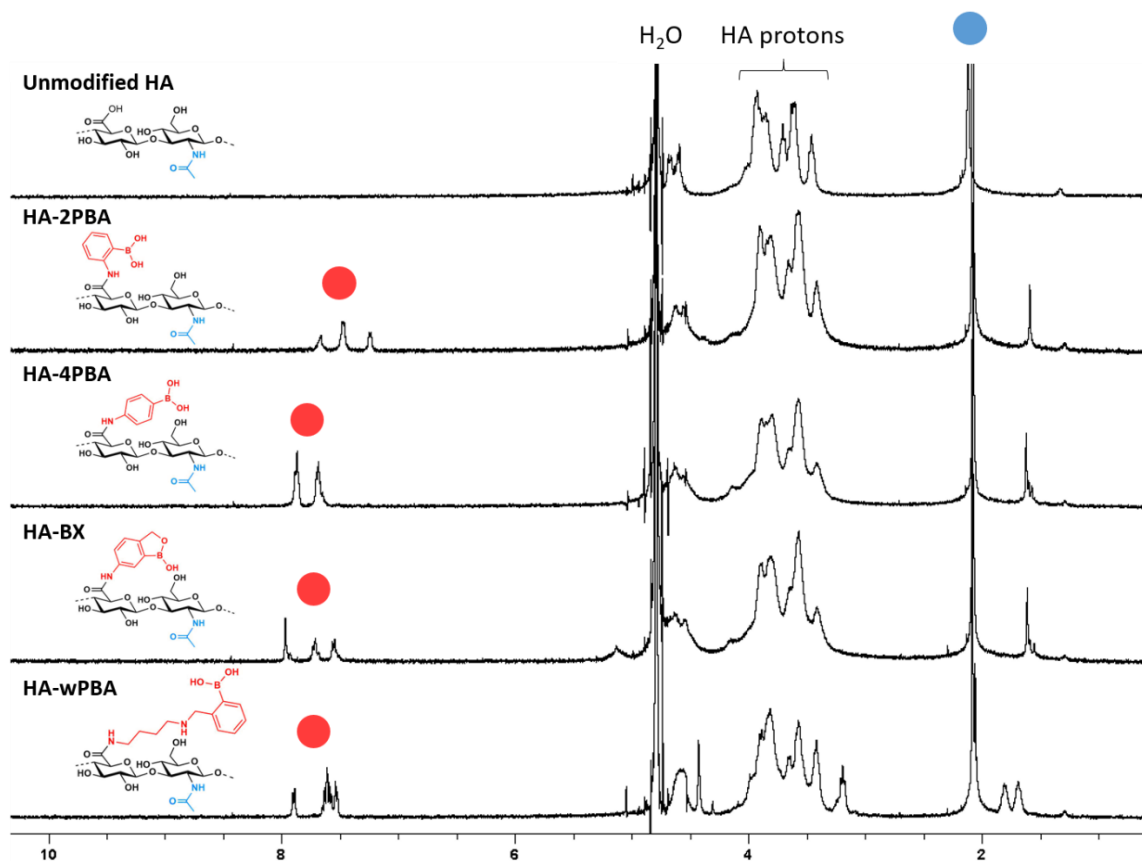


Figure S5: Representative ^1H NMR (400 MHz, D_2O) of HA, HA-2PBA, HA-4PBA, HA-BX and HA-wPBA, confirming the success of the syntheses.

The 3 protons of the N-acetyl group of HA (blue circle, 2.1 ppm) served as a reference to calculate the degrees of substitution of HA-PBAs (red circles at 7.5 8 ppm, accounting for 3 or 4 protons).

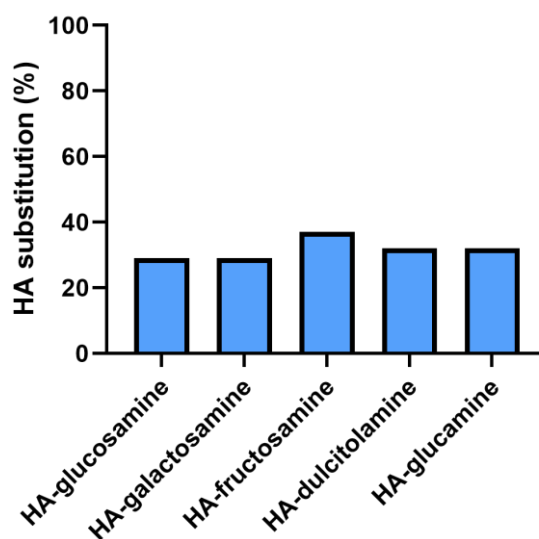


Figure S6: The matching degrees of substitution of HA-diol-containing molecules, determined by elemental analysis.

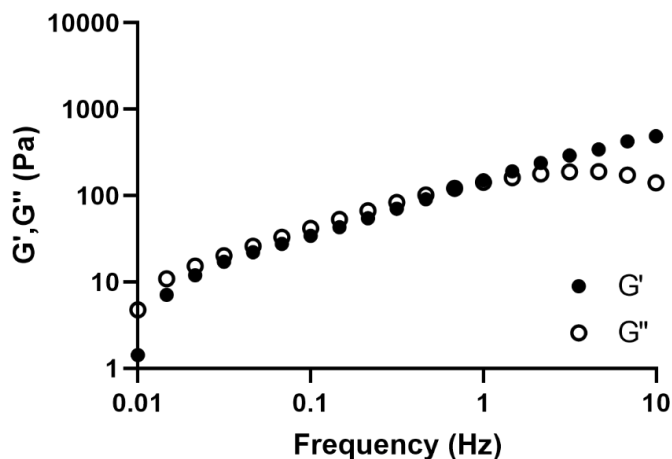


Figure S7: Frequency sweep of a wPBA/glucamine alginate hydrogels, at a total alginate concentration of 2% (w/v), using an alginate-wPBA:alginate-glucamine volume ratio of 1:1.

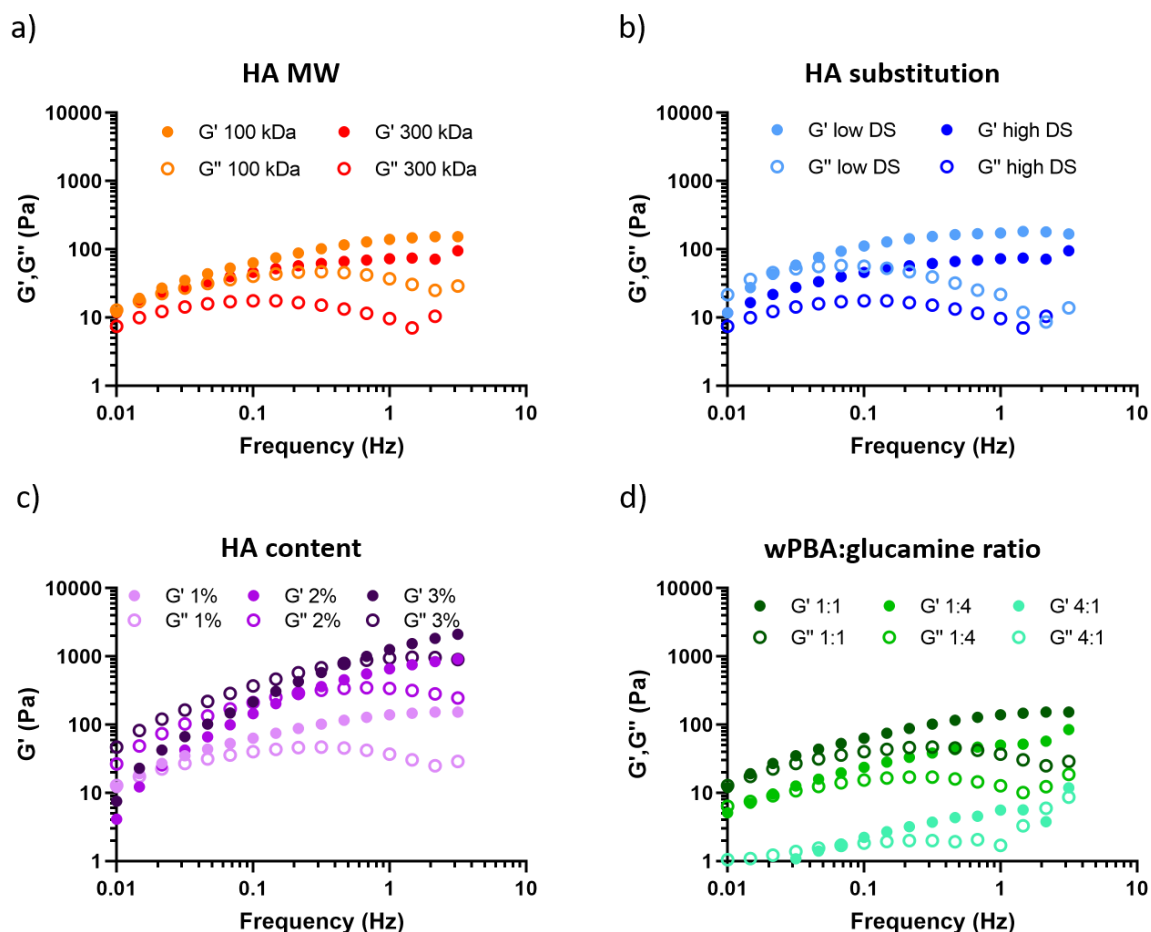


Figure S8: The influence of a) HA MW, b) HA DS, c) HA content, and d) wPBA:glucamine molar ratio on hydrogel shear elastic (G') and loss (G'') moduli, evaluated using dynamic shear rheometry. Results on HA DS compare low DS (HA-wPBA, 24%; HA-glucamine, 32%) and high DS (HA wPBA, 40%; HA-glucamine, 52%).

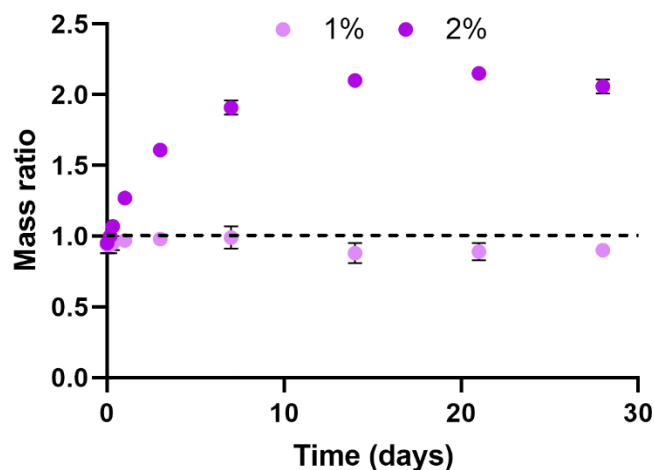


Figure S9: The influence of HA content of 300 kDa HA hydrogels (HA-wPBA: DS of 40%; HA-glucamine: DS of 52%) on the hydrogel stability/swelling. Data are shown as mean \pm SD ($n = 3$).

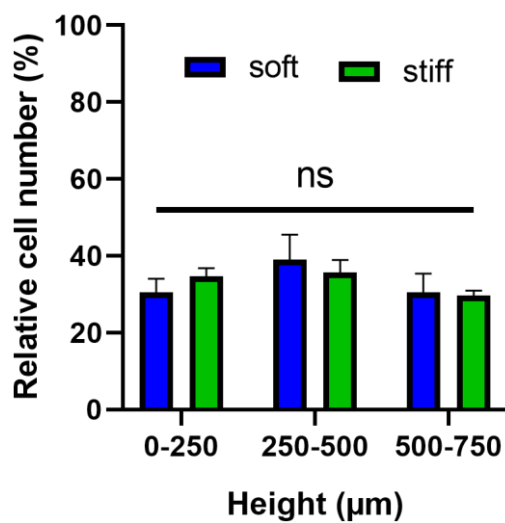


Figure S10: Relative cell distribution in the soft and stiff hydrogels, confirming homogenous cell encapsulation. The dashed line indicates the expected relative cell number in each of the three bins, which is 33%. Data are shown as mean \pm SD ($n = 3$) with statistical significance determined using one-way ANOVA with a Tukey's post hoc test (ns : not significant).

Préambule aux chapitres 3 et 4

Au cours de cette thèse, nous avons pour ambition d'améliorer l'efficacité thérapeutique de CSMs pour le traitement de l'arthrose par l'utilisation d'un hydrogel.

Afin d'identifier une formulation permettant de favoriser la sécrétion de facteurs potentiellement « anti-arthrosiques » par des CSMs encapsulées, nous avons dans un premier temps étudié l'influence des différentes propriétés mécaniques et biochimiques des hydrogels sur la sécrétion des CSMs, mettant à profit la plateforme d'hydrogels présentée dans le chapitre 2. Ces résultats sont détaillés dans le chapitre 3 de ce manuscrit. Dans un second temps, nous avons évalué l'injectabilité et la stabilité in vivo des hydrogels, deux propriétés qui nous semblent essentielles pour une thérapie cellulaire assistée par un hydrogel. Ces résultats sont présentés dans le chapitre 4 de ce manuscrit.

L'ensemble de ces résultats rentre dans le cadre d'une plus large étude portant sur la conception rationnelle d'hydrogels pour l'amélioration de la thérapie cellulaire de l'arthrose. En effet, à la suite de ces expériences, une étude de l'efficacité d'une thérapie cellulaire assistée par un hydrogel a été entreprise sur un modèle d'arthrose post-traumatique chez le lapin. Les résultats de cette étude seront obtenus d'ici quelques mois, et pourront être associés aux résultats des chapitres 3 et 4 pour la rédaction d'un article scientifique.

**CHAPITRE 3 : ETUDE DE L'INFLUENCE DES
INTERACTIONS CELLULES-MATERIAUX SUR LES
PROPRIETES DE SECRETION DES CSMs**

1. Rationnel pour l'étude de l'influence des interactions cellules-matériaux

En raison de leur faculté à sécréter des facteurs immunomodulateurs et pro-régénératifs en réponse à un environnement dégénéré et inflammatoire, les CSMs sont envisagées comme un outil thérapeutique prometteur pour le traitement de l'arthrose. Parmi les facteurs sécrétés, la prostaglandine E2 (PGE2), l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) et certaines interleukines (IL) (e.g., IL-4, IL-10, IL-13) pourraient participer à atténuer l'inflammation présente au sein de l'articulation,^[40,157,158] tandis que le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) et le facteur de croissance des fibroblastes-2 (bFGF) ont montré un effet anti-fibrotique sur les chondrocytes.^[159,160] Enfin les CSMs peuvent prévenir la dégradation du cartilage via la sécrétion de thrombospondine (THBS),^[161] la sécrétion de la protéine induite par le facteur de croissance transformant- β (TGF- β i),^[162] ou encore celle de vésicules extracellulaires (EVs).^[163]

Comme mentionné auparavant, le comportement des CSMs est connu pour être dépendant de la composition et des propriétés mécaniques de la MEC. Bien que l'influence de ces propriétés sur la survie et la différenciation des CSMs ait fait l'objet de nombreuses études, leur effet sur les propriétés de sécrétion des CSMs est encore mal connu. Cette étude s'inscrit dans la continuité des travaux présentés dans le chapitre 2 de ce manuscrit (cf. Chapitre 2 – partie 2). Dans ce précédent chapitre, des CSMs humaines dérivant du tissu adipeux (hASCs) avaient été encapsulées dans des hydrogels élastiques, réticulés par la chimie SPAAC, à la rigidité et à la composition ajustables. Les cellules avaient été stimulées avec des cytokines pro-inflammatoires pendant 3 jours, avant d'évaluer la concentration en PGE2, IDO et IL-6 dans les surnageants. Nous n'avions alors pas observé d'influence de la rigidité (1 kPa vs 5 kPa), ni de l'ajout de CS, sur la sécrétion de ces facteurs. De façon intéressante nous avons montré que la présence d'un peptide d'adhésion, le RGD, diminuait la sécrétion de PGE2. Enfin, comparé à l'alginate, nous avons mis en évidence l'importance de l'AH pour favoriser la sécrétion de ces 3 facteurs par les hASCs.

Dans ce contexte, nous avons utilisé la plateforme d'hydrogels nouvellement développée afin d'étudier l'influence de nouvelles propriétés mécaniques et biochimiques sur la sécrétion des facteurs potentiellement « anti-arthrosique ». Nous avons notamment étudié l'influence de la viscoélasticité et celle d'un peptide mimant la N-cadhérine (séquence : HAVDI) sur les

propriétés de sécrétion des CSMs. Cette nouvelle étude a donc eu pour but d'approfondir notre compréhension sur l'influence des interactions cellules-matériaux sur la sécrétion des hASCs en conditions pro-inflammatoires.

2. Partie expérimentale

2.1 Stimulation pro-inflammatoires des hASCs

Afin d'étudier l'influence des interactions cellules-matériaux sur la sécrétion des CSMs, les cellules ont été encapsulées et stimulées selon le protocole illustré sur la Figure 14. Brièvement, des hASCs issues de différents donneurs (N=5) ont été amplifiées dans du milieu de culture avant que celui-ci n'ait été totalement dépleté en sérum. Les hASCs (10^5 cellules) ont ensuite été encapsulées dans 100 μ L d'hydrogel puis stimulées avec du facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) et de l'interféron- γ (INF- γ) (50 ng.mL⁻¹). Après 3 jours de stimulation, le surnageant a été récupéré et congelé à - 80 °C. L'activité enzymatique d'IDO a été dosée dans le surnageant via un test d'Ehrlich selon un protocole déjà publié.^[151] La concentration en PGE2 a été dosée à l'aide d'un kit ELISA (Cayman Chemical). L'IL-4, -6, -10, -13, l'HGF, le bFGF, et la THBS ont été dosés grâce à un kit Luminex® à façon (Biotechne) en suivant les recommandations du fournisseur. La fluorescence a été mesurée par un Bio-plex 200.

Pour cette étude les hASCs ont été encapsulées dans 6 hydrogels distincts :

Tableau 1 : Composition des hydrogels utilisés pour l'étude des interactions cellules-matériaux

Hydrogels	Précurseurs utilisés	Concentration polymère	Ratio molaire
AH élastique	100 kDa AH-BCN 15% 100 kDa AH-N ₃ 40%	1% (w/v)	BCN:N ₃ 1:4
AH viscoélastique « mou »	300 kDa AH-wPBA 24% 300 kDa AH-glucamine 52%	1% (w/v)	wPBA:glucamine 1:1
AH viscoélastique « mou » + HAVDI	300 kDa AH-wPBA 24% 300 kDa AH-glucamine 52%-HAVDI 3%	1% (w/v)	wPBA:glucamine 1:1
AH viscoélastique « dur »	100 kDa AH-wPBA 40% 100 kDa AH-glucamine 52%	2.5% (w/v)	wPBA:glucamine 1:1
AH viscoélastique « dur » + HAVDI	100 kDa AH-wPBA 40% 100 kDa AH-glucamine 52%-HAVDI 3%	2.5% (w/v)	wPBA:glucamine 1:1
Alginate viscoélastique	Alginate-wPBA 1eq Alginate-glucamine 1eq	2% (w/v)	wPBA:glucamine 1:1

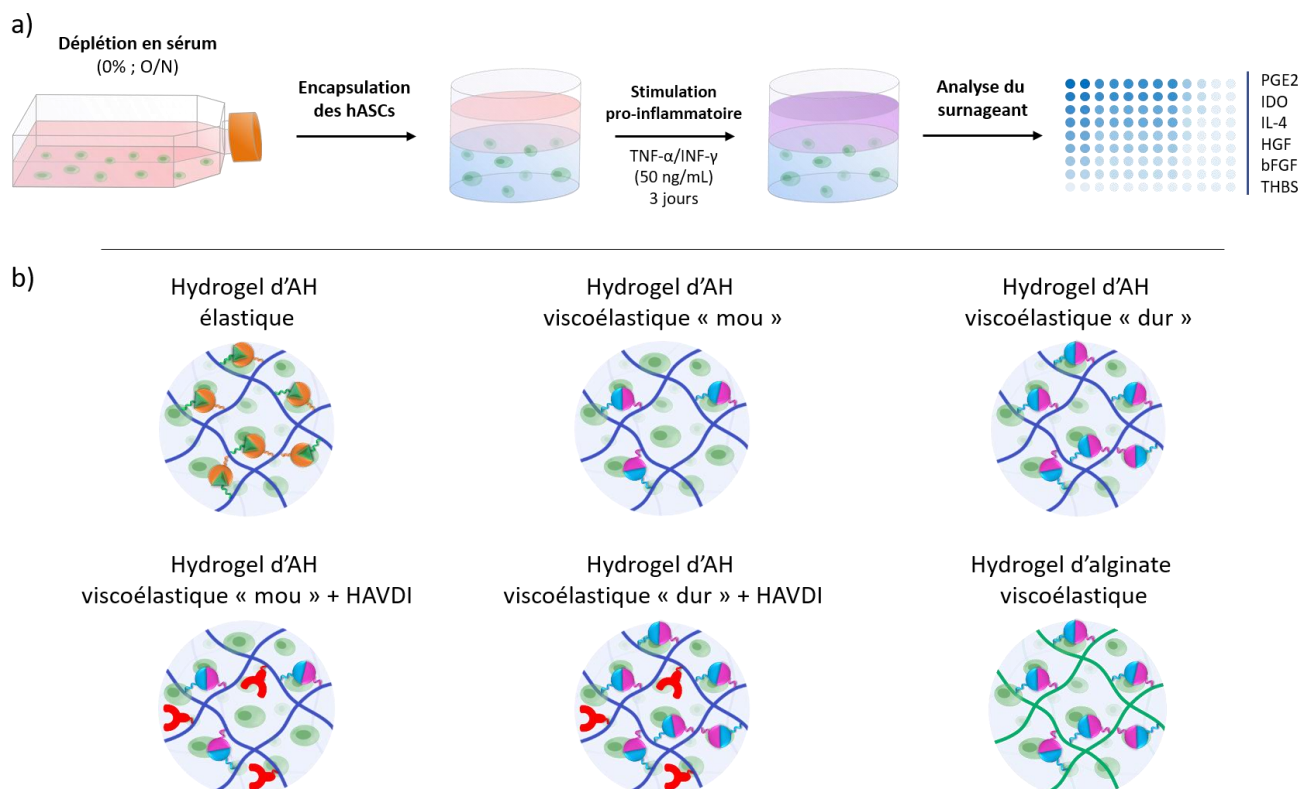


Figure 14 : Méthodologie pour l'étude de l'influence des interactions cellules-matériaux.

a) Protocole de stimulation des hASCs par des cytokines pro-inflammatoires (i.e., TNF- α , INF- γ). b) Différentes formulations d'hydrogels utilisées pour cette étude (voir plus haut pour le détail des formulations).

2.2 Polarisation des macrophages

Les hASCs (100k cellules) ont été encapsulées dans 100 μ L d'hydrogel viscoélastique « dur » + HAVDI. Les cellules ont ensuite été stimulées avec du TNF- α et de l'INF- γ (50 ng.mL⁻¹) pendant 12 heures, suivie de 2 jours de culture dans du milieu ne contenant pas de cytokines exogènes. Le milieu conditionné (MC) a été ensuite récupéré puis congelé à - 80 °C.

En parallèle, 100 mM de phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) a été ajouté dans le milieu de culture d'une lignée monocyttaire humaine THP-1 pour obtenir des macrophages M0 adhérents (Figure 15). Pour évaluer l'effet du sécrétome des hASCs encapsulées sur la polarisation des macrophages, le MC (facteur de dilution de 2) a été mis en contact avec les macrophages pendant 72h. Comme contrôles, des macrophages pro-inflammatoires (M1) ont été obtenus en cultivant les macrophages M0 en présence d'INF- γ (20 ng.mL⁻¹) et de lipopolysaccharides (LPS; 10 pg.mL⁻¹) pendant 24 heures, et des macrophages anti-inflammatoires (M2) ont été obtenus en cultivant les macrophages M0 en présence

d'IL-4 et d'IL-10 ($20 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) pendant 72 heures. A la fin de la culture, l'ARN des cellules a été récupéré, et l'expression des gènes *IL-6*, *TNF- α* , *IL-1 β* , *IL-10*, *CD206* a été évaluée (détails des amorces en annexe I).

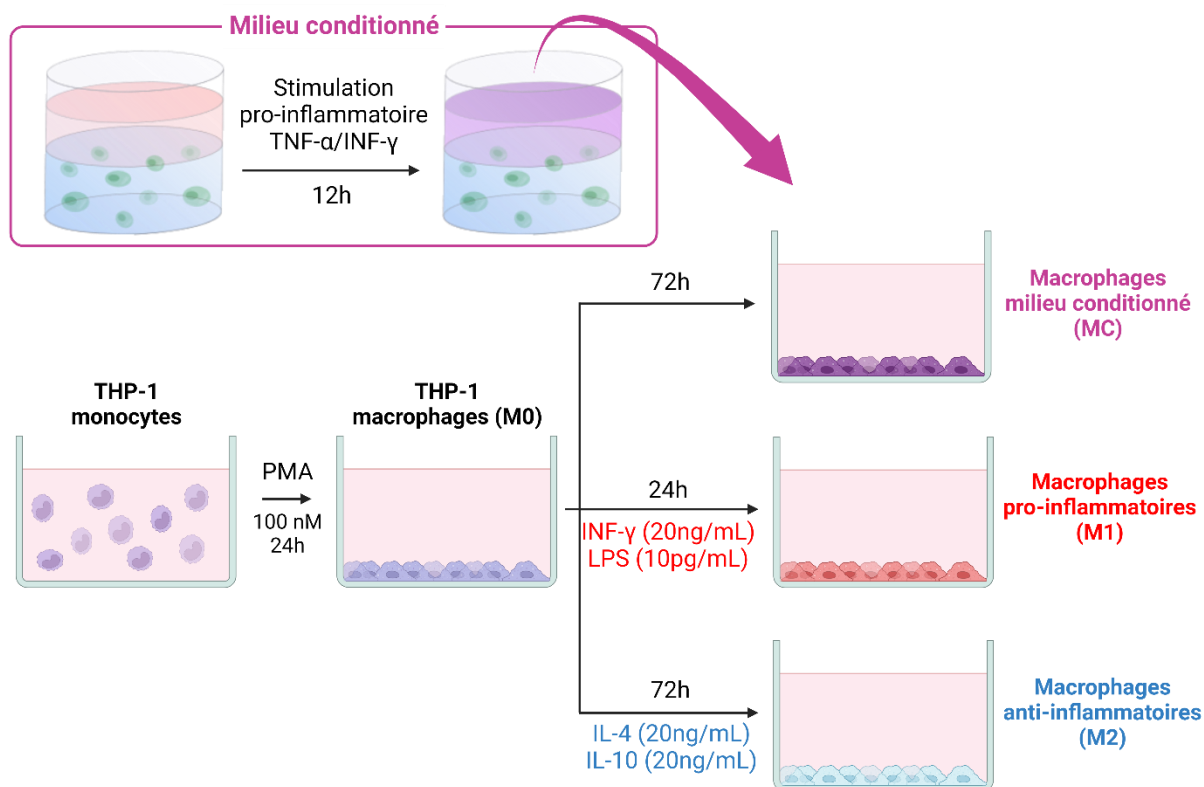


Figure 15 : Protocole de différenciation des macrophages.

2.3 Analyse statistique

Tous les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm écart type. L'analyse statistique a été effectuée grâce au logiciel GraphPad. Les différences statistiques ont été évaluées par test de Student.

3. Résultats et discussion

3.1 Influence des interactions cellules-matériaux sur la sécrétion des CSMs en conditions pro-inflammatoires

Cette étude avait pour but d'évaluer l'influence des interactions cellules-matériaux sur la sécrétion des hASCs en conditions pro-inflammatoires, et notamment sur la sécrétion de facteurs potentiellement « anti-arthrosique ». Pour cela, nous avons utilisé la plateforme d'hydrogels nouvellement développée afin d'étudier l'influence de la viscoélasticité, du module d'élasticité G' , de la nature du polymère, et de la présence du peptide HAVDI sur la

sécrétion d'IDO, de PGE2, des IL-4, -6, -10, et -13, de HGF, de bFGF, et de THBS. Cependant, pour des raisons techniques, les concentrations en IL-4, IL-6 et IL-13 n'ont pas pu être évaluées et ne seront donc pas rapportées dans ce manuscrit.

3.1.1 Influence de la viscoélasticité

Afin d'évaluer l'influence de la viscoélasticité, des hASCs ont été encapsulées dans un hydrogel d'AH élastique (réticulé par la réaction SPAAC) ou un hydrogel d'AH viscoélastique (réticulé par la formation de liaisons esters de boronate); tous deux présentant des modules d'élasticité G' proches (respectivement de 890 ± 17 Pa et 1035 ± 73 Pa) (Figure 16a).

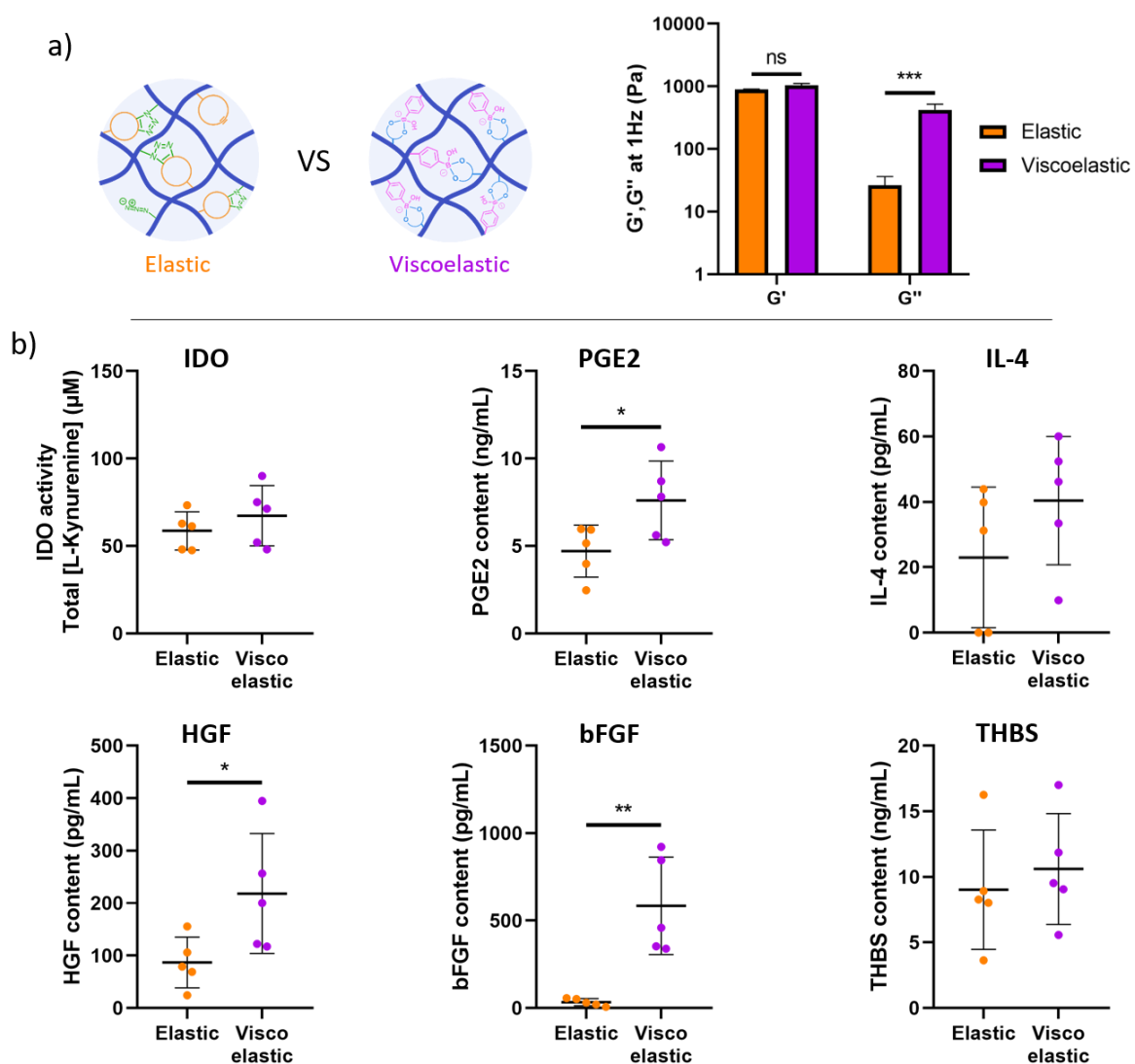


Figure 16 : Influence de la viscoélasticité sur les propriétés de sécrétion des hASCs.

a) Comparaison entre un hydrogel élastique et viscoélastique présentant des modules d'élasticité G' proches. b) Dosage de l'activité IDO, et de la concentration de PGE2, IL-4, HGF, bFGF, THBS dans le surnageant de culture. Les données sont présentées sous la forme de moyenne \pm écart type (N=5) avec une différence statistique déterminée par un test de Student (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

Suite à la stimulation pro-inflammatoire des hASCs encapsulées, les résultats ont montré une activité IDO et une sécrétion de THBS comparables pour les hydrogels élastiques et viscoélastiques. Une légère augmentation de la sécrétion d'IL-4 a été constatée avec l'hydrogel viscoélastique, cependant celle-ci n'est pas significative. Enfin, nos résultats ont montré une augmentation significative de la sécrétion de PGE2, HGF et bFGF lorsque les hASCs ont été encapsulées dans un hydrogel viscoélastique en comparaison à un hydrogel purement élastique (Figure 16b). Ces résultats sont en accord avec les quelques travaux rapportés dans la littérature, où il a été montré que la viscoélasticité tend à augmenter la sécrétion de facteurs par des CSMs.^[164,165] En particulier, Vining et al. ont comparé l'influence d'hydrogels élastiques et viscoélastiques (avec des modules d'élasticité G' comparables) sur la sécrétion de PGE2, et sur l'expression des gènes *cyclooxygenase-2 (COX-2)* et *TNF-inducible gene-6 (TSG-6)*.^[165] En encapsulant les CSMs dans l'hydrogel viscoélastique, les auteurs ont noté une augmentation de la sécrétion de PGE2, associée à une augmentation de l'expression de *COX-2* et *TSG-6* par rapport à l'hydrogel purement élastique. Cette augmentation de l'expression génique tend à confirmer l'influence de la viscoélasticité sur les capacités de sécrétion des cellules. Ainsi nos résultats observés ne peuvent pas être uniquement attribués à des propriétés de diffusion distinctes induite par l'utilisation de mécanismes de réticulation différents.

3.1.2 Influence du module d'élasticité G'

L'influence du module d'élasticité G' a ensuite été évaluée en encapsulant les cellules dans deux hydrogels d'AH viscoélastiques présentant des modules d'élasticité distincts, de 132 ± 12 Pa and 1035 ± 73 Pa (Figure 17a), Les deux hydrogels ont été nommés « mou » et « dur ».

Hormis une légère augmentation (non significative) de la sécrétion de PGE2 et bFGF avec l'hydrogel « dur », nous n'avons pas constaté de différence majeure de sécrétion entre les deux hydrogels (Figure 17b). De la même façon, nous n'avons pas observé de différence entre des hydrogels élastiques d'une rigidité de 1 kPa et 5 kPa (cf. article II – Chapitre 2 – partie 2). Cependant, il a été rapporté dans la littérature qu'augmenter le module élastique G' d'un hydrogel viscoélastique de 2 à 35 kPa permettait d'augmenter l'expression de gènes impliqués dans l'immunomodulation (i.e., *TSG-6*, *IL-6*, *IL-8*).^[166] Il a aussi été montré que les CSMs sécrétaient plus de PGE2 lorsqu'elles étaient encapsulées dans un hydrogel viscoélastique présentant un module d'élasticité de 2.5 kPa plutôt que dans un hydrogel de 0.25 kPa.^[165] Ces

résultats suggèrent donc que le module d'élasticité a une influence sur la sécrétion des CSMs. Ainsi, l'absence de différence observée pourrait être le résultat d'une gamme de modules G' trop restreinte.

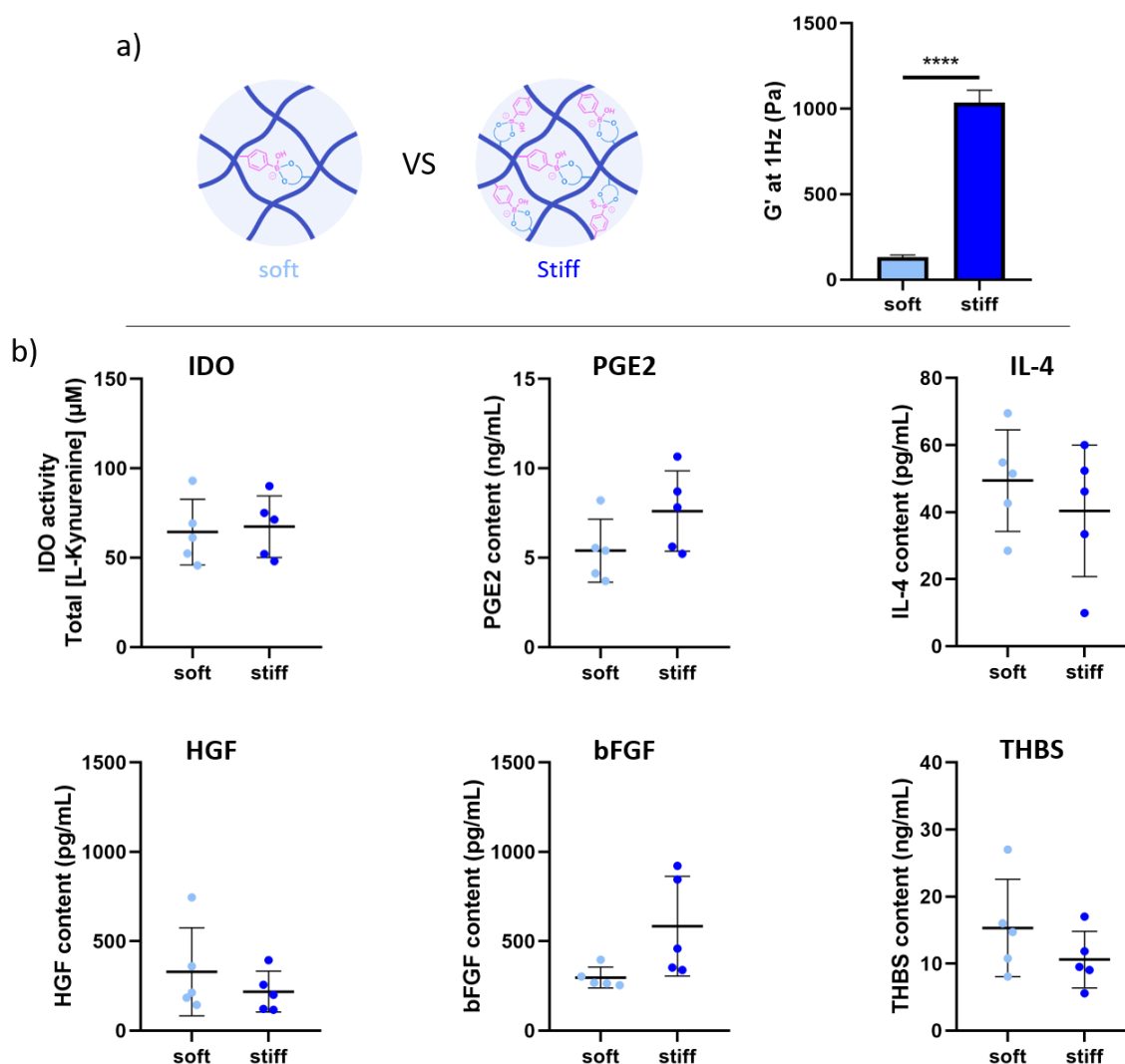


Figure 17 : Influence du module d'élasticité G' sur le sécrétome des hASCs.

a) Comparaison entre deux hydrogels viscoélastiques « mou » et « dur » présentant des modules d'élasticité G' respectivement de 132 ± 12 Pa et 1035 ± 73 Pa. b) Dosage de l'activité IDO, et de la concentration de PGE2, IL-4, HGF, bFGF, THBS dans le surnageant de culture. Les données sont présentées sous la forme de moyenne \pm écart type (N=5) avec une différence statistique déterminée par un test de Student.

3.1.3 Influence de la nature du polymère

Lors de notre précédente étude utilisant les hydrogels à base de SPAAC, nous avons montré que, en comparaison à l'alginate, l'AH permettait de favoriser la sécrétion d'IDO, de PGE2 et d'IL-6 par les hASCs (cf. article II – Chapitre 2 – partie 2). Dans l'objectif de confirmer un effet de l'AH sur la sécrétion des hASCs, nous avons évalué la sécrétion d'hASCs encapsulées dans

des hydrogels viscoélastiques composés d'AH ou d'alginate (Figure 18a). En encapsulant les hASCs dans un hydrogel viscoélastique à base d'AH, nous avons pu une nouvelle fois observer l'augmentation significative de la sécrétion de plusieurs cytokines (i.e., PGE2, bFGF) par rapport à un hydrogel à base d'alginate ; ainsi qu'une tendance à l'augmentation de la sécrétion d'HGF (Figure 18b). Ces données viennent confirmer nos précédents travaux sur l'effet de l'AH sur la sécrétion des hASCs.

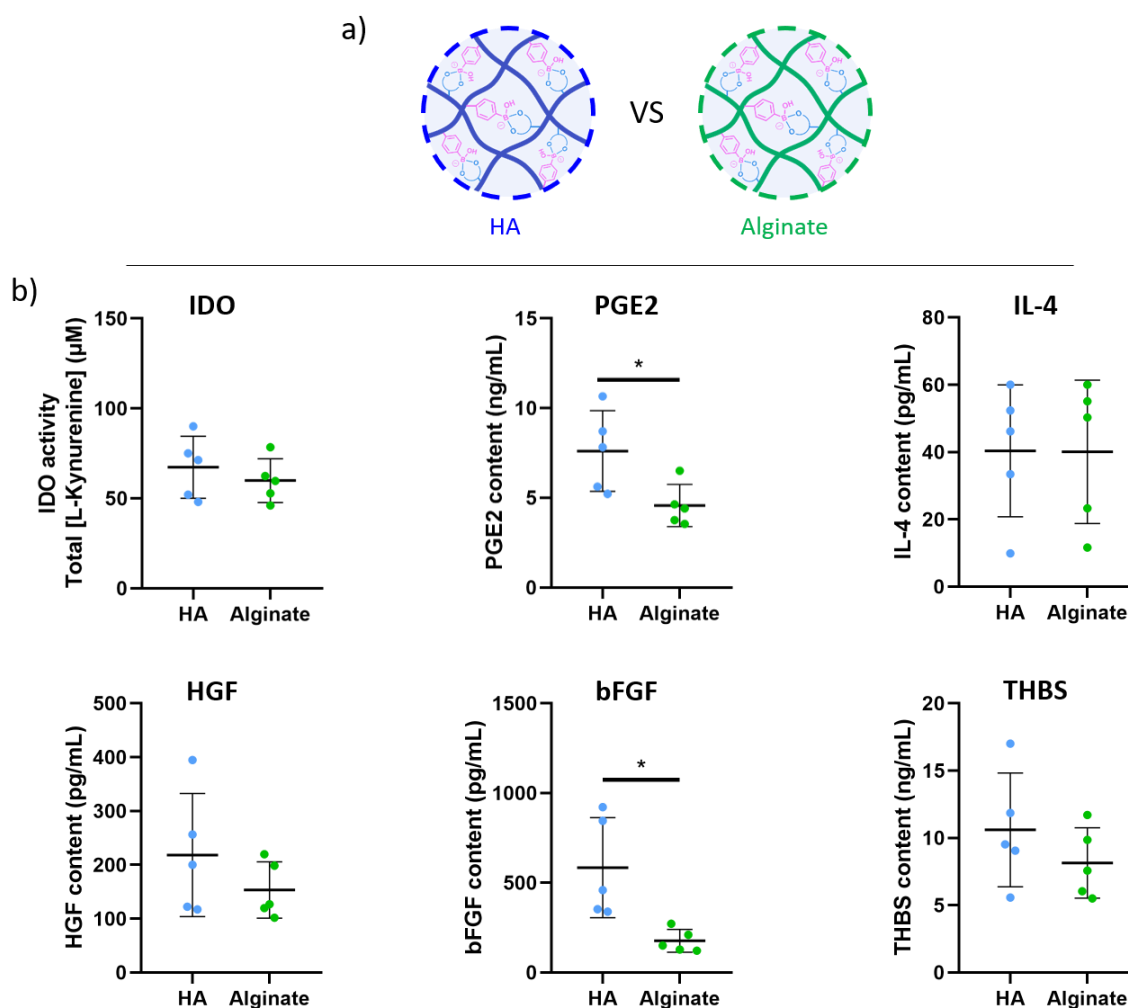


Figure 18 : Influence de la nature du polymère sur le sécrétome des hASCs.

a) Comparaison entre un hydrogel viscoélastique (produit par formation d'esters de boronate) à base d'AH ou d'alginate. b) Dosage de l'activité IDO, et de la concentration de PGE2, IL-4, HGF, bFGF, THBS dans le surnageant de culture. Les données sont présentées sous la forme de moyenne \pm écart type (N=5) avec une différence statistique déterminée par un test de Student (* $p < 0.05$).

3.1.4 Influence du peptide HAVDI

Enfin, nous avons évalué l'influence de l'immobilisation du peptide HAVDI dans un hydrogel d'AH viscoélastique sur la sécrétion des hASCs. Ce peptide, dérivé de la N-cadhérine, permet de mimer les interactions cellules-cellules. Deux précédentes études ont mis en évidence

l'intérêt de ce peptide pour augmenter la sécrétion de nombreuses cytokines.^[167,168] Cependant, dans notre étude, nous n'avons pas observé de différence suite au greffage chimique du peptide HAVDI dans l'hydrogel (Figure 19). Cette absence de différence a été observée pour les deux hydrogels d'AH viscoélastiques « mou » et « dur », et pourrait être due à une absence d'effet spécifique sur les cytokines étudiées. En effet, bien que les précédentes études aient analysé un large éventail de cytokines, cette gamme ne comportait pas nos cytokines d'intérêts. A l'avenir, une analyse plus exhaustive des facteurs sécrétés par les hASCs pourraient permettre de corroborer les résultats décrits dans la littérature.

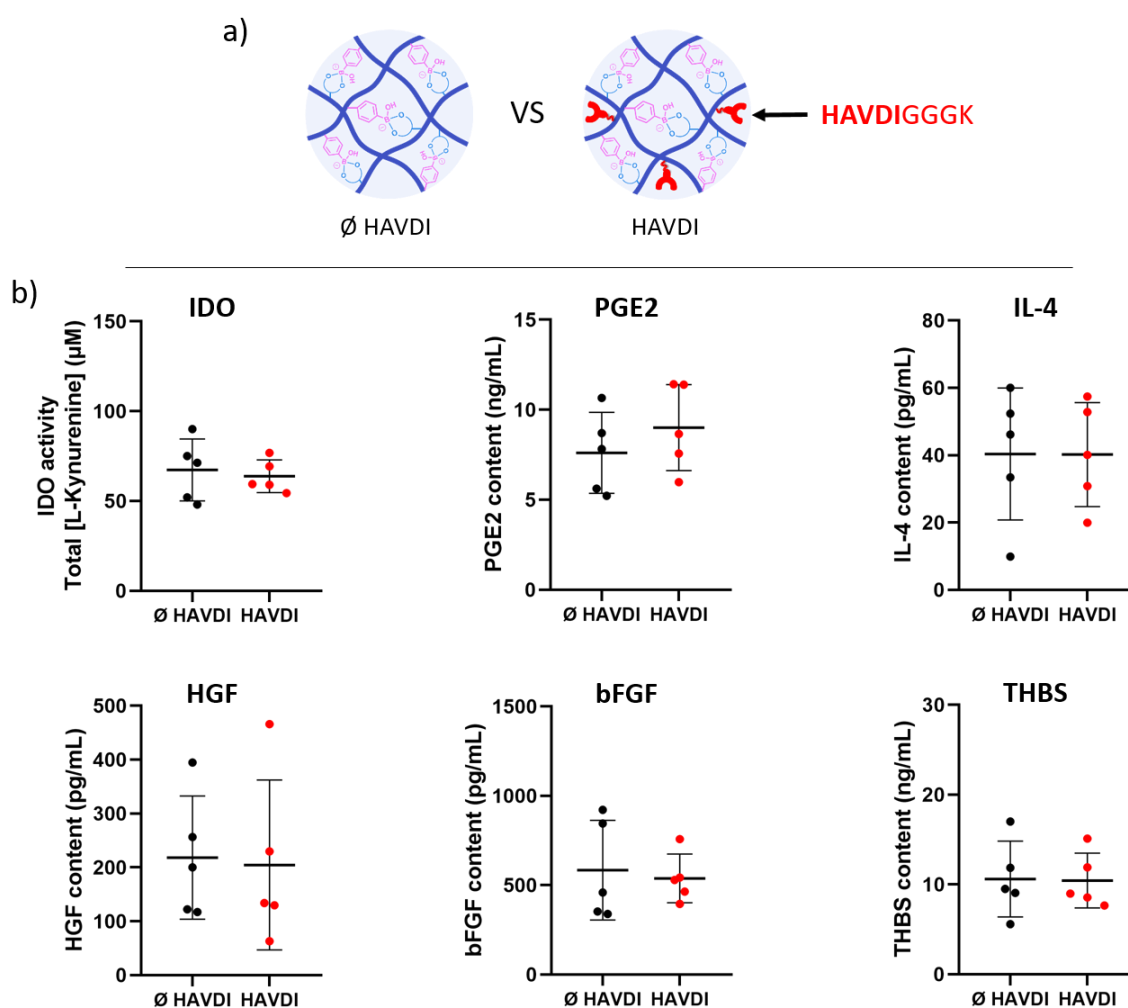


Figure 19 : Influence de l'immobilisation du peptide HAVDI sur le sécrétome des hASCs.

a) Comparaison entre un hydrogel viscoélastique (produit par formation d'esters de boronate) contenant ou non un peptide HAVDI. b) Dosage de l'activité IDO, et de la concentration de PGE2, IL-4, HGF, bFGF, THBS dans le surnageant de culture. Les données sont présentées sous la forme de moyenne \pm écart type (N=5) avec une différence statistique déterminée par un test de Student.

L'étude des interactions cellules-matériaux a permis de mettre en évidence le rôle de la viscoélasticité et de la présence d'AH pour l'augmentation des propriétés de sécrétion des

hASCs. De plus, même si nos résultats ne montrent pas ou peu d'effet du module d'élasticité et du peptide HAVDI sur les cytokines étudiées, la littérature suggère leur influence pour l'augmentation de la sécrétion d'autres facteurs d'intérêts (e.g., IL-10, insulin-like growth factor [IGF]-1).^[167,168] Ainsi, l'hydrogel d'AH viscoélastique « dur » avec HAVDI nous semble être l'hydrogel le plus pertinent pour augmenter les propriétés de sécrétion des hASCs et a donc été utilisé pour l'étude de l'influence du sécrétome sur les macrophages.

3.2 Influence du sécrétome des hASCs encapsulées sur les macrophages

Il a été montré que la polarisation de macrophages (M0) en macrophages anti-inflammatoires (M2) favorise la régénération des tissus et l'atténuation de l'inflammation.^[40,158] L'inflammation représentant une part importante du processus pathologique de l'arthrose, et favoriser la polarisation des macrophages vers un phénotype de type M2 constitue un élément important de la stratégie thérapeutique. Dans cette optique, une étude préliminaire a été mise en place afin d'évaluer l'effet du sécrétome d'hASCs encapsulées dans un hydrogel sur la polarisation de macrophages.

Dans cette étude, l'expression de 5 gènes a été évaluée : 3 gènes pro-inflammatoires, i.e., *IL-6*, *TNF- α* , *IL-1 β* , et 2 gènes anti-inflammatoires, i.e., *IL-10*, *CD206*. Cultivés en présence de cytokines pro-inflammatoires (i.e., INF- γ , LPS), nous avons observé une augmentation de l'expression des gènes pro-inflammatoires par les macrophages M0, confirmant la polarisation des macrophages vers un type M1 comme attendu (Figure 20). Au contraire, lorsque les macrophages M0 ont été cultivés avec des cytokines anti-inflammatoires (i.e., IL-4, IL-10), ils exprimaient faiblement ces gènes pro-inflammatoires et plus fortement les gènes anti-inflammatoires, suggérant un phénotype de type M2.

En parallèle de ces contrôles, les macrophages cultivés en présence de MC ont montré de faibles niveaux d'expressions d'*IL-6*, de *TNF- α* , d'*IL-1 β* et de *CD206*, mais une forte expression d'*IL-10*. Cette faible expression de gènes pro-inflammatoires et la forte expression d'un gène anti-inflammatoire tendent à montrer que le sécrétome des hASCs favoriserait la polarisation des macrophages vers le phénotype M2. Cependant, contrairement au contrôle M2, les macrophages cultivés en présence de MC ont faiblement exprimé *CD206*. *CD206* est un marqueur de surface caractéristique de macrophages M2 matures.^[169] Ainsi, les macrophages

en présence de MC s'orienteraient vers un phénotype M2 ayant des caractéristiques phénotypiques plus proches de leurs précurseurs monocytaires que les M2 contrôles.

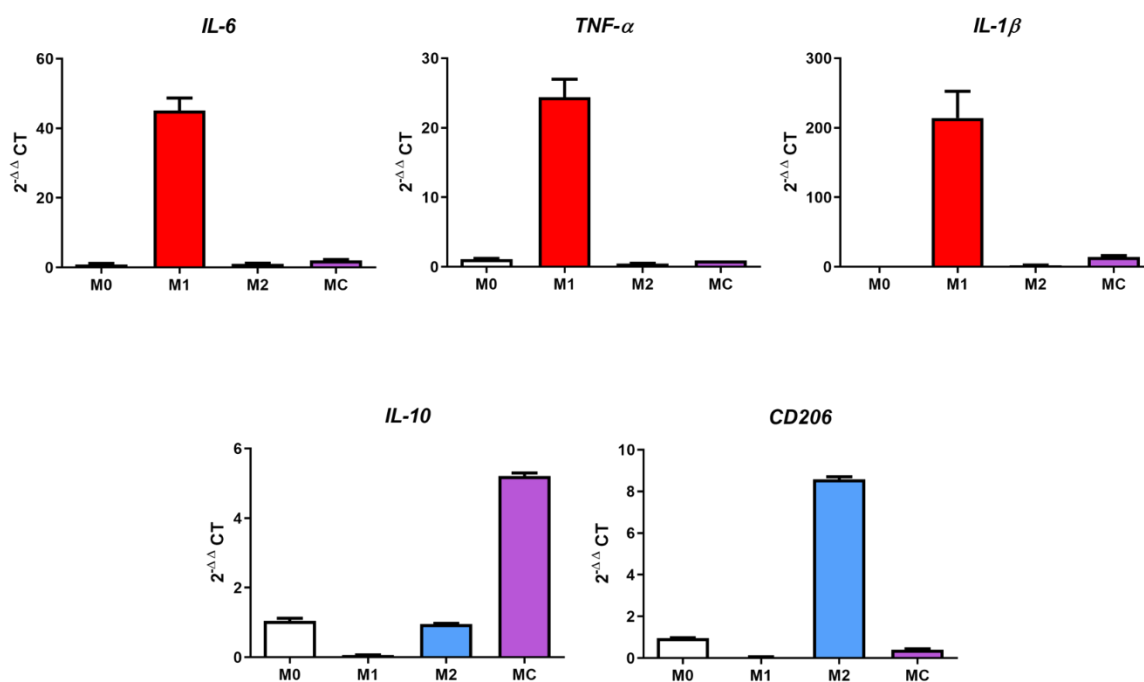


Figure 20 : Etude de l'influence du milieu conditionné sur l'expression des gènes pro-inflammatoires (i.e., IL-6, TNF-α, IL-1β) et anti-inflammatoires (i.e., IL-10, CD206) des macrophages. Les données sont présentées sous la forme de moyenne ± écart type (N=1 ; n=3).

Pour conclure, au cours de ces travaux, nous avons étudié l'influence des interactions cellules-matériaux sur la sécrétion des hASCs en conditions pro-inflammatoires, et mis en évidence le rôle de viscoélasticité et de la présence d'AH pour l'augmentation des propriétés de sécrétion des hASCs. De plus, nous avons confirmé que le sécrétome d'hASCs encapsulées dans un hydrogel viscoélastique à base d'AH permettait de favoriser la polarisation de macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire. Ces résultats suggèrent donc qu'il est important de développer des hydrogels avec des propriétés mécaniques et biochimiques adéquates pour améliorer le potentiel thérapeutique des CSMs. En plus de contrôler les interactions-cellules, d'autres critères de conception d'hydrogels apparaissent essentiels pour l'amélioration de la thérapie cellulaire de l'arthrose et seront développés dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 4 : EVALUATION DE L'INJECTABILITE ET DE LA STABILITE IN VIVO DES HYDROGELS

1. Rationnel et objectifs des études

Dans la perspective du développement d'une thérapie cellulaire intra-articulaire assistée par un hydrogel, l'injectabilité et la stabilité de l'hydrogel utilisé sont deux paramètres importants à évaluer. En effet, l'hydrogel doit être injectable pour permettre des interventions peu invasives. De plus, un hydrogel stable à long terme in vivo est souhaitable pour éviter la répétition des injections et éventuellement prolonger l'efficacité du traitement. Dans le cas spécifique d'une injection intra-articulaire, cette stabilité doit notamment se manifester par une résistance aux cytokines pro-inflammatoires, aux enzymes, et aux dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) présents dans le liquide synovial des patients arthrosiques.

En raison du caractère dynamique de leurs nœuds de réticulation, les hydrogels à base d'esters de boronate développés au cours de mon doctorat pouvaient être injectables. Dans ce contexte, deux hydrogels à base d'esters de boronate nommé « mou » et « dur », nous ont semblés être de bons candidats pour l'amélioration de la thérapie cellulaire assistée par un hydrogel. De plus, ces deux formulations ont été optimisées pour être stables et présenter un gonflement minimal in vitro. Ainsi, nous avons dans un premier temps évalué leur injectabilité. Nous avons ensuite examiné leur stabilité en présence de liquide synoviale d'un patient arthrosique. Enfin, dans le but d'évaluer leur stabilité in vivo, une expérience de suivi de la stabilité in vivo a été menée avec des hydrogels injectés en sous-cutané chez la souris.

2. Partie expérimentale

2.1 Evaluation de l'injectabilité

Deux hydrogels viscoélastiques à base d'esters de boronate ont été sélectionnés en raison de leur stabilité et leur gonflement minimal in vitro. Le premier hydrogel, nommé « mou », est formé en mélangeant 1% (w/v) 300 kDa AH-wPBA 24% (dissous dans du PBS) avec 1% (w/v) 300 kDa AH-glucamine 52% dans un ratio molaire (wPBA:glucamine) 1:1. Le second hydrogel, nommé « dur », est formé en mélangeant 2.5% (w/v) 100 kDa AH-wPBA 40% (dissous dans du PBS) avec 1% (w/v) 100 kDa AH-glucamine 52% dans un ratio molaire (wPBA:glucamine) 1:1. L'injectabilité de ces hydrogels a été évaluée en transférant 500 μ L d'hydrogels dans une seringue de 1 mL, et en mesurant la force maximale d'injection à travers une aiguille 26G. Ces analyses ont été réalisées à une vitesse de 2mm.s⁻¹ avec un testeur mécanique TAHD+ équipé d'une cellule de force de 5 kg.

2.2 Stabilité en présence de liquide synoviale d'un patient arthrosique

La stabilité des hydrogels a été étudiée en adaptant un protocole déjà publié.^[96] Brièvement, 200 μL d'hydrogels mou (voir ci-dessus) ont été formés dans des tubes Eppendorf pré-pesés et laissés durant 12 heures à 37 °C. Après ce temps d'incubation, les tubes contenant les hydrogels ont été pesés, et 250 μL de liquide synovial provenant d'un patient arthrosique ont ensuite été ajoutés. A différents temps (0, 1, 2, 4, 8 heures ; puis 1, 3 et 7 jours) le surnageant a été retiré, et les tubes ont été pesés. La masse relative correspond au rapport entre la masse de l'hydrogel à un instant donné et sa masse initiale.

2.3 Stabilité des hydrogels en sous-cutané chez la souris

La stabilité des hydrogels en sous-cutané a été mesurée par suivi de fluorescence in vivo, en collaboration avec la société Kaer Labs, grâce à leur Kaer Imaging System. Pour cela, les précurseurs d'hydrogels ont été fonctionnalisés par un fluorophore (Alexa Fluor™ 647) selon le protocole décrit dans les articles II et III du Chapitre 2. Dans cette étude, la stabilité de 3 types d'hydrogels a été étudiée : l'hydrogel mou, l'hydrogel dur, et un hydrogel SPAAC (1% [w/v] 100 kDa AH-BCN 15%/100 kDa AH-N₃ 40%, ratio molaire 1:4 [BCN:N₃]) servant d'hydrogel covalent contrôle. Deux autres contrôles ont également été injectés : le fluorophore en solution (PBS), et le fluorophore greffé sur un 100 kDa AH non réticulé (AH solution). 200 μL d'hydrogels (ou de solution) ont été injectés chez des souris femelles SWISS âgées de 10 semaines, en accord avec les autorités avec les comités d'éthiques (2021102516108117/APAFIS 33591). A différents temps (0, 1, 3, 7, 14, 21, 28 jours), les souris ont été anesthésiées, et la fluorescence des hydrogels a été mesurée. Le suivi de la fluorescence a été effectué sur les mêmes animaux (N = 4) tout au long de l'étude, en déterminant une région d'intérêt d'un diamètre similaire pour l'ensemble des animaux.

A la suite du suivi de fluorescence in vivo, les hydrogels mous et durs ont été explantés et leur module d'élasticité a été évalué par rhéologie oscillatoire. Les hydrogels SPAAC ont également explantés et leur rigidité a été déterminée par des tests de compression.

2.4 Analyse statistique

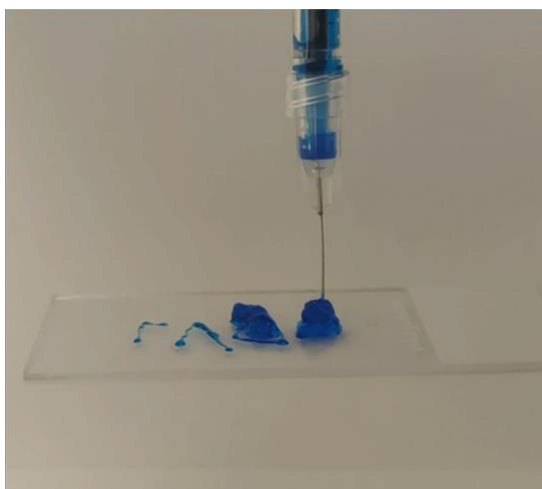
Tous les résultats sont présentés sous la forme d'une moyenne \pm écart type. L'analyse statistique a été effectuée grâce au logiciel GraphPad. Les différences statistiques ont été évaluées par test de Student.

3. Résultats et discussion

3.1 Injectabilité des hydrogels

Afin de réaliser des interventions peu invasives, il est important que les hydrogels puissent facilement être injectés par le clinicien. Pour cela, nous avons évalué l'injectabilité de deux formulations d'hydrogels : mou et dur. Une première expérience qualitative nous a permis de confirmer que les hydrogels mous et durs peuvent être injectés manuellement à travers une aiguille de 26G (Figure 21a). Afin de compléter cette observation, nous avons évalué la force maximale d'injection à travers une aiguille de 26G. Nos expériences ont révélé une force maximale de 11 ± 0.6 N et de 46 ± 13 N, respectivement pour l'hydrogel mou et l'hydrogel dur (Figure 21b). Pour pouvoir injecter facilement des hydrogels à travers une aiguille, leur force maximale d'injection doit se situer sous la force d'injection manuelle, comprise entre 40 et 60 N selon les individus.^[170] Ainsi, bien que la force maximale d'injection de l'hydrogel dur soit relativement élevée, ces résultats confirment le caractère injectable des deux hydrogels dynamiques covalents.

a)



b)

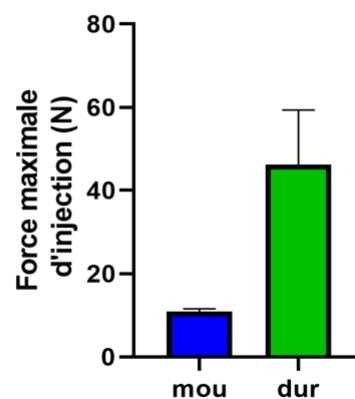


Figure 21 : Injectabilité des hydrogels à base d'esters de boronate.

a) Image montrant l'injection manuelle de l'hydrogel dur. b) Force maximale d'injections des hydrogels mou et dur à travers une aiguille de 26G. Les données sont présentées sous la forme de moyenne \pm écart type ($n=3$).

3.2 Stabilité des hydrogels en présence de liquide synoviale d'un patient arthrosique

Dans le cas d'une injection intra-articulaire, l'hydrogel est en contact avec du liquide synovial. Nous avons donc voulu comparer la stabilité de nos hydrogels injectables en présence de PBS

et de liquide synovial de patient arthrosique. En raison de la faible quantité de liquide synovial disponible, seule la stabilité de l'hydrogel mou a été étudiée. En présence de liquide synovial, l'hydrogel mou a montré une stabilité et un gonflement similaire au contrôle de stabilité dans le PBS (Figure 22). Certaines études ont notamment rapporté que les acides boroniques étaient sensibles aux ROS (présents dans le liquide synovial), pouvant entraîner la dégradation des hydrogels à base d'esters de boronate.^[171-173] Nos résultats ont cependant montré que les propriétés physico-chimiques de l'hydrogel n'ont pas été altérées en présence de liquide synovial d'un patient arthrosique. Ces résultats prometteurs devront être répétés avec du liquide synovial provenant de différents patients arthrosiques. En effet, l'arthrose étant une maladie multifactorielle avec une grande variabilité inter-individuelle, la composition du liquide synovial peut grandement varier.

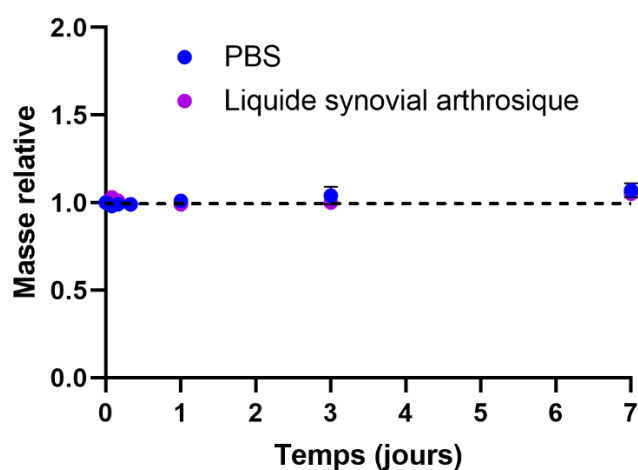


Figure 22 : Etude de la stabilité d'un hydrogel à base d'esters de boronate (hydrogel mou) en présence de liquide synovial d'un patient arthrosique.

Les données sont présentées sous la forme de moyenne \pm écart type (n=3).

3.3 Stabilité des hydrogels in vivo

Après avoir évalué la stabilité des hydrogels in vitro, nous avons étudié la stabilité des hydrogels mous et durs in vivo. Nous avons choisi d'utiliser une technique de suivi par fluorescence, étant donné que c'est une méthode peu onéreuse et facile à mettre en place contrairement à d'autres techniques d'imagerie in vivo comme l'IRM. Pour cela, nous avons injecté les hydrogels modifiés par un fluorophore en sous-cutané au niveau du dos de souris SWISS, et suivi leur stabilité en mesurant leur intensité de fluorescence au cours du temps (Figure 23a, b). Un hydrogel d'AH élastique (SPAAC) a été choisi comme contrôle d'hydrogel stable in vivo.^[170] La stabilité des hydrogels a aussi été comparée au fluorophore en solution

(PBS) et au fluorophore greffé sur de l'AH (AH solution). Nous avons observé une diminution très rapide de l'intensité de fluorescence des contrôles PBS et AH solution, suggérant une diffusion et une élimination rapide du fluorophore et du polymère en solution (Figure 23c). A l'inverse, l'intensité de fluorescence des 3 formulations d'hydrogels (i.e., mou, dur, SPAAC) est restée constante tout au long de l'étude, comme indiqué par des valeurs d'intensité non significativement différentes de celle à J0. Le maintien de la fluorescence démontre indirectement la stabilité des hydrogels en sous-cutané pendant au moins 28 jours.

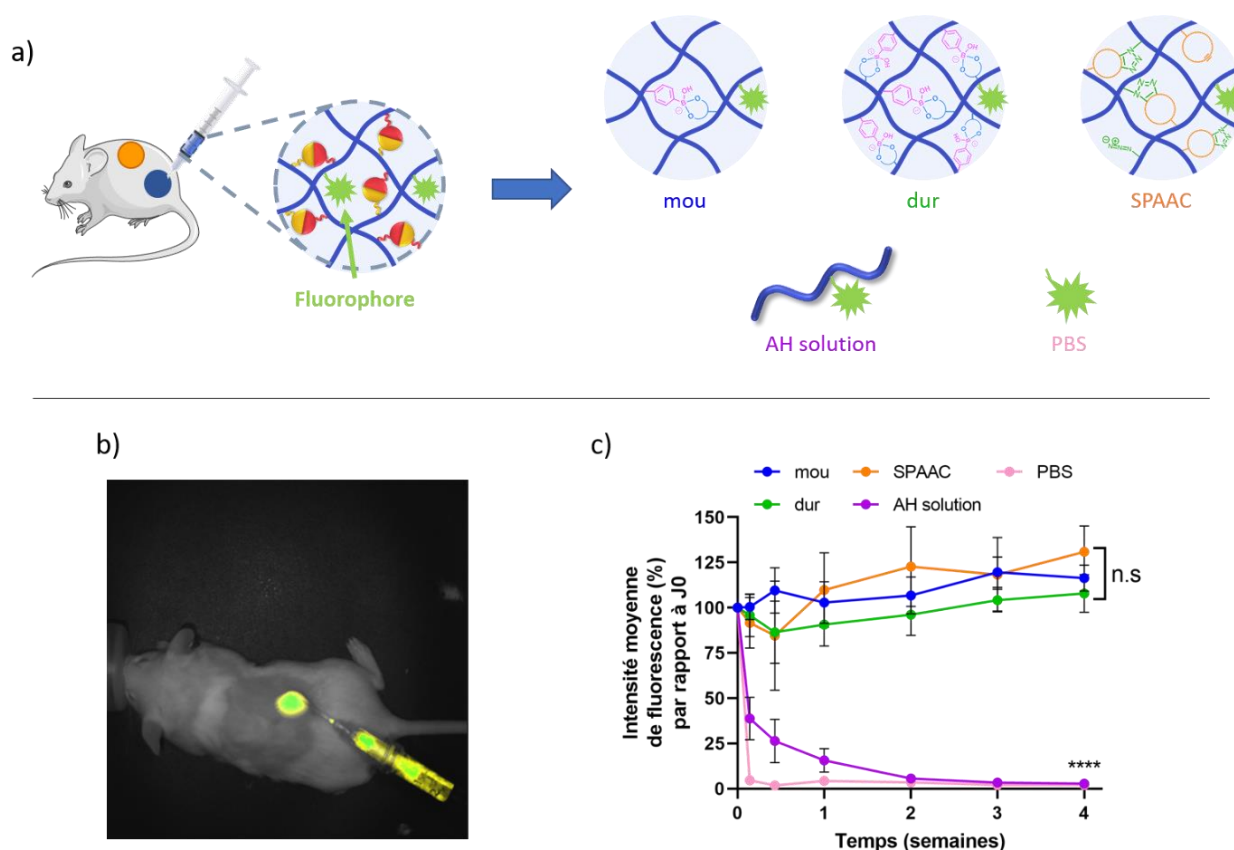


Figure 23 : Suivi de la stabilité des hydrogels in vivo.

a) Injection en sous-cutané d'hydrogels fonctionnalisés par un fluorophore (647 nm). b) Suivi en temps réel de la fluorescence. c) Intensité moyenne de fluorescence au cours du temps. Les données sont présentées sous la forme de moyenne \pm écart type (N=4) avec une différence statistique déterminé par une ANOVA à 2 facteurs (**** $p < 0.0001$).

Pour compléter cette étude, les hydrogels ont été explantés en fin d'expérimentation animale afin de caractériser leurs propriétés mécaniques. Nous avons observé un maintien du module d'élasticité de l'hydrogel mou au cours de l'étude et une légère augmentation du module d'élasticité de l'hydrogel dur explanté après 7 jours (Figure 24). De nouvelles expériences ont montré que l'augmentation du module d'élasticité G' de l'hydrogel dur à long terme est aussi observée sur des hydrogels non-injectés, et peut être attribuée à un long temps de

stabilisation du réseau (annexe 2). La rigidité des hydrogels du contrôle SPAAC est restée constante tout au long de l'expérimentation.

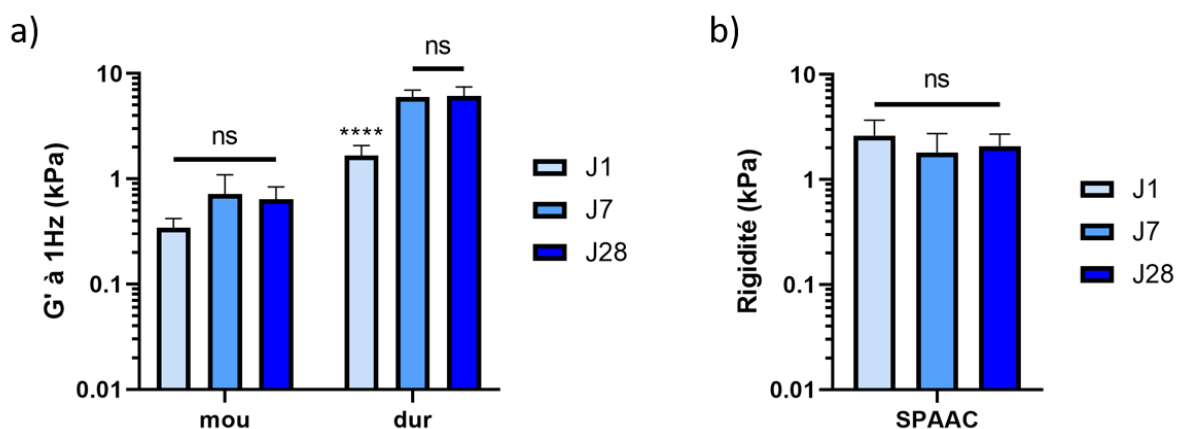


Figure 24 : Caractérisation mécanique des hydrogels implantés en sous-cutané.

*a) Module d'élasticité des hydrogels mous et durs au cours du temps. b) Rigidité des hydrogels SPAAC au cours du temps. Les données sont présentées sous la forme de moyenne \pm écart type (N=5) avec une différence statistique déterminé par une ANOVA à 2 facteurs (**** $p < 0.0001$).*

Ensemble, le maintien de la fluorescence in vivo et le maintien des propriétés élastiques au cours du temps suggèrent que les hydrogels sont stables après injection en sous-cutané. Cette étude a été réalisée en sous-cutané pour des raisons pratiques. Cependant, les résultats ne fournissent pas d'informations directes quant à la stabilité des hydrogels après injection dans une articulation arthrosique, là où les contraintes de compression et de cisaillement sont plus importantes. Dans cette optique, nous avons mis en place une expérience préliminaire de suivi d'hydrogels par fluorescence dans une articulation de lapin. Ainsi deux hydrogels ont été injectés en intra-articulaire chez le lapin. Malheureusement, la grande variabilité des résultats après 3 jours ne nous a pas permis de conclure. Des phénomènes d'auto-fluorescence de l'os ont aussi été observés, compliquant les mesures. Néanmoins, bien que cette expérience doive être reconduite et optimisée, le suivi de fluorescence in vivo constitue une méthode intéressante pour étudier la stabilité d'hydrogels en intra-articulaire de manière non létale.

Suite à l'évaluation de la stabilité des hydrogels, les animaux ont été sacrifiés et les tissus explantés pour une analyse histologique de l'inflammation et de la réponse immunitaire suite à l'implantation des hydrogels. L'évaluation de l'épaisseur de la capsule fibreuse et de la densité cellulaire autour de l'hydrogel (par coloration au bleu alcian et à l'hématoxyline/éosine/safran) est en cours.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION GENERALE

1. Considérations sur la plateforme d'hydrogels

Pour ce projet, nous avons pour ambition de développer une plateforme d'hydrogels permettant la culture cellulaire pendant plusieurs mois, et présentant des propriétés mécaniques et biochimiques ajustables.

Pour ce projet, les choix de stratégies de synthèse ont été guidés par une volonté de simplicité et d'accessibilité de conception et d'utilisation. Afin de faciliter la conception de nos hydrogels, nous avons principalement choisi des molécules disponibles commercialement, associées à des conditions de réaction/purification/stérilisation simples. Les hydrogels développés ont été obtenus en fonctionnalisant un polysaccharide (principalement de l'AH) par des molécules réactives via une réaction en une seule étape. Cette réaction se déroule en conditions douces (i.e., eau à température ambiante) et en évitant l'utilisation de solvants organiques. De même, la purification des précurseurs d'hydrogels a été réalisée dans des conditions respectant ces principes de chimie verte. Grâce à cette stratégie de fonctionnalisation nous avons pu obtenir de précurseurs de façon très reproductible. L'accès à une méthode simple de stérilisation est essentiel à l'utilisation des hydrogels pour la culture 3D et la délivrance de cellules. Pour cette raison, nous nous sommes limités délibérément à des polymères possédant une masse molaire inférieure à 700 kDa, permettant la stérilisation par filtration des précurseurs d'hydrogels à la suite de la purification.

La plupart des précurseurs synthétisés ont présenté une bonne stabilité, pouvant être utilisés plus de 6 mois après leur synthèse en les stockant à -20 °C. Seuls les polymères fonctionnalisés par le BCN ont présenté des problèmes de stabilité, nécessitant un stockage à -80 °C pour une utilisation limitées à 6 mois.^[174] Cette faible stabilité est probablement due à la capacité des cyclooctynes à autopolymériser.^[175] A l'avenir, le développement de cyclooctynes réactives et stables sera indispensable pour l'industrialisation des hydrogels de SPAAC.

Concernant les hydrogels à base d'esters de boronate, leur formation quasi-instantanée peut limiter leur accessibilité. En effet, la gélification de ces hydrogels se produit en une dizaine de secondes et nécessite une certaine expérience pour éviter la formation de bulles et obtenir un hydrogel homogène. Afin de contrôler leur formation et faciliter leur utilisation, des groupements protecteurs sensibles à certaines radiations lumineuses pourraient être utilisés.^[176,177] Ceux-ci empêcheraient la réaction de réticulation en l'absence de lumière

spécifique, et permettrait de contrôler la formation des hydrogels. Cette stratégie simplifierait donc l'utilisation des hydrogels au dépend de leur simplicité de synthèse.

Pour de nombreuses applications biomédicales, il est aujourd'hui admis que l'utilisation d'hydrogels réticulés par des réactions clicks et bioorthogonales est essentielle. L'utilisation de telles réactions nous a d'ailleurs permis d'obtenir une viabilité cellulaire importante (> 95%) après 7 jours de culture au sein de nos hydrogels.

Dans le cadre de la ligation chimique, les critères des réactions clicks et bioorthogonales ont été définis par Sharpless et Bertozzi. Dans le domaine de la conception d'hydrogels, ces critères peuvent varier selon l'interprétation des chercheurs. Par exemple, les réactions dynamiques covalentes sont parfois qualifiées de clicks mais leur réversibilité est contradictoire avec les critères énoncés par Sharpless.^[178] De plus, certaines réactions de réticulation (e.g., thiol-ène, bases de Schiff) sont régulièrement qualifiées de bioorthogonales par certains malgré leurs possibles interactions avec des composants présents dans le milieu biologique.^[179] Il serait alors intéressant de redéfinir les critères de réactions clicks et bioorthogonales pour le domaine de la conception d'hydrogels. Selon moi, une réaction click et bioorthogonale pour la synthèse d'hydrogels doit présenter les caractéristiques suivantes :

- Un mécanisme de réaction $A + B \rightarrow C$ (valable pour une réaction dynamique covalente)
- Réaction en conditions physiologiques
- Absence de catalyseur
- Stéréospécificité
- Efficacité de la réaction
- Stabilité des précurseurs en conditions physiologiques
- Absence de sous-produits ou alors de l'eau
- Absence d'interactions avec les processus biologiques

Parmi les réactions décrites, seule l'IEDDA, la SPAAC, et certaines interactions « host-guest » rempliraient tous les critères (subjectifs et restrictifs) de cette liste. Au vu de la très faible réactivité des dérivés d'acide boronique envers les diols présents dans le milieu biologique, la formation d'esters de boronate pourrait aussi être qualifiée de chimie click et bioorthogonale. Le nombre de réactions répondants à ces critères est donc très réduit. Le développement de nouvelles réactions clicks et bioorthogonales représente donc un axe de recherche prometteur pour la conception d'hydrogels.

Bien que les hydrogels soient souvent considérés comme des biomatériaux aux propriétés modulables, ajuster leurs propriétés mécaniques et biochimiques de façon indépendante demeure un défi.

Dans ce contexte, nous avons envisagé l'utilisation de deux stratégies de réticulation distinctes pour obtenir des hydrogels aux propriétés mécaniques ajustables. La première stratégie de réticulation, la cycloaddition entre un azoture et un alcyne (SPAAC), est une stratégie de réticulation covalente permettant la formation d'hydrogels purement élastiques. Nous avons pu montrer qu'il est possible de moduler la rigidité de ces hydrogels, d'au moins 0.2 à 45 kPa, en jouant sur la densité de réticulation. Cette large gamme de rigidité couvre l'ensemble des rigidités des tissus mous.^[130] Parmi les stratégies de réticulations covalentes click couramment utilisées, seules les réactions photo-click ont permis d'obtenir des hydrogels avec une telle gamme de rigidité.^[180,181] Une réaction dynamique covalente a ensuite été envisagée comme seconde stratégie de réticulation. Celle-ci consiste en la formation réversible d'esters de boronate et a permis la production d'hydrogels viscoélastiques. Ainsi, grâce à l'optimisation de deux stratégies de réticulation, cette plateforme permet d'évaluer l'influence des propriétés mécaniques en comparant un hydrogel élastique et un hydrogel viscoélastique. Cette plateforme ne permet cependant pas encore l'étude du rôle de la viscoélasticité sur le comportement cellulaire. En effet, l'étude de son influence doit s'effectuer en faisant varier le temps de relaxation des hydrogels.^[81,114,139] Malgré un criblage de nombreuses formulations, nous n'avons pas réussi à moduler de manière importante le temps de relaxation des hydrogels à base d'esters de boronate. Dans ce sens, des travaux sont actuellement menés au laboratoire dans le but d'étendre la gamme de temps de relaxation des hydrogels à base d'esters de boronate. Pour cela, deux stratégies sont étudiées : (i) combiner la réticulation covalente SPAAC avec la réticulation dynamique covalente à base d'esters de boronate ; et (ii) utiliser un autre couple PBA/diol. Bien que préliminaires, ces travaux permettent d'entrevoir la conception d'une plateforme d'hydrogels à la viscoélasticité ajustable.

Contrairement à l'influence des propriétés mécaniques sur le comportement cellulaire, celle de la composition des hydrogels est très peu étudiée. Le manque d'informations provient probablement du manque d'outils disponibles à ce jour pour faire varier les propriétés biochimiques des hydrogels indépendamment de leurs propriétés mécaniques.

Afin d'évaluer l'influence de la nature du polymère sur les fonctions cellulaires, nous avons appliqué une même stratégie de réticulation (SPAAC pour une étude, esters de boronate pour une autre) à l'AH et l'alginate. Les hydrogels conçus à partir de ces différents polysaccharides ont par la suite été optimisés pour présenter les mêmes propriétés physiques (e.g., propriétés mécaniques, gonflement, stabilité), permettant ainsi de conclure sur la seule influence de la nature du polymère. Bien que cette stratégie n'ait été appliquée qu'à l'AH et l'alginate, elle pourrait, en théorie, être appliquée à d'autres polymères bioactifs tels que la gélatine ou les GAGs, pour la formation de nouveaux hydrogels. Il est cependant important de noter que les polymères doivent être modifiés avec une faible quantité de molécules réactives pour ne pas compromettre leurs potentielles interactions avec les cellules.^[182] Au cours de ce projet, seuls des polymères anioniques ont été étudiés. Il serait intéressant d'adapter la méthode de greffage à des polymères neutres (e.g., cellulose) ou cationiques (e.g., chitosane), permettant ainsi d'étudier l'effet de la charge du polymère sur le comportement cellulaire. Ces stratégies ont aussi pu être utilisées pour incorporer des molécules bioactives telles que des GAGs ou des peptides biomimétiques dans les hydrogels. Cependant, nous avons constaté que l'incorporation de GAGs pouvait entraîner une altération des propriétés physiques des hydrogels, notamment de leurs propriétés mécaniques et de leur stabilité/gonflement, interférant ainsi avec l'influence du polymère. Dans ce sens, l'utilisation de peptides biomimétiques devrait être privilégiée pour modifier les propriétés biochimiques d'un hydrogel sans altérer ses propriétés mécaniques.

2. Considérations sur l'intérêt des interactions cellules-matériaux

Au cours de ce travail de thèse, nous avons envisagé tirer profit des interactions cellules-matériaux pour améliorer le potentiel thérapeutique des CSMs dans le cadre de l'arthrose. Grâce à l'utilisation de notre plateforme d'hydrogels, nous avons pu étudier l'influence de la composition et des propriétés mécaniques des hydrogels sur la sécrétion des hASCs en conditions pro-inflammatoires. Malgré un criblage de nombreuses propriétés mécaniques et biochimiques, les différences de sécrétion observées restent assez faibles, et la variabilité biologique importante. Nous avons cependant confirmé le rôle de la viscoélasticité pour l'augmentation de la sécrétion de certains facteurs d'intérêts par les hASCs.^[164,165] Nous avons aussi mis en évidence l'importance de l'AH pour favoriser la sécrétion de ces mêmes facteurs. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une étude

démontre la bioactivité de l'AH sur la capacité de sécrétion des hASCs. Cette bioactivité pourrait notamment être médiée par des voies de signalisation impliquant les récepteurs de surfaces CD44 et RHAMM qui peuvent interagir avec l'AH.^[72,73] Il serait alors intéressant de bloquer ces voies de signalisation afin d'identifier les mécanismes par lesquels l'AH influence la sécrétion.

Cette étude sur l'influence des interactions cellules-matériaux présente néanmoins plusieurs limites qu'il convient de citer ici. Afin de mimer les conditions pro-inflammatoires présentes au sein d'une articulation arthrosique, les cellules ont été stimulées par du TNF- α et de l'INF- γ . Les cytokines et les concentrations utilisées in vitro sont cependant très éloignées de celles retrouvées dans un liquide synovial arthrosique. En effet, les concentrations de TNF- α et d'INF- γ dans le liquide synovial peuvent être jusqu'à 1000 fois inférieures à celles utilisées pour cette étude in vitro.^[183] De plus, ce liquide est composé de nombreuses autres cytokines (e.g., IL-1 β , chimiokines CC, chimiokines CXC) qui peuvent elles aussi stimuler les hASCs. Il pourrait ainsi être intéressant de stimuler les hASCs avec du liquide synovial de patients arthrosiques afin de mimer un environnement inflammatoire plus proche de celui d'une articulation arthrosique.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la sécrétion d'IDO, PGE2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, HGF, bFGF et THBS. Bien qu'importante, cette gamme de cytokines étudiée pourrait encore être complétée avec d'autres facteurs d'intérêts dans le contexte de l'arthrose (e.g., TSG-6, IGF-1). Elle devra aussi être complétée par l'analyse de cytokines dont la sécrétion n'est pas souhaitable dans le cadre d'un traitement de l'arthrose, telles que des cytokines pro-angiogéniques et/ou ostéogéniques. A l'avenir, seule une étude complète permettra de véritablement conclure sur l'influence spécifique des propriétés mécaniques et biochimiques sur le sécrétome, et d'améliorer la conception de biomatériaux pour assister la thérapie cellulaire de l'arthrose.

Pour finir, nous avons mené une étude préliminaire pour évaluer le potentiel thérapeutique du sécrétome des hASCs, en étudiant son effet sur la polarisation des macrophages. Nous avons ainsi pu observer que le sécrétome d'hASCs dans un hydrogel viscoélastique à base d'AH et fonctionnalisé par un peptide HAVDI favorisait la polarisation des macrophages vers un phénotype de type M2. Cette propriété est très intéressante et permettrait d'atténuer l'inflammation présente au sein d'une articulation arthrosique.^[40,158] Ces résultats devront

cependant être répétés afin de confirmer l'effet biologique observé. A l'avenir, ce protocole pourrait être utilisé en combinaison du dosage des cytokines présentes dans le surnageant pour évaluer l'influence des interactions cellules-matériaux sur le potentiel thérapeutique des hASCs. Dans le cadre de l'arthrose, il serait également intéressant d'évaluer l'influence du sécrétome d'hASCs encapsulées sur la viabilité et/ou l'expression génique de chondrocytes arthrosiques, et ainsi évaluer son potentiel anti-fibrotique et anti-apoptotique.

3. Considérations sur le projet global

Malgré des résultats encourageants, la délivrance intra-articulaire de CSMs pour le traitement de l'arthrose souffre encore de limites réglementaires et techniques. Afin d'améliorer la délivrance des cellules, beaucoup de laboratoires ont envisagé de combiner les CSMs avec des hydrogels injectables. Néanmoins, l'efficacité de cette stratégie n'a pas encore pu être prouvée dans le cadre d'études cliniques. A ce jour, seulement quelques études menées chez le petit animal ont montré un effet bénéfique de l'injection de CSMs associée à un hydrogel sur la régénération du cartilage.^[184,185] Ce manque de recul évident nous empêche encore de confirmer l'intérêt de l'utilisation d'hydrogels pour améliorer l'efficacité de la thérapie cellulaire de l'arthrose. De plus, en raison du peu de travaux rapportés à ce jour, il est difficile d'identifier des critères de conception indispensables pour l'utilisation d'hydrogels dans le cadre de l'arthrose.

Au-delà de l'injectabilité et de la stabilité des hydrogels qui nous paraissent être des critères évidents, il pourrait être intéressant de concevoir des hydrogels capables de résister aux forces de compression et de cisaillement présentes au sein d'une articulation. Dans ce sens nous avons fait l'hypothèse que le caractère dynamique et auto-réparant du réseau à base d'esters de boronate conférerait aux hydrogels la capacité de soulager le cartilage des forces de compression. En effet, sous la contrainte, les liaisons pourraient se dissocier, permettant ainsi de dissiper l'énergie et d'absorber les chocs. D'autres stratégies ont pu être mises en place afin d'obtenir des hydrogels capables de soulager l'articulation des contraintes mécaniques. Une des stratégies consiste en la production d'hydrogels avec des propriétés mécaniques comparables à celles du cartilage natif. Ces propriétés remarquables sont alors souvent obtenues en produisant des hydrogels avec des réseaux interpénétrés.^[186,187] Une seconde stratégie se concentre sur l'augmentation du potentiel de lubrification des hydrogels.^[184] Dans cette étude, les auteurs ont encapsulées des liposomes dans des microgels

biodégradables. Une fois exposés à la surface, les liposomes provoquent la formation d'une couche de solvation (i.e., couche de molécules d'eau) au niveau de leurs têtes hydrophiles améliorant la lubrification et réduisant les phénomènes de friction.

Pour ce projet, nous avons aussi pensé l'hydrogel comme un outil pour l'amélioration du potentiel thérapeutique des CSMs. A notre connaissance, personne ne s'est intéressé à l'utilisation des interactions cellules-matériaux pour favoriser l'efficacité de la thérapie cellulaire. L'utilisation de ces interactions risque cependant d'aboutir à la conception de systèmes d'hydrogels complexes, nécessitant de nombreuses modifications chimiques. Cette complexité pourrait alors constituer un frein pour leur utilisation dans un cadre clinique. Seules des études supplémentaires permettront de savoir si l'utilisation de ces systèmes est justifiée d'un point de vue clinique pour l'amélioration de la thérapie cellulaire.

CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'utilisation d'hydrogels est dorénavant envisagée comme une stratégie prometteuse pour l'amélioration de la thérapie cellulaire de l'arthrose. Plus que de simples vecteurs, les hydrogels pourraient influencer le potentiel thérapeutique des CSMs via leurs propriétés mécaniques et biochimiques. Cependant, l'influence de ces propriétés sur le profil de sécrétion des CSMs reste mal connue.

Dans ce contexte, nous avons développé une plateforme d'hydrogels à la composition et aux propriétés mécaniques ajustables afin d'étudier indépendamment l'influence de ces paramètres sur le potentiel de sécrétion des CSMs. Pour cela, deux types d'hydrogels ont été développés en utilisant deux stratégies de réticulations distinctes : (i) des hydrogels élastiques réticulés via la réaction de type SPAAC, et (ii) des hydrogels viscoélastiques réticulés via la formation d'esters de boronate. Les deux types d'hydrogels sont cytocompatibles et ont été optimisés pour être stables *in vitro* et *in vivo*, et présenter des propriétés mécaniques et biochimiques ajustables. Cette plateforme a par la suite été utilisée pour étudier l'influence des interactions cellules-matériaux sur le sécrétome des hASCs. Parmi les paramètres étudiés, nous avons montré que la viscoélasticité et la présence d'AH favorisent la sécrétion de nombreux facteurs potentiellement « anti-arthrosiques ». L'étude des interactions cellules-matériaux a permis d'identifier une formulation d'hydrogel à base d'AH, viscoélastique et fonctionnalisé par un peptide HAVDI, particulièrement attrayant pour améliorer la capacité de sécrétion d'hASCs. Le sécrétome d'hASCs encapsulées dans cet hydrogel a d'ailleurs permis la polarisation de macrophages vers un phénotype anti-inflammatoire (M2).

Afin d'évaluer si la conception rationnelle d'hydrogels injectables pourrait permettre d'améliorer l'efficacité de la thérapie cellulaire de l'arthrose, nous avons mis en place une étude *in vivo* dans un modèle d'arthrose post-traumatique chez le lapin. Pour cela, une arthrose a été induite chez le lapin (femelle ; 15 semaines ; N=6) par section du ligament croisé antérieur du genou. 2 mois après l'induction, les animaux ont été divisés en 4 groupes : (i) injection de PBS, (ii) injection de l'hydrogel seul, (iii) injection de CSMs seules, (iv) injection de CSMs combinées à l'hydrogel. L'hydrogel choisi pour cette expérience est celui identifié durant l'étude de l'influence des interactions cellules-matériaux (AH viscoélastique dur avec HAVDI). 6 semaines après l'injection, les articulations ont été collectées, et préparées pour une analyse histologique. Cette étude est toujours en cours.

En raison de leur modularité, les hydrogels développés au cours de ce travail de thèse peuvent être utilisés pour de nombreuses autres applications que l'amélioration de la thérapie cellulaire de l'arthrose. Ainsi, cette plateforme sert aujourd'hui d'outil pour l'étude des interactions cellules-matériaux sur le comportement d'autres types cellulaires. Une collaboration au sein du laboratoire RMeS avec Anne Camus a notamment été mise en place afin d'étudier l'influence de ces interactions cellules-matériaux sur la différenciation de cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPS) en cellules du disque intervertébral. Cette plateforme est aussi utilisée dans le cadre d'une collaboration avec Olivier Goureau (Institut de la vision ; Paris), pour identifier les paramètres favorisant le développement d'organoïdes de rétine dérivés d'hiPS. Enfin, dans le cadre d'une collaboration avec Afsaneh Gaillard (LNEC ; Poitiers), nos hydrogels sont utilisés pour améliorer la culture et la délivrance de neurosphères.

Le développement d'hydrogels injectables (i.e., à base d'esters de boronate) a permis d'envisager leur utilisation dans le cadre la bio-impression. Cette technique permet de mimer la structure native des tissus en contrôlant précisément la composition des biomatériaux et l'arrangement spatial des cellules. Dans ce contexte, Pierre Tournier a notamment optimisé différentes bio-encre qui ont pu être bio-imprimées par extrusion. Il a aussi montré que les propriétés mécaniques et biochimiques des structures imprimées pouvaient être modifiées après leur impression, ouvrant la voie vers une bioimpression en 4D (papier en préparation). Ces travaux prometteurs seront alors poursuivis dans le cadre de l'ANR DYNAM-OA, qui a pour but de modéliser des articulations arthrosiques. Ainsi, la plateforme d'hydrogels développée permettra à l'avenir de répondre à de nombreux défis biomédicaux, de la culture 3D à la délivrance de principes et de cellules thérapeutiques en passant par la bioimpression.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] V. B. Kraus, F. J. Blanco, M. Englund, M. A. Karsdal, L. S. Lohmander, *Osteoarthr. Cartil.* **2015**, *23*, 1233.
- [2] D. J. Hunter, L. March, M. Chew, *Lancet* **2020**, *396*, 1711.
- [3] I. J. Wallace, S. Worthington, D. T. Felson, R. D. Jurmain, K. T. Wren, H. Maijanen, R. J. Woods, D. E. Lieberman, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2017**, *114*, 9332.
- [4] J. Martel-Pelletier, A. J. Barr, F. M. Cicuttini, P. G. Conaghan, C. Cooper, M. B. Goldring, S. R. Goldring, G. Jones, A. J. Teichtahl, J.-P. Pelletier, *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2016**, *2*, 16072.
- [5] S. Safiri, A. A. Kolahi, E. Smith, C. Hill, D. Bettampadi, M. A. Mansournia, D. Hoy, A. Ashrafi-Asgarabad, M. Sepidarkish, A. Almasi-Hashiani, G. Collins, J. Kaufman, M. Qorbani, M. Moradi-Lakeh, A. D. Woolf, F. Guillemain, L. March, M. Cross, *Ann. Rheum. Dis.* **2020**, *1*.
- [6] A. J. Carr, *Osteoarthr. Cartil.* **1999**, *7*, 230.
- [7] S. Swain, A. Sarmanova, C. Coupland, M. Doherty, W. Zhang, *Arthritis Care Res.* **2020**, *72*, 991.
- [8] D. Pereira, E. Ramos, J. Branco, *Acta Med. Port.* **2014**, *28*, 99.
- [9] S. R. Kingsbury, H. J. Gross, G. Isherwood, P. G. Conaghan, *Rheumatology* **2014**, *53*, 937.
- [10] J. H. Salmon, A. C. Rat, J. Sellam, M. Michel, J. P. Eschard, F. Guillemain, D. Jolly, B. Fautrel, *Osteoarthr. Cartil.* **2016**, *24*, 1500.
- [11] J. W. J. Bijlsma, F. Berenbaum, F. P. J. G. Lafeber, *Lancet* **2011**, *377*, 2115.
- [12] X. L. LU, V. C. MOW, *Med. Sci. Sport. Exerc.* **2008**, *40*, 193.
- [13] S. R. Goldring, M. B. Goldring, *Nat. Rev. Rheumatol.* **2016**, *12*, 632.
- [14] D. Heinegård, T. Saxne, *Nat. Rev. Rheumatol.* **2011**, *7*, 50.
- [15] X. Houard, M. B. Goldring, F. Berenbaum, *Curr. Rheumatol. Rep.* **2013**, *15*, 375.
- [16] H. Y. Ng, A. A. Lee, K. X. Shen, *JSM Bone Jt. Dis* **2017**, *1*, 1010.
- [17] C. Lesage, M. Lafont, P. Guihard, P. Weiss, J. Guicheux, V. Delplace, *Adv. Sci.* **2022**, *9*, 2200050.
- [18] A. J. Sophia Fox, A. Bedi, S. A. Rodeo, *Sports Health* **2009**, *1*, 461.
- [19] H. Guo, S. A. Maher, P. A. Torzilli, *J. Biomech.* **2015**, *48*, 166.
- [20] C. Orr, E. Vieira-Sousa, D. L. Boyle, M. H. Buch, C. D. Buckley, J. D. Cañete, A. I. Catrina, E. H. S. Choy, P. Emery, U. Fearon, A. Filer, D. Gerlag, F. Humby, J. D. Isaacs, S. A. Just, B. R. Lauwerys, B. Le Goff, A. Manzo, T. McGarry, I. B. McInnes, A. Najm, C. Pitzalis, A. Pratt, M. Smith, P. P. Tak, S. W. Tas, R. Thurlings, J. E. Fonseca, D. J. Veale, *Nat. Rev. Rheumatol.* **2017**, *13*, 463.
- [21] C. R. Scanzello, S. R. Goldring, *Bone* **2012**, *51*, 249.
- [22] M. D. Smith, *Open Rheumatol. J.* **2011**, *5*, 100.
- [23] S. R. Goldring, M. B. Goldring, *Nat. Rev. Rheumatol.* **2016**, *12*, 632.
- [24] H. Madry, C. N. van Dijk, M. Mueller-Gerbl, *Knee Surgery, Sport. Traumatol. Arthrosc.* **2010**, *18*, 419.
- [25] M. Oliveira Silva, J. L. Gregory, N. Ansari, K. S. Stok, *Front. Cell Dev. Biol.* **2020**, *8*, 1.
- [26] H. Imhof, M. Breitenseher, F. Kainberger, T. Rand, S. Trattnig, *Top. Magn. Reson. Imaging* **1999**, *10*, 180.

- [27] T. E. McAlindon, R. R. Bannuru, M. C. Sullivan, N. K. Arden, F. Berenbaum, S. M. Bierma-Zeinstra, G. A. Hawker, Y. Henrotin, D. J. Hunter, H. Kawaguchi, K. Kwok, S. Lohmander, F. Rannou, E. M. Roos, M. Underwood, *Osteoarthr. Cartil.* **2014**, *22*, 363.
- [28] S. P. Messier, S. L. Mihalko, C. Legault, G. D. Miller, B. J. Nicklas, P. DeVita, D. P. Beavers, D. J. Hunter, M. F. Lyles, F. Eckstein, J. D. Williamson, J. J. Carr, A. Guermazi, R. F. Loeser, *JAMA* **2013**, *310*, 1263.
- [29] J. Sellam, A. Courties, F. Eymard, S. Ferrero, A. Latourte, P. Ornetti, B. Bannwarth, L. Baumann, F. Berenbaum, X. Chevalier, H. K. Ea, M.-C. Fabre, R. Forestier, L. Grange, H. Lellouche, J. Maillet, D. Mainard, S. Perrot, F. Rannou, A.-C. Rat, C. H. Roux, E. Senbel, P. Richette, *Rev. Rhum.* **2020**, *87*, 439.
- [30] L. E. Miller, *Clin. Rheumatol.* **2019**, *38*, 2881.
- [31] O. Ethgen, O. Bruyère, F. Richy, C. Dardennes, J.-Y. Reginster, *J. Bone Jt. Surg.* **2004**, *86*, 963.
- [32] R. G. Steele, S. Hutabarat, R. L. Evans, C. E. Ackroyd, J. H. Newman, *J. Bone Joint Surg. Br.* **2006**, *88-B*, 1164.
- [33] M. M. Dowsey, J. Gunn, P. F. M. Choong, *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **2014**, *28*, 157.
- [34] D. Reker, A. S. Siebuhr, C. S. Thudium, T. Gantzel, C. Ladel, M. Michaelis, A. Aspberg, M. W. Berchtold, M. A. Karsdal, A. Gigout, A. C. Bay-Jensen, *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 6011.
- [35] J. Maihöfer, H. Madry, A. Rey-Rico, J. K. Venkatesan, L. Goebel, G. Schmitt, S. Speicher-Mentges, X. Cai, W. Meng, D. Zurakowski, M. D. Menger, M. W. Laschke, M. Cucchiari, *Adv. Mater.* **2021**, *33*, 2008451.
- [36] P. Mancuso, S. Raman, A. Glynn, F. Barry, J. M. Murphy, *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2019**, *7*, 299.
- [37] A. I. Caplan, *J. Orthop. Res.* **1991**, *9*, 641.
- [38] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. . Marini, D. S. Krause, R. J. Deans, A. Keating, D. J. Prockop, E. M. Horwitz, *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315.
- [39] M. J. Stoddart, J. Bara, M. Alini, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *84*, 135.
- [40] N. Song, M. Scholtemeijer, K. Shah, *Trends Pharmacol. Sci.* **2020**, *41*, 653.
- [41] S. H. Ranganath, O. Levy, M. S. Inamdar, J. M. Karp, *Cell Stem Cell* **2012**, *10*, 244.
- [42] A. R. Armiento, M. J. Stoddart, M. Alini, D. Eglin, *Acta Biomater.* **2018**, *65*, 1.
- [43] L. Moroni, P. M. Fornasari, *J. Cell. Physiol.* **2013**, *228*, 680.
- [44] Y. Shi, Y. Wang, Q. Li, K. Liu, J. Hou, C. Shao, Y. Wang, *Nat. Rev. Nephrol.* **2018**, *14*, 493.
- [45] M. M. Lalu, L. McIntyre, C. Pugliese, D. Fergusson, B. W. Winston, J. C. Marshall, J. Granton, D. J. Stewart, *PLoS One* **2012**, *7*, e47559.
- [46] U. Nöth, A. F. Steinert, R. S. Tuan, *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **2008**, *4*, 371.
- [47] H. Kwon, W. E. Brown, C. A. Lee, D. Wang, N. Paschos, J. C. Hu, K. A. Athanasiou, *Nat. Rev. Rheumatol.* **2019**, *15*, 550.
- [48] J. Yang, Y. S. Zhang, K. Yue, A. Khademhosseini, *Acta Biomater.* **2017**, *57*, 1.
- [49] F. Hached, C. Vinatier, C. Le Visage, H. Gondé, J. Guicheux, G. Grimandi, A. Billon-Chabaud, *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **2017**, *31*, 730.

- [50] Y.-M. Pers, L. Rackwitz, R. Ferreira, O. Pullig, C. Delfour, F. Barry, L. Sensebe, L. Casteilla, S. Fleury, P. Bourin, D. Noël, F. Canovas, C. Cyteval, G. Lisignoli, J. Schrauth, D. Haddad, S. Domergue, U. Noeth, C. Jorgensen, *Stem Cells Transl. Med.* **2016**, *5*, 847.
- [51] A.-T. Wang, Y. Feng, H.-H. Jia, M. Zhao, H. Yu, *World J. Stem Cells* **2019**, *11*, 222.
- [52] H. Afizah, J. H. P. Hui, *J. Clin. Orthop. Trauma* **2016**, *7*, 177.
- [53] W. Y. Lee, B. Wang, *J. Orthop. Transl.* **2017**, *9*, 76.
- [54] K. Toupet, M. Maumus, J.-A. Peyrafitte, P. Bourin, P. L. E. M. van Lent, R. Ferreira, B. Orsetti, N. Pirot, L. Casteilla, C. Jorgensen, D. Noël, *Arthritis Rheum.* **2013**, *65*, 1786.
- [55] L. M. Marquardt, S. C. Heilshorn, *Curr. Stem Cell Reports* **2016**, *2*, 207.
- [56] B. A. Aguado, W. Mulyasmita, J. Su, K. J. Lampe, S. C. Heilshorn, *Tissue Eng. - Part A* **2012**, *18*, 806.
- [57] D. M. Jensen, *Am. J. Gastroenterol.* **2018**, *113*, 1570.
- [58] K. Y. Lee, D. J. Mooney, *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 106.
- [59] J. A. Rowley, G. Madlambayan, D. J. Mooney, *Biomaterials* **1999**, *20*, 45.
- [60] C. Godugu, M. Singh, **2016**, pp. 117–128.
- [61] D. A. Gyles, L. D. Castro, J. O. C. Silva, R. M. Ribeiro-Costa, *Eur. Polym. J.* **2017**, *88*, 373.
- [62] D. Dippold, A. Cai, M. Hardt, A. R. Boccaccini, R. E. Horch, J. P. Beier, D. W. Schubert, *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *95*, 217.
- [63] S. R. Caliarì, J. A. Burdick, *Nat. Methods* **2016**, *13*, 405.
- [64] S. C. P. Norris, S. M. Delgado, A. M. Kasko, *Polym. Chem.* **2019**, *10*, 3180.
- [65] C. Chang, L. Zhang, *Carbohydr. Polym.* **2011**, *84*, 40.
- [66] N. Contessi, L. Altomare, A. Filipponi, S. Farè, *Mater. Lett.* **2017**, *207*, 157.
- [67] N. Contessi, L. Altomare, A. Filipponi, S. Farè, *Mater. Lett.* **2017**, *207*, 157.
- [68] X. Xu, Y. Liu, W. Fu, M. Yao, Z. Ding, J. Xuan, D. Li, S. Wang, Y. Xia, M. Cao, *Polymers (Basel)*. **2020**, *12*, 580.
- [69] M. M. Rana, H. De la Hoz Siegler, *Polymers (Basel)*. **2021**, *13*, 3154.
- [70] M. A. Haq, Y. Su, D. Wang, *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *70*, 842.
- [71] K. Flégeau, R. Pace, H. Gautier, G. Rethore, J. Guicheux, C. Le Visage, P. Weiss, *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *247*, 589.
- [72] A. Aruffo, I. Stamenkovic, M. Melnick, C. B. Underhill, B. Seed, *Cell* **1990**, *61*, 1303.
- [73] S. Misra, V. Hascall, R. Markwald, S. Ghatak, *Front. Immunol.* **2015**, *6*.
- [74] C. B. Rodell, A. L. Kaminski, J. A. Burdick, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 4125.
- [75] J. Omar, D. Ponsford, C. A. Dreiss, T. Lee, X. J. Loh, *Chem. – An Asian J.* **2022**, *17*.
- [76] C. B. Highley, G. D. Prestwich, J. A. Burdick, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *40*, 35.
- [77] J. Omar, D. Ponsford, C. A. Dreiss, T. Lee, X. J. Loh, *Chem. – An Asian J.* **2022**, *17*.

- [78] C. Loebel, C. B. Rodell, M. H. Chen, J. A. Burdick, *Nat. Protoc.* **2017**, *12*, 1521.
- [79] G. Li, J. Wu, B. Wang, S. Yan, K. Zhang, J. Ding, J. Yin, *Biomacromolecules* **2015**, *16*, 3508.
- [80] E. A. Appel, F. Biedermann, U. Rauwald, S. T. Jones, J. M. Zayed, O. A. Scherman, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 14251.
- [81] B. Yang, K. Wei, C. Loebel, K. Zhang, Q. Feng, R. Li, S. H. D. Wong, X. Xu, C. Lau, X. Chen, P. Zhao, C. Yin, J. A. Burdick, Y. Wang, L. Bian, *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3514.
- [82] A. M. Rosales, C. B. Rodell, M. H. Chen, M. G. Morrow, K. S. Anseth, J. A. Burdick, *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29*, 905.
- [83] C. B. Rodell, J. W. MacArthur, S. M. Dorsey, R. J. Wade, L. L. Wang, Y. J. Woo, J. A. Burdick, *Adv. Funct. Mater.* **2015**, *25*, 636.
- [84] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.
- [85] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 666.
- [86] C. M. Madl, S. C. Heilshorn, *Adv. Funct. Mater.* **2018**, *28*, 1706046.
- [87] K. M. Gattás-Asfura, C. L. Stabler, *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 3122.
- [88] B. D. Fairbanks, L. J. Macdougall, S. Mavila, J. Sinha, B. E. Kirkpatrick, K. S. Anseth, C. N. Bowman, *Chem. Rev.* **2021**, *121*, 6915.
- [89] C. E. Hoyle, C. N. Bowman, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2010**, *49*, 1540.
- [90] S. R. Caliari, S. L. Vega, M. Kwon, E. M. Soulas, J. A. Burdick, *Biomaterials* **2016**, *103*, 314.
- [91] N. E. Fedorovich, M. H. Oudshoorn, D. van Geemen, W. E. Hennink, J. Alblas, W. J. A. Dhert, *Biomaterials* **2009**, *30*, 344.
- [92] R. Cruz-Acuña, M. Quirós, A. E. Farkas, P. H. Dedhia, S. Huang, D. Siuda, V. García-Hernández, A. J. Miller, J. R. Spence, A. Nusrat, A. J. García, *Nat. Cell Biol.* **2017**, *19*, 1326.
- [93] J. Pupkaite, J. Rosenquist, J. Hilborn, A. Samanta, *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 3475.
- [94] Z. Q. Liu, Z. Wei, X. L. Zhu, G. Y. Huang, F. Xu, J. H. Yang, Y. Osada, M. Zrínyi, J. H. Li, Y. M. Chen, *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2015**, *128*, 140.
- [95] R. M. Desai, S. T. Koshy, S. A. Hilderbrand, D. J. Mooney, N. S. Joshi, *Biomaterials* **2015**, *50*, 30.
- [96] V. Delplace, P. E. B. Nickerson, A. Ortin-Martinez, A. E. G. Baker, V. A. Wallace, M. S. Shoichet, *Adv. Funct. Mater.* **2020**, *30*, 1.
- [97] R. Huisgen, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **1963**, *2*, 565.
- [98] J. E. Hein, J. C. Tripp, L. B. Krasnova, K. B. Sharpless, V. V. Fokin, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2009**, *48*, 8018.
- [99] N. J. Agard, J. A. Prescher, C. R. Bertozzi, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15046.
- [100] S. M. Hodgson, E. Bakaic, S. A. Stewart, T. Hoare, A. Adronov, *Biomacromolecules* **2016**, *17*, 1093.
- [101] F. Chen, P. Le, G. M. Fernandes-Cunha, S. C. Heilshorn, D. Myung, *Biomaterials* **2020**, *255*, 120176.
- [102] C. M. Madl, L. M. Katz, S. C. Heilshorn, *Adv. Funct. Mater.* **2016**, *26*, 3612.

- [103] G. Deng, F. Li, H. Yu, F. Liu, C. Liu, W. Sun, H. Jiang, Y. Chen, *ACS Macro Lett.* **2012**, *1*, 275.
- [104] R. Guo, Q. Su, J. Zhang, A. Dong, C. Lin, J. Zhang, *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 1356.
- [105] Z. Tong, L. Jin, J. M. Oliveira, R. L. Reis, Q. Zhong, Z. Mao, C. Gao, *Bioact. Mater.* **2021**, *6*, 1375.
- [106] H. Wang, S. C. Heilshorn, *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 3717.
- [107] S. Kirchhof, F. P. Brandl, N. Hammer, A. M. Goepferich, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 4855.
- [108] L. J. Smith, S. M. Taimoory, R. Y. Tam, A. E. G. Baker, N. Bintah Mohammad, J. F. Trant, M. S. Shoichet, *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 926.
- [109] H.-L. Wei, Z. Yang, L.-M. Zheng, Y.-M. Shen, *Polymer (Guildf)*. **2009**, *50*, 2836.
- [110] C. M. Nimmo, S. C. Owen, M. S. Shoichet, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 824.
- [111] C. M. Madl, S. C. Heilshorn, *Chem. Mater.* **2019**, *31*, 8035.
- [112] J. Kalia, R. T. Raines, *Angew. Chemie Int. Ed.* **2008**, *47*, 7523.
- [113] B. M. Richardson, D. G. Wilcox, M. A. Randolph, K. S. Anseth, *Acta Biomater.* **2019**, *83*, 71.
- [114] B. M. Richardson, C. J. Walker, L. J. Macdougall, J. W. Hoye, M. A. Randolph, S. J. Bryant, K. S. Anseth, *Biomater. Sci.* **2020**, *8*, 3804.
- [115] A. N. Borelli, M. W. Young, B. E. Kirkpatrick, M. W. Jaeschke, S. Mellett, S. Porter, M. R. Blatchley, V. V. Rao, B. V. Sridhar, K. S. Anseth, *Adv. Healthc. Mater.* **2022**, *11*, 2200393.
- [116] Z. Zhang, C. He, X. Chen, *Mater. Chem. Front.* **2018**, *2*, 1765.
- [117] X. Wu, C. He, Y. Wu, X. Chen, *Biomaterials* **2016**, *75*, 148.
- [118] J. A. Peters, *Coord. Chem. Rev.* **2014**, *268*, 1.
- [119] S. H. Hong, S. Kim, J. P. Park, M. Shin, K. Kim, J. H. Ryu, H. Lee, *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 2053.
- [120] B. Marco-Dufort, R. Iten, M. W. Tibbitt, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 15371.
- [121] Y. Xiang, S. Xian, R. C. Ollier, S. Yu, B. Su, I. Pramudya, M. J. Webber, *J. Control. Release* **2022**, *348*, 601.
- [122] T. Figueiredo, V. Cosenza, Y. Ogawa, I. Jeacomine, A. Vallet, S. Ortega, R. Michel, J. D. M. Olsson, T. Gerfaud, J. G. Boiteau, J. Jing, C. Harris, R. Auzély-Velty, *Soft Matter* **2020**, *16*, 3628.
- [123] V. Yesilyurt, M. J. Webber, E. A. Appel, C. Godwin, R. Langer, D. G. Anderson, *Adv. Mater.* **2016**, *28*, 86.
- [124] M. Cantini, H. Donnelly, M. J. Dalby, M. Salmeron-Sanchez, *Adv. Healthc. Mater.* **2020**, *9*, 1901259.
- [125] B. Marco-Dufort, J. Willi, F. Vielba-Gomez, F. Gatti, M. W. Tibbitt, *Biomacromolecules* **2021**, *22*, 146.
- [126] X. Deng, R. Attalla, L. P. Sadowski, M. Chen, M. J. Majcher, I. Urosev, D. C. Yin, P. R. Selvaganapathy, C. D. M. Filipe, T. Hoare, *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 62.
- [127] T. Figueiredo, J. Jing, I. Jeacomine, J. Olsson, T. Gerfaud, J. Boiteau, C. Rome, C. Harris, R. Auzely, *Biomacromolecules* **2019**.
- [128] R. J. Pelham, Y. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1997**, *94*, 13661.

- [129] A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, D. E. Discher, *Cell* **2006**, *126*, 677.
- [130] O. Chaudhuri, J. Cooper-White, P. A. Janmey, D. J. Mooney, V. B. Shenoy, *Nature* **2020**, *584*, 535.
- [131] K. H. Vining, D. J. Mooney, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2017**, *18*, 728.
- [132] L. G. Griffith, M. A. Swartz, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 211.
- [133] H.-D. Kim, T. W. Guo, A. P. Wu, A. Wells, F. B. Gertler, D. A. Lauffenburger, *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 4249.
- [134] Y. Li, Y. Xiao, C. Liu, *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 4376.
- [135] H. Tanaka, C. L. Murphy, C. Murphy, M. Kimura, S. Kawai, J. M. Polak, *J. Cell. Biochem.* **2004**, *93*, 454.
- [136] M. W. Tibbitt, K. S. Anseth, *Biotechnol. Bioeng.* **2009**, *103*, 655.
- [137] J. Lee, O. Jeon, M. Kong, A. A. Abdeen, J.-Y. Shin, H. N. Lee, Y. Bin Lee, W. Sun, P. Bandaru, D. S. Alt, K. Lee, H. Kim, S. J. Lee, S. Chaterji, S. R. Shin, E. Alsberg, A. Khademhosseini, *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaaz5913.
- [138] N. Huebsch, P. R. Arany, A. S. Mao, D. Shvartsman, O. A. Ali, S. A. Bencherif, J. Rivera-Feliciano, D. J. Mooney, *Nat. Mater.* **2010**, *9*, 518.
- [139] O. Chaudhuri, L. Gu, D. Klumpers, M. Darnell, S. A. Bencherif, J. C. Weaver, N. Huebsch, H. P. Lee, E. Lippens, G. N. Duda, D. J. Mooney, *Nat. Mater.* **2016**, *15*, 326.
- [140] A. M. Rosales, K. S. Anseth, *Nat. Rev. Mater.* **2016**, *1*, 15012.
- [141] C. M. Madl, B. L. LeSavage, R. E. Dewi, C. B. Dinh, R. S. Stowers, M. Khariton, K. J. Lampe, D. Nguyen, O. Chaudhuri, A. Enejder, S. C. Heilshorn, *Nat. Mater.* **2017**, *16*, 1233.
- [142] S. Xin, C. A. Gregory, D. L. Alge, *Acta Biomater.* **2020**, *101*, 227.
- [143] S. Khetan, M. Guvendiren, W. R. Legant, D. M. Cohen, C. S. Chen, J. A. Burdick, *Nat. Mater.* **2013**, *12*, 458.
- [144] O. Chaudhuri, *Biomater. Sci.* **2017**, *5*, 1480.
- [145] A. R. Cameron, J. E. Frith, J. J. Cooper-White, *Biomaterials* **2011**, *32*, 5979.
- [146] S. Tang, H. Ma, H. C. Tu, H. R. Wang, P. C. Lin, K. S. Anseth, *Adv. Sci.* **2018**, *5*, 1.
- [147] H. Lee, F. Alisafaei, K. Adebawale, J. Chang, V. B. Shenoy, O. Chaudhuri, *Sci. Adv.* **2021**, *7*.
- [148] J. Whitehead, K. H. Griffin, M. Gionet-Gonzales, C. E. Vorwald, S. E. Cinque, J. K. Leach, *Biomaterials* **2021**, *269*, 120607.
- [149] E. Oliveira, R. C. Assunção-Silva, O. Ziv-Polat, E. D. Gomes, F. G. Teixeira, N. A. Silva, A. Shahar, A. J. Salgado, *Stem Cells Int.* **2017**, *2017*.
- [150] N. M. Drzeniek, A. Mazzocchi, S. Schlickeiser, S. D. Forsythe, G. Moll, S. Geißler, P. Reinke, M. Gossen, V. S. Gorantla, H.-D. Volk, S. Soker, *Biofabrication* **2021**, *13*, 045002.
- [151] F. Hached, C. Vinatier, P. G. Pinta, P. Hulin, C. Le Visage, P. Weiss, J. Guicheux, A. Billon-Chabaud, G. Grimandi, *Stem Cells Int.* **2017**, *2017*, 6.
- [152] N. Huettner, T. R. Dargaville, A. Forget, *Trends Biotechnol.* **2018**, *36*, 372.

- [153] J. Dhillon, S. A. Young, S. E. Sherman, G. I. Bell, B. G. Amsden, D. A. Hess, L. E. Flynn, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **2019**, *107*, 571.
- [154] A. Y. Clark, K. E. Martin, J. R. García, C. T. Johnson, H. S. Theriault, W. M. Han, D. W. Zhou, E. A. Botchwey, A. J. García, *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 114.
- [155] F. Karimi, A. J. O'Connor, G. G. Qiao, D. E. Heath, *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7*, 1701324.
- [156] M. E. Wechsler, V. V. Rao, A. N. Borelli, K. S. Anseth, *Adv. Healthc. Mater.* **2021**, *10*, 2001948.
- [157] D. Polchert, J. Sobinsky, G. Douglas, M. Kidd, A. Moadsiri, E. Reina, K. Genrich, S. Mehrotra, S. Setty, B. Smith, A. Bartholomew, *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38*, 1745.
- [158] C. Manferdini, F. Paoletta, E. Gabusi, L. Gambari, A. Piacentini, G. Filardo, S. Fleury-Cappellesso, A. Barbero, M. Murphy, G. Lisignoli, *Osteoarthr. Cartil.* **2017**, *25*, 1161.
- [159] M. Maumus, C. Manferdini, K. Toupet, J. A. Peyrafitte, R. Ferreira, A. Facchini, E. Gabusi, P. Bourin, C. Jorgensen, G. Lisignoli, D. Noël, *Stem Cell Res.* **2013**, *11*, 834.
- [160] H. Suga, H. Eto, T. Shigeura, K. Inoue, N. Aoi, H. Kato, S. Nishimura, I. Manabe, K. Gonda, K. Yoshimura, *Stem Cells* **2009**, *27*, 238.
- [161] M. Maumus, C. Manferdini, K. Toupet, P. Chuchana, L. Casteilla, M. Gachet, C. Jorgensen, G. Lisignoli, D. Noël, *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1.
- [162] M. Ruiz, K. Toupet, M. Maumus, P. Rozier, C. Jorgensen, D. Noël, *Biomaterials* **2020**, *226*, 119544.
- [163] S. Cosenza, M. Ruiz, K. Toupet, C. Jorgensen, D. Noël, *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 16214.
- [164] B. P. Hung, T. Gonzalez-Fernandez, J. B. Lin, T. Campbell, Y. Bin Lee, A. Panitch, E. Alsberg, J. K. Leach, *Biomaterials* **2020**, *245*, 1.
- [165] K. H. Vining, A. Stafford, D. J. Mooney, *Biomaterials* **2019**, *188*, 187.
- [166] S. W. Wong, S. Lenzini, M. H. Cooper, D. J. Mooney, J. W. Shin, *Sci. Adv.* **2020**, *6*, aaw0158.
- [167] A. S. Caldwell, V. V. Rao, A. C. Golden, K. S. Anseth, *Biomaterials* **2020**, *232*, 119725.
- [168] T. H. Qazi, D. J. Mooney, G. N. Duda, S. Geissler, *Biomaterials* **2020**, *230*, 1.
- [169] P. B. Wright, E. McDonald, A. Bravo-Blas, H. M. Baer, A. Heawood, C. C. Bain, A. M. Mowat, S. L. Clay, E. V. Robertson, F. Morton, J. S. Nijjar, U. Z. Ijaz, S. W. F. Milling, D. R. Gaya, *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 19616.
- [170] K. Flegeau, C. Toquet, G. Rethore, C. d'Arros, L. Messenger, B. Halgand, D. Dupont, F. Autrusseau, J. Lesoeur, J. Veziers, P. Bordat, A. Bresin, J. Guicheux, V. Delplace, H. Gautier, P. Weiss, *Adv. Healthc. Mater.* **2020**, *9*, 1.
- [171] G. T. Williams, A. C. Sedgwick, S. Sen, L. Gwynne, J. E. Gardiner, J. T. Brewster, J. R. Hiscock, T. D. James, A. T. A. Jenkins, J. L. Sessler, *Chem. Commun.* **2020**, *56*, 5516.
- [172] A. J. R. Amaral, V. M. Gaspar, J. F. Mano, *Polym. J.* **2020**, *52*, 997.
- [173] J. Sawayama, T. Okitsu, A. Nakamata, Y. Kawahara, S. Takeuchi, *iScience* **2020**, *23*, 101243.
- [174] S. M. Hull, C. D. Lindsay, L. G. Brunel, D. J. Shiwerski, J. W. Tashman, J. G. Roth, D. Myung, A. W. Feinberg, S. C. Heilshorn, *Adv. Funct. Mater.* **2021**, *31*, 2007983.
- [175] J. S. Silver, K. A. Günay, A. A. Cutler, T. O. Vogler, T. E. Brown, B. T. Pawlikowski, O. J. Bednarski, K. L. Bannister, C. J. Rogowski, A. G. McKay, F. W. DelRio, B. B. Olwin, K. S. Anseth, *Sci. Adv.* **2021**,

- 7, 1.
- [176] X. Ding, D. A. Devalankar, P. Wang, *Org. Lett.* **2016**, *18*, 5396.
- [177] P. Klán, T. Šolomek, C. G. Bochet, A. Blanc, R. Givens, M. Rubina, V. Popik, A. Kostikov, J. Wirz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 119.
- [178] E. Mueller, I. Poulin, W. J. Bodnaryk, T. Hoare, *Biomacromolecules* **2022**, *23*, 619.
- [179] L. J. Macdougall, M. M. Pérez-Madrugal, M. C. Arno, A. P. Dove, *Biomacromolecules* **2018**, *19*, 1378.
- [180] A. R. Killaars, C. J. Walker, K. S. Anseth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, *117*, 21258.
- [181] P. Xu, J. Guan, Y. Chen, H. Xiao, T. Yang, H. Sun, N. Wu, C. Zhang, Y. Mao, *J. Cell. Mol. Med.* **2021**, *25*, 880.
- [182] M. Y. Kwon, C. Wang, J. H. Galarraga, E. Puré, L. Han, J. A. Burdick, *Biomaterials* **2019**, *222*, 119451.
- [183] A. Cifù, R. Domenis, M. Pozzi-Mucelli, P. Di Benedetto, A. Causero, M. Moretti, M. Stevanato, C. Pistis, P. C. Parodi, M. Fabris, F. Curcio, *Stem Cells Int.* **2020**, *2020*, 1.
- [184] Y. Lei, Y. Wang, J. Shen, Z. Cai, C. Zhao, H. Chen, X. Luo, N. Hu, W. Cui, W. Huang, *Sci. Adv.* **2022**, *8*, 1.
- [185] X. Yan, B. Yang, Y. Chen, Y. Song, J. Ye, Y. Pan, B. Zhou, Y. Wang, F. Mao, Y. Dong, D. Liu, J. Yu, *Adv. Mater.* **2021**, *33*, 2104758.
- [186] A. K. Means, C. S. Shrode, L. V. Whitney, D. A. Ehrhardt, M. A. Grunlan, *Biomacromolecules* **2019**, *20*, 2034.
- [187] S. Fuchs, K. Shariati, M. Ma, *Adv. Healthc. Mater.* **2020**, *9*, 1.

ANNEXES

Annexe 1

Cibles	Forward 5' => 3'	Reverse 5' => 3'
IL-6	TCCACAAGCGCCTTCGGTCCAG	CTCAGGGCTGAGATGCCGTCG
IL1b	CCGGGACTCACAGCAAAA	GGACATGGAGAACACCACTTG
CD206	AGCCAACACCAGCTCCTCAAGA	CAAAACGCTCGCGCATTGTCCA
CD163	GGAGTGACCTGCTCAGATGG	CCCCACCGTCCTTGGAATTT
PPIA	GTCAACCCACCGTGTCTT	CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT
18S	AGCAAACCCCAACTCAACC	GTCCCTCAGAAGGGGTGAC
TNFa	CAGCCTCTTCTCCTTCCTGAT	GCCAGAGGGCTGATTAGAGA
IL10	TACGGCGCTGTCATCGATT	TAGAGTCGCCACCCTGATGT

Tableau annexe 1 : Séquences des amorces d'ARN utilisées pour l'analyse de macrophages

Annexe 2

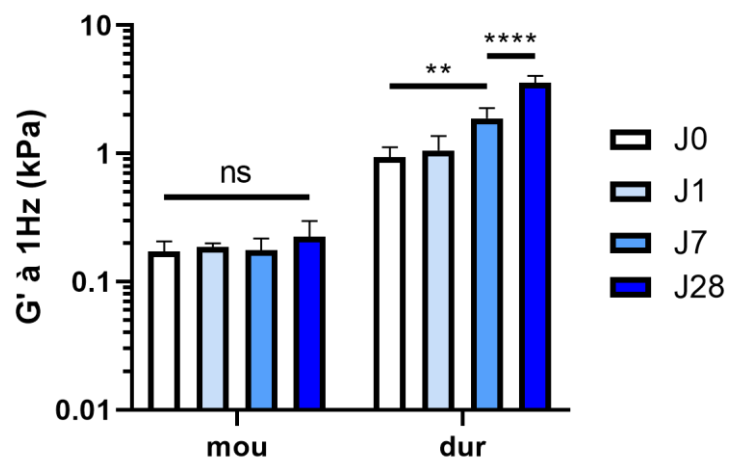


Figure annexe 2 : Caractérisation mécanique des hydrogels immergés dans du PBS au cours du temps

Titre : Conception d'hydrogels à la composition et aux propriétés mécaniques ajustables pour l'étude des interactions cellules-matériaux et l'amélioration de la thérapie cellulaire de l'arthrose

Mots clés : arthrose, thérapie cellulaire, hydrogels, chimie click, chimie bioorthogonale, interactions cellules-matériaux, viscoélasticité, acide hyaluronique.

Résumé : En raison de leur capacité à sécréter divers agents thérapeutiques, les cellules stromales mésenchymateuses (CSMs), constituent un outil thérapeutique prometteur pour le traitement de l'arthrose. Afin d'améliorer leur délivrance, les CSMs sont souvent combinées avec des biomatériaux injectables tels que les hydrogels. Cependant, l'influence des propriétés mécaniques (e.g., rigidité, viscoélasticité) et biochimiques (e.g., peptides, nature des polymères) de ces hydrogels sur les propriétés de sécrétion des CSMs reste mal connue.

Dans ce contexte, nous avons développé des hydrogels aux propriétés mécaniques et biochimiques ajustables afin d'étudier indépendamment l'influence de ces paramètres sur le sécrétome des CSMs. Pour cela, deux stratégies de réticulations distinctes ont été développées, permettant séparément l'étude de

l'influence de la rigidité et de la viscoélasticité. Ces stratégies ont été appliquées à différents polysaccharides (i.e., acide hyaluronique, alginate) pour permettre l'évaluation de l'influence de la nature du polymère sur les propriétés de sécrétion des CSMs. Enfin ces hydrogels ont été fonctionnalisés par des peptides biomimétiques (e.g., RGD, HAVDI) pour étudier leur influence sur la sécrétion des CSMs. L'ensemble de nos résultats a révélé un effet important de la viscoélasticité et la présence d'acide hyaluronique sur la sécrétion par les CSMs de facteurs potentiellement anti-arthrosiques.

Ces travaux ouvrent la voie à la conception rationnelle d'hydrogels injectables pour l'amélioration de l'efficacité thérapeutique de thérapies à base de CSMs pour le traitement de l'arthrose.

Title: Design of hydrogels with tunable composition and mechanical properties to study cell-material interactions and to improve osteoarthritis cell therapy

Keywords: osteoarthritis, cell therapy, hydrogels, click chemistry, bioorthogonal chemistry, cell-material interactions, viscoelasticity, hyaluronic acid

Abstract: Owing to their capacity to secrete therapeutic factors, mesenchymal stem cells (MSCs) are becoming key elements of promising strategies to treat osteoarthritis (OA). To improve their therapeutic potential, MSCs are often combined with injectable biomaterials such as hydrogels. Yet, much remains to be done to decipher the role of hydrogel mechanical (e.g., stiffness, viscoelasticity) and biochemical (e.g., peptides, composition) properties on MSC secretory properties; and such investigations require biomaterials with independently tunable mechanical and biochemical properties.

In this context, using two distinct crosslinking strategies, we developed a series of hydrogels to study the influence of stiffness and

viscoelasticity on MSC secretion. These crosslinking strategies were applied to various polysaccharides (i.e., hyaluronic acid, alginate) allowing us to evaluate the influence of polymer composition. Finally, we investigated the influence of biomimetic peptides (i.e., RGD, HAVDI) on MSC secretory ability. Our results revealed an important role of both viscoelasticity and the presence hyaluronic acid on the secretion of potent anti-OA factors by MSCs.

Overall, this study put into perspective the effect of hydrogel mechanical and biochemical properties on MSC secretion, paving the way toward better material design to improve OA cell therapy.