

Titre: Identification des propriétés structurales du chitosane induisant la libération de cytokines pro-régénératrices chez les macrophages humains
Title:

Auteur: David Fong
Author:

Date: 2016

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Fong, D. (2016). Identification des propriétés structurales du chitosane induisant la libération de cytokines pro-régénératrices chez les macrophages humains
Citation: [Ph.D. thesis, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie.
<https://publications.polymtl.ca/2426/>

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

URL de PolyPublie:
PolyPublie URL: <https://publications.polymtl.ca/2426/>

Directeurs de recherche: Caroline D. Hoemann
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

IDENTIFICATION DES PROPRIÉTÉS STRUCTURALES DU CHITOSANE INDUISANT LA
LIBÉRATION DE CYTOKINES PRO-RÉGÉNÉRATRICES CHEZ LES MACROPHAGES
HUMAINS

DAVID FONG

INSTITUT DU GÉNIE BIOMÉDICAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

DÉCEMBRE 2016

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée:

IDENTIFICATION DES PROPRIÉTÉS STRUCTURALES DU CHITOSANE INDUISANT LA
LIBÉRATION DE CYTOKINES PRO-RÉGÉNÉRATRICES CHEZ LES MACROPHAGES
HUMAINS

présentée par : FONG David

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

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

M. DE CRESCENZO Gregory, Ph. D., président

Mme HOEMANN Caroline, Ph. D., membre et directrice de recherche

M. BUSCHMANN Michael, Ph. D., membre

M. MANTOVANI Diego, Ph. D., membre

DÉDICACE

À Gisèle et Arthur,

En espérant qu'un jour, cette thèse vous inspirera à vous réaliser au meilleur de vous-même.

REMERCIEMENTS

On pense souvent que le doctorat est une réalisation personnelle. En effet, cela est le cas. Toutefois, le mien a été enrichi par plusieurs personnes à qui je désirerais exprimer mes plus sincères remerciements pour leurs aides et appuis tout au long de cette quête du savoir ardue.

En premier temps, je voudrais remercier la professeure Caroline Hoemann, ma directrice de thèse, pour avoir cru en moi et de m'avoir donné l'opportunité d'entreprendre ma formation de chercheur au sein de son groupe. Caroline, tu as une vocation pour la science et celle-ci se remarque habilement à travers ton travail et ta façon ingénieuse de penser. Tu as vraiment une rigueur scientifique indéniable et qui m'a inspiré, tout au long de mes études doctorales, à poser les bonnes questions de recherche et à m'assurer que le travail scientifique réalisé soit infaillible et réponde à ces questions. Qu'ils soient sur la science, ma carrière, ou bien ma vie personnelle, tes conseils judicieux ont fait de moi une meilleure personne. Merci pour tout.

Je voudrais également remercier le professeur Michael Buschmann pour ses conseils et discussions enrichissantes par rapport aux travaux réalisés au cours de mon doctorat. Je désirerais exprimer ma gratitude au Dr Patrice Poubelle de l'Université Laval pour ses conseils, ses recommandations et ses appréciations pour mes travaux lors de mon examen de synthèse. Merci à la professeure Sachiko Sato de l'Université Laval pour ses conseils et son expertise qui m'ont beaucoup aidé pour cette thèse. Finalement, je voudrais également remercier les professeurs Gregory De Crescenzo et Diego Mantovani pour avoir accepté de faire partie du jury de ma thèse doctorale.

Le laboratoire des biomatériaux et du cartilage est un environnement unique au monde. Situé au 6^e étage (enfin, mon bureau, le fameux A-631) du pavillon principal de Polytechnique, ce laboratoire m'a permis d'assurer que je garde une forme physique impeccable (mollets de fer) grâce au nombre de marches que j'ai eu à gravir chaque matin. Néanmoins, cette ascension m'a donné la chance de côtoyer chaque jour des gens merveilleux qui ont supporté ma bonne, et ma mauvaise humeur et qui ont contribué à un environnement de travail enrichissant :

- Je voudrais d'abord remercier mes anciens et présents collègues du laboratoire : Marianne, Isabelle, Xian, Rajesh, Ashkan, Sotcheadt, Karim, Garima, Almas, Mohamad, les Gabrielle, Andréanne, Rosa, Julie, Vincent D., Anik, Les Marc, Nic, Yuan, Gaoping, Hongmei, Wei et Jun. Je vous suis très reconnaissant pour votre support, votre amitié, votre aide et vos expertises qui m'ont aidé tout au long de mon doctorat.

- Je désirerai remercier Colleen, Charles-Hubert, Daniel et Jessica. Colleen, merci pour ton attitude positive et ta bonne humeur qui est contagieuse et *lovable*. Merci à toi Charles-Hubert, pour ta générosité à foison et sache que j'admire amplement ta personnalité altruiste. Merci Daniel pour tes conseils, ta bonne humeur et surtout ton ouverture d'esprit. Merci Jessica, pour avoir supporté notre chahut dans le bureau sans grincer une seule fois et surtout merci pour ta patience et tes précieux conseils qui m'ont grandement aidé durant ma thèse. Jess, Dan, CoMat et Charlo, je suis chanceux de vous avoir eu comme collègues de travaux et encore plus fortuné de pouvoir vous compter parmi mes amis.
- Un gros merci aux étudiants de 1^{er} cycle qui ont été sous ma supervision : Simon, Marvin, Joël, Nicholas, Rykiel, Ellery, Pascal, Tal et Alexandre. Votre volonté à vouloir apprendre et votre persévérance m'ont inspiré à devenir un meilleur mentor et un meilleur pédagogue. Vous avoir sous ma supervision a été une expérience unique et je suis privilégié d'avoir eu cette chance (Merci Caroline!).

Je voudrais remercier Charles, Samantha, Fred, Mélusine, Anthony, Mark, Will, Éric, Ophélie, Emily, Jessica, Matthieu, Gaël et Neda au sein de la CBS pour la préparation du WBC2016.

Un très gros merci à Skandar, Simon, Dallala, Dimitri et Marco. Vous êtes vraiment les meilleurs amis qu'on peut avoir dans le monde entier.

Merci à mon frère Gérald et sa conjointe Sok-Na pour tout leur support et leur encouragement. Merci Papa et Maman. Je ne peux imaginer le sacrifice que vous aviez fait pour nous offrir la meilleure éducation possible et nous donner l'opportunité de réussir dans la vie et pour cela, merci.

Je voudrais également remercier le FRQ-NT, les IRSC et la Fondation Polytechnique pour leur support financier.

Finalement, je voudrais remercier (et remercier est un terme qui ne lui fait pas justice) *ma Émilie*. Aucun mot ne pourrait remplacer la gratitude que j'ai à ton égard. Ton support, ta confiance et ta patience inconditionnels sont sans égaux. J'ai bien hâte de savoir ce que le futur nous réserve, car je sais, celui-ci sera sans limites.

David

RÉSUMÉ

Le cartilage articulaire possède une faible capacité de réparation intrinsèque car celui-ci est avasculaire. Initiée par un traumatisme ou une inflammation chronique de l'articulation, l'arthrose est une pathologie des articulations caractérisée par une dégradation du cartilage articulaire et de l'os sous-jacent. La stimulation osseuse est la procédure chirurgicale la plus recommandée pour traiter les lésions ostéochondrales. Cette procédure consiste à induire une réponse de guérison spontanée dans l'os sous-chondral afin d'induire le recrutement de MSC dans la lésion ostéochondrale et la génération d'un nouveau tissu cartilagineux. Présentement, il existe un besoin clinique de développer des traitements auxiliaires à la stimulation osseuse qui permettront d'augmenter le recrutement de MSC *in situ* et leur différenciation dans le nouveau tissu de réparation.

Le chitosane est un polysaccharide composé d'unité de glucosamine et N-acétyl-glucosamine qui a été utilisé précédemment pour améliorer l'attraction des MSC et la réparation du cartilage induite par stimulation osseuse. Une étude de ces mécanismes cellulaires derrière cette meilleure réparation du cartilage a démontré que les macrophages pourraient jouer des rôles vitaux dans la meilleure réparation du tissu. Il est reconnu que les macrophages présents dans le tissu de granulation et la membrane synoviale sécrètent une vaste gamme de molécules solubles qui peuvent promouvoir le succès, ou l'échec de la réparation du cartilage. Par conséquent, les approches thérapeutiques visant à moduler le phénotype des macrophages afin que celles-ci sécrètent des cytokines anti-inflammatoires et anaboliques qui favorisent le recrutement des MSC s'avèrent prometteuses. Pour ces raisons, le chitosane est très intéressant, car celui-ci possède un potentiel immunomodulateur important sur les cellules de l'immunité innée. Toutefois, ces propriétés immunomodulatrices sur les macrophages demeurent méconnues. Un obstacle majeur est de comprendre quelles sont les propriétés structurales du chitosane qui mènent aux réponses pro- ou anti-inflammatoires chez les macrophages.

Cette thèse de doctorat vise à caractériser les interactions entre les macrophages et le chitosane afin de déterminer comment ce polysaccharide peut être utilisé pour moduler le comportement des macrophages afin d'améliorer la réparation du cartilage et maintenir l'intégrité des articulations. Les objectifs principaux de cette thèse sont de :

- 1) Déterminer comment le comportement des macrophages peut être modulé par le chitosane afin de stimuler chez ces cellules la libération de facteurs anti-inflammatoire et anabolique capables d'améliorer la réparation du cartilage et protéger son intégrité.
- 2) Générer une librairie de chitosanes possédant des propriétés structurales distinctes afin d'évaluer l'influence de ces propriétés sur la capacité des macrophages à sécréter des facteurs bénéfiques pour la réparation du cartilage.
- 3) Identifier les mécanismes cellulaires et les motifs structuraux du chitosane permettant à ce polysaccharide d'induire chez les macrophages des réponses anti-inflammatoire tout en minimisant l'activation de réponses pro-inflammatoire.

Dans le premier article présenté dans cette thèse, nous avons testé l'hypothèse que le chitosane biodégradable (degré de déacétylation (DDA) 80%, poids moléculaire moyen de nombre (M_n) 132 kDa) stimule les macrophages sous différents états de polarisation à sécréter des facteurs anti-inflammatoires et des molécules chimiotactiques pour les MSC. Pour cette étude, des macrophages humains U937 ont été obtenus par différenciation avec du phorbol myristate acétate (PMA) et ont été polarisés en macrophages M1 ou M2a par le biais d'une stimulation IFN- γ /LPS ou IL-4 (en présence ou absence de particules de chitosanes). Nous avons observé que la stimulation au chitosane induit la libération de cytokines bien distinctes en fonction du phénotype macrophagique de départ. Chez les macrophages M0 et M2a, le chitosane a stimulé la libération de chimiokines (CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10 et CCL4/MIP-1 β), de cytokines anti-inflammatoires (IL-1ra et IL-10) et d'IL-1 β , avec 25 à 400 fois plus d'IL-1ra que d'IL-1 β . Chez les macrophages M1, le chitosane a amplifié la libération d'IL-1 β sans augmenter la production d'IL-1ra. En utilisant des essais de migration *in vitro*, nous avons observé que les milieux conditionnés de macrophages M0 et M2a stimulent la migration des MSC tandis que les milieux conditionnés provenant des macrophages M1 sont incapables de le faire.

Ensuite, nous avons testé l'hypothèse que le chitosane acétylé induit la phosphorylation des protéines STAT-1 et STAT-6 afin de conduire à la libération des facteurs CXCL10/IP-10 et IL-1ra. Nous avons observé que le chitosane stimule la libération d'IL-1ra de manière indépendante à la protéine STAT-6 tandis qu'il stimule la libération de CXCL10/IP-10 par le biais de la voie STAT-1. Cette activation, qui est différée, n'est pas observée lors que les macrophages sont stimulés avec un chitosane non biodégradable (98% DDA, M_n 128 kDa). Chez des macrophages

primaires humains, l'augmentation de la production d'IL-1 β et CXCL10/IP-10 par la stimulation au chitosane (80% DDA, M_n 132 kDa) était uniquement observée lorsque ces cellules étaient préalablement activées avec le PMA. En absence de PMA, la stimulation au chitosane a uniquement stimulé la production d'IL-1ra, suggérant ainsi que le chitosane stimule IL-1ra de manière indépendante à IL-1 β . En adressant le premier objectif de cette thèse, nous avons démontré que le chitosane biodégradable n'altère pas la capacité intrinsèque des macrophages à attirer des MSC. Nos travaux ont identifié que le chitosane peut être utilisé pour guider les macrophages dans l'articulation à libérer de manière endogène des chimiokines et les facteurs IL-1ra et IL-10 en excès par rapport au facteur IL-1 β .

Dans le deuxième article, nous identifions davantage les mécanismes moléculaires et les motifs structuraux minimaux du chitosane permettant à ce polysaccharide d'augmenter la production simultanée de soit IL-1ra et IP-10, ou bien IL-1 β et PGE₂. Nous avons généré une librairie unique de 20 chitosanes possédant des DDA (60, 80 et 98%), patron d'acétylation (en bloc et aléatoire) et M_n (1, 3, 5, 10 et > 100 kDa) distincts et nous avons évalué leur capacité à stimuler la libération d'IP-10, IL-1ra, IL-1 β et PGE₂ chez des macrophages U937. Nous rapportons qu'une gamme spécifique de chitosanes (98% DDA, 3-10 kDa; 80% DDA, acétylation en bloc, 10 et 190 kDa) induit à de faibles doses une réponse IFN de type 1, qui comprend une activation paracrine de STAT-1/STAT-2 par l'IFN- β et qui mène ultimement à la libération simultanée d'IL-1ra et IP-10. À de plus fortes doses, les chitosanes de 98% de DDA dont le M_n est supérieur à 5 kDa ont stimulé l'activation de l'inflammasome. Cette activation a mené à la costimulation d'IL-1 β et PGE₂ qui est responsable de l'inhibition de la réponse IFN de type 1. Nous démontrons que la capacité de certains chitosanes à induire la libération de cytokines dépend en outre de leur capacité intrinsèque à briser les lysosomes une fois internalisés dans les macrophages. La nature et l'ampleur des cytokines sécrétées dépend en outre de la sévérité de la rupture lysosomale.

Pour résumer, cette thèse suggère que certains chitosanes peuvent être utilisés pour intensifier la libération endogène des facteurs IL-1ra et IL-10 à partir des macrophages activés, afin de protéger l'articulation des cytokines cataboliques comme l'IL-1 β . La librairie de chitosanes générée dans cette thèse contribue à déterminer les motifs structuraux du chitosane menant à la libération de cytokines pro- et anti-inflammatoires par les macrophages et amène de nouvelles connaissances sur les propriétés immunomodulatrices du chitosane. Ces connaissances permettront d'utiliser ce

biomatériau polysaccharidique de manière plus efficace et sécuritaire pour la réparation du cartilage articulaire et pour un vaste nombre d'applications biomédicales.

ABSTRACT

Articular cartilage has very limited intrinsic repair abilities due to its avascular nature. Hence, trauma or chronic knee joint inflammation often lead to osteochondral lesions that further degenerate and promote development of osteoarthritis, a pathological condition characterized by degradation of the articular cartilage and its underlying subchondral bone. To date, marrow-stimulation procedures are the first-line treatment options available for patients with osteochondral lesions. This procedure involves creating a spontaneous wound repair response in the subchondral bone tissue in order to recruit mesenchymal stem cells (MSC) to the lesion site in order to generate a new cartilage tissue. There is a current need for augmented-marrow stimulation procedures which involve the use of biomaterials in order to augment the *in situ* recruitment of MSC and support proper anatomical differentiation of these cells.

Chitosan is a polysaccharide biomaterial composed of glucosamine and N-acetyl glucosamine monomers that has previously been shown to improve marrow-stimulation elicited MSC attraction and cartilage repair. The mechanisms behind the improved cartilage-repair response are partly elucidated and have suggested macrophages to be principal orchestrators of the improved repair response. It is now recognized that macrophages within the granulation tissue and the synovial membrane secrete a wide spectrum of soluble mediators that influence for better or worse the outcome of the cartilage repair procedures. Hence, strategies that modulate macrophage phenotype in order to guide these cells to release anti-inflammatory cytokines and anabolic factors that promote MSC attraction are promising alternatives for cartilage repair. In this regard, chitosan has attracted great interest because of its immunomodulatory potential in innate immune cells. Yet, its immune modulating properties in macrophages are controversial, as studies have both reported pro- or anti-inflammatory effects of chitosan in macrophages. More importantly, the minimal structural motifs required for chitosan to induce these divergent pro- or anti-inflammatory responses in macrophages remain unidentified.

This thesis aims at characterizing the interactions between macrophages and chitosan in order to determine how this polysaccharide can be used to modulate macrophage behavior in order to improve cartilage repair and preserve knee joints. The main objective of this thesis are to:

- 1) Determine how macrophage behavior can be modulated by chitosan stimulation in order to guide the release of anti-inflammatory and anabolic mediators that can improve cartilage repair and maintain knee joint integrity.
- 2) Generate a library of chitosans with distinct structural properties in order to evaluate the influence of chitosan structural properties on the macrophage ability to secrete factors that are beneficial for cartilage repair.
- 3) Define the cellular mechanisms that are involved in chitosan-mediated macrophage activation and identify the minimal structural motifs that allows chitosan to drive the release of anti-inflammatory cytokines while minimizing the release of pro-inflammatory factors.

To fulfill the first objective of this thesis, we tested the hypothesis that chitosan (80% degree of deacetylation (DDA), number-average molecular weight (M_n) 132 kDa) stimulates macrophages under different polarization states to release functional MSC chemokines and anti-inflammatory factors. In this study, U937 macrophages were obtained through phorbol-ester differentiation and further polarized to M1 or M2a phenotypes using IFN- γ /LPS or IL-4 stimulation in presence or absence of chitosan microparticles. We found that chitosan stimulation lead to distinct cytokine responses that depended on macrophage polarisation state. In M0 and M2a macrophages, chitosan enhanced the release of chemokines (CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10, CCL4/MIP-1 β), anti-inflammatory cytokines (IL-1ra and IL-10), and IL-1 β , with a 25- to 400-fold excess release of IL-1ra over IL-1 β . In M1 macrophages, chitosan amplified IL-1 β release and failed to enhance IL-1ra production. Using MSC chemotaxis assay, we found that conditioned medium from M0 and M2a macrophages, with or without chitosan stimulation, attracted primary human MSCs whereas M1 macrophage conditioned medium failed to stimulate MSC migration.

We then tested the hypothesis that acetylated chitosan induces the release of CXCL10/IP-10 and IL-1ra through the phosphorylation of the proteins STAT-1 and STAT-6 respectively. We found that chitosan stimulates IL-1ra release independently of STAT-6 activation whereas it induced CXCL10/IP-10 through a delayed activation of STAT-1. This delayed STAT-1/IP-10 response was not observed when macrophages were stimulated with non biodegradable chitosan (98% DDA, M_n 128 kDa). In primary human macrophages, chitosan (80% DDA, 132 kDa) stimulated CXCL10/IP-10 and IL-1 β release only when cells were primed with PMA. In absence of PMA, chitosan stimulation only increased IL-1ra released, suggesting that IL-1ra induction in primary cells was

independent of IL-1 β release. These data fulfilled the first objective of this thesis, by allowing us to conclude that biodegradable chitosan particles do not alter the inherent capacity of macrophages to attract MSC. Instead, we concluded that chitosan can be used to guide macrophages to repairing bone marrow stimulation defects, and to induce macrophages to release excess amounts of IL-1ra and IL-10 over IL-1 β , and chemokines.

In the second article presented in this thesis, we further identify the molecular mechanisms and minimal chitosan structural motifs required for chitosan that lead to the co-stimulation of either IL-1ra and CXCL10/IP-10, or IL-1 β and PGE₂. We generated a unique library of 20 chitosans with distinct DDA (60, 80 and 98%), acetylation pattern (block and random) and M_n (1, 3, 5, 10 and > 100 kDa) and evaluated their ability to stimulate CXCL10/IP-10, IL-1ra, IL-1 β and PGE₂ release in U937 macrophages. We found that a type 1 IFN response was elicited by specific chitosans (98% DDA, 3-10 kDa; block-acetylated 80% DDA, 10 and 190 kDa) at low doses which lead to paracrine IFN- β activity leading to STAT-1/STAT-2 activation and co-release of IL-1ra and CXCL10/IP-10. At higher doses, the 98% DDA chitosans above 5 kDa activated the inflammasome, which lead to co-stimulation of IL-1 β and PGE₂ release that suppressed the type 1 IFN response. We showed that the ability of distinct chitosans to induce cytokine release depended on their ability to disrupt lysosomes once internalized by macrophages and further showed that the extent of the lysosomal disruption dictated the nature and the magnitude of the cytokine response.

In summary, this thesis identifies that chitosan can be used to intensify the release of endogenous IL-1ra and IL-10 from macrophages in order to protect the joint from inflammatory mediators. The novel chitosan library generated in this thesis contributed to identifying the chitosan structural motifs required for this polysaccharide to elicit pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages and helps bridge an important gap in the literature concerning chitosan's immune modulating properties. This increased knowledge contributes to a more effective and safer translational use of this polysaccharide in cartilage repair and other biomedical applications.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	III
REMERCIEMENTS	IV
RÉSUMÉ.....	VI
ABSTRACT	X
TABLE DES MATIÈRES	XIII
LISTE DES TABLEAUX.....	XVIII
LISTE DES FIGURES.....	XIX
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XXII
LISTE DES ANNEXES.....	XXVI
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 Contexte	1
1.2 Contribution de cette thèse.....	2
1.3 Organisation de la thèse	3
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE.....	4
2.1 Structure générale de l'articulation du genou	4
2.1.1 Le cartilage articulaire.....	5
2.1.2 La membrane synoviale et le liquide synovial	5
2.1.3 L'os sous-chondral	6
2.2 L'arthrose	6
2.3 Traitement des lésions cartilagineuses	7
2.3.1 Les greffes ostéochondrales	7
2.3.2 L'implantation de cellules autologues.....	7
2.3.3 La stimulation osseuse	8
2.4 Étapes de réparation de cartilage par stimulation osseuse	9
2.5 Rôle de l'inflammation lors de la régénération tissulaire	11

2.5.1	Les neutrophiles	12
2.5.2	Les lymphocytes.....	13
2.5.3	Les macrophages	14
2.5.4	Influence des cytokines et chimiokines dans l'attraction des MSC	26
2.6	L'inflammation de l'articulation dans la progression de l'ostéoarthrite	27
2.6.1	Les macrophages synoviaux.....	27
2.6.2	Les fibroblastes synoviaux	27
2.6.3	Rôle des cytokines dans la progression de l'ostéoarthrite.....	28
2.7	Le chitosane.....	29
2.7.1	Modification des propriétés structurales du chitosane	30
2.7.2	Mesure du DDA du chitosane par RMN du proton	32
2.7.3	Mesure du poids moléculaire par chromatographie	32
2.8	Utilisation du chitosane dans la réparation ostéochondrale	33
2.8.1	Mécanismes cellulaires impliqués dans la réparation ostéochondrale induite par les implants de chitosane	34
2.8.2	Réponses des neutrophiles au chitosane.....	34
2.8.3	Réponses des macrophages au chitosane	35
2.9	Modèle d'étude des macrophages in vitro.....	39
2.9.1	Culture primaire de macrophages humains	39
2.9.2	Lignées cellulaires U937	40
2.10	Essais cellulaires et biochimiques	41
2.10.1	Mesure de la viabilité cellulaire	41
2.10.2	Les essais ELISA	42
2.10.3	L'électrophorèse sur gel d'acrylamide et le buvardage de type western	45
2.10.4	L'immunomarquage, la cytométrie de flux et la microscopie confocale	45

2.10.5	Essais de migration des cellules souches mésenchymateuse	47
CHAPITRE 3 RATIONELLE ET ORGANISATION GÉNÉRALE DES ARTICLES		48
3.1	Objectifs de cette thèse.....	52
3.2	Hypothèses générales émises dans cette thèse	52
3.2.1	Objectifs de l'article 1	52
3.2.2	Hypothèses de l'article 1	53
3.2.3	Objectifs de l'article 2	53
3.2.4	Hypothèses de l'article 2	53
CHAPITRE 4 ARTICLE 1: BIODEGRADABLE CHITOSAN MICROPARTICLES INDUCE DELAYED STAT-1 ACTIVATION AND LEAD TO DISTINCT CYTOKINE RESPONSES IN DIFFERENTIALLY POLARIZED HUMAN MACROPHAGES IN VITRO		55
4.1	Abstract	57
4.2	Introduction	59
4.3	Materials and methods	61
4.4	Results	67
4.5	Discussion	80
4.6	Conclusions	85
4.7	Competing interest statement	85
4.8	Acknowledgments	85
4.9	References	86
4.10	Supplementary data	92
CHAPITRE 5 ARTICLE 2: LYSOSOMAL RUPTURE INDUCED BY STRUCTURALLY DISTINCT CHITOSANS EITHER PROMOTES A TYPE 1 IFN RESPONSE OR ACTIVATES THE INFLAMMASOME IN MACROPHAGES.....		94
5.1	Summary	96

5.2	Introduction	98
5.3	Results	100
5.4	Discussion	113
5.5	Experimental procedures.....	117
5.6	Author contribution	120
5.7	Acknowledgements	121
5.8	Conflicts of interest	121
5.9	References	121
5.10	Supplemental figures.....	126
CHAPITRE 6 RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES : INFLUENCE DES MÉTHODES DE DÉTACHEMENTS DES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES SUR LEUR CAPACITÉ DE MIGRATION ET D'ADHÉSION CELLULAIRE DANS DES ESSAIS IN VITRO.....		
6.1	Préambule.....	132
6.2	Introduction	132
6.3	Matériels et méthodes.....	134
6.3.1	Réactifs.....	134
6.3.2	Cultures des MSC.....	134
6.3.3	Essais de migration Transwell.....	135
6.3.4	Coloration des cellules au Hoechst et quantification de la migration cellulaire	137
6.3.5	Essais d'adhésion cellulaires	138
6.3.6	Buvardage de type western pour l'analyse de l'expression de PDGF-R	138
6.3.7	Analyses de cytométrie en flux pour l'expression de CD29	139
6.3.8	Analyses statistiques	139
6.4	Résultats	139

6.5	Discussion et conclusions.....	144
CHAPITRE 7	DISCUSSION GÉNÉRALE	146
CHAPITRE 8	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	156
BIBLIOGRAPHIE		158

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : Propriétés des chitosanes rapportées sur des études évaluant la réponse des macrophages au chitosane (tableau adapté de Hoemann et Fong 2017).	38
Table 4.1: Chitosan solutions used in this study.	62
Table 4.2: Study design, U937 differentiation, polarization and conditioned medium generation.	64
Table 5.1. Properties of the chitosans generated and tested in this study.	102
Tableau 6.1 : Résumé des méthodes de détachement cellulaires utilisées dans des essais de migration impliquant les MSC.	133
Tableau 6.2 : Manipulations réalisées lors des quatre méthodes de détachement cellulaire évaluées dans ce chapitre.	137

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1 : Structure générale de l'articulation du genou	4
Figure 2.2 : Étapes de la réparation du cartilage par stimulation osseuse.....	9
Figure 2.3 : Étapes de la réparation du cartilage et de l'os sous-chondral dans un modèle de réparation du cartilage par stimulation osseuse chez le lapin	11
Figure 2.4 : Polarisation des macrophages vers les phénotypes M1, M2a et M2c	16
Figure 2.5 : Activation des voies STAT-1 et STAT-2 par les IFN de type 1 et de type 2	18
Figure 2.6 : Activation des voies STAT-3 et STAT-6 par IL-4, IL-13 et IL-10.....	19
Figure 2.7 : Formation des autophagosomes durant l'autophagie	21
Figure 2.8 : Molécules déterminantes exprimées par les macrophages M1, M2, et ceux retrouvés lors de la réparation tissulaire.....	23
Figure 2.9 : Balances des cytokines IL-1ra, IL-10, IL-1 β et TNF- α dans l'articulation influencent le développement de l'ostéoarthrite	29
Figure 2.10 : Schéma représentant la structure linéaire du chitosane. Le chitosane peut varier en poids moléculaire, DDA et peut être acétylé en bloc ou de manière aléatoire	31
Figure 2.11 : Schéma représentant la détection d'une protéine d'intérêt par ELISA en sandwich.	43
Figure 2.12 : Principe de détection des protéines par essais multiplexes.	44
Figure 2.13 : Schéma représentant la chambre de migration Transwell® utilisée pour les essais de migration des MSC.....	47
Figure 3.1 : Organigramme présentant les étapes majeures des travaux à réaliser dans cette thèse.	51
Figure 4.1: Graphical Abstract	58
Figure 4.2: Macrophage interaction with latex beads or RITC-labeled chitosan particles observed by 2-D confocal microscopy.	68

Figure 4.3: Release of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines by differentially polarized D-U937 macrophages.....	72
Figure 4.4: Cell surface analysis of CD86, CD80 and CD206 in polarized D-U937 macrophages.	73
Figure 4.5: Human MSC migration to low-serum D-U937 macrophage-CM in different polarization states with and without 80M chitosan stimulation.	74
Figure 4.6: Effect of chitosan particles on phosphorylation of STAT-1 and STAT-6 in D-U937.	76
Figure 4.7: Chitosan GlcNA content is critical for STAT-1 activation and IP-10 release without influencing cytocompatibility.	77
Figure 4.8: Small molecular weight 80% DDA chitosan fragments induce the same delayed activation of STAT-1 and IP-10 release in D-U937 macrophages as 130 kDa 80% DDA chitosan.....	78
Figure 4.10: Human primary bone-marrow-derived MSC demonstrate multilineage potential and can differentiate towards bone or fat when cultured in osteogenic and adipogenic media....	92
Figure 4.11: Polarized D-U937 macrophage CM are not cytotoxic for MSC.	93
Figure 4.12: Release of IP-10 and IL-1ra by chitosan-stimulated D-U937 macrophages as a function of chitosan dose.....	93
Figure 5.1. Graphical abstract	97
Figure 5.2. Determination of chitosan DDA by H^1 NMR.....	101
Figure 5.3. Release of CXCL10, IL-1ra, IL-1 β and PGE $_2$ from macrophages stimulated for 24 hours with the chitosan library.	105
Figure 5.4. Chitosan induces a delayed type 1 IFN cytokine response that involves paracrine IFN- β activity to stimulate IL-1ra and CXCL10 release.	106
Figure 5.5. Chitosan-induced cytokine responses are dependent on lysosomal acidification and are accompanied by slowed autophagy flux..	110
Figure 5.6. Chitosans that stimulate cytokine release induce lysosomal disruption, which leads to galectin-3 recruitment to chitosan-containing vesicles and slowed autophagy flux.	112

Figure 5.7. Positive controls for cytokine array, showing differential release of IL-1ra and CXCL10, IL-1 β and PGE ₂ by macrophages after 24 hours of stimulation with 100 ng/mL LPS, 20 ng/mL IFN- γ or 20 ng/mL IL-4.....	126
Figure 5.8. 98% DDA chitosans stimulate macrophages induce higher LDH leakage than partly-acetylated chitosans.....	127
Figure 5.9. Chitosan tendency to precipitate and aggregate correlate with IL-1 β , PGE ₂ and LDH leakage.....	128
Figure 5.10. Chitosan either co-stimulates IL-1ra and CXCL10 release and co-stimulates IL-1 β and PGE ₂ release.....	129
Figure 5.11. Chitosan-mediated STAT-1 phosphorylation is dependent on de novo gene expression or protein synthesis.....	130
Figure 5.12. Chitosan 98-10K induces the formation of GCS that co-localize with LC3	131
Figure 6.1 : Analyses de buvardage de type western montrant que les méthodes de détachement cellulaire à base de trypsine mènent à la dégradation de PDGF-R chez les MSC humains..	140
Figure 6.2 : Résultats des essais de migration Transwell.....	142
Figure 6.3 : Expression de CD29 et adhésion des MSC sur l'atélocollagène.	143

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

bFGF	Facteur de croissance de base des fibroblastes
CCM	Milieu de culture complet
CCL2/MCP-1	Protéine chimioattractante des monocytes-1
CCL3/MIP-1 α	Protéine inflammatoire macrophagique-1 Alpha
CCL4/MIP-1 β	Protéine inflammatoire macrophagique-1 Beta
CCL5/RANTES	<<Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted>>
CCR2	Récepteur de chimiokine 2
CCR7	Récepteur de chimiokine 7
CD163	<<Cluster of Differentiation 163>>
CD200-R	<<Cluster of Differentiation 200 Receptor>>
CD206	<<Cluster of Differentiation 206>>
CD220	<<Cluster of Differentiation 220>>
CD29	<<Cluster of differentiation 29>>
CD3	<<Cluster of Differentiation 3>>
CD4	<<Cluster of Differentiation 4>>
CD64	<<Cluster of Differentiation 64>>
CD8	<<Cluster of Differentiation 8>>
CD80	<<Cluster of Differentiation 80>>
CD86	<<Cluster of Differentiation 86>>
CD98	<<Cluster of Differentiation 98>>
CFU-GM	Progéniteur commun granulocytaire/monocytaire
CFU-M	Progéniteur commun monocytaire
CM	<<Conditioned medium>>
CRD	Domaines de reconnaissance des carbohydrates
CXCL8/IL-8	Interleukine-8
CXCL10/IP-10	Protéine 10 induite par l'Interféron-Gamma
CXCL12/SDF-1 α	Facteur dérivé du Stroma Alpha
DAMP	Motifs moléculaires associés aux dommages
DDA	Degré de déacétylation
D-U937	<<Differentiated U937 macrophages>>

ELISA	<<Enzyme-linked immunosorbent assay>>
GAG	Glycosaminoglycane
GlcN	<<Glucosamine>>
GlcNAc	<<N-acetyl glucosamine>>
GLM	Modèle linéaire généralisé
GM-CSF	Facteurs de stimulation des colonies granulocytaires/monocytaires
GP	Glycérolphosphate
GPC	Chromatographie par perméation de gel
HMGB-1	<<High mobility group box-1>>
HONO	Acide nitrique
HRP	Peroxydase de raifort
ICA	Implantation de chondrocytes autologues
IFNAR1	Récepteur de l'interféron-alpha 1
IFNAR2	Récepteur de l'interféron-alpha 2
IFNGR1	Récepteur de l'interféron-gamma 1
IFNGR2	Récepteur de l'interféron-gamma 2
IFN- α	Interféron-Alpha
IFN- β	Interféron-Beta
IFN- γ	Interféron-Gamma
IL-1ra	Récepteur antagoniste de l'interleukine-1
IL-1 β	Interleukine-1Beta
IL-4	Interleukine-4
IL-6	Interleukine-6
IL-10	Interleukine-10
IL-12	Interleukine-12
IL-12p70	Interleukine-12, hétérodimère p70
IL-13	Interleukine-13
IL-18	Interleukine-18
iNOS	Synthase de l'oxide nitrique inducible
JAK	<<Janus Kinase>>
LC3	<<Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain>>

LDH	Lactate déshydrogénase
LPS	Lipopolysaccharide
MALS	Détecteurs de diffusion de lumière multi-angle
M-CSF	Facteur de stimulation des colonies monocytaires
MDM	<<Monocyte-derived macrophages>>
MEC	Matrice extracellulaire
MMP-2	Métalloprotéinase matricielle-2
MMP-9	Métalloprotéinase matricielle-9
M _n	Poids moléculaire moyen en nombre
MSC	Cellules souches mésenchymateuses
MTT	bromure de 3-(4,5-dyméthyl-2-thiazozyl)-2,5-diphenyl tetrazolium
M _w	Poids moléculaire moyen en masse
NLR	<<NOD-like receptors>>
NLRP3	<<NLR family, pyrin domain-containing 3>>
OA	Ostéoarthrite
PAMP	Motifs moléculaires associés aux pathogènes
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PDGF-R	Récepteur du PDGF-BB
PDI	Polydispersité
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PKC	<<Protein kinase C>>
PMA	<<Phorbol myristate acetate>>
PRR	Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
RITC	Rhodamine isothiocyanate
RMN	Résonance magnétique nucléaire
SDS	Dodécylsulfate de sodium
STAT	<<signal transducers and activators of transcription>>
TGF- β	Facteur de croissance transformant-Beta
TLR	Récepteur de type Toll
TNF- α	Facteur de nécrose tumorale Alpha

TRAP	<<Tartrate acid-resistant phosphatase>>
TYK2	<<non-receptor tyrosine-protein kinase 2>>
VCAM-1	Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
α -MEM	Milieu essentiel minimum de Eagle Alpha

LISTE DES ANNEXES

Annexe A – Certificats d'éthique de la recherche avec des êtres humains de l'École Polytechnique de Montréal	179
Annexe B – Autorisation de l'éditeur Elsevier pour droits d'auteur.....	183

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Contexte

Il est estimé que plus de 3 millions de Canadiens, soit un individu sur dix, sont atteints d'arthrose, la forme la plus courante d'arthrite. Cette maladie chronique, affectant les articulations, mène à la détérioration du cartilage articulaire et de l'os sous-jacent. Cette pathologie touche les personnes de tous âges et a souvent des effets débilissants sur la qualité de vie des individus touchés. Les répercussions de l'arthrite sur l'économie canadienne sont estimées à 33 milliards de dollars annuellement (Société de l'arthrite, 2013). Il a été évalué qu'entre 2010 et 2015, le fardeau économique cumulatif de cette maladie sur la société canadienne (sous forme de coûts directs liés aux soins de santé ou perte de productivité) a atteint plus de 230 milliards de dollars (Société de l'arthrite, 2013). En ce moment, on peut traiter, mais l'on ne peut pas guérir l'arthrite. D'ici 2036, il est estimé que l'arthrite touchera un Canadien sur cinq, avec un nouveau diagnostic d'arthrose établi toutes les minutes (Société de l'arthrite, 2013).

Le cartilage est un tissu avasculaire qui possède une capacité de réparation intrinsèque quasi inexistante. Suite à un traumatisme ou lors d'une inflammation chronique de l'articulation, le cartilage se dégrade graduellement sans jamais se réparer, ce qui promeut le développement de l'arthrose. Actuellement, la stimulation osseuse est le traitement de première ligne pour traiter les patients atteints de lésions ostéochondrales (Bedi, Feeley, & Williams, 2010). Cette technique consiste à perforer l'os sous-chondral afin d'amorcer une réponse de guérison spontanée qui va permettre le recrutement de nouvelles cellules souches mésenchymateuses (MSC) au site de lésion qui vont pouvoir générer un nouveau tissu cartilagineux. Malgré un succès clinique à court terme, le tissu obtenu par stimulation osseuse est fibrocartilagineux et possède des propriétés biomécaniques plus faibles que le cartilage hyalin original (Knutsen et al., 2007; Knutsen et al., 2004).

Précédemment, des implants hybrides à base de sang autologue et de chitosane ont été développés afin d'améliorer la réparation du cartilage induite par stimulation osseuse (Chevrier, A., Hoemann, Sun, & Buschmann, 2007; Hoemann, C. D. et al., 2005). Le chitosane est un polysaccharide obtenu à partir de déacétylation de la chitine. Une fois implanté dans les lésions ostéochondrales, l'implant sang/chitosane induit une inflammation aigüe où des macrophages sont mobilisés aux tissus adjacents à l'implant et est ensuite suivi d'un recrutement accru des MSC (Chevrier, A. et al., 2007;

Hoemann, C. D. et al., 2010). Les macrophages sont des cellules du système immunitaire inné jouant des rôles importants dans la régénération tissulaire et l'homéostasie des tissus (Mosser & Edwards, 2008). Ensemble, ces observations suggèrent que l'interaction entre les macrophages et le chitosane mène à la libération de facteurs anaboliques qui promeuvent le recrutement *in situ* des MSC et leur différenciation appropriée dans le nouveau tissu formé.

Malgré cela, il existe toujours un besoin pour améliorer cet implant, car celui-ci est beaucoup moins efficace pour la réparation ostéochondrale chez les animaux âgés. Nous posons l'hypothèse qu'afin de développer des implants à base de chitosane plus efficaces, il est critique de mieux caractériser l'interaction entre les macrophages et le chitosane et de définir comment les propriétés de ce polysaccharide influencent la libération de facteurs anaboliques bénéfiques pour le recrutement des MSC, la réparation et la préservation de l'intégrité des tissus cartilagineux.

1.2 Contribution de cette thèse

Les travaux de cette thèse sont multidisciplinaires et contribuent à l'avancement des connaissances dans les domaines du génie biomédical, de la médecine régénératrice, des biomatériaux et de l'immunologie.

En premier, les travaux présentés dans cette thèse évaluent pour la première fois la réponse de macrophages arborant différents phénotypes d'activations aux particules de chitosane. Cette étude, bien qu'elle soit *in vitro*, révèle comment les interactions entre les macrophages et le chitosane peuvent être exploitées pour améliorer le recrutement *in situ* des MSC et préserver l'intégrité des articulations. Notamment, cette étude démontre le potentiel du chitosane afin de stimuler la libération de deux puissants facteurs anti-inflammatoires, le récepteur antagoniste de l'interleukine-1 (IL-1ra) et l'interleukine-10 (IL-10) dans l'environnement ostéochondral.

Ces travaux présentent la création d'une librairie unique de chitosanes qui ont permis de décrire et d'identifier les propriétés structurales du chitosane qui gouvernent l'activation de réponse pro- ou anti-inflammatoires chez les macrophages. Ces travaux innovateurs établissent une fondation sur laquelle la communauté scientifique pourra concevoir de nouveaux biomatériaux à base de chitosane possédant des propriétés immunomodulatrices contribuant à une meilleure performance des biomatériaux en question.

Globalement, les travaux de cette thèse démontrent qu'il existe un fort potentiel afin d'utiliser le chitosane pour moduler de manière positive le comportement des macrophages durant la réparation ostéocondrale et durant l'inflammation des articulations.

1.3 Organisation de la thèse

Mis à part le premier chapitre qui sert d'introduction, cette thèse comporte 5 chapitres :

Le chapitre 2 présente une revue des connaissances et discute des différents sujets nécessaires à la bonne compréhension des travaux réalisés dans cette thèse.

Le chapitre 3 expose la problématique, les hypothèses et les objectifs de cette thèse. Une présentation des articles scientifiques, et plus précisément comment ces objectifs répondent aux objectifs de la thèse, sera réalisée.

Les chapitres 4 et 5 présentent les deux articles scientifiques qui constituent les contributions de cette thèse.

Le chapitre 6 présente des résultats complémentaires obtenus lors de l'optimisation de méthodes.

Le chapitre 7 traite d'une discussion générale des travaux présentés dans cette thèse.

Le chapitre 8 présente un bilan des résultats principaux obtenus, les conclusions tirées et présentent des recommandations pour les travaux à venir.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

Ce chapitre présente les éléments scientifiques nécessaires à la compréhension des travaux de recherche présentés dans cette thèse. Ce chapitre discutera des sujets suivants : le cartilage articulaire, le rôle du système immunitaire et de l'inflammation dans la régénération tissulaire et la progression de l'arthrose, le macrophage et son rôle dans la réparation des tissus, le chitosane et son implication dans la réparation ostéochondrale. Finalement, une brève revue des connaissances courantes caractérisant l'interaction entre les macrophages et le chitosane sera présentée.

2.1 Structure générale de l'articulation du genou

L'articulation du genou, entourée d'une capsule articulaire, est constituée de quatre composantes majeures qui sont l'os sous-chondrale, le cartilage articulaire, la membrane synoviale, et le liquide synovial (Figure 2.1) (Strand, Kimberly, & Isaacs, 2007). Ces quatre types de tissus seront présentés brièvement dans les sections suivantes.

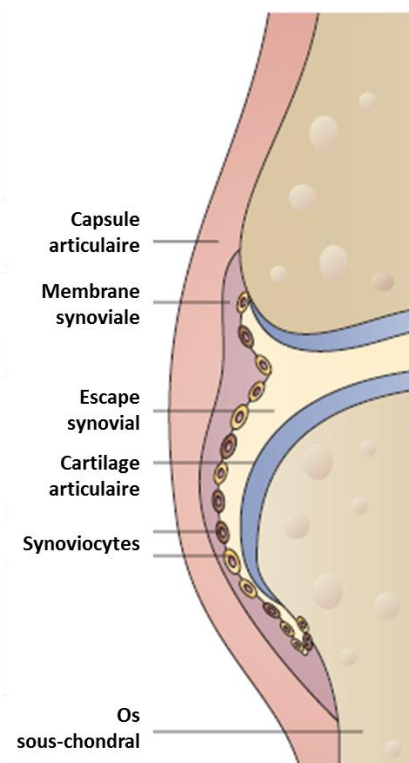


Figure 2.1 : Structure générale de l'articulation du genou (image adaptée de Strand, Kimberly et al. 2007).

2.1.1 Le cartilage articulaire

Le cartilage articulaire est le fin tissu conjonctif qui recouvre la surface des extrémités osseuses d'une articulation. Se retrouvant au-dessus de l'os sous-chondral, ce tissu assume deux fonctions : il permet un mouvement fluide et indolore de l'articulation; il facilite la transmission des charges mécaniques survenant lors du mouvement à l'os sous-chondral (Athanasίου, Shah, Hernandez, & LeBaron, 2001). Le cartilage est composé d'une dense matrice extracellulaire (MEC) constituée majoritairement d'eau (70%), de collagène de type II (20%), de protéoglycanes et glycoaminoglycanes (Athanasίου et al., 2001). La composition et l'intégrité du cartilage sont maintenues par des cellules spécialisées appelées chondrocytes. Ces cellules assurent l'homéostasie du cartilage et régulent de manière équilibrée la synthèse et la dégradation des constituants de la MEC (Athanasίου et al., 2001).

2.1.2 La membrane synoviale et le liquide synovial

La membrane synoviale est le tissu encapsulant l'intérieur de l'articulation et sépare ce dernier des tissus conjonctifs adjacents. Il est possible de distinguer deux couches tissulaires dans la membrane synoviale. La première couche, faisant face à la cavité synoviale, est la paroi synoviale et est composée majoritairement de cellules appelées synoviocytes (Smith, M. D., 2011). Cette paroi cellulaire est soutenue par un tissu conjonctif fibreux vascularisé qui est beaucoup moins riche en cellules que la paroi cellulaire (Smith, M. D., 2011). Le rôle principal de la membrane synoviale est de maintenir l'intégrité de l'articulation en produisant, par le biais des synoviocytes, les nutriments nécessaires pour le cartilage articulaire et les molécules lubrifiantes permettant de faciliter le mouvement de l'articulation (Bhattaram & Chandrasekharan, 2016; Smith, M. D., 2011).

Il existe deux types de synoviocytes ayant des fonctions différentes dans la membrane synoviale (Smith, M. D., 2011). Les synoviocytes de type A, appelés synoviocytes macrophagiques, sont importants pour la phagocytose des cellules apoptotiques et des débris générés dans le tissu (Smith, M. D., 2011). Ils maintiennent également l'équilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires dans le liquide synovial. Les synoviocytes de type B, appelés synoviocytes fibroblastiques, sont responsables de maintenir la composition de la MEC de la membrane synoviale et la composition du liquide synovial (Bhattaram & Chandrasekharan, 2016; Smith, M. D., 2011). En outre, elles

sécrètent la molécule lubrifiante Lubricine et l'acide hyaluronique dans le liquide synovial permettant ainsi le bon fonctionnement et le mouvement fluide de l'articulation (Bhattaram & Chandrasekharan, 2016).

2.1.3 L'os sous-chondral

Le tissu osseux est formé d'une phase inorganique et d'une phase organique. La phase inorganique est composée majoritairement d'ions calcium et phosphate sous forme de cristaux d'hydroxyapatite. La phase organique est composée de collagène de type I et d'autres protéines dont l'ostéopontine, l'ostéocalcine et l'ostéonectine. Au sein de l'os, on retrouve deux types de structure : l'os cortical et l'os trabéculaire. L'os cortical est dense et solide, conférant à l'os ses propriétés mécaniques. L'os trabéculaire est poreux et moins dense que l'os cortical et contient la moelle osseuse, l'organe contenant les cellules précurseurs d'origine mésenchymateuses et hématopoïétiques (Clarke, 2008). L'os est formé de deux façons distinctes. L'os peut être formé par ossification endochondrale, ou bien ossification membranaire. L'ossification endochondrale commence par la formation d'un tissu cartilagineux qui par la suite est remplacé en tissu osseux suite à l'hypertrophie des chondrocytes et la minéralisation de la matrice. Lors de l'ossification membranaire, les cellules souches mésenchymateuses se différencient directement en ostéoblastes (cellules osseuses) qui vont produire la MEC osseuse et organiser le nouveau tissu osseux formé (Shapiro, Koide, & Glimcher, 1993).

2.2 L'arthrose

L'arthrose, aussi appelée ostéoarthrite (OA), est une condition pathologique correspondant à la dégénération du cartilage articulaire et de l'os sous-jacent (Iqbal & Fleischmann, 2007). L'initiation de l'OA peut être due soit à un traumatisme, ou bien à une inflammation chronique au niveau du genou. Le traumatisme, causé par une blessure ou bien un impact, va induire la mort des chondrocytes. Étant donné que le cartilage n'est pas vascularisé, celui-ci possède une capacité de régénération intrinsèque très faible, et ainsi, celui-ci se dégrade progressivement sans aucune réparation spontanée possible (Bedi et al., 2010). Une inflammation chronique va également mener à la progression de l'OA par le biais de molécules cataboliques qui vont induire la mort des chondrocytes et la libération d'enzymes capable de dégrader le cartilage (Scanzello & Goldring, 2012).

2.3 Traitement des lésions cartilagineuses

Pour réparer le cartilage endommagé, plusieurs traitements ont été développés et incluent l'autogreffe ou l'allogreffe ostéochondrale, l'implantation de chondrocytes autologues et la stimulation osseuse (ou microfracture) (Bedi et al., 2010).

2.3.1 Les greffes ostéochondrales

L'autogreffe ostéochondrale consiste à l'implanter des tissus ostéochondraux prélevés directement chez le patient à partir de régions de l'articulation moins sollicitées dans le mouvement de l'articulation et supportant en temps normal de faibles charges mécaniques. Dans le cadre de l'allogreffe, le tissu provient d'un cadavre dont le tissu est en bonne condition et adéquat pour remplacer le tissu endommagé du patient. Les avantages des greffes sont qu'elles se réalisent en une seule opération et permettent l'implantation immédiate d'un cartilage hyalin viable. Ainsi la période de convalescence est relativement brève. Toutefois, l'autogreffe mène à une morbidité au niveau du site du donneur et la taille de la greffe possible est limitée. Dans le cadre de l'allogreffe, cette procédure est coûteuse, la greffe peut être immunologiquement rejetée et il existe toujours le risque de transmission de maladies (Bedi et al., 2010).

2.3.2 L'implantation de cellules autologues

L'implantation de chondrocytes autologues (ICA) consiste à récupérer des chondrocytes provenant du cartilage d'une région non chargée et de les mettre en culture afin de pouvoir obtenir un nombre suffisant de cellules pour traiter la lésion cartilagineuse (Brittberg et al., 1994). Une fois que le nombre de cellules requis est atteint, les cellules sont implantées sous ou sur une membrane attachée à la lésion cartilagineuse (Bedi et al., 2010). Une fois injectée, il est supposé que les cellules vont produire les cytokines et une nouvelle MEC cartilagineuse pouvant ainsi aider à remplacer le tissu endommagé. Cette technique nécessite un nombre élevé de cellules pour le traitement et ainsi le besoin d'une expertise technique importante pour l'expansion des cellules en culture. De plus, cette technique nécessite deux et parfois trois chirurgies : Une pour la collecte des cellules et une pour l'implantation des cellules suite à la culture cellulaire (Bedi et al., 2010), et une autre pour enlever le tissu hypertrophique. Ces facteurs font de l'ICA une technique relativement plus coûteuse que les autres techniques de réparation du cartilage. L'ICA est recommandée pour le traitement de lésions ostéochondrales supérieures à 4 cm² ou comme un

traitement de deuxième ligne pour les patients dont la stimulation osseuse a échoué pour le traitement de leurs lésions ostéochondrales (Knutsen et al., 2007).

2.3.3 La stimulation osseuse

La stimulation osseuse consiste au débridement du tissu endommagé et la perforation multiple de l'os sous-jacent afin de créer des canaux d'accès entre la moelle osseuse et la lésion ostéochondrale (Figure 2.2) (Mithoefer et al., 2005). Cette perforation va générer un caillot sanguin qui va servir d'échafaudage tissulaire pour amorcer le processus de réparation tissulaire (Hoemann, C. D. et al., 2010; Mithoefer et al., 2005). Ce processus de réparation va induire une inflammation locale qui va permettre le recrutement des précurseurs stromaux et hématopoïétiques nécessaires à la formation d'un nouveau cartilage hyalin (Hoemann, C. D. et al., 2010). Les précurseurs stromaux (dont les MSC) vont, en fonction de leur localisation anatomique, se différencier en cellules osseuses (ostéoblastes et ostéocytes) ou bien en chondrocytes et contribuent ainsi à la reconstruction d'un nouveau tissu cartilagineux (Richter, 2009). Les événements cellulaires et le processus de réparation seront discutés plus en détail dans la section 2.4. Cette technique a un avantage important face à l'ICA, car elle est beaucoup plus simple et requiert une seule intervention chirurgicale (Bedi et al., 2010). Au Canada, la stimulation osseuse est la procédure chirurgicale la plus adoptée pour le traitement des lésions articulaires, car elle est beaucoup moins coûteuse et démontre la même efficacité que les thérapies à base cellulaire (Alford & Cole, 2005; Knutsen et al., 2007; Knutsen et al., 2004). Toutefois, la stimulation osseuse n'est pas recommandée pour le traitement de lésions ostéochondrales larges (Knutsen et al., 2007).

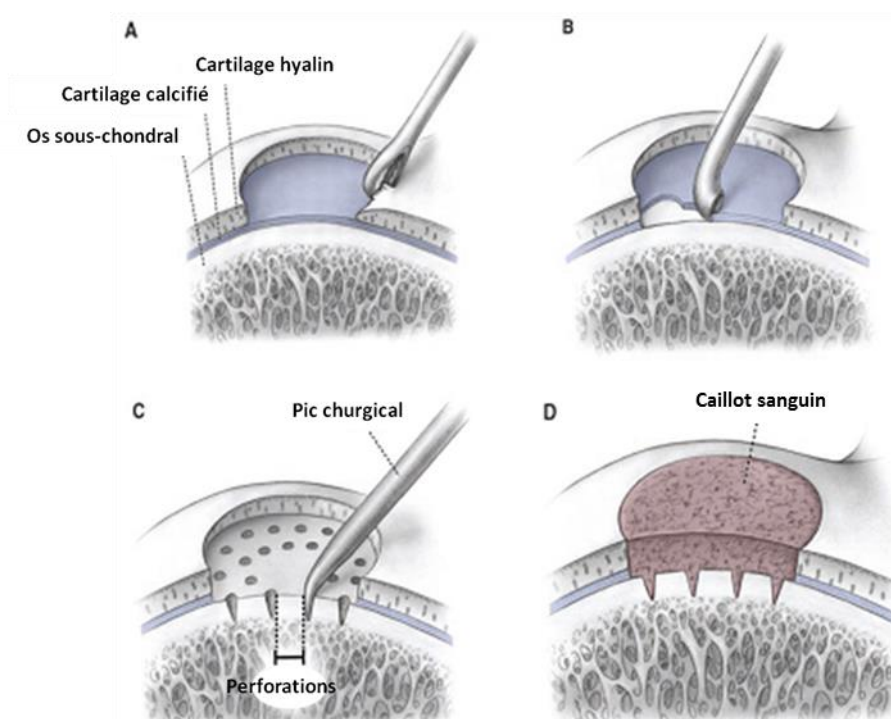


Figure 2.2 : Étapes de la réparation du cartilage par stimulation osseuse. A et B) Le cartilage endommagé et la couche de cartilage calcifiée sont d'abord enlevés. C) Un pic chirurgical va ensuite être utilisé pour créer des perforations dans l'os sous-chondral afin de générer un saignement et D) un caillot sanguin (image adaptée de Mithoefer et al. 2005).

2.4 Étapes de réparation de cartilage par stimulation osseuse

En général, les lésions restreintes aux régions du cartilage articulaire sont incapables de se réparer spontanément tandis que les lésions qui traversent le cartilage articulaire et atteignent également l'os sous-chondral démontrent une réponse de guérison provenant de la moelle osseuse (Shapiro et al., 1993). Les événements cellulaires prenant place durant la stimulation osseuse ont été amplement décrits chez les rongeurs (Anraku et al., 2009), les lapins et les chevaux (Frisbie et al., 2003; Shapiro et al., 1993). Au départ, le saignement induit dans l'os sous-chondral par la stimulation osseuse suite à la perforation du tissu permet la formation d'un caillot sanguin riche en fibrine qui progresse graduellement en tissu de granulation. (Frisbie et al., 2003). Lors de cette transition, une réponse inflammatoire locale et contenue commence où les leucocytes (cellules du système immunitaire) infiltrent la lésion et le caillot afin d'initier les premières étapes de la

réparation (Chevrier, A. et al., 2007). Pendant cette phase inflammatoire, plusieurs événements débutent place dans l'os sous-chondral. Ces événements sont la chondrogenèse, l'ostéogenèse, l'angiogenèse (formation de nouveaux vaisseaux sanguins) et le remodelage osseux (Chen, 2010; Chevrier, A. et al., 2007; Frisbie et al., 2003; Hoemann, C. D. et al., 2010; Shapiro et al., 1993). La réparation du cartilage articulaire par stimulation osseuse dépend particulièrement du recrutement des MSC dans la lésion ostéochondrale et leur différenciation appropriée une fois recruté dans le tissu de granulation. Les MSC sont recrutées à partir de niches couramment inconnues dans la moelle osseuse. Ces MSC vont se différencier soit en chondrocytes, ostéoblastes ou adipocytes afin de régénérer le cartilage articulaire et l'os sous-chondral (Shapiro et al., 1993).

Lors de la réparation ostéochondrale, l'ossification membranaire prend lieu à la base des trous au niveau des tissus de réparation adjacents à l'os sous-chondral résiduel (Shapiro et al., 1993). Lors de ce processus, les MSC présentes dans les trabécules osseuses adjacentes au tissu de granulation se différencient en ostéoblastes et amorcent la formation de l'os couche par couche. Au-delà de cette région, les MSC se différencient en chondrocytes et produisent la MEC riche en GAGs et collagène de type II (Shapiro et al., 1993). Les MSC différenciées en chondrocytes produisent ainsi des foyers chondrogéniques où une couche de chondrocytes est formée. Cette couche va amorcer la synthèse de cartilage articulaire hyalin dans les régions superficielles du tissu de réparation (Figure 2.3, onglets A,B et C) (Chevrier, A., Hoemann, Sun, & Buschmann, 2011). Dans les régions plus profondes du tissu de réparation, les foyers chondrogéniques vont s'hypertrophier et les chondrocytes hypertrophiés (identifiable par leur forte expression en collagène de type X) vont ensuite mourir par apoptose (Figure 2.3, onglet G) (Chevrier, A. et al., 2011). Cette hypertrophie est suivie par le recrutement des cellules endothéliales et la formation de vaisseaux sanguins dans le tissu. Une fois que ces premiers processus ont eu lieu, une matrice cartilagineuse transitoire est ensuite minéralisée pour produire de l'ossification endochondrale et la formation de nouvel os en dessous du nouveau cartilage hyalin formé (Chevrier, A. et al., 2011).

Il est bien connu que toutes ces étapes ayant lieu dans le tissu de granulation pendant le processus de réparation sont gouvernées par différentes populations cellulaires qui interagissent entre elles. Plus particulièrement, les leucocytes jouent des rôles indispensables à la bonne réparation du cartilage articulaire (Eming, Krieg, & Davidson, 2007). Différents types de leucocytes vont sécréter une multitude de molécules solubles sécrétées dans le tissu de granulation qui vont permettre

d'orchestrer la réponse régénératrice (Eming et al., 2007; Hoemann, C. D. et al., 2010; Koh & DiPietro, 2011).

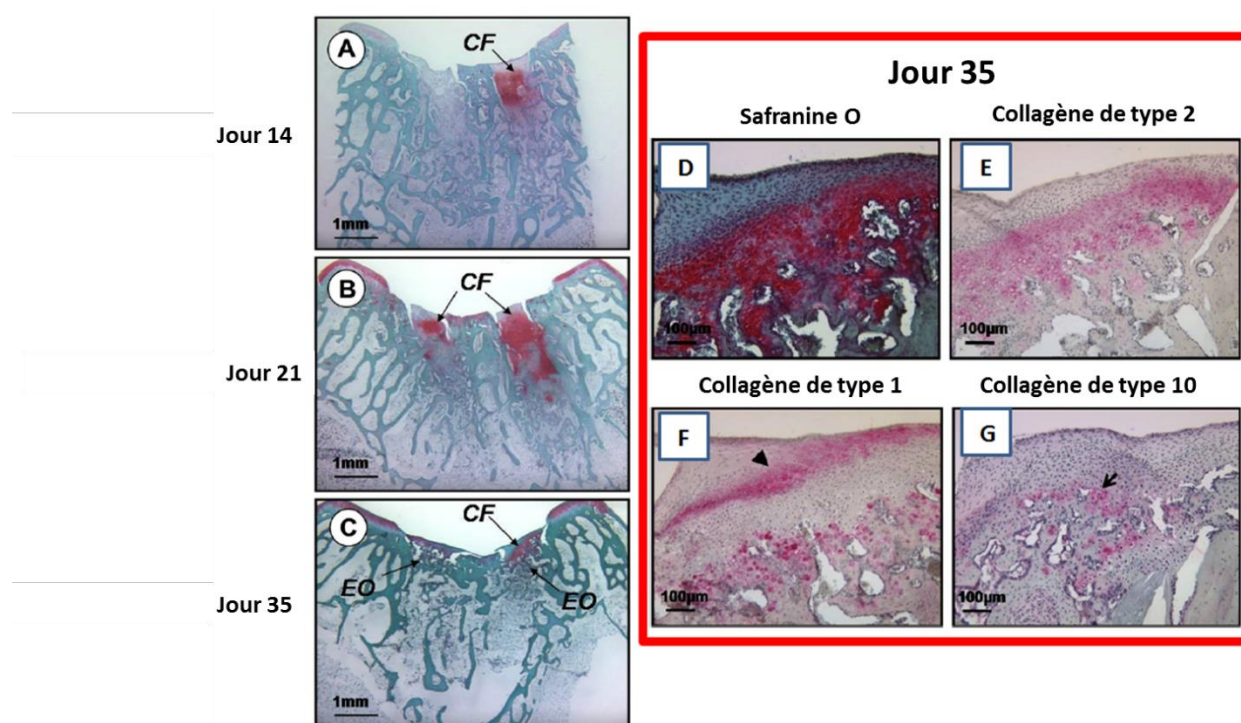


Figure 2.3 : Étapes de la réparation du cartilage et de l'os sous-chondral dans un modèle de réparation du cartilage par stimulation osseuse chez le lapin à 14 (onglet A), 21 (onglet B) et 35 (onglet C) jours après chirurgie. Dans les onglets A, B et C, les foyers chondrogéniques riches (notés CF) en GAGs sont retrouvés aux bases des perforations au-dessus de l'os sous-chondral. Après 35 jours, le tissu cartilagineux est minéralisé et remplacé par de l'os (notés EO pour « Endochondral Ossification »). Au jour 35 après l'opération, des foyers chondrogéniques riches en GAGs (onglet D) et collagène de type 2 (onglet E) sont observés. Des chondrocytes hypertrophiques exprimant le collagène de type X sont retrouvés à l'interface entre l'os sous-chondral et le nouveau tissu cartilagineux (onglet G) (image adaptée de Chevrier et al. 2011).

2.5 Rôle de l'inflammation lors de la régénération tissulaire

Il est bien reconnu que le processus de régénération des tissus épithéliaux, musculaires et conjonctifs (dont l'os et le cartilage) débute par une phase inflammatoire locale (Andrew, Andrew, Freemont, & Marsh, 1994; Arnold et al., 2007; Koh & DiPietro, 2011; Lucas et al., 2010). Au site de lésion, les neutrophiles et macrophages et lymphocytes T envahissent le caillot sanguin (Eming

et al., 2007; Schmidt-Bleek et al., 2009). La phase inflammatoire permet d'agir comme une première ligne de défense contre les corps étrangers et stimule la réparation du tissu par le biais de molécules solubles (cytokines, chimiokines, facteurs de croissances et protéine de la MEC) (Eming et al., 2007). Dans les sections suivantes, les rôles connus des différentes populations leucocytaires dans la réparation des tissus seront présentés. Une emphase sur les macrophages, cellules principales étudiées dans cette thèse, sera effectuée.

2.5.1 Les neutrophiles

Les neutrophiles sont les leucocytes les plus abondants dans le sang. Les neutrophiles sont une source importante de cytokines et chimiokines après l'activation par les PAMP (Motifs moléculaires associés aux pathogènes) ou DAMP (motifs moléculaires associés aux dommages) (Scapini et al., 2000; Wilgus, Roy, & McDaniel, 2013). Les neutrophiles activés sécrètent une grande quantité de TNF- α (Tumor Necrosis Factor Alpha), IL-1 β (Interleukine-1 Beta), IL-6 et CXCL8/IL-8 (Eming et al., 2007). Ces facteurs agissent de manière paracrine et autocrine afin de stimuler les cellules déjà présentes au site de lésion à sécréter leurs propres molécules effectrices nécessaires lors de la phase inflammatoire (Eming et al., 2007). Dès les premiers instants suivant une blessure, les neutrophiles sont rapidement recrutés au site de traumatisme (Eming et al., 2007).

Le premier rôle du neutrophile est de trouver et phagocyter tout pathogènes présents dans la lésion. Toutefois, l'importance de ces cellules dans la réponse régénératrice continue de faire débat (Dovi, Szpaderska, & DiPietro, 2004). Premièrement, l'élimination spécifique des neutrophiles n'empêche pas le processus de guérison de la peau et même au contraire accélère la réépithélialisation (Dovi, He, & DiPietro, 2003; Dovi et al., 2004). De plus, les neutrophiles activés sécrètent plusieurs médiateurs cataboliques (métalloprotéinase matricielle, enzymes cataboliques, superoxydes, dérivés réactifs de l'oxygène) qui sont souvent responsables de la dégradation des tissus lors d'une inflammation chronique qui persiste au sein du tissu (Wilgus et al., 2013). D'un autre côté, les neutrophiles jouent un rôle régulateur lors de l'inflammation. Durant le processus de guérison, les neutrophiles amorcent leur programme de mort cellulaire programmée (l'apoptose) après avoir rempli leur mandat au site de traumatisme (Wilgus et al., 2013). Les neutrophiles apoptotiques sont rapidement phagocytés par les macrophages via un processus physiologique appelé l'efférocytose. L'efférocytose des neutrophiles active chez les macrophages des voies de signalisation contribuant à la résolution de l'inflammation (Koh & DiPietro, 2011; Lafantaisie-

Favreau et al., 2013). De plus, il a été montré que les neutrophiles sécrètent également des facteurs capables de moduler le comportement et phénotype des macrophages afin qu'ils sécrètent des facteurs anaboliques contribuant à la résolution de l'inflammation (Daley et al., 2005).

2.5.2 Les lymphocytes

Il a été identifié que les lymphocytes sont impliqués dans la réparation des fractures osseuses mais leur rôle demeure inconnu. Des analyses histologiques de fractures osseuses ont démontré que les lymphocytes T et B (identifiés respectivement par l'expression exclusive des protéines CD3 (Cluster of differentiation 3) et CD220) sont présents au départ de la phase inflammatoire dans le caillot sanguin (Toben et al., 2011). Les lymphocytes T et B sont également présents durant la minéralisation de l'os et sont plus souvent abondants proche des régions où l'os est nouvellement reformé (Colburn, Zaal, Wang, & Tuan, 2009; Toben et al., 2011).

Les souris RAG^{-/-} (souris dépourvues de lymphocytes) possèdent des fractures osseuses qui guérissent plus vite dont le nouvel os obtenu a des propriétés mécaniques supérieures aux souris de type sauvage (Toben et al., 2011). Il s'avère que les lymphocytes influencent de manière positive et négative la réparation des fractures osseuses (Colburn et al., 2009; Schlundt et al., 2015; Toben et al., 2011). Cette influence, qu'elle soit positive ou négative, dépend du type de lymphocyte T. Il a été suggéré que les lymphocytes T cytotoxiques (exprimant la protéine CD8, aussi appelé lymphocytes T CD8+) jouent un rôle régulateur sur la réparation osseuse. En effet, une meilleure réparation de l'os est obtenue lorsque les lymphocytes T CD8+ sont spécifiquement inhibés (Park, J. E. & Barbul, 2004; Schaffer & Barbul, 1998; Schlundt et al., 2015). D'autre part, les lymphocytes T auxiliaires (exprimant la protéine CD4, aussi appelé lymphocytes T CD4+) ont un effet agonistique sur l'ostéogenèse (Grassi et al., 2016). Cela a été suggéré par des études *in vitro* démontrant que les milieux conditionnés provenant de lymphocytes T CD4+ promeuvent la différenciation ostéogénique des MSC (Grassi et al., 2016). Toutefois, ces études ne permettent pas exactement de conclure sur le rôle des lymphocytes en général sur la réparation tissulaire, car il semble que leurs effets bénéfiques ou néfaste sur la régénération des tissus dépendent du contexte cellulaire (le type de lymphocyte) et le type de tissu étudié (Schlundt et al., 2015).

2.5.3 Les macrophages

Les macrophages sont des cellules effectrices indispensables dans l'immunité innée. Ils sont impliqués dans la surveillance immunitaire, la phagocytose, l'élimination des corps étrangers et l'amorcement de l'immunité adaptative (Mosser & Edwards, 2008). L'importance des macrophages dans la régénération des tissus a premièrement été démontrée par Leibovitch et Ross qui ont rapporté que l'élimination sélective des macrophages inhibe et retarde la réparation des tissus dermiques (Leibovich & Ross, 1975). Depuis, le rôle des macrophages dans la réparation de plusieurs types de tissus a été étudié considérablement (Alexander et al., 2011; Arnold et al., 2007; Chang et al., 2008; Fahy et al., 2014; Lucas et al., 2010; Nahrendorf et al., 2007).

Les macrophages sont obtenus à la suite de plusieurs étapes de différenciations successives. La différenciation débute dans la moelle osseuse où une cellule souche hématopoïétique se différencie en précurseur CFU-GM (Progéniteur commun granulocytaire/monocytaire) (Mosser & Edwards, 2008). Ce précurseur GM-CFU s'engage ensuite dans la différenciation monocytaire en devenant un précurseur CFU-M (Progéniteur commun monocytaire) (Mosser & Edwards, 2008). Ce CFU-M mature dans la moelle osseuse pour devenir un monocyte (Mosser & Edwards, 2008). Une fois différenciée en monocyte, la cellule quitte la moelle osseuse pour circuler dans le sang. À ce stade, le monocyte est également appelé cellule mononucléaire du sang périphérique. La différenciation terminale du monocyte en macrophage se réalise après que le monocyte a quitté la circulation sanguine et a migré dans le tissu (Mosser & Edwards, 2008).

Les macrophages représentent des populations cellulaires hétérogènes (Geissmann, Jung, & Littman, 2003; Mantovani et al., 2004; Mosser & Edwards, 2008; Pettit, Chang, Hume, & Raggatt, 2008). Pour cette raison, plusieurs systèmes de classification des macrophages ont été suggérés dans la littérature afin de décrire les différents phénotypes adoptés par ces cellules *in vivo*. Dans les sections suivantes, le concept de polarisation des macrophages (Mantovani et al., 2004; Mosser & Edwards, 2008), le concept de monocyte inflammatoire et résident (Geissmann et al., 2003), et le macrophage spécialisé de l'os appelé ostéomac (Pettit et al., 2008), représentent trois modèles permettant de décrire de manière pertinente les différents phénotypes macrophagiques typiquement détectés durant la réparation des tissus.

2.5.3.1 La polarisation des macrophages

Afin d'assumer leurs diverses fonctions dans les tissus, les macrophages peuvent adopter différents états d'activation, aussi appelés phénotype de polarisation, qui sont induits par un éventail de facteurs (Mosser & Edwards, 2008). Présentement, deux phénotypes de polarisation majeurs ont été identifiés dans la littérature. Il s'agit de l'activation classique ou l'activation alternative des macrophages (Mantovani et al., 2004; Mosser & Edwards, 2008).

Le phénotype d'activation classique, aussi appelé polarisation M1, est obtenu lorsque les macrophages sont exposés à des cytokines pro-inflammatoires et à des pathogènes et doivent stimuler une réponse inflammatoire de type Th1 (Brown, Ratner, Goodman, Amar, & Badylak, 2012; Mantovani et al., 2004). La polarisation M1 est induite par l'IFN- γ (Interféron-Gamma), le LPS (lipopolysaccharide) ou le TNF- α (Brown, Ratner, et al., 2012; Mantovani et al., 2004). Les macrophages M1 peuvent être identifiés par l'expression des molécules de surface CD80 et CCR7 (récepteur de chimiokine 7) (Ambarus et al., 2012; Martinez, Gordon, Locati, & Mantovani, 2006). Également, ils sécrètent plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-12/p70 (Interleukine-12, hétérodimère p70) et des effecteurs bactéricidaux comme des DRO (dérivés réactifs de l'oxygène) et radicaux libres (monoxyde d'azote) (Figure 2.4) (Brown, Ratner, et al., 2012). Ils stimulent également le recrutement *in situ* des autres types de leucocytes (monocytes, neutrophiles et lymphocytes) en sécrétant des chimiokines inflammatoires comme CXCL8/IL-8, CCL2/MCP-1 (protéine chimioattractante des monocytes-1) CCL3/MIP-1 α (protéine inflammatoire macrophagique-1 Alpha), CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES (<<regulated on activation, normal T cell expressed and secreted>>) et CXCL10/IP-10 (protéine induite par l'IFN- γ) pour orchestrer la réponse Th1 (Figure 2.4) (Mantovani et al., 2004).

L'activation alternative des macrophages, aussi appelée polarisation M2, est obtenue lorsque les macrophages sont exposés à un stimulus de type Th2 provenant des lymphocytes T auxiliaires comme l'IL-4, l'IL-10 ou l'IL-13 (Brown, Ratner, et al., 2012; Mantovani et al., 2004). Parmi le phénotype M2, il est possible de davantage distinguer des phénotypes M2a, M2b ou M2c en fonction du stimulus responsable de l'activation alternative (Mantovani et al., 2004). Le phénotype M2a est obtenu par une stimulation à l'IL-4 ou l'IL-13 (Mantovani et al., 2004). Le phénotype M2b est obtenu par une costimulation avec des complexes immuns et des ligands du TLR (récepteur de type Toll) (Mantovani et al., 2004). Le phénotype M2c est obtenu par stimulation avec l'IL-10

(Mantovani et al., 2004). En général, les macrophages M2 expriment les molécules de surface CD163, CD200-R et CD206 et chez la souris, expriment fortement l'enzyme intracellulaire arginase-1 (Ambarus et al., 2012; Mantovani et al., 2004). Contrairement aux macrophages M1, les macrophages M2 produisent de faibles niveaux de facteurs pro-inflammatoires et sécrètent plus fortement des cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-1ra et l'IL-10 (Lolmede et al., 2009; Mantovani et al., 2004). De plus, les macrophages M2 sécrètent plusieurs facteurs mitogéniques dont le PDGF, VEGF (facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), bFGF (facteur de croissance de base des fibroblastes et TGF- β (facteur de croissance transformant-Beta) (Figure 2.4) (Fichtner-Feigl, Strober, Kawakami, Puri, & Kitani, 2006; Kodelja et al., 1997; Mantovani et al., 2004).

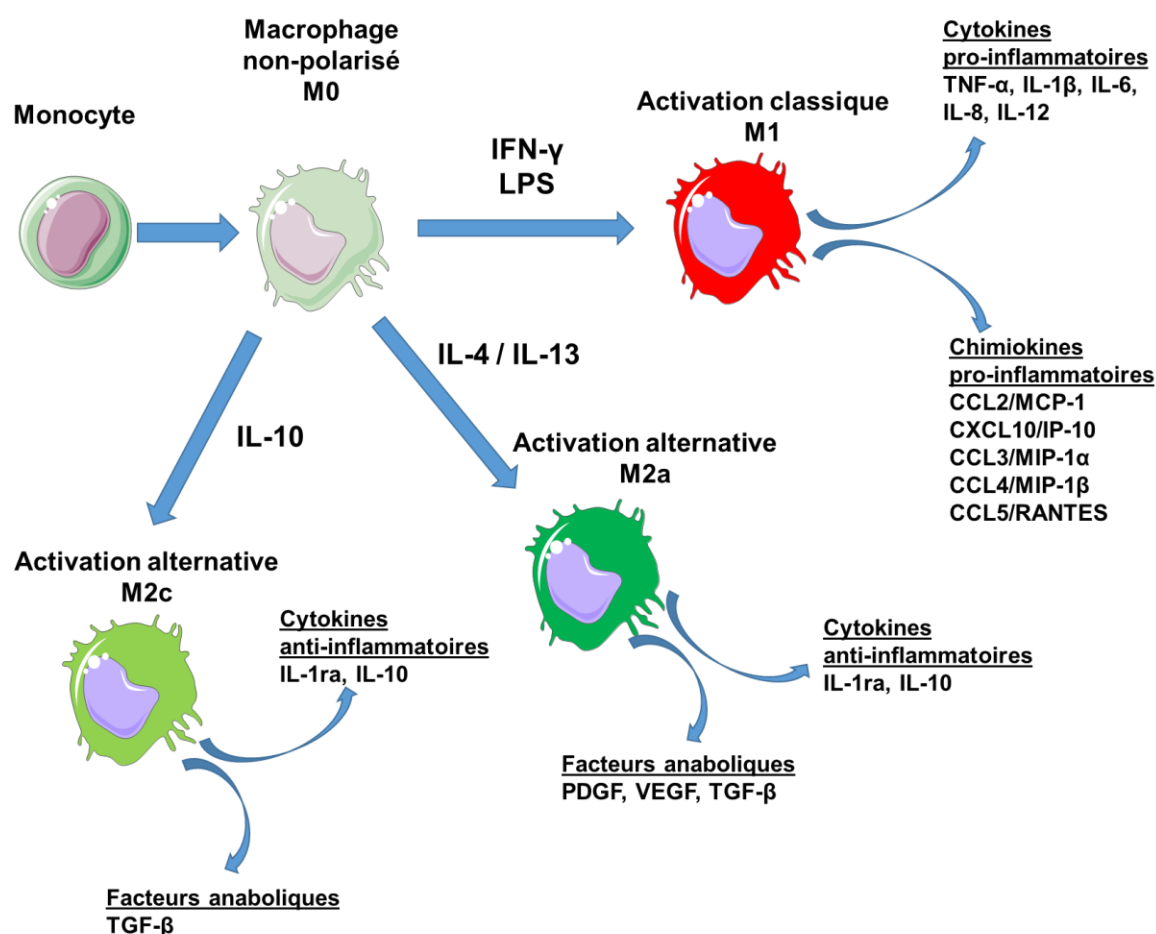


Figure 2.4 : Polarisation des macrophages vers les phénotypes M1, M2a et M2c (image adaptée de Mantovani et al. 2004)

2.5.3.1.1 *La voie de signalisation STAT dans la polarisation des macrophages*

Le phénotype de polarisation et l'activation des macrophages induite par les cytokines IFN- γ , IL-, IL-10 et IL-13 sont régulés par la voie de signalisation JAK-STAT (Gordon, 2003; Lawrence & Natoli, 2011). Dans cette voie de signalisation, la liaison de ces cytokines sur leurs récepteurs respectifs induit une oligomérisation de ces derniers qui permet l'activation des kinases cytosoliques JAK (<<Janus kinase>>, JAK1, JAK2, JAK3 et Tyk2 (<<non-receptor tyrosine-protein kinase 2>>)). Cette activation permet le recrutement des protéines STAT (<<Signal transducers and activators of transcription>>, STAT-1 à STAT-6) au domaine cytosolique du récepteur, ce qui mène à la phosphorylation et l'activation de protéines STAT spécifique à chaque cytokine (Tamiya, Kashiwagi, Takahashi, Yasukawa, & Yoshimura, 2011). Les protéines STAT phosphorylées se dimérisent et se déplacent du cytoplasme vers le noyau pour initier l'expression de gènes spécifiques (Tamiya et al., 2011).

L'IFN de type 2, aussi connu sous le nom d'IFN- γ , est un facteur prédominant dans l'activation classique des macrophages et active la voie de signalisation STAT-1 pour amorcer la transcription de gènes associés à la polarisation M1 des macrophages (Lawrence & Natoli, 2011; Platanias, 2005). La stimulation de IFNGR (récepteur IFN- γ) par IFN- γ induit la phosphorylation et dimérisation de STAT-1. Les dimères de STAT-1 se lient aux promoteurs des gènes codant pour les molécules pro-inflammatoires NOS2 (gène codant pour iNOS), l'IL-6, l'IL-12, CXCL10/IP-10, CCL2/MCP-1 et CCL4/MIP-1 β et les récepteurs CD64, CD80 (Figure 2.5) (Lawrence & Natoli, 2011; Mosser & Edwards, 2008; Ramana, Gil, Schreiber, & Stark, 2002).

Les IFN de type 1, qui incluent l'IFN- α et l'IFN- β , sont rapidement produits par une variété de cellules à la suite d'une infection de bactérie intracellulaire, parasite intracellulaire ou infection virale. Pour la transduction du signal, l'IFN- α et l'IFN- β se lient à des complexes hétérodimériques de récepteurs IFNAR1 et IFNAR2 (récepteur IFN-alpha 1 et 2) (Platanias, 2005). Cette liaison mène à la phosphorylation des protéines STAT-1 et STAT-2. Ces phosphorylations permettent la formation d'homodimères STAT-1/STAT-1 ou d'hétérodimères STAT-1/STAT-2 qui seront mobilisés au noyau pour induire la transcription de gènes. Les IFN de type 1 ont été rapporté d'activer plusieurs autres STAT comme STAT-3, STAT-4 et STAT-5 (Platanias, 2005). Le rôle des IFN de type 1 dans l'inflammation demeure obscur et controversé, car il a été démontré que

ces molécules induisent la transcription et la libération d'une variété de cytokines et chimiokines comme IL-1ra, IL-10 et IP-10 (Figure 2.5) (McNab, Mayer-Barber, Sher, Wack, & O'Garra, 2015).

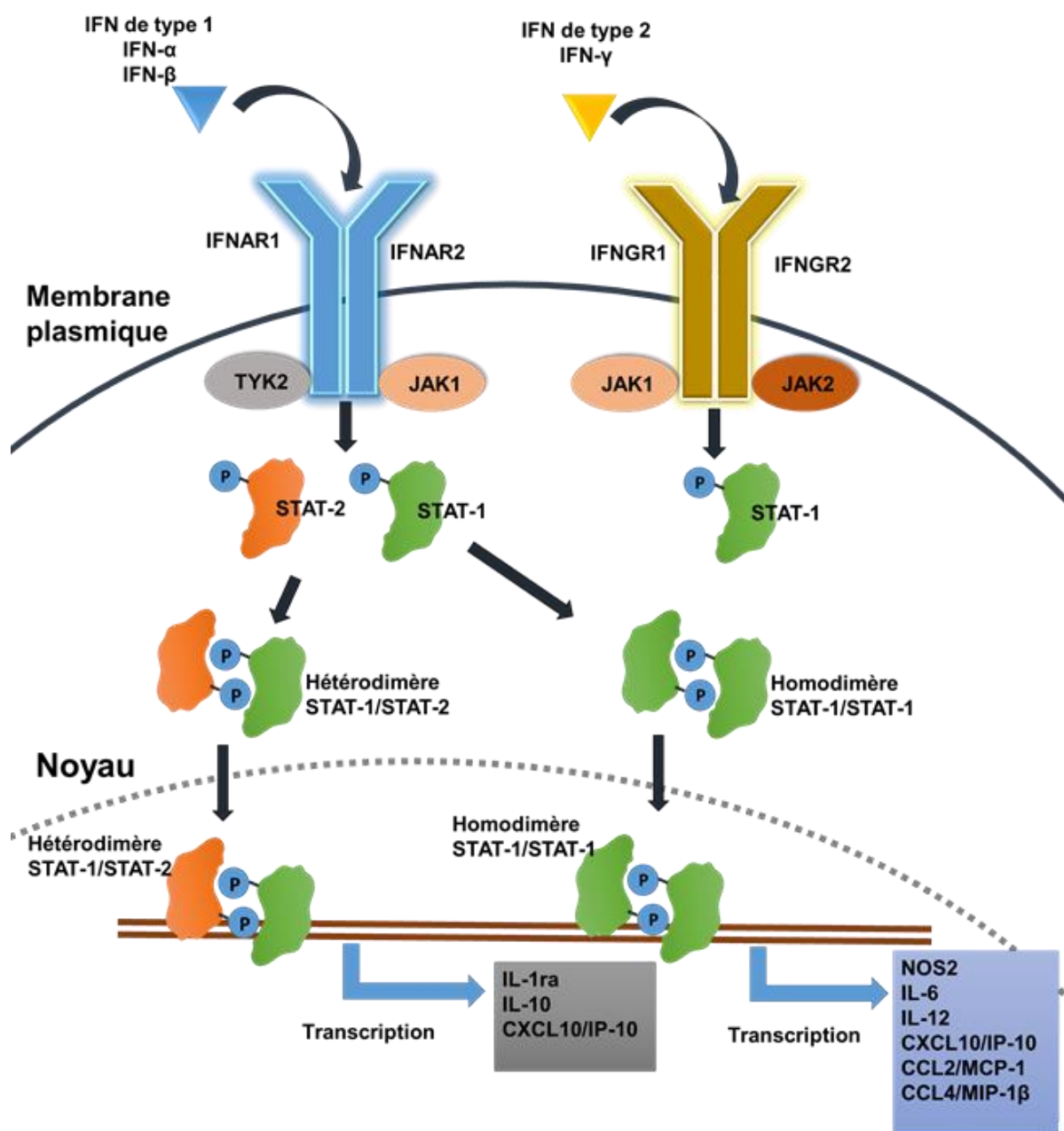


Figure 2.5 : Activation des voies STAT-1 et STAT-2 par les IFN de type 1 et de type 2 (image adaptée de Platanias et al. 2005).

Les protéines STAT-3 et STAT-6 régulent les effets induits par IL-4, IL-10 et IL-13 (Gordon, 2003; Gordon & Martinez, 2010; Tamiya et al., 2011). Les cytokines IL-4 et IL-13 se lient à leurs récepteurs respectifs pour induire la phosphorylation de la protéine STAT-6, tandis qu'IL-10 induit la phosphorylation de STAT-3 (Figure 2.6). Une fois phosphorylés, des homodimères de STAT-3 et STAT-6 sont formés et activent la transcription des gènes codant pour arginase-1, IL-1ra, IL-10, le récepteur CD206 (Figure 2.6) (Gordon, 2003).

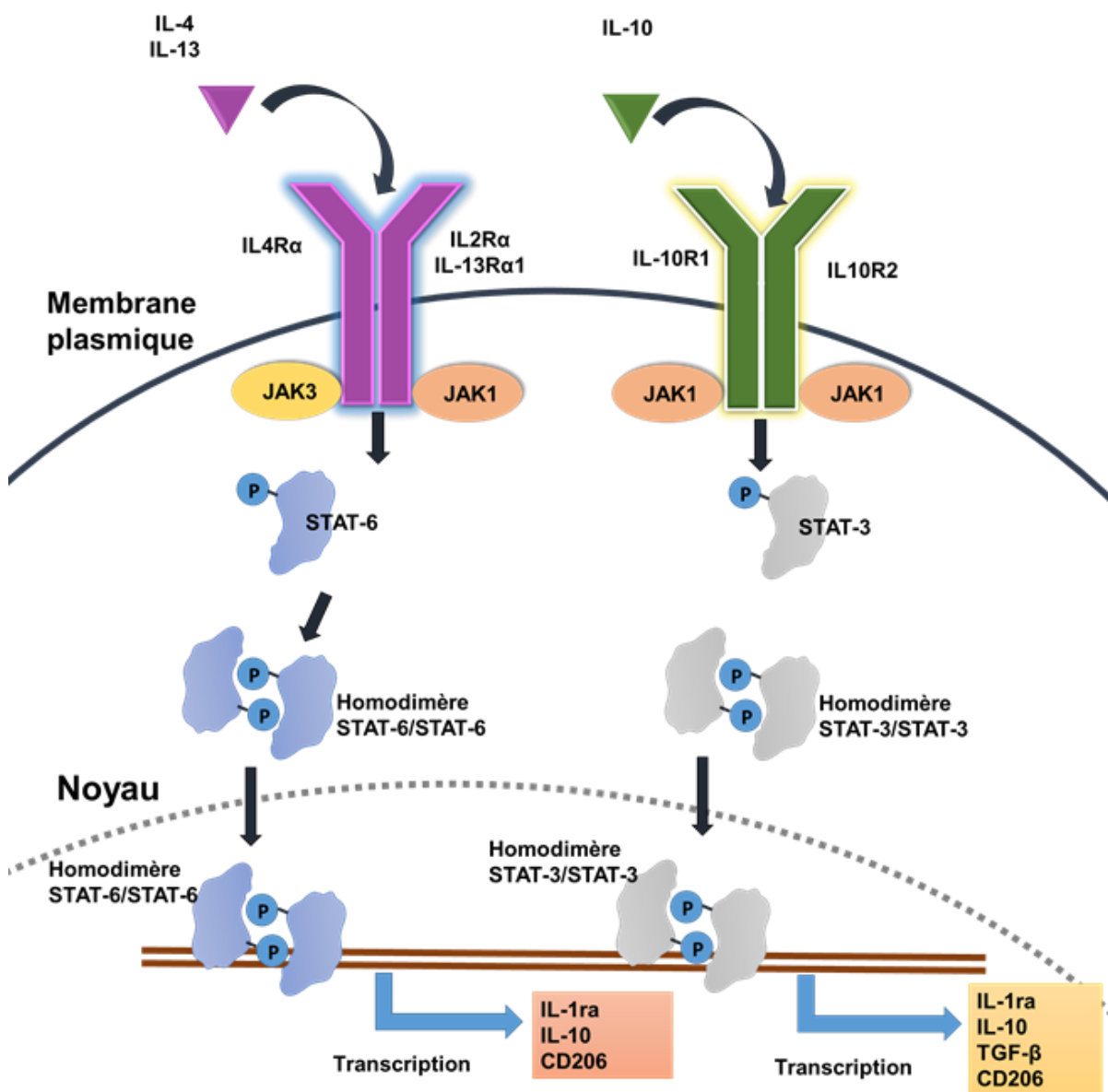


Figure 2.6 : Activation des voies STAT-3 et STAT-6 par IL-4, IL-13 et IL-10 (image adaptée de Gordon et al. 2007 et Tamiya et al. 2011).

2.5.3.1.2 *L'inflammasome et la régulation d'IL-1 β*

L'inflammasome représente une famille de complexes protéiques multimériques de l'immunité innée responsables de la production des formes actives d'IL-1 β et IL-18 (Guo, Callaway, & Ting, 2015). Ces complexes sont activés suite à la détection de PAMP lors d'une infection microbienne ou suite à la détection de DAMP libérés par un traumatisme tissulaire (Guo et al., 2015). Ces PAMP et DAMP sont reconnus par des récepteurs spécifiques de l'inflammasome appelés PRR (Récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires). Parmi ces PRR, les protéines NLR (<<NOD-like receptors>>) sont présentes dans la majorité des inflammasomes décrits dans la littérature. Parmi ces différents inflammasomes, l'inflammasome NLRP3 (<<NLR family, pyrin domain-containing 3>>) sera uniquement discuté, car c'est le complexe le mieux caractérisé et le plus pertinent aux travaux présentés dans cette thèse (Guo et al., 2015).

L'activation de l'inflammasome NLRP3 est réalisée en deux étapes (Bueter et al., 2011; Guo et al., 2015). Dans la première étape, un premier signal de préactivation doit d'abord être donné à la cellule. Ce signal est souvent un agoniste des TLR comme le LPS et celui-ci augmente la production de pro-IL-1 β ou pro-IL-18, la forme inactive de la protéine. Le deuxième signal induit le clivage de l'enzyme pro-caspase-1 (forme inactive) en caspase-1 (forme active) (Guo et al., 2015). Le complexe est alors activé et induit la libération de protéine IL-1 β ou IL-18 mature et active. Une vaste gamme de molécules peut stimuler l'inflammasome. Celles-ci incluent des molécules endogènes comme des ROS et de l'ADN provenant des mitochondries, les cristaux, des ions de potassium provenant de canaux à ions et des cathepsines libérées suite à la rupture des membranes lysosomales (Guo et al., 2015). L'activation de l'inflammasome est étroitement contrôlée afin d'induire une réponse inflammatoire suffisante afin de contrer l'infection sans induire d'inflammation excessive au détriment de l'organisme (Guo et al., 2015).

2.5.3.1.3 *L'autophagie*

L'autophagie est un processus d'homéostasie intracellulaire où des constituantes cytosoliques et des organelles sont dégradées par les lysosomes (Harris et al., 2011). Ce processus joue un rôle important dans la survie cellulaire, car elle permet la dégradation des organelles endommagées et des constituantes du cytosol dont l'intégrité est compromise. Celle-ci est orchestrée par la famille de protéines Atg (protéine associée à l'autophagie) et contribue à la formation des vésicules autophagiques, appelées autophagosomes. Au début de l'autophagie, la composante cellulaire à

dégrader est isolée dans une membrane spécifique appelée phagophore. Le phagophore recrute les protéines Atg5, Atg7, Atg10 et Atg12 pour former un complexe qui va recruter la protéine Atg8, aussi connue sous le nom de LC3 (<<Microtubule-associated protéines 1A/1B light chain>>) (Klionsky et al., 2008). LC3 va être clivée pour donner la formation de LC3-I, la forme cytosolique de LC3 qui n'est pas spécifique à l'autophagosome. C'est uniquement après le greffage de la phosphatidyléthanolamine à LC3-I que l'on obtient la protéine LC3-II, la forme de LC3 associé aux membranes lipidiques (Klionsky et al., 2008). Une fois sous cette forme, LC3-II est ciblé aux autophagosomes précoces et permet ainsi l'identification de vésicules autophagiques (Figure 2.7). L'autophagosome mature va ensuite fusionner avec les lysosomes pour former une autophagolysosome qui va dégrader son contenu y compris LC3-II (Klionsky et al., 2008).

L'autophagie est un processus dynamique où en même temps que plusieurs autophagosomes se forment, plusieurs se dégradent (Klionsky et al., 2008). Pour cette raison, plusieurs contrôles pharmacologiques doivent être utilisés afin de distinguer une augmentation de la formation de nouveau autophagosome d'une diminution du taux de dégradation des autophagosomes (Klionsky et al., 2008; Mizushima & Yoshimori, 2007). La bafilomycine et la chloroquine sont souvent utilisées à ces fins, car ces agents interfèrent avec l'acidification des lysosomes et empêchent ainsi la dégradation du contenu lysosomal. La chloroquine est un agent qui s'accumule dans les lysosomes et agit en tant que tampon pour augmenter le pH des lysosomes. La bafilomycine est un inhibiteur des pompes à protons V-ATPase et ainsi empêche l'acidification des lysosomes (Figure 2.7) (Cheong, Lu, Lindsten, & Thompson, 2012; Klionsky et al., 2008).

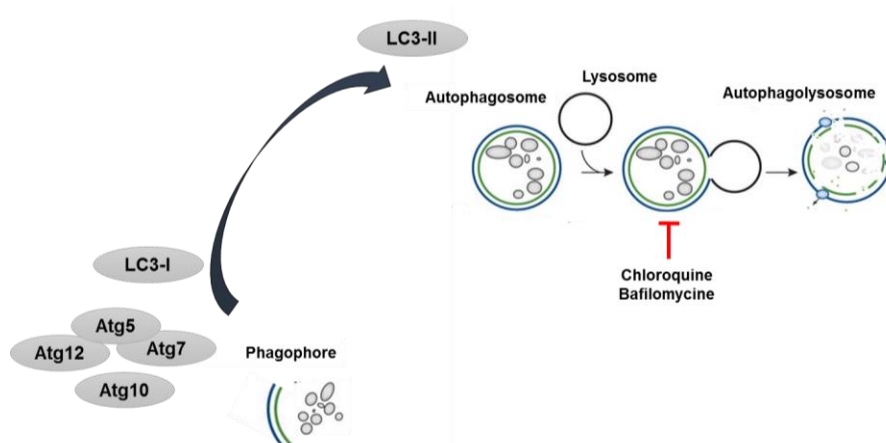


Figure 2.7 : Formation des autophagosomes durant l'autophagie (image adaptée de Cheong et al. 2011).

L'autophagie est impliquée dans un grand nombre de réponses immunitaires qui comprennent l'élimination de pathogènes intracellulaires et le contrôle de la production et la sécrétion de cytokines (Harris et al., 2007; Harris et al., 2011). Un grand nombre de cytokines et autres molécules peuvent moduler l'autophagie. Le LPS, l'IFN- γ , l'IL-1 β stimulent l'autophagie chez les macrophages tandis que l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 inhibent ce processus (Harris, 2013; Harris et al., 2007; Harris et al., 2011). L'autophagie est un important régulateur de l'inflammasome en effectuant la dégradation de ces complexes afin de contrôler le processus d'inflammation (Harris et al., 2011). Ainsi, l'inhibition de l'autophagie mène à une augmentation d'IL-1 β et IL-18 tandis qu'au contraire, une augmentation de l'autophagie permet une dégradation de la pro-IL-1 β et des composantes de l'inflammasome comme NLRP3 (Harris et al., 2011; Peral de Castro et al., 2012).

2.5.3.1.4 Les galéctines

Les protéines galéctines représentent une famille de lectines possédant des domaines CRD (domaine de reconnaissance des carbohydrates) permettant à celle-ci de se lier à des glucides (Liu & Rabinovich, 2005). Les galéctines agissent au niveau extracellulaire en se liant aux glycoprotéines et glycolipides de la MEC et en surfaces des cellules et au niveau intracellulaire en interagissant avec les protéines cytoplasmiques et nucléaires (Liu & Rabinovich, 2005).

Galéctine-3 est la protéine de la famille des galéctines la plus étudiée et est suggérée de jouer un rôle important dans la polarisation et l'activation des macrophages (Jeon et al., 2010; MacKinnon et al., 2008). Plus spécifiquement, galectine-3 est nécessaire pour la polarisation des macrophages M2a induite par IL-4 ou IL-13 en s'associant avec la protéine CD98 pour activer la voie de signalisation PI3K (phosphoinositide 3-kinase) qui régule en partie l'expression de gènes associés au phénotype M2 (arginase-1, CD206) (MacKinnon et al., 2008). Galéctine-3 joue également un rôle dans l'activation de STAT-1, STAT-3 et STAT-5 chez les macrophages présents dans les tissus nerveux (cellules gliales) (Jeon et al., 2010). La stimulation des macrophages par l'addition exogène de galéctine-3 induit une phosphorylation de ces trois STAT, et une augmentation de l'expression de TNF- α , IL-1 β , IL-6, CXCL8/IL-8, TNF- α , IFN- γ et CXCL10/IP-10 (Jeon et al., 2010).

Galéctine-3 et galéctine-8 jouent également des rôles importants dans l'autophagie et la détection de lysosomes endommagés (Paz et al., 2010; Thurston, Wandel, von Muhlinen, Foeglein, & Randow, 2012). Paz, Thurston et collègues respectifs ont montré que les protéines galéctine-3 et

galéctine-8 reconnaissent et ciblent les vésicules intracellulaires déchirées (Paz et al., 2010; Thurston et al., 2012). Dans le cas d'infection par une bactérie intracellulaire, les vésicules déchirées lors l'infection accumulent des protéines galéctine-3 et galéctine-8 (Paz et al., 2010; Thurston et al., 2012). Une fois reconnues, les vésicules revêtues de galectines sont ciblées pour l'autophagie et la dégradation (Thurston et al., 2012).

2.5.3.2 Les monocytes inflammatoires et résidents

Au départ, il était suggéré que la contribution du macrophage dans la réparation des tissus (qu'elle soit positive ou négative) dépendait strictement de son stade de polarisation vers le phénotype M1 ou M2 (Brancato & Albina, 2011; Mosser & Edwards, 2008). Il est reconnu que cette façon de décrire le comportement physiologique des macrophages est simpliste et qu'au contraire, les macrophages adoptent *in vivo* des phénotypes qui combinent simultanément des aspects caractéristiques des polarisations M1 et M2 (Figure 2.8) (Brancato & Albina, 2011; Mosser & Edwards, 2008).

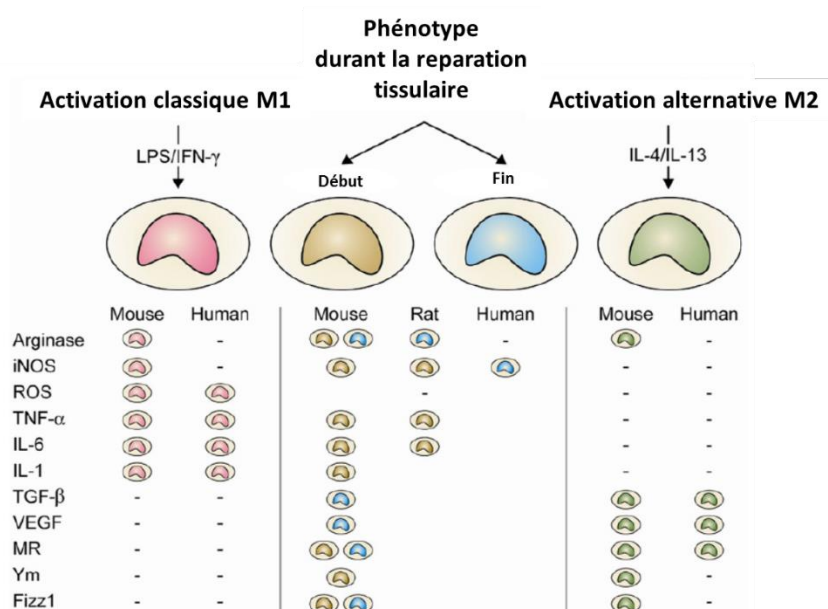


Figure 2.8 : Molécules déterminantes exprimées par les macrophages M1, M2, et ceux retrouvés lors de la réparation tissulaire. Les macrophages impliqués dans la réparation tissulaire expriment des molécules caractéristiques des phénotypes M1 et M2. (Image adaptée de Brancato et Albina 2011)

Récemment, il a été proposé que des populations monocytaires et macrophagiques hétérogènes, adoptant des comportements pro- et anti-inflammatoires, contribuent à rétablir l'intégrité des tissus endommagés (Brancato & Albina, 2011). Chez la souris, deux sous-populations de monocytes ont été décrites suite au trauma. Les monocytes inflammatoires ($\text{Gr-1}^{\text{élevé}}\text{CCR2}^+\text{CX3CR1}^{\text{faible}}$) sont abondamment présents dans le sang périphérique et la rate (Geissmann et al., 2003). Ces cellules sont recrutées aux sites de trauma au début de la réponse régénératrice à travers un mécanisme qui dépend sur la signalisation MCP-1/CCR2 (Brancato & Albina, 2011). Ces monocytes inflammatoires sécrètent une forte quantité de facteurs pro-inflammatoires ($\text{IL-1}\beta$ et $\text{TNF-}\alpha$) et en général sécrètent de faibles niveaux de facteurs anaboliques ($\text{TGF-}\beta$, IL-10 et VEGF) (Arnold et al., 2007; Nahrendorf et al., 2007). L'autre sous-population, les monocytes résidents ($\text{Gr-1}^{\text{faible}}\text{CCR2}^-\text{CX3CR1}^{\text{élevé}}$) sont retrouvés plus tard dans la réponse régénératrice (Brancato & Albina, 2011). Comparés aux monocytes inflammatoires, les monocytes résidents sécrètent de faibles niveaux de facteurs pro-inflammatoires et en revanche sécrètent beaucoup plus de $\text{TGF-}\beta$, IL-10 et VEGF (Arnold et al., 2007; Nahrendorf et al., 2007). Ces deux sous-populations jouent des rôles indispensables aux processus de réparation, car l'inhibition du recrutement de ces cellules au site de blessure (par le biais de souris transgéniques $\text{CCR2}^{-/-}$ ou $\text{CX3CR1}^{-/-}$) ou bien l'élimination spécifique de ces sous-populations (en utilisant des liposomes d'acide clodronique) durant les différentes étapes de la réparation des tissus interfère avec le processus de régénération (Arnold et al., 2007; Nahrendorf et al., 2007).

2.5.3.3 Les macrophages de l'os: les ostéomacs

Lors de la formation de nouvel os, des macrophages sont identifiés parmi les cellules bordantes de l'os (Chang et al., 2008). Ces macrophages, aussi appelés ostéomac, sont identifiés dans les tissus murins via l'expression de F4/80^+ , l'absence de l'expression de Mac-2^- et TRAP^- (contrairement aux macrophages inflammatoires qui sont $\text{F4/80}^+\text{Mac-2}^+\text{TRAP}^-$ ou les ostéoclastes qui sont $\text{F4/80}^+\text{TRAP}^+$) (Chang et al., 2008). Les ostéomacs sont présents aux sites de remodelage osseux et interagissent directement avec les ostéoblastes. Le rôle des ostéomacs est de promouvoir l'ostéogenèse membranaire en sécrétant des facteurs qui stimulent la différenciation et l'activité anabolique des ostéoblastes (Alexander et al., 2011; Chang et al., 2008). Dans des systèmes *in vivo* et *in vitro*, il a été démontré que l'élimination spécifique des ostéomacs inhibe la formation de

nouvelle matrice osseuse et la minéralisation du tissu, suggérant ainsi que ces cellules jouent un rôle vital dans l'ostéogenèse (Alexander et al., 2011; Chang et al., 2008).

2.5.3.4 Influence des macrophages la réparation des tissus ostéochondraux

Quoique la ségrégation des macrophages en phénotype M1 et M2 ne décrit pas de manière exacte le phénotype des macrophages obtenus *in vivo* (Brown, Ratner, et al., 2012; Mosser & Edwards, 2008), cette description M1/M2 fournit un cadre simplifié permettant de déchiffrer les rôles complexes des macrophages dans différents contextes.

Le profil de polarisation des macrophages influence directement le recrutement des MSC et leur différenciation ostéogénique ou chondrogénique (Fahy et al., 2014; Guihard et al., 2012; Lolmede et al., 2009; Nicolaidou et al., 2012). Dans un premier temps, les macrophages sécrètent plusieurs facteurs stimulant l'attraction des MSC aux sites de lésions (Hoemann, C. D. et al., 2010; Lolmede et al., 2009). Plus particulièrement, les macrophages sécrètent spontanément plusieurs molécules, dont le TGF- β , PDGF (Facteur de croissance dérivé des plaquettes), CCL2/MCP-1 et CXCL8/IL-8 qui sont des facteurs chimiotactiques chez les MSC (Anton, Banerjee, & Glod, 2012; Richter, 2009; Ringe et al., 2007; Thibault, M. M., Hoemann, & Buschmann, 2007). De plus, plusieurs autres facteurs, comme CXCL10/IP-10, CCL5/RANTES, peuvent être induits durant la polarisation M1 des macrophages (Mantovani et al., 2004), et sont rapportés également comme des facteurs chimiotactiques chez les MSC (Anton et al., 2012; Endres et al., 2010; Kalwitz et al., 2010). Toutefois, la contribution positive ou négative des macrophages sur le recrutement des cellules souches demeure sous débat et dépend du contexte cellulaire. Par exemple, les macrophages M1 sécrètent les molécules TNF- α et HMGB-1 (<<High Mobility Group Box-1>>) pour stimuler le recrutement des mésoanglioblastes (cellules souches dérivées des vaisseaux sanguins) (Lolmede et al., 2009), tandis que ces mêmes cellules ont un effet négatif sur le recrutement des myofibroblastes (progéniteurs musculaires) (Brown, Londono, et al., 2012).

Lors de la réparation des lésions ostéochondrales, les macrophages sont présents dans le tissu de granulation lors de la phase inflammatoire (Hoemann, C. D. et al., 2010). Au niveau de l'ostéogenèse sous-chondrale, les macrophages M1, mais pas M2, sécrètent plusieurs facteurs ostéogéniques, dont l'IL-6 et l'Oncostatine M qui permettent de stimuler la différenciation ostéogénique des MSC et la minéralisation de l'os (Guihard et al., 2012; Nicolaidou et al., 2012). Par contre, une activation M1 chronique, comme retrouvée dans le cas de l'ostéolyse

périprosthétique, peut inhiber le processus de réparation de l'os et même au contraire induire sa destruction (Schlundt et al., 2015). Plutôt, il est suggéré que pour une réparation complète de la fracture osseuse, l'état d'activation des macrophages M1 retrouvés au début de l'inflammation doit progresser en bonne et due forme vers un état d'activation M2 (Schlundt et al., 2015).

Dans le contexte de la réparation du cartilage, il a été identifié que les macrophages sont impliqués le processus de réparation. Les molécules IL-1 β et TNF- α , qui sont sécrétées par les macrophages M1, peuvent inhiber le recrutement des progéniteurs chondrogéniques vers les lésions cartilagineuses. Toutefois, leur contribution exacte dans le processus de chondrogenèse est encore très vague. Néanmoins, les études qui ont porté sur les effets de l'inflammation de la membrane synoviale dans la progression de l'OA permettent de mieux comprendre comment les macrophages contribuent au catabolisme des tissus, et ainsi comment les macrophages (dans le tissu de granulation et dans la membrane synoviale) pourraient ultimement influencer le processus de réparation du cartilage par stimulation osseuse (Fahy et al., 2014; Simeone et al., 2015).

2.5.4 Influence des cytokines et chimiokines dans l'attraction des MSC

Les macrophages peuvent sécréter une pléthore de cytokines et chimiokines en fonction de leur état de polarisation (Mantovani et al., 2004). Plusieurs de ces facteurs ont été identifiés comme chimiotactiques chez les MSC et peuvent stimuler la migration de ces cellules dans des essais *in vitro*. En outre, PDGF, VEGF et TGF- β sont de puissants facteurs chimiotactiques pour les MSC sécrétés par les macrophages M2 (Mantovani et al., 2004; Ozaki et al., 2007; Thibault, M. M. et al., 2007). Plusieurs autres chimiokines, comme CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, CXCL8/IL-8, CXCL10/IP-10, CXCL12/SDF-1 α (Facteur dérivé du stroma Alpha), fortement sécrétées par les macrophages M1 (Mantovani et al., 2004), sont également capables de promouvoir la migration des MSC dans des essais *in vitro* (Anton et al., 2012; Endres et al., 2010; Kalwitz et al., 2010; Ponte et al., 2007; Ringe et al., 2007; Stich et al., 2008).

Ces différentes études suggèrent ainsi que les macrophages peuvent sécréter une multitude de facteurs susceptibles de mobiliser les MSC aux sites de lésions. Ainsi, la polarisation des macrophages peut fortement influencer l'attraction des MSC dans les lésions ostéochondrales en modulant principalement la sécrétion de différents facteurs chimiotactiques.

2.6 L'inflammation de l'articulation dans la progression de l'ostéoartrite

L'OA est caractérisée par la dégradation du cartilage. L'inflammation ayant lieu dans la membrane synoviale, qu'elle soit aiguë (suite à un traumatisme) ou chronique, contribue de manière significative au processus de dégradation du cartilage (Bhattaram & Chandrasekharan, 2016; Fahy, Farrell, Ritter, Ryan, & Murphy, 2015; Lieberthal, Sambamurthy, & Scanzello, 2015; Scanzello & Goldring, 2012). Dans des modèles de co-cultures tissulaires, il a été démontré que la membrane synoviale, lorsqu'elle est enflammée, sécrète des facteurs cataboliques qui mènent à la dégradation du cartilage articulaire (Fahy et al., 2015; Scanzello & Goldring, 2012).

2.6.1 Les macrophages synoviaux

Les macrophages synoviaux sont relativement quiescents dans les articulations saines. Cependant, une fois polarisés vers un phénotype M1, ils sécrètent l'IL-1 β et le TNF- α . Ces deux molécules diminuent chez les chondrocytes la synthèse de collagène de type II et de protéoglycanes, augmentent la sécrétion des protéases de la MEC MMP-2, MMP-9 et MMP-13 (Métalloprotéinase matricielle-2, -9 et -13) (Fahy et al., 2015; Lieberthal et al., 2015; Scanzello & Goldring, 2012). IL-1 β et TNF- α stimulent également l'expression de COX-2, une enzyme clé dans la production des prostaglandines et associée à la calcification du tissu cartilagineux (Fahy et al., 2015). De plus, il a été montré que les macrophages M1 sécrètent des facteurs qui répriment la différenciation chondrogénique des MSC (Fahy et al., 2014). Les macrophages M2 n'exercent pas cet effet et au contraire, il a été suggéré que ces cellules ont un impact positif sur la chondrogenèse (Sesia et al., 2015).

2.6.2 Les fibroblastes synoviaux

Les molécules pro-inflammatoires sécrétées par les macrophages synoviaux peuvent activer les fibroblastes synoviaux et induire ces cellules à produire également leurs propres cytokines pro-inflammatoires. Par exemple, L'IL-1 β stimule chez les fibroblastes la production d'IL-6, de CXCL8/IL-8, de M-CSF (Lieberthal et al., 2015; Scanzello & Goldring, 2012). De plus, les fibroblastes activés vont également exprimer à la surface de leur membrane plusieurs récepteurs

comme VCAM-1 (Molécule d'adhésion cellulaire vasculaire-1) qui facilitent le recrutement et la rétention des leucocytes au site d'inflammation (Fahy et al., 2015).

2.6.3 Rôle des cytokines dans la progression de l'ostéoarthrite

Suite à un traumatisme, une multitude de cytokines et chimiokines sont libérées dans les tissus de l'articulation et l'environnement synovial (Lieberthal et al., 2015; Scanzello & Goldring, 2012). Ces différents facteurs, de nature pro- et anti-inflammatoires, jouent des rôles prédominants dans la progression ou la régression de l'inflammation dans l'articulation.

IL-1ra est l'inhibiteur physiologique d'IL-1 β et est présent dans le liquide synovial chez les personnes saines. Suite à une blessure, les niveaux d'IL-1ra et IL-1 β augmentent fortement pour ensuite diminuer de manière significative (Lieberthal et al., 2015). Cependant, la diminution progressive d'IL-1ra sans aucune modulation d'IL-1 β dans le liquide synovial est un des facteurs favorisant la dégradation de l'articulation et la progression de l'OA (Lieberthal et al., 2015). Dans des études précliniques, l'augmentation de la présence d'IL-1ra dans les articulations par le biais d'injection de la protéine recombinante ou par thérapie génique permet de réduire les lésions cartilagineuses et la formation d'ostéophyte induite par l'OA post-traumatique (Lieberthal et al., 2015; Scanzello & Goldring, 2012). Bien que l'efficacité clinique d'IL-1ra chez l'homme est sous débats (Lieberthal et al., 2015; Scanzello & Goldring, 2012), les plus récentes études montrent que cette protéine possède un potentiel thérapeutique prometteur pour freiner la progression de l'OA post-traumatique (King et al., 2016).

TNF- α est une deuxième molécule, complice d'IL-1 β , capable d'induire le catabolisme de l'articulation (Scanzello & Goldring, 2012). Dans le cadre de l'arthrite rhumatoïde, l'inhibition du TNF- α par le biais d'anticorps monoclonaux réprime la dégradation de l'articulation (Scanzello & Goldring, 2012). IL-10 est une molécule anti-inflammatoire puissante et joue un rôle protecteur sur les chondrocytes. Notamment, IL-10 réduit la production de cytokines inflammatoires et de protéases par les cellules synoviales (Wojdasiewicz, Poniatowski, & Szukiewicz, 2014). IL-10 protège également les chondrocytes des effets cataboliques du TNF- α et de l'inflammation issue de l'hémarthrose (saignement de l'articulation) (Alaaeddine et al., 1999; Jansen et al., 2008).

En somme, toutes ces études suggèrent qu'un déséquilibre des cytokines vers un environnement plus catabolique contenant de fortes concentrations d'IL-1 β et TNF- α et de faibles concentrations

d'IL-1ra et IL-10 favorise le développement de l'OA. Au contraire, des environnements synoviaux contenant plus d'IL-1ra et d'IL-10, et moins d'IL-1 β et TNF- α auraient des effets protecteurs contre l'inflammation et freineraient la progression de l'OA (Figure 2.9).

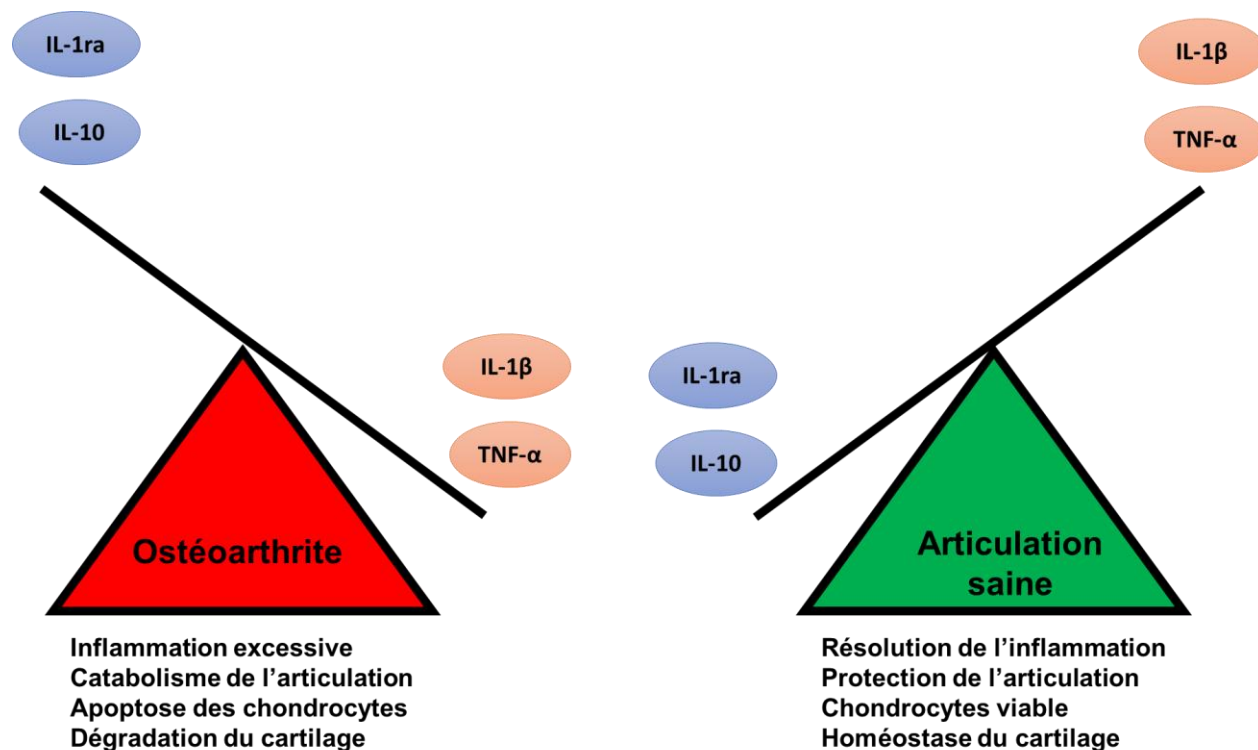


Figure 2.9 : Balances des cytokines IL-1ra, IL-10, IL-1 β et TNF- α dans l'articulation influencent le développement de l'ostéoartrite (image adaptée de Scanzello et Goldring 2012).

2.7 Le chitosane

Le chitosane est un polysaccharide linéaire composé de monomères de D-glucosamine (GlcN) et de N-acétyl-D-glucosamine (Buschmann et al., 2013). Étant donné que le chitosane est abondant, biocompatible, hémocompatible et biodégradable, il est utilisé dans une grande variété d'applications biomédicales. Le chitosane est obtenu suite à la déacétylation partielle de la chitine en milieu alcalin (Lamarque, Viton, & Domard, 2004a, 2004b). Les propriétés physicochimiques et biologiques du chitosane sont contrôlées par deux paramètres : le degré de déacétylation (DDA) et le poids moléculaire (Buschmann et al., 2013). Le DDA est équivalent au pourcentage d'unités glucosamine dans le chitosane. Par définition, le chitosane est obtenu lorsque la chitine est déacétylée au-delà d'un DDA supérieur à 50% (Buschmann et al., 2013). La chitine est insoluble dans la

majorité des solvants organiques (Buschmann et al., 2013). Dans le cas du chitosane, la présence de groupements amine permet la protonation de ces groupes à pH faible (lorsque le pH est en dessous du pKa du chitosane) et permet la dissolution du chitosane dans des solutions aqueuses (Filion, Lavertu, & Buschmann, 2007). Toutefois, lorsque le pH de la solution est au-dessus du pKa du chitosane, les groupements amines ne sont plus protonés et le chitosane devient alors insoluble (Filion et al., 2007).

Le DDA et poids moléculaire du chitosane contrôlent plusieurs propriétés du polymère comme sa solubilité, viscosité, taux de dégradation et biocompatibilité (Buschmann et al., 2013). La biodégradabilité et la solubilité du chitosane peuvent être augmentées en diminuant le DDA ou le poids moléculaire (Buschmann et al., 2013; Hoemann & Fong, 2017). À pH neutre, le chitosane est insoluble (Hoemann & Fong, 2017; Hoemann, C. D. et al., 2013). C'est seulement en solution acide et lorsqu'au moins 50% des groupements amine libre sont chargés que le chitosane se solubilise. Toutefois, les petites chaînes de chitosanes (en dessous de 5 kDa) sont solubles en solution aqueuse à pH neutre (Hoemann & Fong, 2017).

2.7.1 Modification des propriétés structurales du chitosane

La déacétylation de la chitine en chitosane est généralement obtenue en ajoutant les particules de chitine dans une solution alcaline chaude (contenu massique de NaOH 25 à 50%) (Buschmann et al., 2013; Lamarque et al., 2004a, 2004b). La déacétylation de la chitine peut être réalisée par le biais d'enzymes. Par contre, cette méthode n'est pas adoptée pour la production du chitosane car elle n'est pas efficace et est trop coûteuse dû à l'usage d'enzymes (Buschmann et al., 2013).

La déacétylation alcaline chaude de la chitine va permettre de produire des chitosanes de différents DDA dont la répartition des groupements amine et N-acétyl sera hétérogène (Aiba, 1991; Varum, Anthonsen, Grasdalen, & Smidsrod, 1991a). Dans ce cas, un chitosane acétylé en bloc, où les groupes N-acétyl restants seront distribués en grappe le long de la chaîne de chitosane est obtenu (Figure 2.10) (Aiba, 1991; Varum et al., 1991a). La réacétylation de chitosane complètement déacétylé par anhydride acétique permet d'obtenir un chitosane acétylé de manière homogène où les groupes N-acétyl sont répartis de manière égale le long de la chaîne de chitosane (Figure 2.10) (Lavertu, Darras, & Buschmann, 2012). Il est également possible d'obtenir des chitosanes acétylés de manière homogène en resuspendant de la chitine dans une solution alcaline pendant plusieurs heures à des températures en dessous de 0°C (Lamarque, Cretenet, Viton, & Domard, 2005).

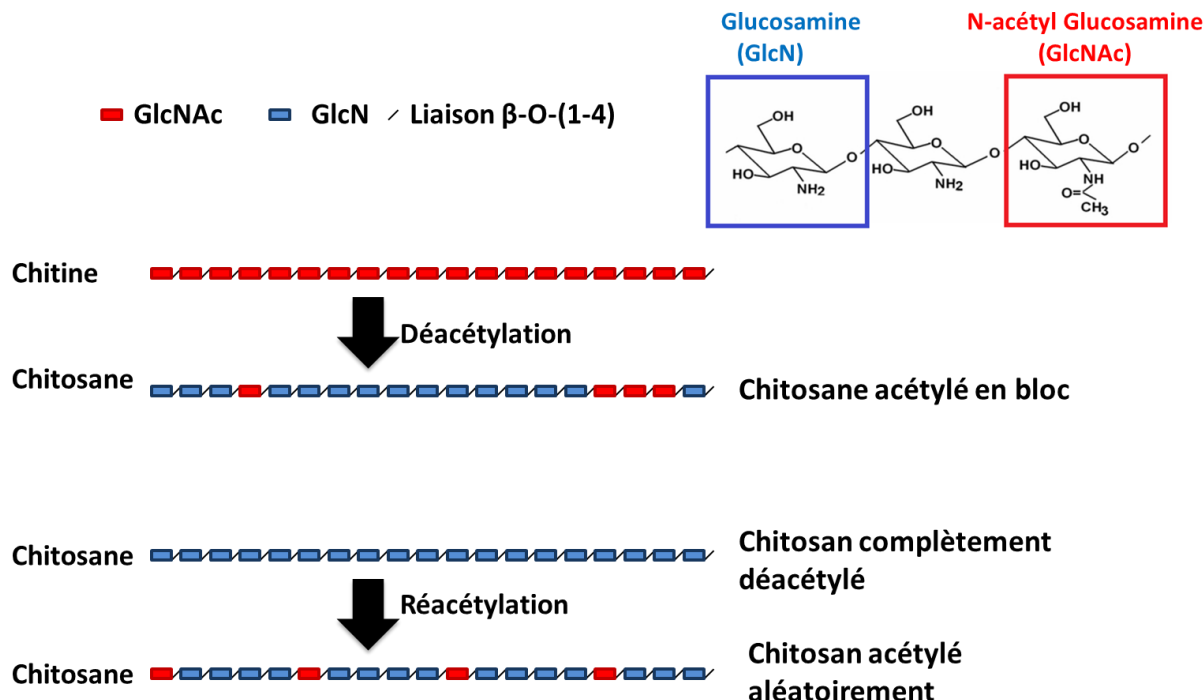


Figure 2.10 : Schéma représentant la structure linéaire du chitosane. Le chitosane peut varier en poids moléculaire, DDA et peut être acétylé en bloc ou de manière aléatoire (image adaptée de Hoemann et Fong 2017).

Les deux approches principales pour dépolymériser le chitosane sont l'hydrolyse chimique ou l'hydrolyse enzymatique (Buschmann et al., 2013; Lavertu, Methot, Tran-Khanh, & Buschmann, 2006). L'hydrolyse enzymatique, utilisant des chitosanases, permet de produire des oligomères de chitosane bien précis (Buschmann et al., 2013). Toutefois, cette approche est très coûteuse et ne permet pas de produire d'importantes quantités de chitosane (Buschmann et al., 2013). Pour ces raisons, l'utilisation de l'acide chlorhydrique (HCl) ou nitrique (HONO) est plus souvent adoptée pour la dépolymérisation du chitosane (Allan & Peyron, 1995a, 1995b; Tommeraas, Varum, Christensen, & Smidsrod, 2001a; Varum, Ottoy, & Smidsrod, 2001). Toutefois, en plus de la dépolymérisation du chitosane, l'utilisation du HCl induit également l'hydrolyse des groupes N-acétyl (Varum et al., 2001). Donc, la dépolymérisation du chitosane par HONO est plus souvent utilisée afin de générer des chitosanes de poids moléculaire désiré (Lavertu et al., 2006).

2.7.2 Mesure du DDA du chitosane par RMN du proton

Plusieurs méthodes existent afin de mesurer le DDA du chitosane et comprennent la spectroscopie infrarouge, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier, la spectroscopie UV et la spectroscopie de résonance magnétique nucléaire (RMN) (Buschmann et al., 2013). Dans le cadre de cette thèse, uniquement la spectroscopie RMN sera discutée.

La spectroscopie RMN du proton exploite le phénomène de RMN où les protons du chitosane sont soumis à un rayonnement électromagnétique (James, 1998). Ce phénomène est obtenu lorsque le champ magnétique appliqué sur le proton possède la même fréquence de rotation (appelé fréquence de Larmor) que celle du moment spin du noyau (James, 1998). Cette fréquence de Larmor va dépendre de la distribution d'électrons autour de chaque proton. Ces différences de fréquences se traduisent en "déplacements chimiques" qui permettent de déterminer la structure de molécules diverses (James, 1998).

Pour mesurer le DDA du chitosane par RMN du proton, le chitosane est d'abord solubilisé dans de l'eau deutérée (Buschmann et al., 2013). À partir du spectre RMN, le DDA peut être calculé à partir de l'intégration des pics H_{1D} et H_{Ac} qui correspondent respectivement aux protons anomériques de l'unité GlcN et aux protons du groupement CH_3 des groupes acétyl (Lavertu et al., 2003). Dans ce cas, le DDA est calculé à partir de l'équation suivante:

$$\%DDA = \left(\frac{H_{1D}}{H_{1D} + \frac{H_{Ac}}{3}} \right) \times 100$$

2.7.3 Mesure du poids moléculaire par chromatographie

Le poids moléculaire du chitosane est déterminé par chromatographie par perméation de gel (GPC), aussi appelée chromatographie d'exclusion stérique (Buschmann et al., 2013; Nguyen, Winnik, & Buschmann, 2009). Cette technique de chromatographie permet de séparer des molécules selon leur taille par le biais de colonnes contenant un matériel poreux (constituant la phase stationnaire) et une phase mobile liquide. Au départ, le chitosane est solubilisé dans une solution identique à la phase mobile composée d'acide acétique, d'acétate de sodium et d'acétate d'ammonium et est ensuite injecté dans la colonne. Une fois dans la colonne, les chaînes de chitosane de différentes tailles vont migrer à travers la colonne. Selon leur taille, les chaînes peuvent pénétrer dans les pores

de la phase stationnaire. Les chaînes les plus petites vont être retenues dans les pores tandis que les grosses chaînes seront exclues. Basées sur ce principe de séparation, les chaînes de chitosane plus grosses seront éluées hors de la colonne alors que les chaînes plus petites seront éluées plus tard.

Des détecteurs de diffusion de lumière multi-angle (MALS), un viscosimètre et un réfractomètre sont placés en sortie des colonnes et mesurent en temps réels différentes données relatives aux chaînes de chitosane (Buschmann et al., 2013; Nguyen et al., 2009). Les informations données par le détecteur MALS et le réfractomètre peuvent être utilisées dans l'approximation de Rayleigh-Gans-Debye afin de déterminer la masse molaire moyenne en nombre (M_n), la masse molaire moyenne en masse (M_w) et la polydispersité (PDI, définie comme le ratio entre le M_w et le M_n) (Buschmann et al., 2013; Nguyen et al., 2009).

2.8 Utilisation du chitosane dans la réparation ostéochondrale

Insoluble à pH neutre, le chitosane peut être mélangé avec une solution de β -glycérol phosphate (GP) afin de générer une solution de chitosane-GP qui possède un pH cytotocompatible et presque neutre (Chenite et al., 2000; Lavertu, Filion, & Buschmann, 2008). Ce produit, maintenant connu sous le nom de BST-CarGel®, est utilisé pour augmenter la réparation du cartilage induite par stimulation osseuse (Shive M. S., 2006; Stanish et al., 2013). Lors de cette procédure, la solution de chitosane-GP est mélangée avec le sang du patient afin de générer un implant hybride (chitosane-GP/sang) qui se solidifie au-dessus de la lésion ostéochondrale percée par microfractures (Shive M. S., 2006; Stanish et al., 2013). Étant donné que le chitosane est cationique, cet implant s'adhère facilement aux tissus (chargé négativement dû aux GAGs) (Hoemann, C. D. et al., 2005; Hoemann, C. D. et al., 2007).

Les premières études précliniques ont démontré l'efficacité des implants de chitosane sur la réparation du cartilage induite par stimulation osseuse chez les lapins et moutons (Chevrier, A. et al., 2007; Hoemann, C. D. et al., 2005; Hoemann, C. D. et al., 2007). Ces implants améliorent la réparation du cartilage en augmentant la vascularisation et le remodelage de l'os sous-chondral (Chevrier, A. et al., 2007; Hoemann, C. D. et al., 2007). Ce remodelage permet ainsi une meilleure intégration du tissu de réparation aux tissus natifs adjacents. De plus, le tissu cartilagineux formé possède une morphologie proche du cartilage hyalin (forte concentration en collagène de type 2 et

de GAGs, ainsi qu'une plus grande densité des cellules avec une morphologie de chondrocytes est observée) (Chevrier, A. et al., 2007; Hoemann, C. D. et al., 2005; Hoemann, C. D. et al., 2007) .

2.8.1 Mécanismes cellulaires impliqués dans la réparation ostéocondrale induite par les implants de chitosane

Il a été montré que les implants de chitosane retardent mais augmentent le recrutement des MSC dans le tissu de granulation (Chevrier, A. et al., 2007). Ceci est également accompagné d'une diminution de l'adipogenèse et une augmentation de l'ostéogenèse et l'angiogenèse dans le tissu de granulation (Chevrier, A. et al., 2007). Ces données suggèrent toutefois que le recrutement des MSC dans le tissu de granulation constitue la force motrice dictant la formation de nouvel os et la formation de cartilage hyalin (Chevrier, A. et al., 2007). Toutefois, la stimulation des MSC avec le chitosane n'affecte pas la libération de cytokines chez ces cellules, suggérant ainsi que l'effet du chitosane sur les MSC dans le tissu de granulation est régulé par des processus cellulaires indirects (Guzman-Morales et al., 2009).

La réponse régénératrice induite par le chitosane est initiée par une forte réponse inflammatoire. Cette réponse inflammatoire précède le recrutement des MSC, la formation des vaisseaux sanguins et de nouvel os dans le tissu de granulation (Chevrier, A. et al., 2007; Hoemann, C. D. et al., 2010). Lors de cette inflammation, un nombre accru de neutrophiles et de macrophages alternativement activés sont recrutés aux implants de chitosane et dans le tissu de réparation adjacent (Chevrier, A. et al., 2007; Hoemann, C. D. et al., 2010). Ces cellules interagissent, phagocytent les particules de chitosanes, et persistent dans le tissu jusqu'à ce que les particules de chitosane soient complètement éliminées (Lafantaisie-Favreau et al., 2013).

2.8.2 Réponses des neutrophiles au chitosane

Dès l'implantation dans le tissu, les neutrophiles se mobilisent rapidement aux particules de chitosane ayant un DDA entre 70 et 92% (Hoemann & Fong, 2017). Toutefois, lorsque le DDA est supérieur à 95%, le recrutement des neutrophiles aux particules de chitosane est beaucoup plus faible (Hoemann & Fong, 2017; Simard et al., 2009). Plusieurs études ont proposé différents mécanismes orchestrant le recrutement des neutrophiles au chitosane. En outre, LTB₄ (Leukotriene B₄) et CXCL8/IL-8 sont des facteurs chimiotactiques pour les neutrophiles et peuvent être induits chez les neutrophiles suite à une stimulation avec le chitosane (Park, C. J., Gabrielson, Pack,

Jamison, & Wagoner Johnson, 2009; Simard et al., 2009; Usami, Okamoto, Takayama, Shigemasa, & Minami, 1998). La libération de ces facteurs et la chimiotaxie des neutrophiles aux chitosanes sont inversement proportionnelles au DDA du chitosane (Park, C. J. et al., 2009; Simard et al., 2009). Les particules de chitosane possèdent un faible potentiel d'activation chez les neutrophiles car elles sont incapables de stimuler la libération d'enzymes normalement libérées par les neutrophiles activés (lysozyme, myéloperoxydase) (Simard et al., 2009).

2.8.3 Réponses des macrophages au chitosane

Suite au recrutement des neutrophiles, des macrophages sont mobilisés aux tissus adjacents aux implants de chitosane (Azab et al., 2007; Hoemann & Fong, 2017; Hoemann, C. D. et al., 2010; Vasconcelos et al., 2013). La dégradation de l'implant de chitosane est en partie orchestrée par les neutrophiles et les macrophages (Hoemann & Fong, 2017). La dégradation graduelle du chitosane par les neutrophiles et macrophages modifie le tissu de granulation qui permet par la suite l'initiation de la régénération tissulaire (Hoemann & Fong, 2017). Plusieurs études ont évalué l'effet de particules de chitosane sur la libération de diverses cytokines chez les macrophages (Hoemann & Fong, 2017). Toutefois, les chitosanes utilisés dans chaque étude possédaient des propriétés structurales différentes (poids moléculaire entre 0.5 à 1000 kDa, DDA entre 51 et 96%) et ont été utilisés à différentes concentrations (entre 1 µg/mL jusqu'à 50 mg/mL). Encore même, dans certains cas, les propriétés des chitosanes utilisés ne sont pas mentionnées.

Dans des modèles de macrophages non activés (aucune préactivation avec des cytokines comme le LPS ou l'IFN-γ), il a été démontré que le chitosane peut stimuler la libération de différents types de cytokines (Almeida et al., 2014; Guzman-Morales et al., 2011; Oliveira, Santos, Oliveira, Torres, & Barbosa, 2012). Plusieurs études utilisant différents chitosanes (DDA entre 80 et 92%, M_n entre 30 et 325 kDa, chitosane sous forme de film ou microparticules) ont montré que le chitosane stimule la libération de cytokine et chimiokines pro-inflammatoires comme l'IL-1β, TNF-α, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1α, CCL4/MIP-1β et CCL5/RANTES. En revanche, le chitosane peut également induire des réponses anaboliques qui mènent ces cellules à sécréter plus de TGF-β, PDGF et IL-10 (Oliveira et al., 2012; Ueno et al., 2001). Il s'avère toutefois que l'induction de certaines cytokines dépend de la dose. Par exemple, l'augmentation d'IL-1β et CCL5/RANTES ont eu lieu uniquement lorsque de hautes concentrations de chitosane ont été utilisées (supérieures à 100 µg/mL) (Guzman-Morales et al., 2011).

Très peu d'études ont évalué la réponse des macrophages polarisés vers différents états d'activation au chitosane (Bueter et al., 2011; Bueter et al., 2014; Vasconcelos et al., 2013). Les macrophages M1 obtenus suite à une stimulation avec le GM-CSF, IFN- γ ou le LPS, sécrètent beaucoup plus d'IL-1 β suite à une stimulation au chitosane (Bueter et al., 2014). Bueter et al. ont montré que la libération d'IL-1 β par le chitosane nécessitait une précédente activation par le LPS (Bueter et al., 2011). Ces résultats suggèrent ainsi que l'Inflammasome, le complexe impliqué dans la production d'IL-1 β , est nécessaire pour la stimulation de la sécrétion du IL-1 β par le chitosane (Bueter et al., 2011; Bueter et al., 2014). D'autres études ont montré dans des lignées cellulaires RAW264.7 (macrophages murins) que le chitosane pouvait augmenter ou supprimer la libération de l'IL-1 β , TNF- α et de NO chez les macrophages préalablement activés au LPS, IFN- γ ou LPS avec IFN- γ (Feng, Zhao, & Yu, 2004; Han, Zhao, Yu, Feng, & Yu, 2005; Hwang, Chen, Chen, & Chen, 2000; Yoon, Moon, Park, Im, & Kim, 2007). Ensemble, ces données suggèrent que la réponse des macrophages au chitosane dépend fortement de l'état d'activation des macrophages au moment de la stimulation.

2.8.3.1 Influence des propriétés du chitosane sur l'activation des macrophages

Il existe très peu d'études ayant évalué l'impact de varier différentes propriétés du chitosane sur le comportement des macrophages (Gorzelanny, Poppelmann, Pappelbaum, Moerschbacher, & Schneider, 2010; Gudmundsdottir, Lieder, Sigurjonsson, & Petersen, 2015; Porporatto, Bianco, Riera, & Correa, 2003; Vasconcelos et al., 2013). Vasconcelos et al. ont montré *in vivo* qu'en fonction du DDA, des échafaudages de chitosane implantés *in vivo* induisent le recrutement de différents types de macrophages : les chitosanes partiellement acétylés (85% DDA) recrutent plus de macrophages présentant un phénotype M1 tandis que les chitosanes fortement déacétylés (95% DDA) recrutent plus de macrophages M2 (Vasconcelos et al., 2013). Toutefois, cette étude évalue uniquement le recrutement des macrophages à court terme (1 ou 4 jours post-implantation) pendant que l'implant de chitosane est encore présent (Vasconcelos et al., 2013) et n'évalue pas à long terme le phénotype macrophagique.

Il a été suggéré que le chitosane, à bas poids moléculaire, est relativement inerte et demeure incapable d'activer les macrophages. Gudmundsdottir, Gorzelanny et collègues respectifs ont montré que les oligomères de chitosanes dont le degré de polymérisation est inférieur à 6 sont incapables de stimuler la libération d'IL-1 β et TNF- α chez des macrophages humains (Gorzelanny

et al., 2010; Gudmundsdottir et al., 2015). Ces observations sont en contradiction avec d'autres études suggérant que des oligomères de chitosanes peuvent stimuler l'expression de TNF- α et IL-1 β chez des macrophages murins (Feng et al., 2004; Han et al., 2005).

Ensemble, ces études indiquent qu'il demeure difficile de prédire le comportement des macrophages à un chitosane ayant des propriétés bien distinctes. La majorité de ces études ont évalué l'impact de varier un seul paramètre du chitosane (DDA ou poids moléculaire) sur le comportement des macrophages. Également, les préparations de chitosane utilisées dans certains cas n'ont pas été complètement caractérisées pour le DDA, le poids moléculaire, et la présence d'impureté. Le tableau 2.1 résume le corps des études ayant évalué la réponse des macrophages au chitosane.

Tableau 2.1 : Propriétés des chitosanes rapportées sur des études évaluant la réponse des macrophages au chitosane (tableau adapté de Hoemann et Fong 2017).

Premier auteur Année	Poids moléculaire	DDA	Formulation du chitosane Concentration utilisée
Nishimura 1984	Oligomères DP-6	>85%	Oligomères Concentration non spécifiée
Otterlei 1994	2.5-50 kDa	79%	Microparticules et oligomères 100-1000 µg/mL
Peluso 1995	300 kDa	85%	Particules 10 ⁻⁸ M
Bianco 2000	0.5-15 kDa	>85%	Particules 300-900 µg/mL
Hwang 2000	150 kDa	>95%	Particules et film 0.32-200 µg/mL
Jeong 2000	300 kDa	-	Chitosane soluble 1 µg/mL
Ueno 2001	50 kDa	>80%	Particules 5-50 µg/mL
Chou 2003	50, 100, 300 kDa	>90%	Particules 2.5-62.5 µg/mL
Porporatto 2003	50 et 1000 kDa	75-85%	Particules 500-1000 µg/mL
Feng 2004	Oligomères DP-6	>85%	Oligomères 20-80 µg/mL
Mori 2004	0.4-20 kDa	-	- 50 mg
Han 2005	1 kDa	>85%	Oligomères Concentration non spécifiée
Yoon 2007	<10 kDa	90-95%	- 0.5-5 mg/mL

Tableau 2.1: Propriétés des chitosanes rapportées sur des études évaluant la réponse des macrophages au chitosane (tableau adapté de Hoemann et Fong 2017) (suite).

Auteur Année	Poids moléculaire	DDA	Formulation du chitosane Concentration utilisée
Gorzalanny 2010	500 kDa	40-90%	Chitosane dégradé enzymatiquement 1 µg/mL
Bueter 2011	-	76.7%	Particules 1 µg-1000 µg/mL
Guzman-Morales 2011	40 kDa	80-81.9%	Microparticules 5-500 µg/mL
Oliveira 2012	324 kDa	88-89%	Film -
Almeida 2014	324 kDa	88-89%	Échafaudage 3D -
Bueter 2014	-	60-92%	Particules 100 µg/mL
Gudmundsdottir 2015	Oligomères, 5 kDa et haut M _n	-	Particules et oligomères 20-120 µg/mL

2.9 Modèle d'étude des macrophages *in vitro*

L'étude de macrophages humains peut se réaliser en utilisant des cultures primaires ou bien des lignées cellulaires. Dans le cadre de cette thèse doctorale, la majorité des expériences a été réalisée dans des lignées cellulaires de macrophages U937. Cependant, certaines expériences confirmatoires ont été réalisées dans des cultures primaires de macrophages humains.

2.9.1 Culture primaire de macrophages humains

Dans le cas des cultures primaires, un échantillon sanguin (environ 120 mL) provenant du sang périphérique est prélevé à partir d'un donneur volontaire sain. Le sang prélevé est ensuite versé sur du Ficoll-Hypaque et l'échantillon est centrifugé afin de séparer les cellules mononucléaires des granulocytes et des globules rouges (Ariganello, Simionescu, Labow, & Lee, 2011). Après centrifugation, les cellules mononucléaires (contenant les monocytes et lymphocytes) sont récoltées à l'interface Ficoll-Plasma. Après plusieurs lavages successifs, les cellules obtenues

peuvent être mises en culture directement, ou bien sont soumises à des étapes de purification en utilisant des microbilles permettant d'isoler uniquement les cellules CD14⁺ (exprimée exclusivement par les monocytes) (Ambarus et al., 2012).

Une fois mises en culture, les cellules peuvent être également maintenues de 4 à 7 jours en présence de M-CSF ou GM-CSF afin de promouvoir leur différenciation et survie en macrophages (Ambarus et al., 2012). Alternativement, les cellules peuvent être uniquement maintenues en culture pendant 14 jours en présence unique de sérum (Ariganello et al., 2011). Dans le cadre de cette thèse, les macrophages primaires humains sont obtenus à partir d'une culture de 14 jours en présence de sérum et permettent d'obtenir des cellules macrophagiques adhérentes (Ariganello et al., 2011). Une fois les macrophages obtenus, il est possible de les stimuler avec l'IFN- γ , le LPS ou l'IL-4 afin d'induire leur polarisation vers les phénotypes M1 ou M2 (Ambarus et al., 2012).

2.9.2 Lignées cellulaires U937

Les cellules U937 sont une lignée monocyttaire utilisée rigoureusement pour étudier la biologie des macrophages (Baek et al., 2009; Sundstrom & Nilsson, 1976). Ces cellules ont été originellement isolées d'un homme atteint d'un lymphome histiocyttaire (Sundstrom & Nilsson, 1976). Les U937 peuvent être cultivées et propagées *in vitro* en tant que précurseurs monocytaires non adhérents, et sont différenciées en macrophages en utilisant différents agents (Vitamine D₃, acide rétinolique, PMA (phorbol-myristate acetate)). Le PMA est traditionnellement utilisé pour la différenciation des U937 en macrophages (Baek et al., 2009). Celui-ci est un agoniste chimique de la voie des protéines kinase C et promeut chez les U937 l'expression de plusieurs protéines exprimées sur les macrophages matures (Baek et al., 2009; Verhoeckx et al., 2004).

L'utilisation de ces lignées cellulaires présente des avantages considérables par rapport aux cultures primaires de macrophages dérivés de monocytes. Premièrement, la différenciation des cellules U937 obtenue est reproductible et permet d'obtenir des macrophages dont le comportement est plus homogène et reproductible que les macrophages obtenus à partir de cultures primaires (Chanput, Mes, & Wichers, 2014). Ceci permet de minimiser la variabilité des résultats obtenus à travers différentes expériences. De plus, les lignées cellulaires permettent d'obtenir un nombre abondant de cellules pour des expériences. Cela permet ainsi de générer assez de cellules pour une récupération adéquate d'échantillon biologique (par exemple, échantillon protéique ou génomique pour des analyses). Finalement, les lignées cellulaires sont plus robustes aux agents de

transfections. Cela permet l'utilisation de ces cellules pour des études de silençage ou de surexpression de gènes chez les macrophages, ce qui est difficile à réaliser avec des macrophages primaires (Zhang, Edwards, & Mosser, 2009).

2.10 Essais cellulaires et biochimiques

Cette section présentera les différents essais cellulaires, biochimiques et immunologiques utilisés afin de réaliser les travaux présentés dans cette thèse.

2.10.1 Mesure de la viabilité cellulaire

Dans les travaux réalisés dans cette thèse, la viabilité cellulaire suite aux différents traitements a été évaluée par des essais MTT (bromure de 3-(4,5-diméthyl-2-thiazolyl)-2,5-diphényl tétrazolium) et LDH (Lactate déshydrogénase). Les essais MTT permettent de mesurer l'activité métabolique des cellules tandis que les essais de LDH mesurent la cytotoxicité induite par un traitement bien précis (Wolterbeek & van der Meer, 2005).

Lors des essais MTT, les cellules sont exposées au sel MTT. Le MTT est alors réduit en formazan par les enzymes mitochondriales présentes dans les cellules vivantes. Le formazan est un précipité brun-violet qui peut être dissout et quantifié par absorbance. L'intensité de la couleur provenant du formazan est proportionnelle à l'activité métabolique des cellules et de leur viabilité (Berridge, Herst, & Tan, 2005).

Les essais LDH permettent de mesurer directement la lyse ou les dommages cellulaires. Le LDH est une enzyme cytosolique qui est relâchée dans le milieu de culture lorsqu'une perturbation au niveau de la membrane cellulaire (induite par nécrose ou apoptose) a lieu (Haslam, Wyatt, & Kitos, 2000; Wolterbeek & van der Meer, 2005). Le LDH libéré en culture indique ainsi l'intégrité des cellules et si une réponse cytotoxique à un traitement prend lieu. Lors ce test, le LDH catalyse par le biais de réactions successives la formation de formazan. L'intensité de la couleur provenant du formazan est proportionnelle à la quantité de LDH présent dans le milieu de culture et reflètent ainsi les niveaux de cytotoxicités parmi les cellules (Haslam et al., 2000; Wolterbeek & van der Meer, 2005).

2.10.2 Les essais ELISA

L'ELISA, de l'anglais <<Enzyme-linked immunosorbent assay>>, est une méthode immunologique permettant de détecter la présence d'une protéine d'intérêt dans un échantillon biologique par le biais d'anticorps. Il existe plusieurs variantes des ELISAs et ces essais peuvent être réalisés de manière directe, en sandwich ou bien par compétition. Dans ces essais, les anticorps utilisés sont monoclonaux, car ils permettent une meilleure spécificité au niveau des liaisons antigène-anticorps, ce qui permet d'assurer la précision et l'exactitude des analyses (Engvall, 2010). Pour les travaux réalisés dans cette thèse, l'ELISA en sandwich, l'ELISA par compétition et les essais multiplexes sont utilisés et seront présentés.

2.10.2.1 L'ELISA en sandwich

Les ELISAs en sandwich sont réalisés dans des microplaques où un premier anticorps (l'anticorps de capture) est adsorbé à la surface de la microplaque (Figure 2.11). Après l'adsorption, l'échantillon contenant l'antigène d'intérêt est ajouté aux plaques et ainsi l'antigène se lie à l'anticorps de capture. Suite à cela, un deuxième anticorps (l'anticorps de détection) est ajouté et celui-ci se lie également à l'antigène d'intérêt. Dans notre cas, l'anticorps de détection est biotinylé, et permet ainsi une liaison spécifique et rapide de la streptavidine aux anticorps de détection. La streptavidine est conjuguée à une enzyme (soit la peroxydase de raifort (HRP) ou la phosphatase alcaline) qui va pouvoir réagir avec un substrat afin de produire un précipité coloré (Figure 2.11). L'intensité du précipité est proportionnelle à la concentration de l'antigène dans l'échantillon. En utilisant un étalon de différentes concentrations de l'antigène d'intérêt, la concentration de l'antigène dans l'échantillon est déterminée (Engvall, 2010).

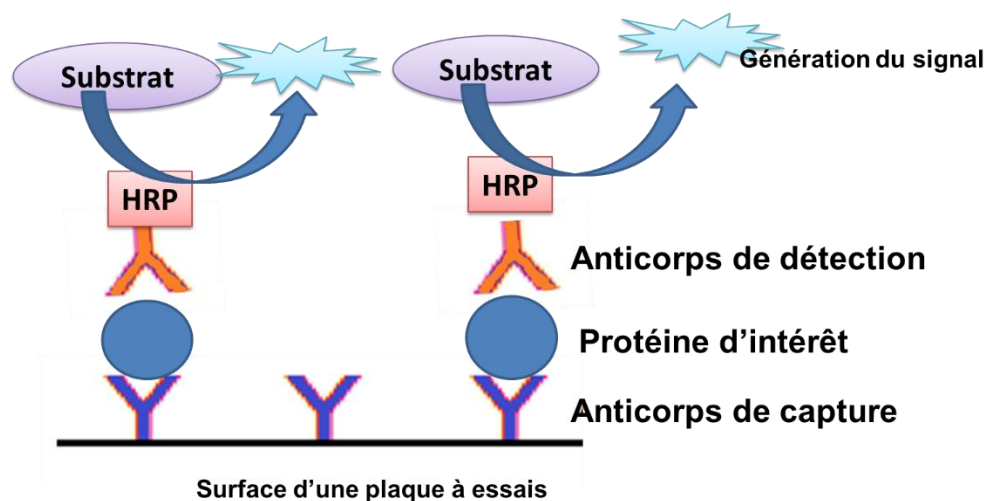


Figure 2.11 : Schéma représentant la détection d'une protéine d'intérêt par ELISA en sandwich.

2.10.2.2 L'ELISA compétitif

Lors de l'ELISA compétitif, un anticorps spécifique à l'antigène d'intérêt est d'abord adsorbé à la surface de la microplaque. Par la suite, l'échantillon contenant l'antigène d'intérêt est ajouté dans la microplaque en présence d'une solution contenant une quantité connue d'antigène qui a été préalablement marqué avec une molécule de détection. Durant l'incubation, l'antigène non marqué provenant de l'échantillon et l'antigène marqué font compétition afin de se lier au même anticorps. Après incubation, la microplaque est rincée et le signal provenant de l'antigène marqué est mesuré (par le biais d'un substrat ou d'une molécule fluorescente) (Hornbeck, 1991).

Dans les ELISAs compétitifs, une faible concentration d'antigène dans l'échantillon à doser permettra une quantité de l'antigène marqué plus grande de se lier aux anticorps, ce qui se traduit à un signal mesuré plus élevé. Au contraire, plus la concentration d'antigène dans l'échantillon à doser est élevée, plus ces antigènes non marqués sont liés aux anticorps aux dépens des antigènes marqués. Cela mène ainsi à un signal mesuré plus faible (Hornbeck, 1991).

2.10.2.3 Les essais multiplexes

Les essais multiplexes peuvent être considérés comme des ELISAs multiples, car ils permettent à partir d'un seul échantillon biologique de quantifier la concentration de plusieurs antigènes distincts. Ces essais utilisent des billes qui ont été infusées avec deux fluorophores à différentes concentrations qui absorbent tous les 2 à 635 nm et émettent à 2 longueurs d'onde distincte. Chaque

bille est attribuée une combinaison de ces deux fluorophores et est couplée à un anticorps (anticorps de capture) ciblant un antigène unique (Figure 2.12, onglet A). Suite à cela, l'échantillon d'intérêt est mis en présence de plusieurs billes chacune couplée individuellement à différents anticorps. Suite à la liaison des anticorps aux antigènes respectifs, un deuxième anticorps est ajouté (l'anticorps de détection). Cet anticorps de détection est biotinylé, ce qui lui permet d'être lié spécifiquement par de la streptavidine. Dans les essais multiplexes, la streptavidine est couplée à une molécule fluorescente, la phycoérythrine.

Chaque antigène analysé est lié d'un côté de par l'anticorps de capture conjugué aux billes (dont la combinaison est spécifique, unique et destinée à l'identification d'un antigène) et d'un autre côté par les anticorps de détection associé avec la streptavidine-phycoérythrine. Le tout est analysé par un appareil qui analyse la fluorescence provenant de la phycoérythrine et des deux fluorophores associés aux billes. La fluorescence mesurée pour chacun des deux fluorophores associés aux billes permet d'identifier quel antigène est mesuré tandis que la fluorescence provenant de la phycoérythrine permet de déterminer la concentration de l'antigène d'intérêt dans l'échantillon (Figure 2.12, onglet B).

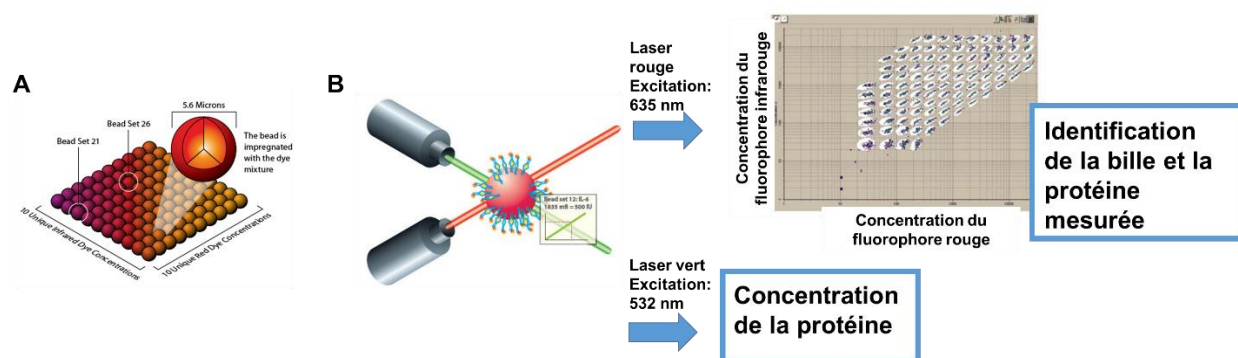


Figure 2.12 : Principe de détection des protéines par essais multiplexes. Les billes sont infusées de deux colorants émettant dans le rouge et l'infrarouge, respectivement (onglet A). Un laser ayant une longueur d'onde d'excitation de 635 nm permet d'identifier la protéine qui est mesurée. Un laser ayant une longueur d'onde d'excitation de 532 nm permet de mesurer le niveau de PE qui est proportionnel à la concentration de la protéine identifiée par le laser 635 (onglet B) (image adaptée de Bio-Rad.com).

2.10.3 L'électrophorèse sur gel d'acrylamide et le buvardage de type western

Le buvardage de type western, aussi appelé Western blot, permet de détecter et d'évaluer de manière relative la présence d'une protéine d'intérêt dans un échantillon. Cet échantillon est généralement un lysat cellulaire ou tissulaire, mais peut également être du surnageant provenant de culture cellulaire ou du plasma.

Suite à la génération de l'échantillon, l'échantillon est dosé pour son contenu protéique. À partir de cela, une quantité connue de protéine est diluée dans un tampon contenant un agent réducteur et du dodécylsulfate de sodium (SDS). L'ajout de SDS permet de charger négativement toutes protéines contenues dans l'échantillon. L'échantillon préparé est alors déposé sur un gel d'acrylamide polymérisé dans une chambre de migration. En appliquant un courant électrique, les protéines migrent à travers le gel vers le pôle positif à différentes vitesses en fonction de leur poids. Cette méthode permet ainsi de séparer toutes les protéines contenues dans un échantillon en fonction de leur poids moléculaire respectif (Gallagher, 2001).

Une fois que la séparation des protéines dans les échantillons est terminée, les protéines contenues dans le gel d'acrylamide sont transférées sur une membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène). Cette membrane va pouvoir contenir toutes les protéines du gel et servira comme une surface d'adhésion pour les anticorps pour le Western blot. Lors du Western blot, un premier anticorps (appelé anticorps primaire) est incubé avec la membrane de PVDF pour une courte période de temps (environ 1 heure). Après cette incubation, la membrane est brièvement lavée pour ensuite être incubée avec un deuxième anticorps, l'anticorps secondaire. Cet anticorps secondaire va se lier au premier anticorps. Dans notre cas, l'anticorps secondaire est couplé à une enzyme (HRP : peroxydase de raifort) qui va pouvoir réagir avec un substrat afin de produire un signal chimiluminescent. Le signal chimiluminescent est détecté par le biais de films autoradiographiques qui sont ensuite développés dans une chambre noire (Gallagher, 2001).

2.10.4 L'immunomarquage, la cytométrie de flux et la microscopie confocale

2.10.4.1 L'immunomarquage

L'immunomarquage est une technique permettant de détecter la présence d'un antigène *in situ* dans une population de cellules. Cette technique peut être réalisée directement sur les cellules qui ont été ou non préalablement fixées. Toutefois, la fixation est souvent utilisée pour immobiliser les

cellules pour la microscopie confocale, mais ce n'est pas nécessaire pour les analyses de cytométrie en flux. Lors de l'immunomarquage, les cellules sont incubées en présence d'un anticorps primaire spécifique pour l'antigène d'intérêt. Lors d'un immunomarquage direct, l'anticorps primaire est directement conjugué à un fluorophore et ne nécessite pas l'addition d'un anticorps secondaire fluorescent. Lors d'un immunomarquage indirect, un anticorps secondaire conjugué à un fluorophore est ajouté et celui-ci se lie à l'anticorps primaire (Donaldson, 2001).

2.10.4.2 La microscopie confocale

La microscopie confocale se distingue de la microscopie en épifluorescence, car celle-ci permet de détecter uniquement la fluorescence émise sur le plan focal X-Y précis dans une série de plan dans l'axe Z (en contraste à la microscopie en épifluorescence qui détecte la fluorescence émise sur le plan focal et sur tous les plans Z). C'est par le biais d'un sténopé que le microscope confocale permet cette détection sélective de la lumière provenant du plan focal. Lors de l'acquisition des images, des lasers (argon-ion ou hélium-néon) balayent l'échantillon afin d'exciter les différents fluorophores. L'émission de la fluorescence est détectée par des tubes photomultiplicateurs (Smith, C. L., 2001).

La microscopie confocale permet ainsi de détecter la fluorescence (qui témoigne de la présence d'une protéine d'intérêt préalablement marquée lors de l'immunomarquage) émise par des fluorophores dans un plan XY à une hauteur Z bien définie. En acquérant plusieurs images X-Y, il est possible de créer une reconstitution en trois dimensions des signaux fluorescents obtenus utilisant un logiciel de déconvolution (Gao et al., 1998; Smith, C. L., 2001).

2.10.4.3 La cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique permettant de quantifier l'intensité de la fluorescence associée à chaque cellule individuelle dans une population de cellules. Lors de cette technique, les cellules en suspension défilent dans le cytomètre à grande vitesse à travers des canaux microfluidiques jusqu'à un système de détection. Le système de détection est composé de lasers qui vont pouvoir exciter les différents fluorophores associés aux cellules et de détecteurs qui vont pouvoir mesurer l'intensité émise par chaque fluorophore. Cette technique permet ainsi d'analyser un nombre très élevé de cellules, soit plusieurs milliers de cellules (Kim & Sederstrom, 2001).

2.10.5 Essais de migration des cellules souches mésenchymateuse

Les chambres de migration Transwell sont utilisées afin d'évaluer le potentiel chimiotactique des milieux de culture provenant de macrophages. Ces chambres sont composées de deux compartiments séparés l'une de l'autre par une membrane poreuse (taille des pores 8 μm). Lors de ces essais, des MSC en culture sont récupérés etensemencés dans le compartiment supérieur de la chambre de migration. Ce compartiment est ensuite mis en contact avec la solution dans la chambre inférieure dont le potentiel chimiotactique est à évaluer (Figure 2.13).

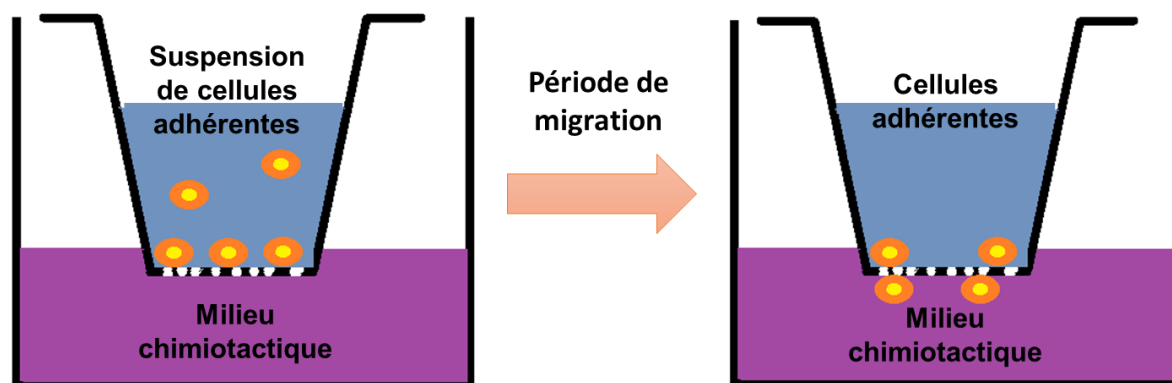


Figure 2.13 : Schéma représentant la chambre de migration Transwell® utilisée pour les essais de migration des MSC.

Après une période d'incubation prédéfinie, les cellules ayant migré vers la solution d'intérêt auront quitté le compartiment supérieur et se retrouveront de l'autre côté de la membrane poreuse. Les cellules qui n'ont pas migré (restant dans le compartiment supérieur) sont enlevées doucement et les cellules restantes (celles qui ont migré) sont marquées et comptées.

CHAPITRE 3 RATIONELLE ET ORGANISATION GÉNÉRALE DES ARTICLES

La réparation du cartilage par stimulation osseuse dépend critiqueusement du recrutement des MSC provenant de la moelle osseuse et leur différenciation appropriée dans la lésion ostéochondrale (Shapiro et al., 1993). En amont de ces deux événements, la phase inflammation aigue initie cette réponse régénératrice où les macrophages sont reconnus comme une des cellules principales orchestrant la réparation tissulaire (Hoemann, C. D. et al., 2010). Qu'ils soient dans le tissu de granulation ou dans la membrane synoviale, les macrophages peuvent sécréter un large spectre de molécules pouvant influencer la réparation ostéochondrale et l'homéostasie de l'articulation de manière significative (Fahy et al., 2014; Hoemann, C. D. et al., 2010). En fonction du phénotype de polarisation acquis, les macrophages présents au cours de la réparation ostéochondrale peuvent sécréter des facteurs qui vont attirer les MSCs, promouvoir la chondrogenèse et exercer un effet protecteur sur le cartilage, ou au contraire libérer plusieurs facteurs cataboliques qui induiront la mort des cellules voisinant y compris les chondrocytes et la dégradation de la matrice cartilagineuse (Fahy et al., 2014; Sesia et al., 2015). Ces connaissances suggèrent que les approches pouvant moduler le phénotype des macrophages présents dans l'articulation pourraient avoir des bénéfices thérapeutiques prometteurs sur les MSC durant la réparation du cartilage et sur les cellules natives. Une de ces approches serait d'utiliser un biomatériau bioactif qui pourrait stimuler la capacité des macrophages à :

- 1) Sécréter des facteurs chimiotactiques pour les MSC afin d'augmenter le recrutement de ces cellules dans la lésion ostéochondrale
- 2) Stimuler la production de molécules anti-inflammatoires pour favoriser la réparation du cartilage.

Plusieurs polysaccharides et polymères, dont le chitosane, le sulfate de chondroïtine, l'acide hyaluronique, le polyéthylène glycol et l'acide polyglycolique ont été proposés comme biomatériaux pour améliorer la réparation ostéochondrale induite par stimulation osseuse (Strauss, Barker, Kercher, Cole, & Mithoefer, 2010). Parmi ces biomatériaux, le chitosane s'avère comme un biomatériau prometteur pour la réparation ostéochondrale pour plusieurs raisons. Dans un premier temps, le chitosane est le seul polysaccharide naturel cationique biodégradable. Cela confère au chitosane ses propriétés hémostatiques et sa capacité à s'adhérer à l'os et au cartilage,

contribuant ainsi lors de la stimulation osseuse à la formation du caillot sanguin plus stable et plus volumineux nécessaire pour une meilleure réparation tissulaire (Hoemann, C. D. et al., 2005). Étant donné qu'il est biodégradable, le chitosane se résorbe graduellement afin de permettre la formation d'un nouveau tissu cartilagineux fonctionnel et bien intégré avec les tissus adjacents (Chevrier, A. et al., 2007; Chevrier, C. D. H., Jun Sun, Michael Buschmann, 2010; Hoemann, C. D. et al., 2010). Finalement, ce polysaccharide est déjà utilisé pour améliorer la réparation du cartilage induite par stimulation osseuse chez l'homme (Stanish et al., 2013). Toutefois, les mécanismes cellulaires et moléculaires qui contribuent à cette meilleure réparation ostéochondrale induite par le chitosane demeurent largement inconnus. Une meilleure compréhension de ces mécanismes contribuerait aux développements d'implants à base de chitosane plus efficace pour traiter les lésions ostéochondrales de patients plus âgés où la réponse régénératrice est atténuée (Kreuz et al., 2006).

Les études précliniques portant sur les implants hybrides sang/chitosane ont identifié que ces implants augmentent la présence des macrophages dans les lésions ostéochondrales, suggérant ainsi que ces cellules participent activement à la réponse régénératrice (C.-H. Lafantaisie Favreau & Henderson, 2010; Hoemann, C. D. et al., 2010). Ainsi, les interactions entre les macrophages et le chitosane joueraient des rôles clés dans le recrutement *in situ* des MSC et la réparation ostéochondrale. Il est bien connu que le chitosane possède un potentiel d'immunomodulation unique au sein des macrophages. Le chitosane peut stimuler chez les macrophages la libération d'un large spectre de molécules, incluant des cytokines pro- et anti-inflammatoires (Bueter et al., 2011; Bueter et al., 2014; Oliveira et al., 2012), des chimiokines et des facteurs de croissance (Guzman-Morales et al., 2011; Ueno et al., 2001). Ces différents facteurs vont largement être responsables d'influencer la réponse régénératrice, dont le recrutement des MSC, leur différenciation et leurs fonctions dans le tissu.

Toutefois, les circonstances sous lesquelles le chitosane peut stimuler la libération de ces différents facteurs demeurent inconnues. Un facteur contribuant à ces inconnues est l'utilisation de diverses préparations de chitosane dont les propriétés structurales varient grandement. Ainsi, il existe un besoin important d'établir un modèle capable de prédire la réponse des macrophages au chitosane en fonction de ses propriétés structurales. De plus, étant donné que les macrophages présentent différents états d'activation en réponse au chitosane (Hoemann, C. D. et al., 2010; Vasconcelos et al., 2013), il devient nécessaire de caractériser les interactions entre le chitosane et les macrophages sous les phénotypes de polarisation qu'ils peuvent adopter *in vivo*.

Ensemble, ces informations permettent d'émettre l'hypothèse que le chitosane pourrait être utilisé afin de moduler le phénotype des macrophages présents dans l'articulation afin de guider la libération de :

- 1) Facteurs chimiotactiques pouvant augmenter le recrutement *in situ* des MSC dans les lésions ostéochondrales lors de la réparation du cartilage par stimulation osseuse.
- 2) Facteurs anaboliques qui permettront la différenciation des MSC et leur saine pérennité au sein du nouveau tissu formé.
- 3) Facteurs anti-inflammatoires qui protégeront l'articulation des effets cataboliques des molécules pro-inflammatoires.

Au départ, le chitosane qui sera utilisé pour évaluer ces différentes réponses moléculaires sera un chitosane acétylé en bloc avec un DDA de 80% et un poids moléculaire (M_n) entre 100 et 200 kDa (Chitosane 80M). Ce chitosane a été choisi, car ces propriétés s'apparentent au chitosane utilisé pour le BST-CarGel® et aux chitosanes utilisés dans les études précliniques précédentes (Chen, 2010; Chevrier, A. et al., 2007; Hoemann, C. D. et al., 2010; Hoemann, C. D. et al., 2005; Stanish et al., 2013). Cependant, il est reconnu que les propriétés structurales du chitosane peuvent influencer drastiquement le phénotype des macrophages (Vasconcelos et al., 2013). Ainsi, il sera important d'évaluer l'influence de ces propriétés structurales (soit le DDA, le poids moléculaire et le patron d'acétylation) sur la libération des différentes molécules induite par le chitosane qui seront identifiées préalablement. Cela permettra d'identifier quels sont les motifs structuraux requis qui permettent au chitosane de stimuler des réponses anaboliques et anti-inflammatoires sans stimuler la libération de facteurs cataboliques.

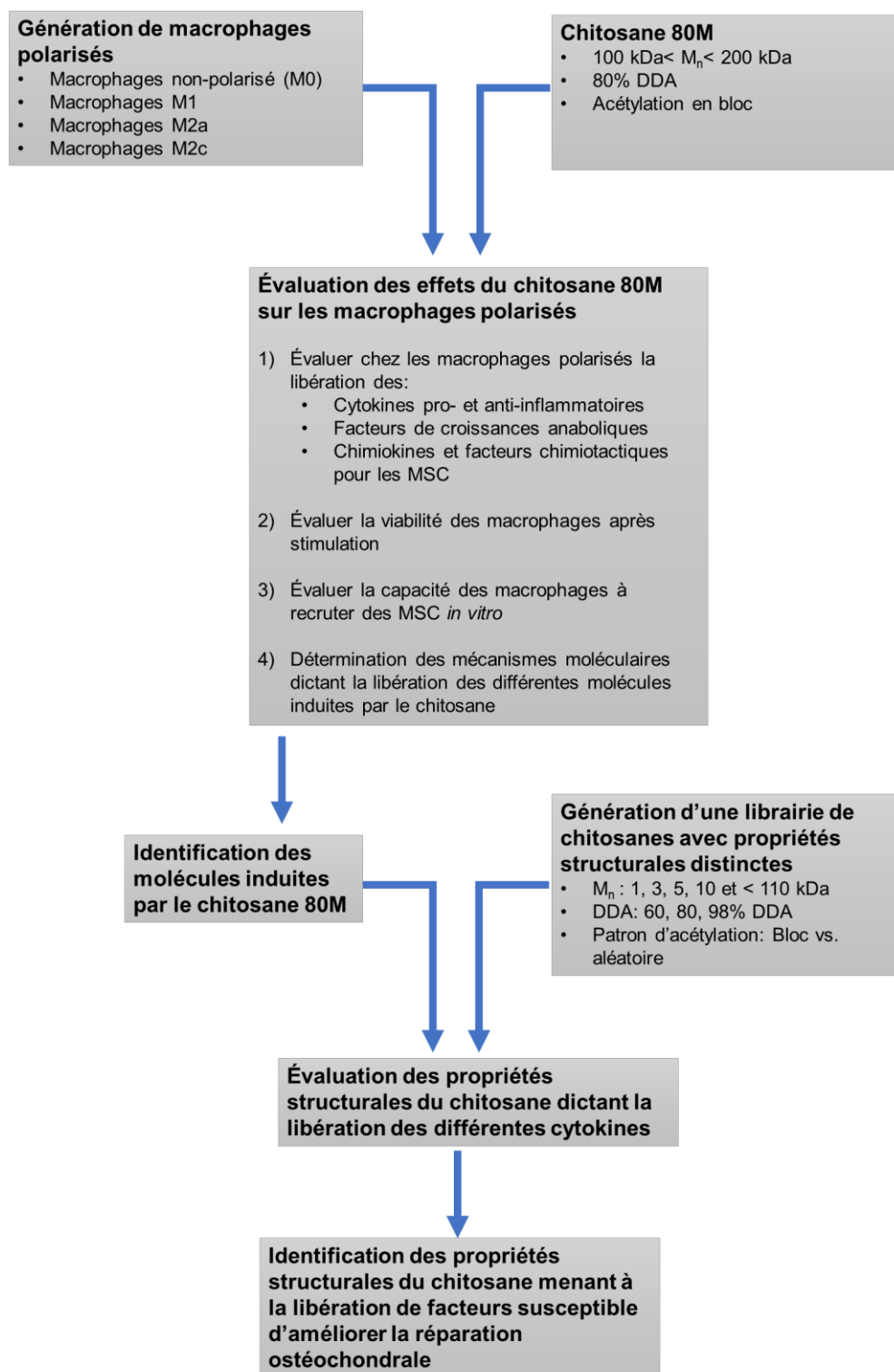


Figure 3.1 : Organigramme présentant les étapes majeures des travaux à réaliser dans cette thèse.

3.1 Objectifs de cette thèse

Les travaux de cette thèse visent à caractériser l'interaction entre les macrophages et le chitosane afin de déterminer comment le chitosane peut être utilisé pour moduler le comportement des macrophages dans le but d'améliorer la réparation du cartilage. Les objectifs principaux de cette thèse sont :

- 1) Déterminer comment le comportement des macrophages peut être modulé par le chitosane afin de stimuler chez ces cellules la libération de facteurs anaboliques capable d'améliorer la réparation du cartilage et protéger son intégrité.
- 2) Générer une librairie de chitosane possédant des propriétés structurales distinctes afin d'évaluer l'influence de ces propriétés sur la capacité des macrophages à sécréter des facteurs bénéfiques pour la réparation du cartilage.
- 3) Identifier les mécanismes cellulaires et les motifs structuraux du chitosane permettant à ce polysaccharide d'induire chez les macrophages des réponses anti-inflammatoire tout en minimisant l'activation de réponses pro-inflammatoire.

3.2 Hypothèses générales émises dans cette thèse

- 1) Le chitosane peut stimuler chez des macrophages polarisés vers différents phénotypes la libération de facteurs anaboliques capable d'améliorer la réparation du cartilage articulaire.
- 2) Le chitosane possède des motifs structuraux capables de stimuler exclusivement chez les macrophages la libération de facteurs anti-inflammatoires sans stimuler la libération de facteurs pro-inflammatoires.

3.2.1 Objectifs de l'article 1

- 1) Évaluer l'effet du chitosane sur la libération de facteurs immunomodulateurs et chimiotactiques chez des macrophages humains polarisés vers des phénotypes M1 et M2.
- 2) Évaluer la capacité des macrophages M1 et M2, stimulés ou non au chitosane, à promouvoir la migration des MSC dans des essais *in vitro*.
- 3) Identifier les voies de signalisation permettant au chitosane de stimuler la libération de facteurs immunomodulateurs et chimiotactiques chez les macrophages.

4) Vérifier que les réponses au chitosane observées chez les cellules U937 sont aussi observées chez les macrophages primaires humains.

3.2.2 Hypothèses de l'article 1

1) Les particules de chitosane stimulent chez les macrophages M1 et M2 la libération de facteurs anti-inflammatoires tout en minimisant la libération de facteurs pro-inflammatoires.

2) Les macrophages stimulés aux particules de chitosane libèrent plus de facteurs chimiotactiques pour les MSC que les macrophages non stimulés.

3) Les milieux conditionnés provenant de macrophages stimulés aux particules de chitosane attirent plus de MSC que les milieux conditionnés provenant de macrophages non stimulés.

4) Les particules de chitosane activent les voies de signalisations STAT-1 et STAT-6 chez les macrophages.

5) Les macrophages primaires ont besoin d'être activés par le PMA pour montrer les réponses au chitosane observé dans les macrophages U937 obtenues par différenciation au PMA.

3.2.3 Objectifs de l'article 2

1) Générer un répertoire de chitosanes possédant des propriétés structurales (DDA, M_n et patron d'acétylation) bien définies.

2) Identifier les propriétés structurales du chitosane menant à la libération des cytokines IL-1 β , IL-1 α et CXCL10 et à la libération de PGE₂ par les macrophages.

3) Évaluer la cytotoxicité des différents chitosane générés sur des macrophages.

4) Définir les mécanismes cellulaires menant aux réponses pro- ou anti-inflammatoires induites par les chitosanes générés.

3.2.4 Hypothèses de l'article 2

1) Le chitosane possède des motifs structuraux bien précis afin de stimuler la libération d'IL-1 α sans induire la libération d'IL-1 β chez les macrophages.

2) Le chitosane possède des motifs structuraux bien précis afin de stimuler la libération d'IL-1 α sans induire de mort cellulaire chez les macrophages

- 3) Les chitosanes qui stimulent la production de CXCL10 et IL-1ra induisent de l'expression de l'IFN de type 1 qui agit comme facteur paracrine sur les macrophages.
- 4) La libération d'IL-1 β , IL-1ra, CXCL10 et PGE₂ sont dépendants de l'intégrité des lysosomes.
- 5) La perturbation et la rupture des lysosomes par le chitosane sont responsables de la libération d'IL-1 β , IL-1ra, CXCL10 et PGE₂.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1: BIODEGRADABLE CHITOSAN MICROPARTICLES INDUCE DELAYED STAT-1 ACTIVATION AND LEAD TO DISTINCT CYTOKINE RESPONSES IN DIFFERENTIALLY POLARIZED HUMAN MACROPHAGES IN VITRO

Ce chapitre présente l'article intitulé *Biodegradable chitosan microparticles induce delayed STAT-1 activation and lead to distinct cytokine responses in differentially polarized human macrophages in vitro* dont les auteurs sont David Fong, Marianne B. Ariganello, Joël Girard-Lauzière et Caroline D. Hoemann.

Cet article a été publié dans la revue *Acta Biomaterialia* en janvier 2015 ([Acta Biomater.](#) 2015 Jan; 12:183-194) et répond aux objectifs de l'article 1 présentés au chapitre 3.

La contribution du premier auteur à l'émission des hypothèses, la conception des expériences, l'obtention des résultats et à la rédaction de l'article est évaluée à 85%.

Description détaillée de la contribution des différents auteurs :

David Fong : Émission des hypothèses, conception des expériences, obtention des résultats, analyse et interprétation des données, rédaction et révision de l'article, responsable de l'intégrité du travail.

Marianne B. Ariganello : Émission des hypothèses, conception des expériences, obtention des résultats, analyse des données, révision de l'article.

Joël Girard-Lauzière : Obtention des résultats, analyse des données

Caroline D. Hoemann : Émission des hypothèses, conception des expériences, analyse et interprétation des données, rédaction et révision de l'article, acquisition des fonds de recherche, responsable de l'intégrité du travail.

Title:

Biodegradable chitosan microparticles induce delayed STAT-1 activation and lead to distinct cytokine responses in differentially polarized human macrophages *in vitro*.

Authors:

David Fong^a, Marianne B. Ariganello^b, Joel Girard-Lauziere^a, Caroline D. Hoemann^{a,b,c*}

^aInstitute of Biomedical Engineering, École Polytechnique, 2900 boul. Édouard-Montpetit, Montreal, QC, Canada, H3T 1J4

^bDepartment of Chemical Engineering, École Polytechnique, 2900 boul. Édouard-Montpetit, Montreal, QC, Canada, H3T 1J4

^cFRQ-S Biomedical Research Group/ Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales, École Polytechnique, 2900 boul. Édouard-Montpetit, Montreal, QC, Canada, H3T 1J4

***Corresponding author:**

Caroline D. Hoemann, Ph.D., P.Eng.

Professor

Dept. of Chemical Engineering

2900 boul. Édouard-Montpetit

École Polytechnique

Montréal, QC, Canada, H3C 3A7

Tel : (514) 340-4848

Fax : (514) 340-2980

caroline.hoemann@polymtl.ca

4.1 Abstract

Current data suggest that chitosan activates wound macrophages to release endogenous factors that guide mesenchymal stem cell (MSC) to bone fractures. We tested the hypothesis that chitosan, a polymer containing glucosamine and N-acetyl glucosamine, stimulates macrophages in different polarization states to release functional MSC chemokines and mainly anabolic factors. Low-serum conditioned medium was collected from M0, M1 and M2a U937 macrophages previously differentiated with phorbol myristate acetate (PMA) and exposed or not for 24 h to chitosan microparticles (80% degree of deacetylation, DDA, 130 kDa). Chitosan particles were highly phagocytosed. Chitosan enhanced anabolic factor release from M0 and M2a macrophages (MCP-1, IP-10, MIP-1beta, IL-1ra, IL-10, PDGF), and IL-1beta release, with 25- to 400-fold excess IL-1ra over IL-1beta. In M1 macrophages, chitosan enhanced IL-1beta without enhancing or suppressing inflammatory factor release (IL-6, IP-10, IL-8). M0 and M2a macrophages, with or without chitosan stimulation, produced conditioned medium that promoted 2-fold more MSC chemotaxis than low-serum control medium, while M1-conditioned medium failed to induce MSC chemotaxis. Acetylated chitosan induced U937 macrophages to release IL-1ra without STAT-6 activation, and also induced a delayed STAT-1 activation/IP-10 release response that was not observed using non-biodegradable chitosan (98% DDA, 130 kDa). In primary human macrophages, acetylated chitosan enhanced IL-1ra release without inducing IL-1beta, and required PMA priming to elicit STAT-1 activation and IP-10 release. We conclude that biodegradable chitosan particles enhance M0 and M2a macrophage anabolic responses independent of the IL4/STAT-6 axis, by inducing excess IL-1ra over IL-1beta and more chemokine release, without altering their inherent capacity to attract MSC.

Keywords: chitin/chitosan, macrophage, immunomodulation, inflammation, mesenchymal stem cells

Running title: Chitosan stimulation of polarized human macrophages

Chitosan microparticle stimulation M0, M1 and M2a macrophages

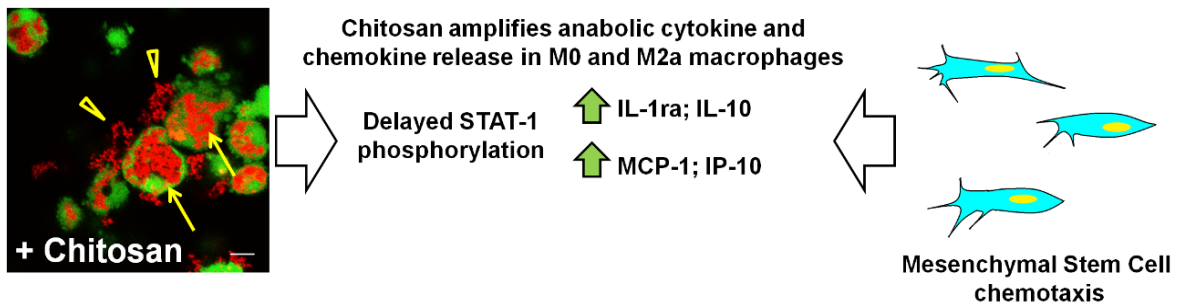


Figure 4.1: Graphical Abstract

4.2 Introduction

Bone marrow stimulation is an articular cartilage repair procedure that consists of introducing controlled fractures in the debrided subchondral bone plate to initiate bleeding and a spontaneous repair response (Hoemann, C. D. et al., 2010; Richter, 2009). This allows formation of a fibrin blood clot, which gradually transits to a granulation tissue, a favorable microenvironment to recruit multipotential mesenchymal stromal cells (MSC) to the injury site (Richter, 2009). Because the repair tissue obtained is often a fibrocartilaginous tissue that breaks down under load (Breinan, Martin, Hsu, & Spector, 2000), strategies are currently needed that suppress fibrocartilage and elicit stem cells capable of forming a more hyaline and biomechanically stable tissue.

It was previously shown that biodegradable chitosan mixed into whole blood clot implants can increase the attraction of MSC to marrow stimulation defects and elicit a more hyaline cartilage repair compared to marrow stimulation alone (Chevrier, A. et al., 2007; Hoemann, C. D. et al., 2005). Chitosan represents a family of linear polysaccharides containing glucosamine and variable levels of N-acetyl glucosamine (GlcNA). The polymer is biodegradable when the N-acetyl glucosamine content is at least 15%, which corresponds to a maximum degree of deacetylation (DDA) of 85% (Tomihata & Ikada, 1997). In animal subchondral bone fracture models, fractures treated with biodegradable chitosan implant develop granulation tissues containing more alternatively activated arginase-1 + macrophages (Hoemann, C. D. et al., 2010), and this acute inflammatory response is followed by enhanced MSC chemotaxis compared to untreated fractures (Chevrier, A. et al., 2007). In vitro, at cytocompatible concentrations ($\leq 100 \mu\text{g ml}^{-1}$), 80–92% DDA chitosan stimulates macrophages to release anabolic cytokines and a host of factors known to attract MSC, including interleukin-10 (IL-10) (Oliveira et al., 2012), platelet-derived growth factor (PDGF), transforming growth factor-beta (Oliveira et al., 2012; Ueno et al., 2001), MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (CCL3) and MIP-1 β (CCL4) (Guzman-Morales et al., 2011), with only minor release of catabolic factors such as IL-1 β (Bueter et al., 2011; Guzman-Morales et al., 2011; Oliveira et al., 2012). In sum, these data suggest that chitosan can be used to stimulate macrophages to release chemotactic factors that guide MSC to subchondral bone wounds.

Macrophages have significant functional roles during osteochondral repair (Alexander et al., 2011; Fahy et al., 2014; Hoemann, C. D. et al., 2010). Within fractures, macrophages are recruited during

the early inflammatory phase and persist throughout the repair process (Alexander et al., 2011). In addition to being recruited to the osteochondral defect following marrow stimulation (Hoemann, C. D. et al., 2010), they are also present in the joint within the synovial membrane and can have direct impacts on MSC chondrogenesis (Fahy et al., 2014). To support the multiple events occurring during wound repair, macrophages polarize towards distinct phenotypes that are induced by environmental cues (Mosser & Edwards, 2008). In vitro exposure to interferon gamma (IFN- γ) and lipopolysaccharide (LPS) polarizes macrophages towards a classically activated M1 phenotype marked by the release of catabolic, pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and tumor necrosis factor- α (TNF- α)) (Mantovani et al., 2004). When stimulated by IL-4, IL-10 or IL-13, macrophages are polarized to an alternatively activated M2 phenotype. M2 macrophages release lower levels of pro-inflammatory factors, and secrete high levels of anti-inflammatory molecules (IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) and IL-10) (Mantovani et al., 2004). In a muscle repair model, elicited macrophages were found to progressively adopt an M1 to an M2 phenotype over time and (Brown, Londono, et al., 2012), depending on their activation state, they release a spectrum of soluble mediators that directly influence mesenchymal progenitor recruitment (Anton et al., 2012; Brown, Londono, et al., 2012; Lolmede et al., 2009), proliferation or differentiation (Fahy et al., 2014; Freytes, Kang, Marcos-Campos, & Vunjak-Novakovic, 2013; Guihard et al., 2012; Nicolaidou et al., 2012; Omar et al., 2011). Therefore, a promising approach for osteochondral repair would be to stimulate differentially activated macrophages to secrete anabolic factors that promote stem cell attraction to the defect and preserve joint health.

The purpose of this study was to investigate the effects of chitosan microparticles on differentially polarized macrophages. We hypothesized that biodegradable chitosan particles stimulate macrophages under different polarization states to release functional MSC chemotactic factors and more anabolic than catabolic factors. This study used an in vitro human U937 macrophage model exposed to Th1 or Th2 cytokines to reflect the different macrophage polarization states that may occur during the biomaterial clearance phase in vivo. The U937 cell line is widely used to study biomaterial-macrophage interactions (Matheson, Labow, & Santerre, 2002; McDade, Brennan-Pierce, Ariganello, Labow, & Michael Lee, 2013). A cell line is needed to address multivariate research questions that require far more cells than the number of post-mitotic macrophages obtained from peripheral blood isolates. A cell line also generates more reproducible biological responses, which improves the power and affordability of a study analyzing many biomarkers.

U937 cells were differentiated into adherent macrophages with phorbol myristate acetate (PMA), and further polarized to an M1 or M2a phenotype using IFN- γ /LPS or IL-4, respectively, in the presence or absence of chitosan microparticles. Following polarization and chitosan stimulation, cells were washed and cultured in low-serum medium to generate macrophage-conditioned medium (CM), which was analyzed for soluble mediators and the ability to attract primary human MSC. Given that chitosan was found to induce the expression of factors whose promoters are under the control of signal transduction activator of transcription (STAT) factors, we analyzed the effects of chitosan DDA and molecular weight on STAT activation and chemokine release. Confirmatory experiments were carried out in chitosan-stimulated primary human monocyte-derived macrophages (MDM).

4.3 Materials and methods

Reagents

RPMI 1640 (Catalog # 31800–089), Eagle's α -minimal essential medium (α -MEM; Catalog # 12000–014), CellTracker™ Green, Cell Mask™, Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgGs and Hoechst 33342 were purchased from Life Technologies (Burlington, ON, Canada). Lot-selected fetal bovine serum (FBS) was purchased from Atlanta Biologics (Atlanta, GA, USA). Recombinant human PDGF-BB, IL-4, IL-10, IFN- γ and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits for IL-1 β , interferon-inducible protein 10 (IP-10, CXCL10), MCP-1 and SDF-1 α (CXCL12) were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Bio-Plex multiplex bead assays were purchased from Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Mouse monoclonal isotype control (phycoerythrin (PE)-conjugated, clone MOPC-21) and antibodies for CD80 (PE-conjugated, clone L307.4), CD86 (unconjugated, clone FUN-1) and CD206 (unconjugated, clone 19.2) were purchased from BD Biosciences (Mississauga, ON, Canada). Rabbit polyclonal antibodies for phosphorylated STAT-1 (Tyr701), STAT-1, phosphorylated STAT-6 (Tyr641), STAT-6, β -actin and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit secondary antibodies were purchased from New England Biolabs (Cell Signaling Technologies, Pickering, ON, Canada). Isotype mouse IgG1 (Clone MOPC-1), green fluorescent latex beads (Product number L4655), LPS (from *Salmonella typhosa*) and all other chemicals were purchased from Sigma–Aldrich (Oakville, ON, Canada).

Chitosan solution preparation and microparticle formation

Medical-grade chitosans (<500 endotoxin units EU g⁻¹, protein content $<0.2\%$, heavy metals <5 ppm) were provided by BioSyntech (now Piramal Healthcare, Laval, QC, Canada), including 81.5% DDA, number-average molecular weight (M_n) = 132 kDa (80M) and 98% DDA, M_n = 128 Da (98M). An 81.9% DDA, M_n = 8.6 kDa (80–10K) chitosan was obtained through nitrous acid depolymerisation (Lavertu et al., 2006). 80M chitosan was labeled with rhodamine isothiocyanate (RITC) to 0.5% mol RITC per mol chitosan as previously described and lyophilized as a free base powder (Ma, L. M., Sun J., Nguyen S., Buschmann MD., Winnik F. and Hoemann CD, 2008). Chitosans were characterized for DDA, M_n and weight-average molecular weight (M_w) as previously described (Table 4.1) (Lavertu et al., 2003; Nguyen et al., 2009). Chitosans were solubilized at 5 mg ml⁻¹ in dilute HCl (resulting in 90% protonation) and 0.22 μ m filter-sterilized. The solutions were characterized for osmolality and pH, and stored as frozen aliquots at -80 °C until use (Table 4.1). During cell culture experiments, chitosan microparticles were formed by pipetting soluble chitosan below pH 6.0 into culture medium pH 7.2, forming particles with an average hydrodynamic radius of ~ 0.5 μ m (80M) to ~ 1.4 μ m (98M) (Hoemann, C. D. et al., 2013).

Table 4.1: Chitosan solutions used in this study.

Chitosan	DDA (%)	M_n (kDa)	M_w (kDa)	PDI	Characteristics
80M	81.5	132	268	2.02	pH = 4.3 Osm = 10 mOsm
98M	98.5	128	187	1.46	pH = 4.4 Osm = 12 mOsm
RITC-80M	80.6	144	187	1.30	0.5% mol RITC per mol chitosan pH = 5.6 Osm = 12 mOsm
80–10K	81.9	8.6	13.4	1.56	pH = 4.83 Osm = 12 mOsm

Cell culture

U937 cells (ATCC # CRL-1593.2) were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA) and maintained in RPMI 1640 supplemented with 10 mM HEPES, 25 mM glucose, 17 mM sodium bicarbonate, 1 mM sodium pyruvate and 10 vol.% FBS at 37 °C, 5% CO₂, according to previous protocols (Ariganello, Labow, & Lee, 2009; Matheson et al., 2002). All experiments involving human subjects were carried out with institutionally approved protocols. Primary human bone-

marrow-derived MSC were purchased from the Texas A&M Institute of Regenerative Medicine (Temple, TX, USA). MSC were obtained from iliac crest aspirates from healthy donors with informed consent ($n = 5$ (3 male, 2 female), 22–27 years old) and supplied in frozen vials at passage P2. P2 cells were characterized by the supplier as over 98% positive for multiple mesenchymal stem cell markers and less than 2% hematopoietic lineage markers using flow cytometry. MSC were used up to passage 4 and could commit to different mesenchymal lineages following 3 weeks' culture in osteogenic or adipogenic differentiation medium (Figure 4.10).

Macrophage differentiation, polarization, and chitosan stimulation to generate low-serum conditioned medium

Differentiated U937 macrophages (D-U937) were obtained by chemical differentiation with 100 nM PMA for 72 h in RPMI 1640 with 10% FBS in 12-well plates at a density of 5×10^5 cells cm^{-2} , as described previously (Matheson et al., 2002). D-U937s were manually resuspended and reseeded at a density of 5×10^5 cells cm^{-2} in 24-well plates in RPMI 1640 with 10% FBS and 100 nM PMA, or RPMI 1640 with 10% FBS, 100 nM PMA and 20 ng ml^{-1} IFN- γ (M1 cells only) for 18 h, then exposed to polarization factors with and without 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ chitosan microparticles for 24 h as shown in Table 4.2. More specifically, non-polarized control macrophages (M0) were maintained in RPMI 1640 with 10% FBS, 100 nM PMA with or without 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 80M chitosan or 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ latex beads. For M1 polarization, IFN- γ -primed cells were further stimulated for 24 h with 100 ng ml^{-1} LPS with and without 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 80M chitosan. For M2a macrophages, D-U937 cells were treated for 24 h with 20 ng ml^{-1} IL-4 with and without 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 80M chitosan. D-U937 were also stimulated with 10 ng ml^{-1} IL-10 for 24 h, with and without 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 80M chitosan. Following the treatments outlined above, cells were rinsed in serum-free RPMI and incubated in low-serum medium (RPMI 1640 with 0.5% FBS and 100 nM PMA) for 24 h to generate macrophage CM. Macrophage CM was centrifuged after each culture at 200 g for 10 min and stored at -80°C until use (Table 4.2).

Table 4.2: Study design, U937 differentiation, polarization and conditioned medium generation.

D-U937 state	Macrophage differentiation	Re-seed cells with PMA	Polarization with PMA and 10% FBS	Culture with PMA and 0.5% FBS (conditioned medium)
M0	PMA (72 h)	18 h	\pm 80M chitosan (24 h)	24 h
M0 + LB	PMA (72 h)	18 h	+Latex beads (24 h)	24 h
M1	PMA (72 h)	IFN- γ for 18 h	LPS \pm 80M chitosan (24 h)	24 h
M2a	PMA (72 h)	18 h	IL-4 \pm 80M chitosan (24 h)	24 h
M0 ^{IL-10}	PMA (72 h)	18 h	IL-10 \pm 80M chitosan (24 h)	24 h

Analysis of D-U937 conditioned medium for cytokines and chemokines

Macrophage CM was analyzed by Bio-Plex multiplex proteomic assay for IL-1ra, IL-6, MIP-1 β , IL-8 (CXCL8), IL-10, PDGF-BB, VEGF and bFGF or TNF- α using a human 8-Plex custom assay with calibrated standard curves, according to the manufacturer's instructions. Macrophage CM was also analyzed by sandwich ELISA using standard curves with recombinant protein for IL-1 β , SDF-1 α , MCP-1 and IP-10.

Analysis of macrophage cell surface markers by flow cytometry

M0, M1, M2a or M0 + IL-10 macrophages (5×10^5 cells previously stimulated or not with chitosan for 24 h) were incubated with either Fc blocking reagent (eBiosciences, San Diego, CA, USA) followed by mouse monoclonal PE-anti-CD80 ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$) or PE-IgG isotype, or bovine serum albumin (BSA) block followed by anti-CD86 ($2 \mu\text{g ml}^{-1}$), anti-CD206 ($2 \mu\text{g ml}^{-1}$) or IgG isotype control antibodies at 4 °C for 30 min. For CD86 and CD206 staining, cells were incubated with Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG at 4 °C for 30 min. Cells were analyzed using a MoFlo Cytometer (Cytomation, Denver, CO, USA). Results are presented as mean fluorescence intensity (MFI).

Cellular metabolic activity and analysis of cell viability

D-U937 metabolic activity following 24 h of exposure to 80M chitosan in RPMI 1640 with 10% FBS and 100 nM PMA was evaluated through reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to formazan. D-U937s were plated in 96-well plates at 50,000 cells well⁻¹ with increasing levels of 80M chitosan (0, 5, 50, 250 and 500 µg ml⁻¹) for 24 h and exposed to MTT (500 µg ml⁻¹) for 3 h at 37 °C. Formazan crystals were solubilized in 50 vol.% DMF/20 wt./vol.% SDS (Okamoto et al., 2002), and read at 550 nm (Tecan M200 Infinity plate reader, Tecan Systems, San Jose, CA, USA).

Leakage of cytosolic lactate dehydrogenase (LDH) into polarized U937 macrophage 24 h low-serum CM was quantified with a colorimetric assay (Cayman, Ann Arbor, MI, USA). A 100 µl volume of reagent was incubated with 100 µl of macrophage CM for 30 min at room temperature and the absorbance read at 490 nm against an LDH standard curve to determine LDH activity. Cytotoxicity is reported as the percentage of LDH leakage into CM = (LDH activity in low-serum CM)/(total LDH activity in the cell lysates and CM of M0 cells) × 100.

Live cell confocal microscopy of fluorescent chitosan microparticle and latex bead phagocytosis

D-U937 cells were cultured on tissue culture-treated plastic coverslips in medium with or without 50 µg ml⁻¹ RITC–chitosan particles for 24 h, then labeled with 0.4 µM CellTracker™ Green (live cell cytosol = green). Other cells were cultured with 50 µg ml⁻¹ green fluorescent latex beads for 24 h followed by Cell Mask™ (fluorescent plasma membrane stain). The medium was replaced with serum-free RPMI and live confocal imaging was performed as described previously (Guzman-Morales et al., 2011).

Human primary bone marrow MSC chemotaxis assays

MSC cell migration assays were carried out in Transwell polycarbonate membrane inserts (8 µm pore, Corning, Cambridge, MA, USA). Sub-confluent MSC that had been starved of serum overnight (α -MEM supplemented with 0.5% FBS) were collected using controlled dissociation conditions and resuspended in serum-free α -MEM as described previously (Thibault, M. M. et al.,

2007). Next, 50,000 cells were seeded in the upper chamber and allowed to migrate to the CM (600 μ l) for 4 h at 37 °C and 5% CO₂. Low-serum non-CM supplemented or not with 50 μ g ml⁻¹ 80M chitosan and serum-free RPMI served as negative controls and PDGF-BB (10 ng ml⁻¹) served as a positive control. At the end of the assays, filters were rinsed in phosphate-buffered saline (PBS) and fixed in 1 vol.% glutaraldehyde in PBS. Both migrated and unmigrated cell nuclei were stained with 1 μ g ml⁻¹ Hoechst 33342 in PBS. Unmigrated cells left in the upper chamber of the inserts were removed with a cotton tip. Images from six random microscope fields (770 μ m \times 1030 μ m) were taken and Hoechst-stained nuclei of migrated cells were counted using Image J (NIH, Bethesda, MD, USA). Results were averaged and expressed as total migrated cells for each migration chamber. Migration assays were performed using MSC from four separate human donors, with two or three distinct assays per donor ($n = 11$ for each test condition).

Western blot analyses of phosphorylation state of STAT-1 and STAT-6

D-U937 macrophages were stimulated with 50 μ g ml⁻¹ 80M chitosan, 98M chitosan or 80–10K chitosan for specific intervals between 15 min and 24 h. At the end of each stimulation period, cells were washed in cold PBS and lysed in the presence of protease inhibitors for 20 min on ice. Next, 50 μ g of protein was separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to PVDF membranes (Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were blocked for 1 h in 5% BSA in Tris-buffered saline with Tween-20 and probed overnight at 4 °C with primary antibodies. HRP-conjugated secondary antibodies were used for band detection using a chemiluminescent system (ECL-plus, GE Healthcare, Baie d'Urfe, QC, Canada). Band densitometry was carried out using Image J.

Human monocyte-derived macrophage cultures

Monocytes were isolated from peripheral whole blood of five healthy volunteers with informed consent and approved protocols, as described previously (Ariganello et al., 2011). Whole blood was layered over Ficoll Histopaque 1077 and centrifuged for 30 min at 800 g . Mononuclear cells from the buffy coat were collected and transferred to a separate tube. After washes in RPMI containing ethylenediaminetetraacetic acid and FBS, cells were seeded in 12-well plates at a concentration of 6×10^6 cells ml⁻¹. Cells were cultured for 14 days in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS, 0.68 mM l-glutamine, 100 units ml⁻¹ penicillin and 100 μ g ml⁻¹ streptomycin

(Ariganello et al., 2011). Culture medium was replaced 2, 24 and 48 h after initial seeding, then replaced every 2 days. On day 14, plastic-adherent MDMs were collected and seeded at 5×10^5 cells per well in 24-well plates. Two hours after seeding, the medium was replaced with fresh culture medium supplemented or not with 100 nM PMA and cells were incubated overnight. The next day, MDMs were stimulated with IFN- γ (20 ng ml⁻¹), IL-4 (20 ng ml⁻¹) or 80M chitosan (5 or 50 μ g ml⁻¹) in the presence or absence of 100 nM PMA for 24 h. MDM medium was collected and analyzed for IL-1ra, IL-1 β and IP-10 by ELISA. Cell lysates were collected and analyzed for STAT-1 phosphorylation.

Statistical analysis

Data are shown as the mean \pm standard deviation. Statistical analyses were performed using Statistica (Statsoft, Tulsa, OK, USA). The General Linear Model (GLM) with Fisher's Least Significant Difference (LSD) post hoc analysis was used to determine differences in cytokine/chemokine release, MSC migration, LDH leakage, metabolic activity and STAT-1 band density, upon treatment with polarization factors, 80M chitosan, 98M chitosan, latex beads or PDGF, using treatment condition as a between-factor categorical predictor. Factorial analysis of the variance of the mean with Fisher's LSD post hoc analysis was also used to determine the effect of polarization state and chitosan on the ability of macrophage CM to attract MSC, using polarization condition (non-CM, M0, M1, M2a, M0^{IL-10}) and chitosan (yes/no) as categorical predictors. Significance was set at $p < 0.05$.

4.4 Results

D-U937 macrophages phagocytose chitosan particles and maintain viability in low-serum medium

D-U937 macrophages readily internalized 80M chitosan particles and latex beads during 24 h of culture in high-serum medium (Figure 4.2A–C). Treatment of D-U937 for 24 h with chitosan particles over a range of concentrations in high-serum medium had no specific effect on cell metabolism compared to control D-U937 cells (Figure 4.2D). After rinsing away chitosan and polarization factors, chitosan-treated and M1 macrophages showed a ~12% increase in LDH leakage to low-serum conditioned medium relative to M0 macrophages (Figure 4.2E). These data

revealed a slight cytotoxicity of the chitosan and M1 polarization conditions, and demonstrated that over 80% of the cells remained viable in all conditions after 24 h of culture in low-serum medium collected for proteomics and MSC migration assays.

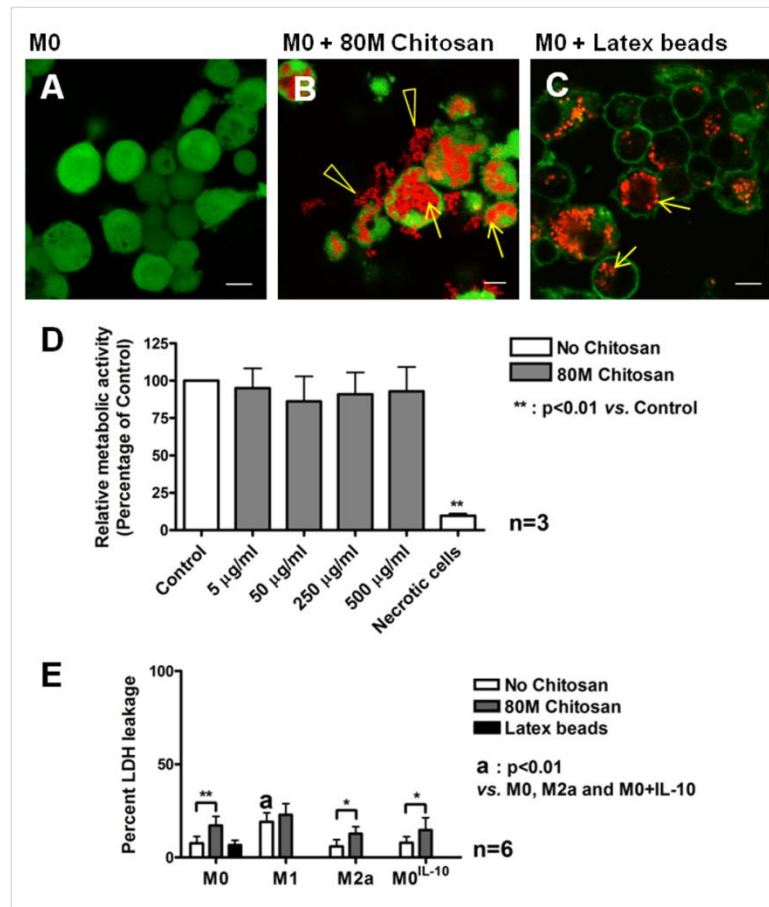


Figure 4.2: Macrophage interaction with latex beads or RITC-labeled chitosan particles observed by 2-D confocal microscopy images through the cell body, and by cell metabolism/necrosis assays. (A) D-U937 macrophage cytosol was stained with CellTracker™ (green). (B) D-U937 macrophage phagocytosis of RITC-labeled chitosan (red) after 24 h exposure at 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and cell cytosol staining with CellTracker™ (green). Open arrowheads show extracellular chitosan particles, arrows show internalized chitosan particles. (C) D-U937 macrophage phagocytosis of fluorescent latex beads (pseudo-red colored, yellow arrows) after 24 h exposure at 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and plasma membrane stained with red CellMask™ (pseudo-green colored). (D) Cellular metabolic activity in M0 macrophages stimulated with increasing doses (5–500 $\mu\text{g ml}^{-1}$) of chitosan for 24 h with 10%

serum measured through reduction of MTT. (E) LDH leakage from polarized macrophages cultured in low-serum medium after treatment or not with chitosan ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$). (A–C) Scale bar = $10 \mu\text{m}$. Data shown as mean \pm SD. Brackets show statistically significant differences between chitosan-treated cells and matching controls. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Polarized macrophages treated with chitosan release specific soluble mediators

According to the profile of soluble factors present in CM, D-U937 cells were successfully polarized to M1 and M2a phenotypes, while the M2c-inducing factor IL-10 (at 10 ng ml^{-1}) showed no changes in CM compared to M0, and is referred to henceforward as $\text{M0}^{\text{IL-10}}$. M0 and $\text{M0}^{\text{IL-10}}$ macrophages secreted high levels of MCP-1, VEGF and IL-8 ($6\text{--}20 \text{ ng ml}^{-1}$), moderate levels of IL-1ra, MIP-1 β and TNF- α ($\leq 1 \text{ ng ml}^{-1}$) and low levels of other factors tested (IP-10, IL-6, IL-10, PDGF-BB, $<0.05 \text{ ng ml}^{-1}$; Figure 4.3). SDF-1 α and bFGF were not detected in D-U937 macrophage CM (Figure 4.3L and data not shown). The principle effect of 80M chitosan on M0 macrophages was a small increase in IL-1 β and IL-6 (Figure 4.3A and C), an even higher release of IL-1ra (Figure 4.3G) and a dramatic increase in the release of chemokines (IP-10, MIP-1 β , MCP-1; Figure 4.3).

M1 macrophage CM contained higher levels of pro-inflammatory factors (IL-1 β , IL-6, IL-8, IP-10, MIP-1 β ; Figure 4.3A–E) and lower levels of VEGF and MCP-1 compared to CM from M0, M2a and $\text{M0}^{\text{IL-10}}$ (Figure 4.3J and K). M1 macrophages released more TNF- α than M2a cells, but less than M0 cells (Figure 4.3F). In M1 macrophages, 80M chitosan stimulated IL-1 β release without enhancing or suppressing other pro-inflammatory factors (Figure 4.3A).

M2a macrophages released the highest levels of anti-inflammatory factors, showing a 2- to 4-fold increase in IL-1ra and IL-10 over M0 macrophages, and a slight increase in low-level PDGF-BB (Figure 4.3G–I). The dominant effect of chitosan on M2a cells was a 1.5- to 4-fold increase in the release of anti-inflammatory factors IL-1ra, IL-10 and PDGF-BB (Figure 4.3G–I) and MIP-1 β (Figure 4.3E), and a low-level increase in IP-10 and TNF- α (Figure 4.3B and F) without inducing IL-1 β (Figure 4.3A). IL-8 and VEGF were not altered by chitosan stimulation. Phagocytosis of latex beads failed to stimulate the release of those factors up-regulated by chitosan (Figure 4.3). Altogether, these data showed that 80M chitosan specifically stimulated a net anabolic factor

response from M0 and M2a U937 macrophages, and enhanced inflammatory cytokine IL-1 β release from M1 cells.

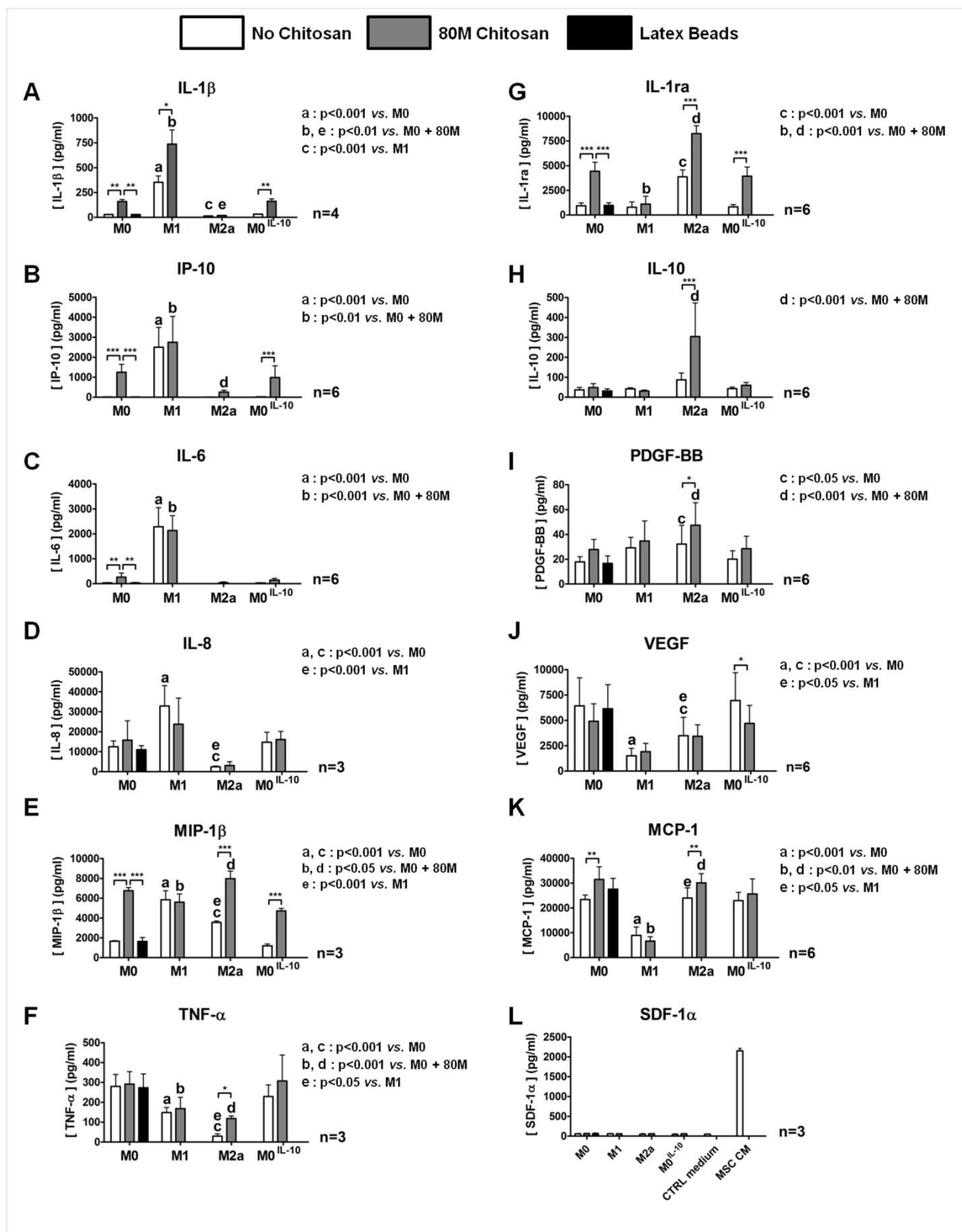


Figure 4.3: Release of pro- and anti-inflammatory cytokines and chemokines by differentially polarized D-U937 macrophages without (white bars) or with 80M chitosan particles stimulation (grey bars). The phagocytosis control was M0 macrophages stimulated with latex beads (black bar). M1-polarized macrophages secreted higher levels of (A) IL-1 β , (B) IP-10, (C) IL-6, (D) IL-8, (E) MIP-1 β and (F) TNF- α than M2a macrophages. M2a macrophages released higher average levels of (G) IL-1ra and (I) PDGF-BB compared to M0 and M1 cells. Chitosan induced cells to release (A) IL-1 β , anti-inflammatory factors (G) IL-1ra and (H) IL-10, and chemokines (B) IP-10, (E) MIP-1 β and (K) MCP-1. (L) SDF-1 α was secreted by human MSC but not D-U937 cells. Data shown as mean \pm SD, for $n = 3$ to $n = 6$ independent cultures, as indicated. Brackets show statistically significant differences between chitosan-treated cells and matching controls. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Expression of cell surface markers in polarized macrophage by flow cytometry

CD86, a suggested marker for M1 polarization (Fahy et al., 2014; Fearing & Van Dyke, 2014), was up-regulated on the surface of live U937 cells under M1 and M2a polarization conditions relative to M0 macrophages (Figure 4.4A and B). Chitosan had no effect on CD86 surface expression levels in U937 cells. CD80, another traditional marker of M1 polarization in primary macrophages (Ambarus et al., 2012), was not detected on the surface of D-U937 macrophages under any condition (Figure 4.4C), although surface CD80 epitope was readily detected in positive control Raji cells (Figure 4.4D). CD206, the mannose receptor and accepted marker of alternative activation (Ambarus et al., 2012; Martinez et al., 2006), was enhanced by IL-4 stimulation of human primary MDMs (Figure 4.4F), but not detected at the surface of D-U937 macrophages or IL-4-treated U937 cells (Figure 4.4E). These data suggested that several markers frequently used to discriminate M1, M2a and M0 primary macrophage populations in vitro are either not expressed on the U937 cell surface or not regulated the same way.

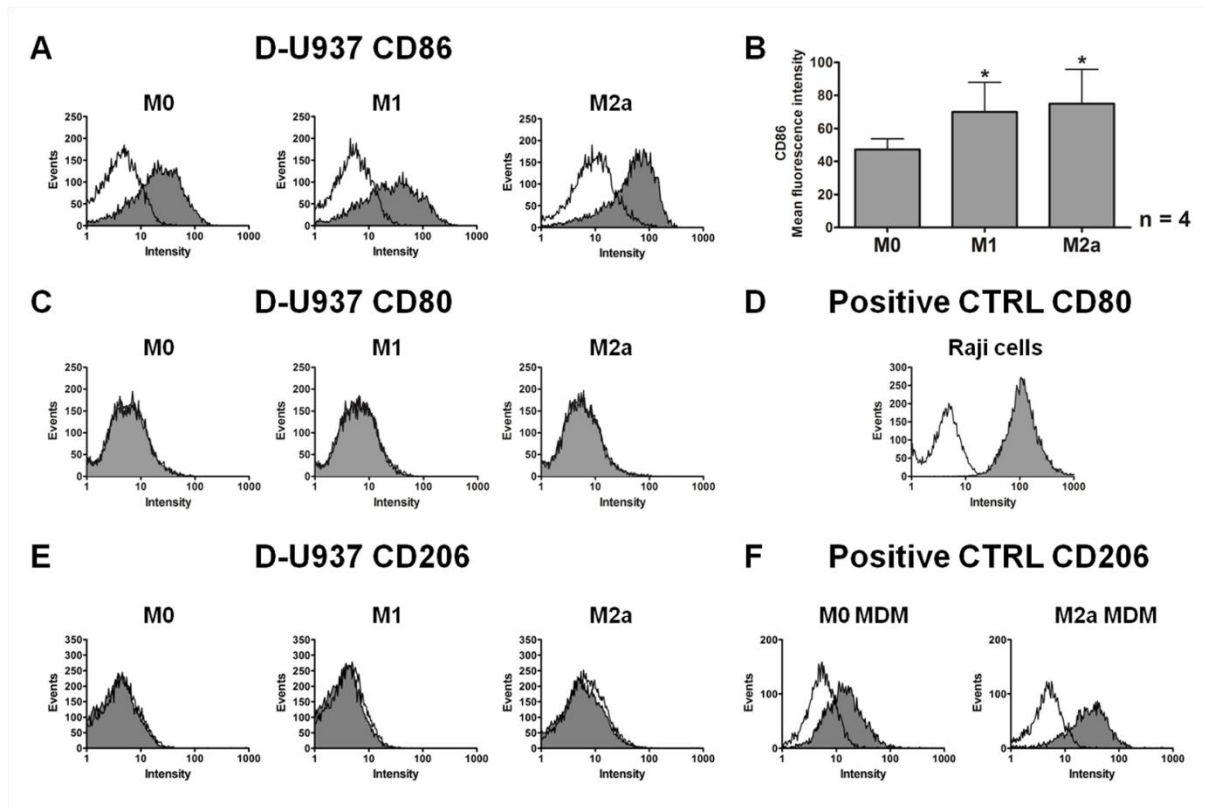


Figure 4.4: Cell surface analysis of CD86, CD80 and CD206 in polarized D-U937 macrophages. Representative histograms from M0, M1 and M2a D-U937 macrophages (no chitosan) stained with (A) anti-CD86, (C) anti-CD80 or (E) anti-CD206. (B) Mean fluorescence intensity from CD86 + cells in polarized D-U937 macrophages. Representative histograms from (D) Raji cells stained with anti-CD80 and (F) primary MDMs unstimulated or stimulated with 20 ng ml⁻¹ IL-4 for 2 days and stained with anti-CD206. Shaded histograms show cells stained with respective primary antibodies whereas clear histograms show cells stained with isotype control. Data shown as mean \pm SD. * $p < 0.05$ vs. M0.

Effect of chitosan and macrophage polarization state on human MSC migration to macrophage-CM

An equal starting number of 50,000 MSC was used to test the chemotactic activity of macrophage CM (top panels, Figure 4.5A). After 4 h of chemotaxis, an average 4700 MSC migrated to the baseline negative controls, non-CM containing 0.5% serum and 100 nM PMA (with or without chitosan). 80M chitosan had no influence on MSC migration to non-CM (Figure 4.5B). As expected, fewer MSC migrated to serum-free medium – on average, 2800 MSC ($p < 0.05$ vs. non-

CM; Figure 4.5B). The positive control PDGF-BB was the most potent MSC chemoattractant, with 2.5-fold higher cell migration vs. non-CM ($p < 0.001$; Figure 4.5).

Macrophage polarization state had a highly significant influence on MSC migration. M0, M2a and M0^{IL-10} macrophage CM, with and without 80M chitosan stimulation, reproducibly attracted ~1.7-fold more MSC than non-CM with and without chitosan ($p < 0.001$; Figure 4.5B). By contrast, MSC migration to M1 macrophage CM, with or without chitosan, was significantly depressed relative to all other macrophage-CM, with or without chitosan ($p < 0.001$; Figure 4.5B). M1 CM without chitosan elicited fewer MSC than the non-CM ($p < 0.05$; Figure 4.5B). Depressed MSC migration to M1 CM was not explained by cytotoxic effects of M1 medium on MSC, as MSC metabolic activity was similarly maintained during 24 h of exposure to macrophage CM in all polarization states (Figure 4.11).

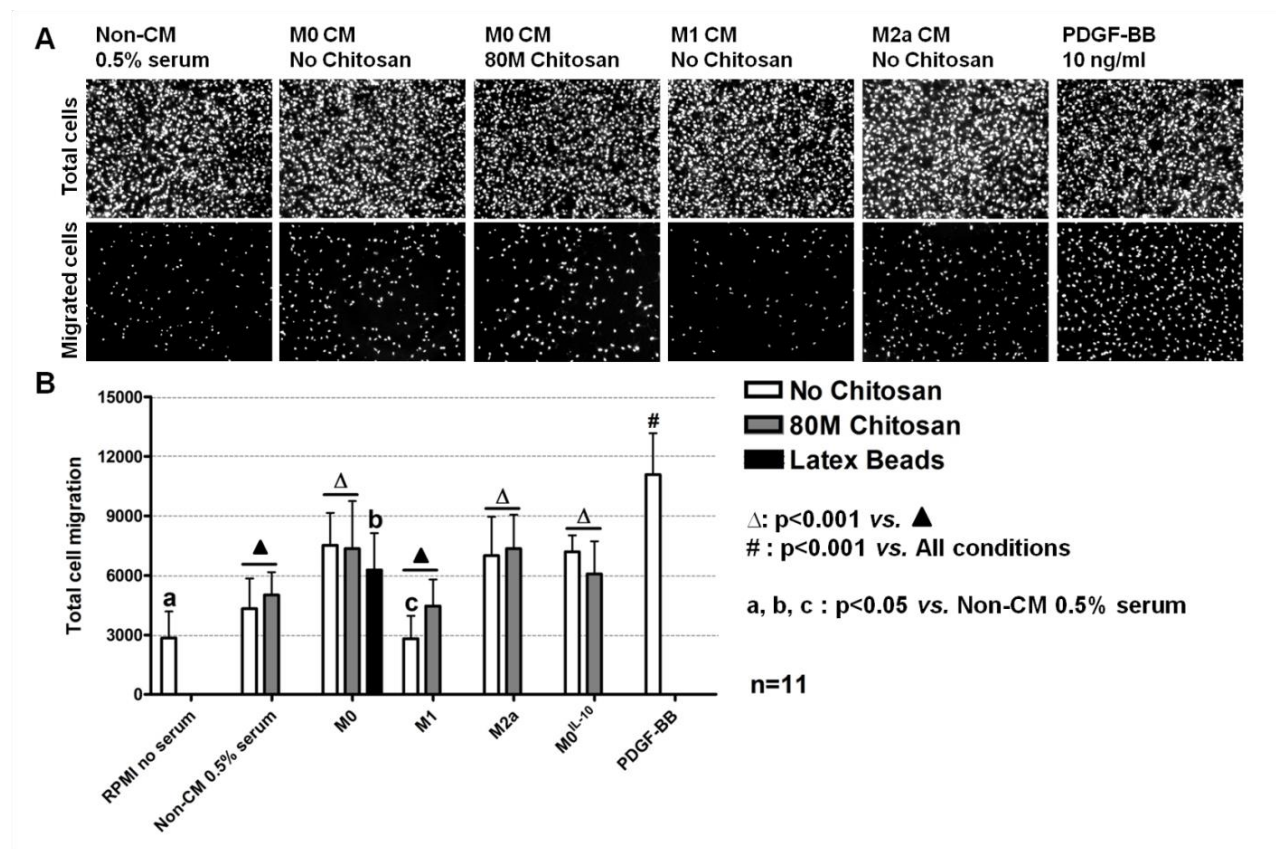


Figure 4.5: Human MSC migration to low-serum D-U937 macrophage-CM in different polarization states with and without 80M chitosan stimulation. (A) Representative images of Transwell migration assays at 4 h post-migration. The top panels show both unmigrated and

migrated Hoechst-stained cell nuclei. The bottom panels show migrated cell nuclei. (B) Average cell migration to different test media, as indicated after 4 h in vitro ($n = 11$ from four different MSC donors migrated to CM generated on two or three different occasions). Data shown as mean \pm SD. Horizontal lines (empty triangle) indicate statistical differences between M0, M2a and M0IL-10 CM (± 80 M chitosan) vs. non-CM 0.5% serum (black triangle) or vs. M1 CM (± 80 M chitosan) (black triangle). Symbols (#, a, b and c) indicate significant differences between individual test conditions.

Chitosan induces delayed STAT-1 activation and IP-10 release through DDA-dependent pathways

At relatively low dosages (5 and 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$), 80M chitosan stimulated D-U937 macrophages to release high levels of both IP-10 and IL-1ra (Figure 4.3 and 4.12). Interestingly, both IP-10 and IL-1ra are factors under the transcriptional control of the JAK/STAT pathway; IP-10 expression can be induced by the IFN- γ /STAT-1 axis, and IL-1ra expression can be driven by the IL-4/STAT-6 axis (Ohmori, Smith, & Hamilton, 1996; Ramana et al., 2002). Therefore, we tested the hypothesis that chitosan induces the phosphorylation of STAT-1 and STAT-6 in D-U937 macrophages. A time-frame from 15 min to 24 h post-chitosan stimulation was assayed to cover the potential response to phagocytosis and induction of autocrine factors. IFN- γ induced strong acute phosphorylation of STAT-1 while IL-4 induced strong acute STAT-6 phosphorylation, and these factors remained phosphorylated up to 24 h (Figure 4.6). Delayed STAT-1 phosphorylation by 80M chitosan was observed at 24 h post-stimulation (Figure 4.6A). No phosphorylated forms of STAT-6 were detected in chitosan-treated macrophages at any time point (Figure 4.6B).

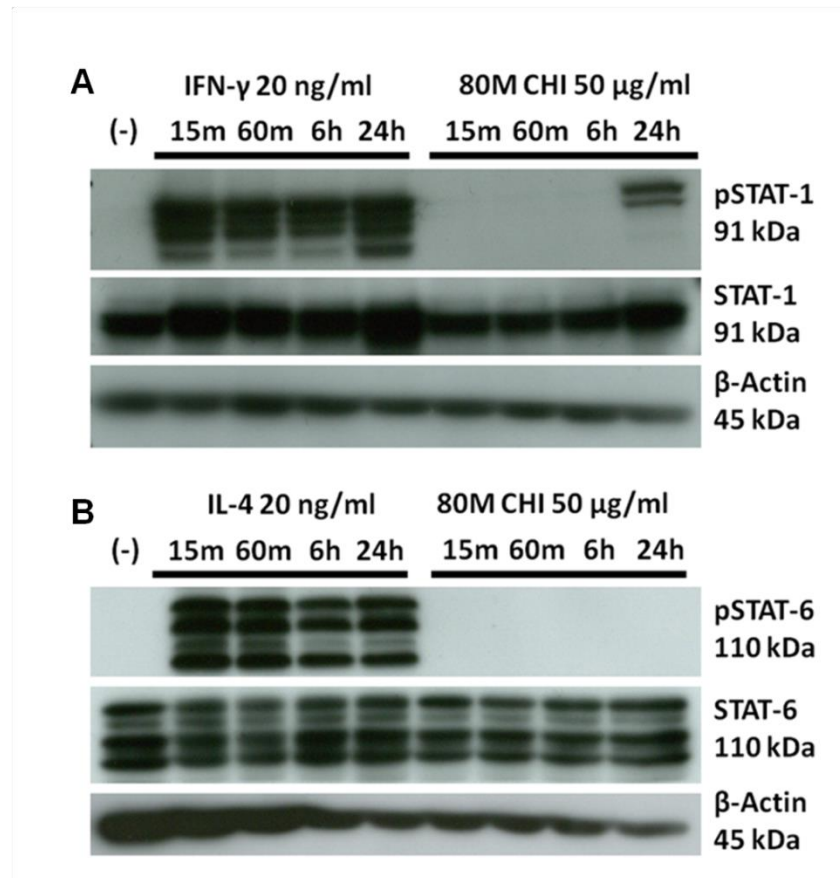


Figure 4.6: Effect of chitosan particles on phosphorylation of (A) STAT-1 and (B) STAT-6 in D-U937. Cells were stimulated with 80M chitosan particles for different time intervals (15 and 60 min, 6 and 24 h). Cell extracts were analyzed for phosphorylation of STAT-1 and STAT-6 by Western blot using antibodies that recognize non-phosphorylated and phosphorylated forms of the proteins (pSTAT-1 and pSTAT-6). IFN- γ and IL-4 were used as positive controls for STAT-1 and STAT-6 phosphorylation, respectively. Data are representative of four independent experiments.

To test the role of chitosan acetylation level in the STAT-1 and IP-10 response, D-U937 were stimulated with 50 μ g ml⁻¹ chitosans at 80% DDA (80M, 130 kDa) vs. 98% DDA (98M, 130 kDa) and the response was analyzed over time. 80M chitosan induced STAT-1 phosphorylation starting at 10 h for up to 24 h (Figure 4.7A), while 98M chitosan induced only weak levels of STAT-1 phosphorylation after 24 h. At 24 h post-stimulation, 80M, but not 98M chitosan-treated macrophages showed an 80-fold increase in IP-10 release into medium compared to unstimulated cultures (Figure 4.7B). The failure of 98M chitosan to induce STAT-1/IP-10 was not due to cytotoxicity, because the same minor LDH leakage was seen from M0 cells treated by 98M and

80M chitosan (Figure 4.7C). Ultralow molecular weight chitosan (80% DDA, 10 kDa: 80–10K) and higher molecular weight chitosan (80M) induced the same delayed STAT-1 phosphorylation 10 h post-stimulation, and similar kinetics of IP-10 release at 24 h (Figure 4.8A and B), compared to IFN- γ -induced STAT-1 phosphorylation at 15 min and IP-10 secretion at 10 h (Figure 4.8C).

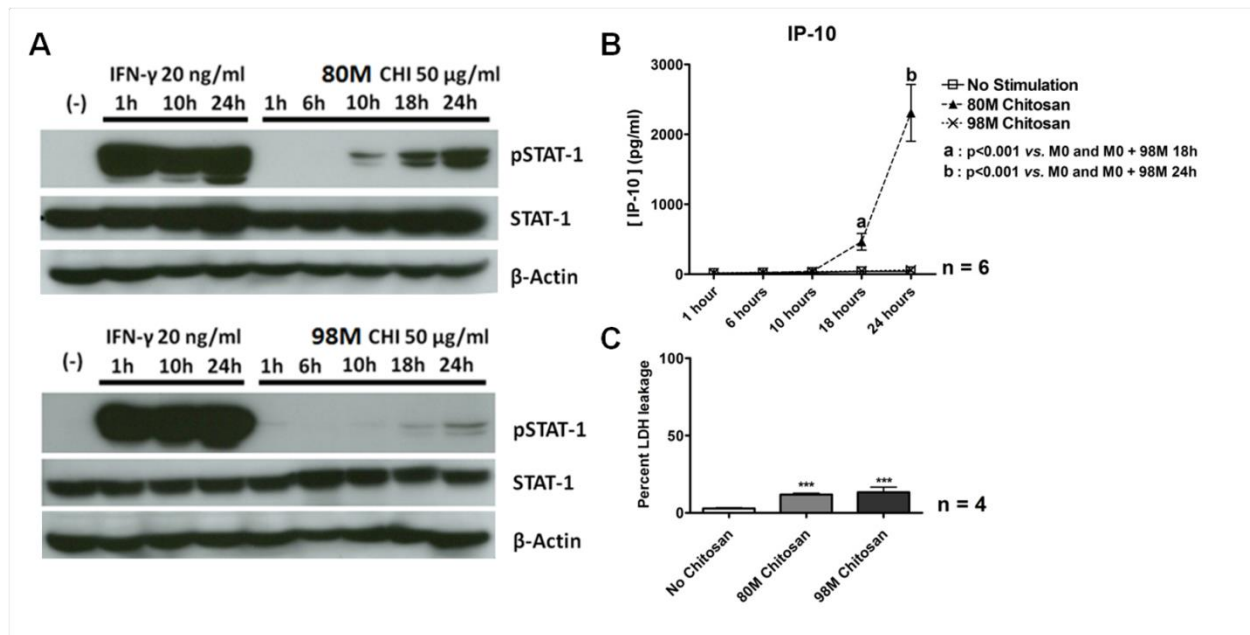


Figure 4.7: Chitosan GlcNAc content is critical for STAT-1 activation and IP-10 release without influencing cytocompatibility. (A) Cell lysates from 81.5% DDA (80M) or 98% DDA (98M) chitosan-stimulated cells were analyzed for STAT-1 phosphorylation. (B) Time course of IP-10 release by D-U937 macrophages stimulated with 80M or 98M chitosan evaluated by ELISA. IFN- γ served as a positive control for STAT-1 activation. (C) Release of LDH in M0 D-U937 supernatants treated or not with 80M or 98M chitosan (50 μ g ml⁻¹). *** $p < 0.001$, 80M or 98M chitosan vs. no chitosan. Data shown as mean \pm SD.

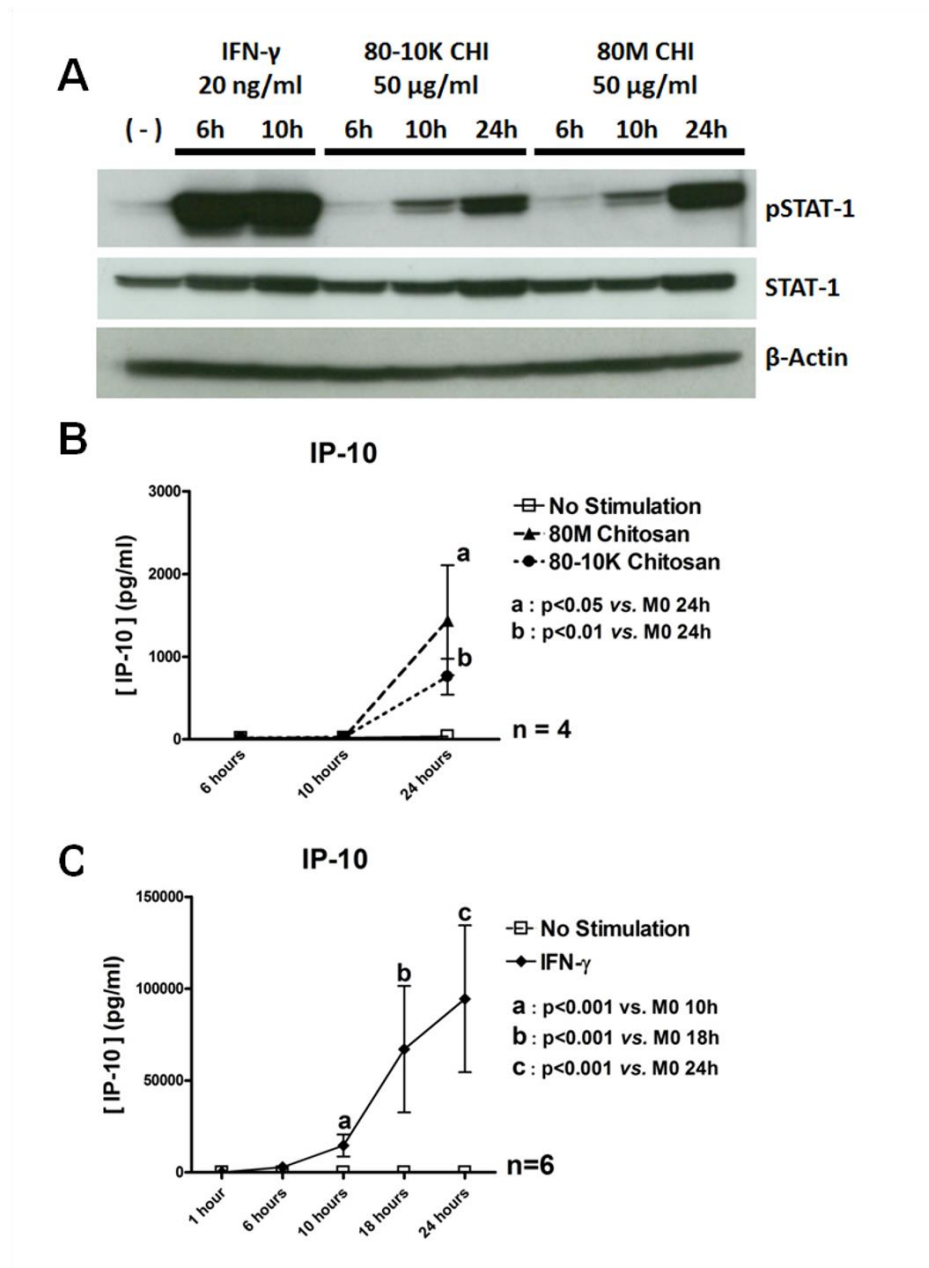


Figure 4.8: Small molecular weight 80% DDA chitosan fragments induce the same delayed activation of STAT-1 and IP-10 release in D-U937 macrophages as 130 kDa 80% DDA chitosan. (A) Cell lysates from D-U937 stimulated with IFN- γ or chitosans with high (80M) or low (80–10K) molecular weight for 6, 10 and 24 h were analyzed for STAT-1 phosphorylation. Time course of IP-10 release by macrophages stimulated with (B) 80M, 80–10K and (C) IFN- γ stimulated macrophages evaluated by ELISA. Data shown as mean \pm SD.

Chitosan-mediated IP-10, IL-1 β , and IL-1ra responses in primary human macrophages are influenced by PMA priming

Release of IL-1ra and IP-10 are beneficial anabolic D-U937 responses to 80M chitosan. Therefore, the ability of 80M chitosan to elicit these responses in primary MDM cells was investigated. MDMs from five distinct donors secreted variable basal levels of IL-1ra (min–max: 0.49–7.2 ng ml⁻¹) and IP-10 (min–max: 0.03–0.17 ng ml⁻¹), and trace levels of IL-1 β (\leq 0.003 ng ml⁻¹). MDM showed enhanced IL-1ra release after IL-4 stimulation (3-fold increase) and 80M chitosan stimulation (1.4-fold increase, $p < 0.05$ vs. unstimulated control; Figure 4.9A), without changes in IL-1 β release (Figure 4.9B). IFN- γ activated STAT-1 and enhanced IP-10 release by 2-fold; however, MDM cultures stimulated with 80M chitosan showed no increased STAT-1 activation or IP-10 release (Figure 4.9C–E).

Because D-U937 cultures contained PMA, which has been shown to activate macrophages through protein kinase C (PKC) (McNally, Macewan, & Anderson, 2008), we also analyzed the response of MDM to PMA priming and 80M chitosan particles. PMA priming alone enhanced IL-1ra release by 2-fold relative to untreated MDM cultures ($p < 0.05$; Figure 4.9A), with insignificant increases in STAT-1 phosphorylation, IL-1 β and IP-10 release (Figure 4.9B–E). 80M chitosan enhanced IL-1ra release 1.5-fold in PMA-primed MDMs ($p < 0.05$ vs. MDM + PMA; Figure 4.9A) and 2.6-fold relative to MDM without PMA ($p < 0.05$, vs. MDM; Figure 4.9A). In PMA-primed MDMs, chitosan stimulated an average 1.7-fold increase in IL-1 β release compared to MDMs treated with PMA-only, with high variation due to much higher IL-1 β secretion by one donor following chitosan stimulation (15-fold increase), resulting in non-significant differences between chitosan-stimulated and control PMA-primed cells (Figure 4.9B). In the presence of PMA, chitosan stimulation enhanced STAT-1 phosphorylation in four out of five donors (Figure 4.9C and D), with a minor average increase in IP-10 release compared to cells treated with PMA-only ($p = 0.074$; Figure 4.9E). Therefore, chitosan-mediated STAT-1 activation and IP-10 release in primary macrophages depend on PMA priming and show donor-to-donor variation in the amplitude of the response.

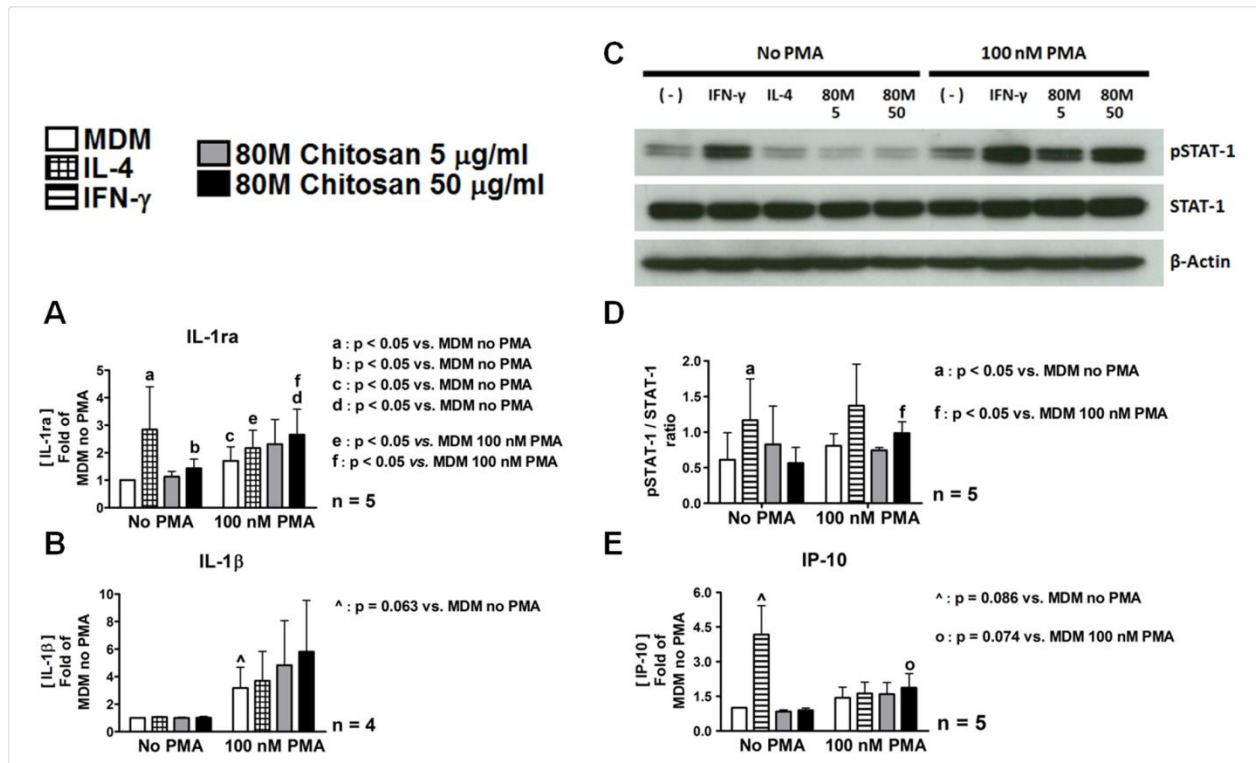


Figure 4.9: Effect of chitosan and PMA priming on primary MDM release of IL-1ra, IL-1 β , IP-10 and STAT-1 phosphorylation. Relative fold-increase compared to MDM (no PMA or chitosan), of (A) IL-1ra, (B) IL-1 β by primary MDM stimulated for 24 h with 80M chitosan with and without PMA priming, as evaluated by ELISA, with IFN- γ and IL-4 as positive controls. (C) Cell extracts from macrophages stimulated for 24 h with 80M chitosan were analyzed for STAT-1 phosphorylation. (D) Densitometric analysis of the ratio between phosphorylated and non-phosphorylated STAT-1. (E) IP-10 release after 24 h of MDM stimulation by chitosan. Data shown as mean \pm SD.

4.5 Discussion

To our knowledge, this study is the first to characterize the response of differentially polarized macrophages to chitosan microparticles at the molecular level *in vitro*. 80M chitosan selectively stimulated the release of factors according to the macrophage polarization state. The data confirmed the hypothesis that biodegradable chitosan particles stimulate the release of more chemokines and anti-inflammatory factors from M0 and M2a macrophages, but do not elicit these anabolic responses in M1 macrophages. Our data do not support the hypothesis that chitosan induces more

functional MSC chemotactic factor release from M0 and M2a macrophages; instead, our study shows that these cells already have an inherent capacity to attract bone-marrow-derived MSC. These results are consistent with previous studies showing that CM from M0 and M2 macrophages can attract mesenchymal progenitors from muscle and blood vessels (Brown, Londono, et al., 2012; Lolmede et al., 2009), whereas M1 macrophages polarized with IFN- γ and LPS suppress migration (Brown, Londono, et al., 2012). More importantly, our data provide new evidence explaining how biodegradable chitosan microparticles can be used to improve wound repair by recruiting more macrophages, which generate a more anabolic microenvironment for attracted MSC.

This study used a U937 model, which permitted evaluation of macrophage responses to chitosan under a variety of conditions. Successful D-U937 polarization was mainly assessed by the profile of soluble factors released. The higher levels of IL-1 β , IL-6, IL-8 and IP-10 – molecules associated with an M1 phenotype (Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2006) – in the M1 CM compared to the M0 and M2a CM confirm that U937 macrophages became activated to an M1 phenotype following IFN- γ /LPS stimulation. The M2a CM contained the highest levels of anti-inflammatory factors IL-1ra and IL-10, which is indicative of M2a polarization by IL-4 stimulation (Mantovani et al., 2004). However, we had no evidence that IL-10 stimulation at the dose used in this study led to M2c polarization. Our data indicate that D-U937 macrophages were differentially activated to release cytokines representative of M1 and M2a but not M2c phenotypes.

One limitation of the U937 model is that the cytokine release profiles of the macrophage populations could not be correlated with the analysis of cell surface markers. CD86 has been suggested as a marker for M1 polarization, but this is under debate (Fahy et al., 2014; Fearing & Van Dyke, 2014; Mantovani et al., 2004). CD86 was up-regulated in both M1 and M2a D-U937s, and this corroborates previous findings suggesting it is not specific of M1 polarization (Ambarus et al., 2012). CD80 and CD206, respectively markers for M1 and M2 polarization (Ambarus et al., 2012), were not detected on the surface of D-U937s. CCR7 and CD163, other recognized markers for macrophage polarization (Ambarus et al., 2012; Martinez et al., 2006), are not expressed in U937 cells either (Buechler et al., 2000; Ott et al., 2005). Therefore, we could not analyze the potential effect of chitosan on macrophage polarization surface marker profiles in U937 cells, as others have done previously with primary human and mouse macrophage models (Oliveira et al., 2012; Vasconcelos et al., 2013).

The data from this study show that biodegradable chitosan particles can influence the microenvironment created by M0 and M2a macrophages by potentiating the release of mainly chemokines and anabolic factors. 80M chitosan did increase IL-1 β release by M0 macrophages, but it also stimulated a 25- to 400-fold greater release of IL-1ra over IL-1 β in M0 and M2a macrophages and further potentiated IL-10 release by M2a cells. This net anabolic effect was not observed in M1 macrophages, where chitosan did not suppress the release of pro-inflammatory factors induced by IFN- γ /LPS. Solely in M1 cells, chitosan stimulation induced a more catabolic response reflected by an increased release in IL-1 β without any increases in IL-1ra. Interestingly, Bueter et al. reported that chitosan particles stimulate murine macrophages to release IL-1 β , but only to high levels when primed by M1 activation signals (LPS) (Bueter et al., 2011; Bueter et al., 2014); chitosan-induced IL-1 β release in the presence of LPS was dose dependent and linked to smaller chitosan particles (Bueter et al., 2011). Macrophage responses to chitosan are clearly different in the presence of endotoxins and sensitive to how readily the material can be phagocytosed. Altogether, these data suggest that the macrophage polarization state directly dictates whether chitosan drives a more pro- or anti-inflammatory response.

Although others have reported that biomaterial surfaces can promote macrophages to release IL-1ra (Schutte, Parisi-Amon, & Reichert, 2009), this study demonstrates that chitosan particles can induce this response. The failure of 80M chitosan to activate STAT-6 indicates that chitosan induces IL-1ra through mechanisms independent of the IL-4/STAT-6 axis. Consistent with previous work (Daley, Brancato, Thomay, Reichner, & Albina, 2010), this indicates that IL-4 promotes, but is not necessary to elicit, pro-wound healing responses in macrophages. Further, in primary human MDMs, 80M chitosan reproducibly enhanced IL-1ra release without increasing IL-1 β secretion, suggesting that chitosan likely stimulates IL-1ra independently of IL-1 β paracrine signaling.

This work reports the novel finding that biodegradable chitosan induces a delayed STAT-1 activation and IP-10 release in human U937 macrophages. The delayed kinetics suggests that the response is mediated either by chitosan digestion or a chitosan-induced paracrine mediator. Because low molecular weight chitosan and 80M chitosan stimulated the same delayed STAT-1 activation kinetics in D-U937 cells, our data suggest that chitosan most probably activates STAT-1 in a paracrine/autocrine manner. Both biodegradable 80% DDA chitosans (10 and 130 kDa)

induced greater STAT-1 activation and IP-10 release than non-biodegradable, 98% DDA chitosan, indicating that this signaling pathway in macrophages is sensitive to chitosan polymeric GlcNA content.

STAT-1 activation and IP-10 release induced by 80M chitosan were confirmed in primary MDMs, but were donor-specific and required the presence of PMA, a chemical activator of PKC signaling. PKC is activated by multiple agonists, including physiological macrophage differentiation agents (i.e. macrophage colony stimulating factor (CSF) and granulocyte macrophage CSF) (Hamilton, 1997), and mediates multiple macrophage functions, including phagocytosis, differentiation and formation of foreign body giant multinucleated cells (McNally et al., 2008; Wang et al., 1997). Our data suggest that, in macrophages, chitosan-mediated STAT-1 activation and IP-10 release depend on physiological PKC agonists that are yet to be identified. It is unclear why chitosan and IFN- γ elicited a much attenuated IP-10 response in PMA-treated primary MDMs compared to D-U937 macrophages (Figure 4.8B and C vs. Figure 4.9E). Either U937 macrophages are more responsive than primary MDMs to factors that induce STAT-1, and hence produce more IP-10 in response to these stimuli, or MDMs constitutively express higher levels of factors that attenuate IP-10 expression, e.g. IL-10 (Tebo, Kim, Gao, Armstrong, & Hamilton, 1998).

In chitosan-treated osteochondral defects, macrophages are highly attracted to the granulation tissue and are thought to play beneficial roles during clearance of the biomaterial (Hoemann, C. D. et al., 2010). Although the ability of M1 macrophages to elicit stem cells is currently under debate (Brown, Londono, et al., 2012; Lolmede et al., 2009), our data show that, with or without chitosan stimulation, macrophages secrete functional chemotactic factors for bone-marrow-derived MSC under M0 and M2a but not M1 polarization states. Chitosan stimulated M0 macrophages to release higher levels of MCP-1 and IP-10, factors previously reported to induce bone-marrow-derived MSC chemotaxis in vitro (Anton et al., 2012; Kalwitz et al., 2010), but did not increase net MSC chemotaxis. The M0 and M2a CM contained abundant levels of MCP-1 (above 20 ng ml⁻¹), which exceeds the reported dose upon which purified MCP-1 induces MSC chemotaxis (5 ng ml⁻¹) (Anton et al., 2012). At these relatively high levels, it is possible that MCP-1 already elicits its maximal chemotactic effect on MSC, rendering further release of this cytokine to have no supplemental effects on migration.

M1 macrophage CM inhibited MSC migration relative to non-CM, indicating that either these cells do not release chemotactic factors or they release factors that inhibit cell chemotaxis. Paradoxically, M1 CM contained the highest levels of IL-8 and IP-10, which in purified form stimulate MSC migration in vitro (Anton et al., 2012; Kalwitz et al., 2010; Ringe et al., 2007). MCP-1 was the only soluble factor investigated in this study that correlated approximately with the differential cell migration in the different conditions. However, M1 CM contained relatively high MCP-1 levels ($>8 \text{ ng ml}^{-1}$). Thus, the reduced MCP-1 alone is unlikely to account for the depressed MSC migration towards M1 macrophage CM. Altogether, the current results lead us to hypothesize that IFN- γ and LPS induce M1 macrophages to release factors that inhibit MSC recruitment. Inflammatory macrophages undeniably have important roles in fracture healing and MSC osteogenic differentiation (Alexander et al., 2011; Guihard et al., 2012; Omar et al., 2011). However, our data indicate that persisting M1 cells within osteochondral defects would impair MSC attraction and, despite their cellular plasticity (Mosser & Edwards, 2008), chitosan stimulation alone is not sufficient to skew the behavior of M1 macrophages into releasing functional MSC chemotactic factors. These data indicate that successful chitosan-mediated strategies to increase MSC attraction to healing osteochondral defects would depend on an increased attraction of M0 and M2a macrophages, but not M1 macrophages, to the granulation tissue during the biomaterial clearance and wound-resolution stage.

Interestingly, this study identifies macrophage responses to chitosan, IL-1ra and IL-10 release by M0 and M2a macrophages, which can potentially improve cartilage repair. IL-1ra is a physiological inhibitor of IL-1 β (Iqbal & Fleischmann, 2007), and IL-1 β is identified as a major contributor to the development of osteoarthritis (Iqbal & Fleischmann, 2007). Therefore, excess IL-1ra over IL-1 β release by chitosan-stimulated macrophages could contribute to anabolic environments that help preserve the native cartilage structure during osteochondral repair. It is important to note that the present work focused specifically on the effects of chitosan microparticles on polarized macrophage behavior and their ability to attract bone-marrow-derived MSC. Neutrophils and mast cells are also involved in the host-response to chitosan (Barbosa, Amaral, Aguas, & Barbosa, 2010; Farrugia et al., 2014; Hoemann, C. D. et al., 2010; Lafantaisie-Favreau et al., 2013), and could produce changes to the local wound environment that would not be predicted in this monoculture model (Park, C. J. et al., 2009; Reese et al., 2007; Usami et al., 1998). Further work therefore needs to be conducted in order to understand how chitosan can stimulate macrophages and other innate

immune cells to not only guide MSC to wounds, but also provide recruited cells with the right molecular signals for successful osteochondral repair.

4.6 Conclusions

Chitosan stimulates anabolic responses in M0 and M2a but not M1 U937 macrophages, including increased IL-10 release and the release of excess IL-1ra over IL-1 β through pathways independent of the IL-4/STAT-6 signalling axis. In primary MDMs, chitosan promotes IL-1ra secretion with only low IL-1 β release, with or without PKC activation. Although 80% DDA chitosans induce delayed STAT-1 activation and the release of chemokine IP-10 in U937 macrophages, in MDMs, STAT-1 activation and IP-10 release by 80% DDA chitosan are dependent on PKC activation. Polarized D-U937 macrophages have a differential capacity to attract human bone-marrow-derived MSC in vitro: M0 and M2a macrophages, with or without chitosan stimulation, release soluble factors that attract MSC, whereas inflammatory M1 macrophage soluble factors are unable to attract MSC. Chitosan-induced STAT-1 activation and IP-10 release are DDA-dependent responses, indicating that macrophage activation and behaviour modulation can be controlled through chitosan GlcNA content.

4.7 Competing interest statement

The authors have no competing interests to declare for this work.

4.8 Acknowledgments

We thank Simon Bolduc-Beaudoin, Marvin Chia and Nicholas Duceppe for excellent technical assistance, Claude Meilleur for collection of venous blood, Dr. Denis Claude-Roy for providing Raji cells, and Julie Tremblay for quality assurance. This work was funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC, Discovery grant No. 262874 to C.D.H.) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, Operating Grant No. 185810-BME to C.D.H.). Salary support was from the Fonds de recherche du Québec - Santé (FRQ-S, Bourse de carrière, Chercheurs nationaux, C.D.H.), Fonds de recherche du Québec - Nature et technologies (FRQ-NT, D.F.), the Mentor program (M.B.A.) and an NSERC summer scholarship (J.G.L.). Data from this

paper were generated towards completion of the PhD thesis of D.F. and were presented in part at the annual meetings of the Society for Biomaterials (2013, Boston, MA, USA) and the Orthopedic Research Society (2014, New Orleans, LA, USA).

4.9 References

- Alexander, K. A., M. K. Chang, et al. (2011). "Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model." J Bone Miner Res **26**(7): 1517-1532.
- Ambarus, C. A., S. Krausz, et al. (2012). "Systematic validation of specific phenotypic markers for in vitro polarized human macrophages." Journal of immunological methods **375**(1-2): 196-206.
- Anton, K., D. Banerjee, et al. (2012). "Macrophage-associated mesenchymal stem cells assume an activated, migratory, pro-inflammatory phenotype with increased IL-6 and CXCL10 secretion." PLoS One **7**(4): e35036.
- Ariganello, M. B., R. S. Labow, et al. (2009). "Response of macrophage-like U937 cells to decellularized tissue heart valve materials." J Heart Valve Dis **18**(2): 187-197.
- Ariganello, M. B., D. T. Simionescu, et al. (2011). "Macrophage differentiation and polarization on a decellularized pericardial biomaterial." Biomaterials **32**(2): 439-449.
- Barbosa, J. N., I. F. Amaral, et al. (2010). "Evaluation of the effect of the degree of acetylation on the inflammatory response to 3D porous chitosan scaffolds." J Biomed Mater Res A **93**(1): 20-28.
- Breinan, H. A., S. D. Martin, et al. (2000). "Healing of canine articular cartilage defects treated with microfracture, a type-II collagen matrix, or cultured autologous chondrocytes." J Orthop Res **18**(5): 781-789.
- Brown, B. N., R. Londono, et al. (2012). "Macrophage phenotype as a predictor of constructive remodeling following the implantation of biologically derived surgical mesh materials." Acta Biomater **8**(3): 978-987.

- Buechler, C., M. Ritter, et al. (2000). "Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli." Journal of leukocyte biology **67**(1): 97-103.
- Bueter, C. L., C. K. Lee, et al. (2011). "Chitosan but not chitin activates the inflammasome by a mechanism dependent upon phagocytosis." The Journal of biological chemistry **286**(41): 35447-35455.
- Bueter, C. L., C. K. Lee, et al. (2014). "Spectrum and mechanisms of inflammasome activation by chitosan." Journal of immunology **192**(12): 5943-5951.
- Chevrier, A., C. D. Hoemann, et al. (2007). "Chitosan-glycerol phosphate/blood implants increase cell recruitment, transient vascularization and subchondral bone remodeling in drilled cartilage defects." Osteoarthritis Cartilage **15**(3): 316-327.
- Daley, J. M., S. K. Brancato, et al. (2010). "The phenotype of murine wound macrophages." J Leukoc Biol **87**(1): 59-67.
- Fahy, N., M. L. de Vries-van Melle, et al. (2014). "Human osteoarthritic synovium impacts chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells via macrophage polarisation state." Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society **22**(8): 1167-1175.
- Farrugia, B. L., J. M. Whitelock, et al. (2014). "The localisation of inflammatory cells and expression of associated proteoglycans in response to implanted chitosan." Biomaterials **35**(5): 1462-1477.
- Fearing, B. V. and M. E. Van Dyke (2014). "In vitro response of macrophage polarization to a keratin biomaterial." Acta biomaterialia **10**(7): 3136-3144.
- Freytes, D. O., J. W. Kang, et al. (2013). "Macrophages modulate the viability and growth of human mesenchymal stem cells." Journal of cellular biochemistry **114**(1): 220-229.
- Guihard, P., Y. Danger, et al. (2012). "Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin m signaling." Stem Cells **30**(4): 762-772.

- Guzman-Morales, J., M. B. Ariganello, et al. (2011). "Biodegradable chitosan particles induce chemokine release and negligible arginase-1 activity compared to IL-4 in murine bone marrow-derived macrophages." Biochem Biophys Res Commun **405**(4): 538-544.
- Hamilton, J. A. (1997). "CSF-1 signal transduction." Journal of leukocyte biology **62**(2): 145-155.
- Hoemann, C. D., G. Chen, et al. (2010). "Scaffold-guided subchondral bone repair: implication of neutrophils and alternatively activated arginase-1+ macrophages." Am J Sports Med **38**(9): 1845-1856.
- Hoemann, C. D., J. Guzman-Morales, et al. (2013). "Chitosan Rate of Uptake in HEK293 Cells is Influenced by Soluble versus Microparticle State and Enhanced by Serum-Induced Cell Metabolism and Lactate-Based Media Acidification." Molecules **18**(1): 1015-1035.
- Hoemann, C. D., M. Hurtig, et al. (2005). "Chitosan-glycerol phosphate/blood implants improve hyaline cartilage repair in ovine microfracture defects." J Bone Joint Surg Am **87**(12): 2671-2686.
- Iqbal, I. and R. Fleischmann (2007). "Treatment of osteoarthritis with anakinra." Current rheumatology reports **9**(1): 31-35.
- Kalwitz, G., K. Andreas, et al. (2010). "Chemokine profile of human serum from whole blood: migratory effects of CXCL-10 and CXCL-11 on human mesenchymal stem cells." Connect Tissue Res **51**(2): 113-122.
- Lafantaisie-Favreau, C. H., J. Guzman-Morales, et al. (2013). "Subchondral pre-solidified chitosan/blood implants elicit reproducible early osteochondral wound-repair responses including neutrophil and stromal cell chemotaxis, bone resorption and repair, enhanced repair tissue integration and delayed matrix deposition." BMC Musculoskelet Disord **14**(1): 27.
- Lavertu, M., S. Methot, et al. (2006). "High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation." Biomaterials **27**(27): 4815-4824.
- Lavertu, M., Z. Xia, et al. (2003). "A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan." Journal of pharmaceutical and biomedical analysis **32**(6): 1149-1158.

- Lolmede, K., L. Campana, et al. (2009). "Inflammatory and alternatively activated human macrophages attract vessel-associated stem cells, relying on separate HMGB1- and MMP-9-dependent pathways." J Leukoc Biol **85**(5): 779-787.
- Ma O., L. M., Sun J. , Nguyen S., Buschmann MD. , Winnik F. and Hoemann CD (2008). "Precise derivatization of structurally distinct chitosans with rhodamine B isothiocyanate." Carbohydrate Polymer **72**(4): 616-624.
- Mantovani, A., A. Sica, et al. (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." Trends Immunol **25**(12): 677-686.
- Martinez, F. O., S. Gordon, et al. (2006). "Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression." J Immunol **177**(10): 7303-7311.
- Matheson, L. A., R. S. Labow, et al. (2002). "Biodegradation of polycarbonate-based polyurethanes by the human monocytes-derived macrophage and U937 cell systems." Journal of biomedical materials research **61**(4): 505-513.
- Matheson, L. A., R. S. Labow, et al. (2002). "Biodegradation of polycarbonate-based polyurethanes by the human monocytes-derived macrophage and U937 cell systems." J Biomed Mater Res **61**(4): 505-513.
- McDade, J. K., E. P. Brennan-Pierce, et al. (2013). "Interactions of U937 macrophage-like cells with decellularized pericardial matrix materials: influence of crosslinking treatment." Acta biomaterialia **9**(7): 7191-7199.
- McNally, A. K., S. R. Macewan, et al. (2008). "Foreign body-type multinucleated giant cell formation requires protein kinase C beta, delta, and zeta." Experimental and molecular pathology **84**(1): 37-45.
- Mosser, D. M. and J. P. Edwards (2008). "Exploring the full spectrum of macrophage activation." Nat Rev Immunol **8**(12): 958-969.
- Nguyen, S., F. M. Winnik, et al. (2009). "Improved reproducibility in the determination of the molecular weight of chitosan by analytical size exclusion chromatography." Carbohydrate polymers **75**(3): 528-533.

- Nicolaidou, V., M. M. Wong, et al. (2012). "Monocytes induce STAT3 activation in human mesenchymal stem cells to promote osteoblast formation." PloS one **7**(7): e39871.
- Ohmori, Y., M. F. Smith, Jr., et al. (1996). "IL-4-induced expression of the IL-1 receptor antagonist gene is mediated by STAT6." J Immunol **157**(5): 2058-2065.
- Okamoto, Y., M. Watanabe, et al. (2002). "Effects of chitin/chitosan and their oligomers/monomers on migrations of fibroblasts and vascular endothelium." Biomaterials **23**(9): 1975-1979.
- Oliveira, M. I., S. G. Santos, et al. (2012). "Chitosan drives anti-inflammatory macrophage polarisation and pro-inflammatory dendritic cell stimulation." Eur Cell Mater **24**: 136-153.
- Omar, O. M., C. Graneli, et al. (2011). "The stimulation of an osteogenic response by classical monocyte activation." Biomaterials **32**(32): 8190-8204.
- Ott, T. R., A. Pahuja, et al. (2005). "A high-throughput chemotaxis assay for pharmacological characterization of chemokine receptors: Utilization of U937 monocytic cells." Journal of pharmacological and toxicological methods **51**(2): 105-114.
- Park, C. J., N. P. Gabrielson, et al. (2009). "The effect of chitosan on the migration of neutrophil-like HL60 cells, mediated by IL-8." Biomaterials **30**(4): 436-444.
- Ramana, C. V., M. P. Gil, et al. (2002). "Stat1-dependent and -independent pathways in IFN-gamma-dependent signaling." Trends Immunol **23**(2): 96-101.
- Reese, T. A., H. E. Liang, et al. (2007). "Chitin induces accumulation in tissue of innate immune cells associated with allergy." Nature **447**(7140): 92-97.
- Richter, W. (2009). "Mesenchymal stem cells and cartilage in situ regeneration." J Intern Med **266**(4): 390-405.
- Ringe, J., S. Strassburg, et al. (2007). "Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2." J Cell Biochem **101**(1): 135-146.
- Schutte, R. J., A. Parisi-Amon, et al. (2009). "Cytokine profiling using monocytes/macrophages cultured on common biomaterials with a range of surface chemistries." Journal of biomedical materials research. Part A **88**(1): 128-139.

- Tebo, J. M., H. S. Kim, et al. (1998). "Interleukin-10 suppresses IP-10 gene transcription by inhibiting the production of class I interferon." Blood **92**(12): 4742-4749.
- Thibault, M. M., C. D. Hoemann, et al. (2007). "Fibronectin, vitronectin, and collagen I induce chemotaxis and haptotaxis of human and rabbit mesenchymal stem cells in a standardized transmembrane assay." Stem Cells and Development **16**(3): 489-502.
- Tomihata, K. and Y. Ikada (1997). "In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives." Biomaterials **18**(7): 567-575.
- Ueno, H., F. Nakamura, et al. (2001). "Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages." Biomaterials **22**(15): 2125-2130.
- Usami, Y., Y. Okamoto, et al. (1998). "Chitin and chitosan stimulate canine polymorphonuclear cells to release leukotriene B4 and prostaglandin E2." J Biomed Mater Res **42**(4): 517-522.
- Vasconcelos, D. P., A. C. Fonseca, et al. (2013). "Macrophage polarization following chitosan implantation." Biomaterials **34**(38): 9952-9959.
- Wang, Q. J., P. Acs, et al. (1997). "The catalytic domain of protein kinase C-delta in reciprocal delta and epsilon chimeras mediates phorbol ester-induced macrophage differentiation of mouse promyelocytes." The Journal of biological chemistry **272**(1): 76-82.

4.10 Supplementary data

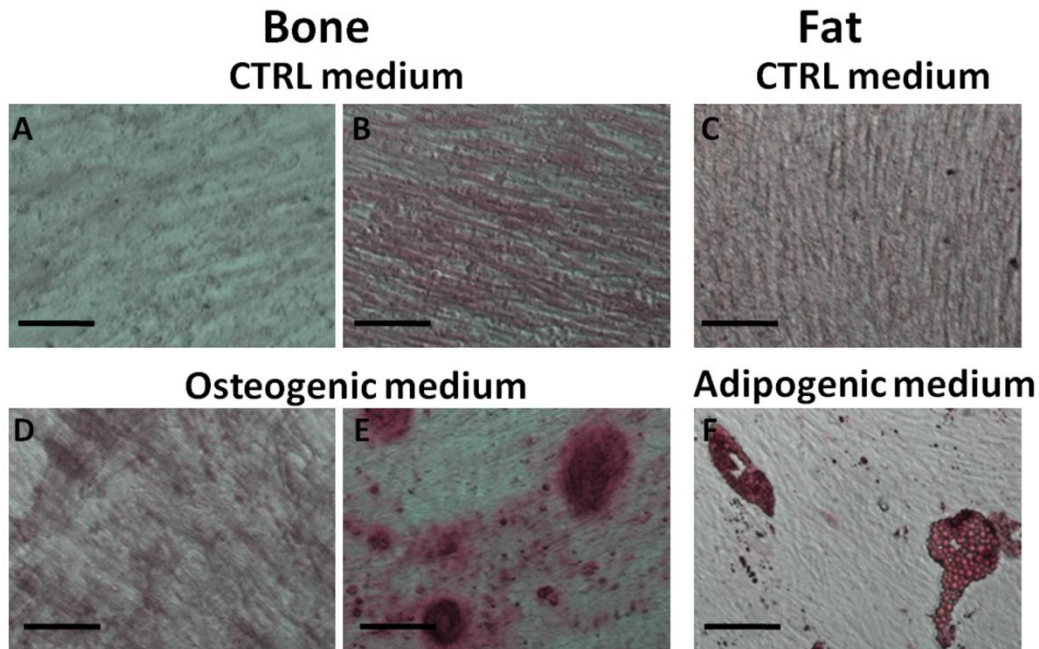


Figure 4.10: Human primary bone-marrow-derived MSC demonstrate multilineage potential and can differentiate towards bone or fat when cultured in osteogenic and adipogenic media. MSC were cultured for 21 days in (A, B and C) control medium (16% FBS without stimuli), (D and E) osteogenic medium (16% FBS supplemented with 10 nM dexamethasone, 0.1 mM l-ascorbic acid and 5 mM β -glycerol phosphate) or (C and F) adipogenic medium (16% FBS supplemented with 500 nM dexamethasone, 50 μ m indomethacin and 500 nM isobutylmethylxanthine). Cells were then stained for (A and D) alkaline phosphatase activity, (B and E) Alizarin Red for calcium deposition or (C and F) Oil Red O for lipids. Scale bar = 50 μ m.

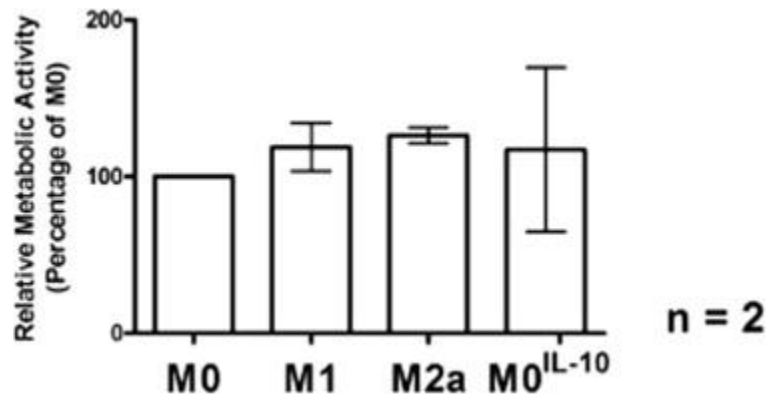


Figure 4.11: Polarized D-U937 macrophage CM are not cytotoxic for MSC. MSC from two donors were incubated in polarized (M1, M2a and M2c) macrophage CM for 24 h and analyzed for metabolic activity using the Alamar Blue assay. Data shown as mean \pm min-max.

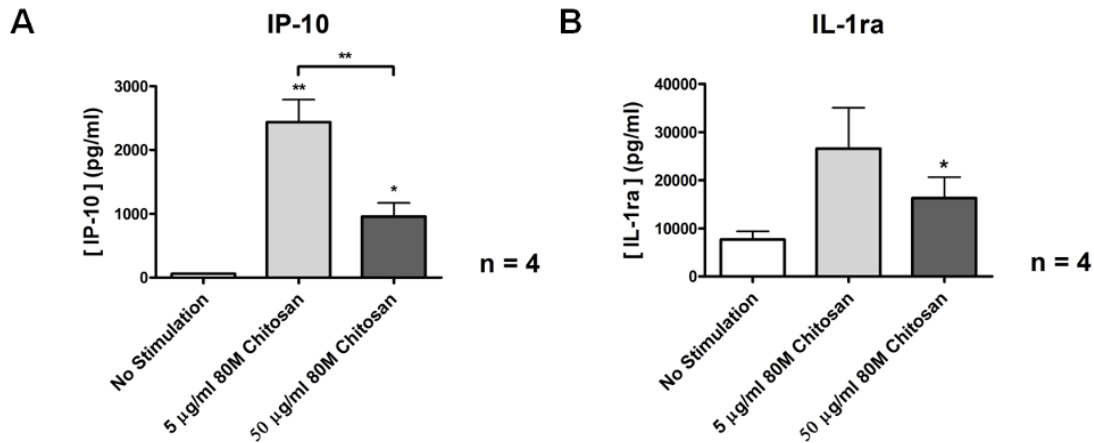


Figure 4.12: Release of IP-10 and IL-1ra by chitosan-stimulated D-U937 macrophages as a function of chitosan dose. M0 macrophages were stimulated with 5 or 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 80M chitosan for 24 h. Macrophage CM were analyzed for (A) IP-10 and (B) IL-1ra by ELISA. Asterisks over error bars show significant differences between chitosan-treated cell and the untreated control. The bracket indicates a significant difference in IP-10 release for cells stimulated with chitosan at 5 vs. 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Data shown as mean \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

CHAPITRE 5 ARTICLE 2: LYSOSOMAL RUPTURE INDUCED BY STRUCTURALLY DISTINCT CHITOSANS EITHER PROMOTES A TYPE 1 IFN RESPONSE OR ACTIVATES THE INFLAMMASOME IN MACROPHAGES

Ce chapitre présente l'article intitulé *Lysosomal rupture induced by structurally distinct chitosans either promotes a type 1 IFN response or activates the inflammasome in macrophages* dont les auteurs sont David Fong, Pascal Grégoire-Gélinas, Alexandre Pellan Cheng, Tal Mezheritsky, Marc Lavertu, Sachiko Sato et Caroline D. Hoemann.

Cet article a été soumis pour publication dans la revue *Immunity* et répond aux objectifs de l'article 2 présentés au chapitre 3.

La contribution du premier auteur à l'émission des hypothèses, la conception des expériences, l'obtention des résultats et à la rédaction de l'article est évaluée à 85%.

Description détaillée de la contribution des différents auteurs :

David Fong : Émission des hypothèses, conception des expériences, obtention des résultats, analyse et interprétation des données, rédaction et révision de l'article, responsable de l'intégrité du travail.

Pascal Grégoire-Gélinas: Élaboration des méthodes d'analyses en microscopie confocale, obtention des résultats, analyse des données, approbation de l'article.

Alexandre Cheng : Obtention des résultats, analyse des données, approbation de l'article

Tal Mezheritsky : Obtention des résultats, analyse des données, approbation de l'article

Marc Lavertu : Conception des expériences, approbation de l'article

Sachiko Sato : Conception des expériences, analyse des données, révision de l'article

Caroline D. Hoemann : Émission des hypothèses, conception des expériences, analyse et interprétation des données, rédaction et révision de l'article, acquisition des fonds de recherche, responsable de l'intégrité du travail.

**Lysosomal rupture induced by structurally distinct
chitosans either promotes a type I IFN response
or activates the inflammasome in macrophages**

David Fong^a, Pascal Grégoire-Gélinas^b, Alexandre P. Cheng^a, Tal Mezheritsky^a, Marc Lavertu^{a,b,c}, Sachiko Sato^d, Caroline D. Hoemann^{a,b,c*}

^aInstitute of Biomedical Engineering; École Polytechnique; Montreal, QC, H3T 1J4; Canada

^bDepartment of Chemical Engineering; École Polytechnique; Montreal, QC, H3T 1J4; Canada

^cFRQ-S Biomedical Research Group/ Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales; École Polytechnique; Montreal, QC, H3T 1J4; Canada

^dResearch Centre for Infectious Diseases, Faculty of Medicine; Laval University; Quebec, QC, G1V 4G2; Canada

***Corresponding author and Lead Contact:**

Caroline D. Hoemann, Ph.D., P.Eng.

Professor

Dept. of Chemical Engineering

2900 boul. Édouard-Montpetit

École Polytechnique

Montréal, QC, Canada, H3C 3A7

Tel : (514) 340-4848

Fax : (514) 340-2980

caroline.hoemann@polymtl.ca

5.1 Summary

Chitosan is a family of glucosamine and N-acetyl glucosamine polysaccharides with poorly understood immune modulating properties. Here, we report the generation of a novel library of 20 chitosans with controlled degree of deacetylation (60 to 98%DDA), molecular weight (1 to >100 kDa), and acetylation pattern (block vs. random). Specific chitosan preparations (10 or 190 kDa 80% block DDA and 3, 5, or 10 kDa 98% DDA) either induced macrophages to release CXCL10 and IL-1ra at doses of 5 to 50 $\mu\text{g/mL}$, or activated the inflammasome to release IL-1 β and PGE₂ at 50 to 150 $\mu\text{g/mL}$. Chitosan induction of these factors required lysosomal acidification. CXCL10 release was preceded by lysosomal rupture, co-localization of galectin-3 with chitosan, slowed autophagy flux, and STAT2/IFN- β paracrine activity that could be suppressed by PGE₂. Chitosan induced a type I IFN paracrine response or inflammasome response depending on the extent of lysosomal rupture and cytosolic foreign body invasion.

Keywords: Chitin/Chitosan, macrophage, immunomodulation, inflammasome, type 1 interferons

Running title: Chitosan-induced macrophage Inflammasome vs type 1 Interferon.

Phorbol ester-differentiated U937 human macrophages

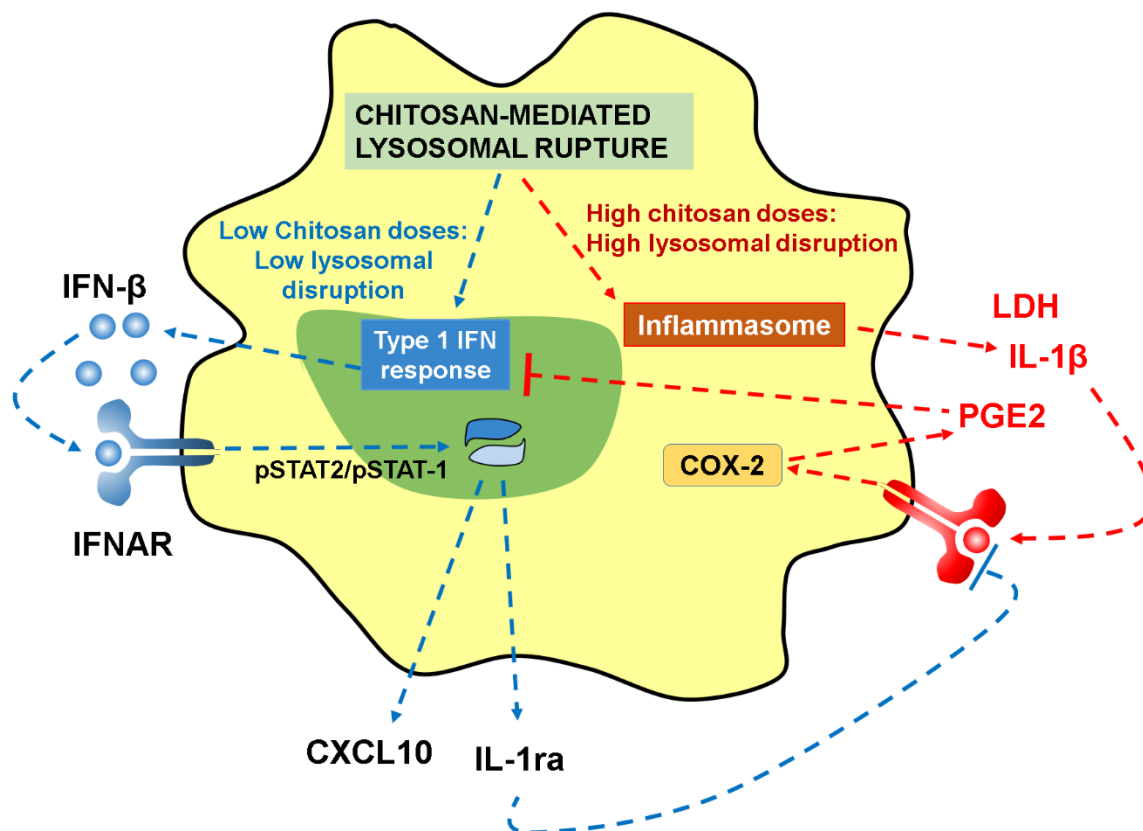


Figure 5.1. Graphical abstract

5.2 Introduction

Chitosan represents a family of a linear polysaccharide of β -O-(1-4)-linked glucosamine (GlcN) with variable content of *N*-acetylglucosamine (GlcNAc). Chitosan is used in medical devices for hemostasis and regenerative medicine through mechanisms involving macrophage immune responses that have yet to be thoroughly elucidated (Hoemann, C. D. et al., 2010; Stanish et al., 2013; Wedmore, McManus, Pusateri, & Holcomb, 2006). To fully exploit the potential of this biomaterial polymer in regenerative medicine, its immunological properties should be thoroughly understood. Despite multiple studies that investigated macrophage responses to chitosan (Almeida et al., 2014; Bueter et al., 2011; Bueter et al., 2014; Fong, Ariganello, Girard-Lauziere, & Hoemann, 2015; Gorzelanny et al., 2010; Gudmundsdottir et al., 2015; Guzman-Morales et al., 2011; Hoemann, C. D. et al., 2010; Oliveira et al., 2012; Porporatto et al., 2003; Ueno et al., 2001; Vasconcelos et al., 2013), current models are unable to explain why a given chitosan may elicit pro- or anti-inflammatory responses in macrophages. For example, chitosan has been shown to be a potent activator of the inflammasome (Bueter et al., 2011; Bueter et al., 2014), and can promote the release of pro-inflammatory cytokines Interleukin-1 β (IL-1 β) (Bueter et al., 2011; Bueter et al., 2014; Fong et al., 2015), Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) and chemokines associated with M1 macrophage polarization (Fong et al., 2015; Guzman-Morales et al., 2011). Conversely, chitosan can also elicit anti-inflammatory M2 macrophages (Hoemann, C. D. et al., 2010; Vasconcelos et al., 2013), and stimulate the release of anti-inflammatory cytokines Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) and IL-10 (Fong et al., 2015; Oliveira et al., 2012). Others have also reported that certain types of chitosan are relatively immunologically inert (Gorzelanny et al., 2010; Gudmundsdottir et al., 2015). Across these studies, chitosans of varying origins, structural properties and purities were used. What is lacking at this time is a structure-function model that can be used to predict macrophage responses to chitosan according to its 3 main molecular characteristics: molecular weight, degree of deacetylation (DDA), and acetylation pattern.

Chitosan is produced by chemical deacetylation of chitin (GlcNAc β 1-4)_n (Lamarque et al., 2004a), leading to chitosan preparations with a GlcN content or DDA that ranges from 50 to 100%. In chitosans produced by this approach, the remaining GlcNAc residues are arranged in block, or clusters that are distributed heterogeneously along the chitosan chain (Varum, Anthonsen,

Grasdalen, & Smidsrod, 1991b). Chitosan may also be produced with a random, homogeneous distribution of GlcNAc residues by treating fully deacetylated chitosan $(\text{GlcN}\beta 1-4)_n$, with acetic anhydride which reacylates chitosan to specific DDA levels (Aiba, 1992; Lavertu et al., 2012). Chitosan can be also be depolymerized with nitrous acid to target molecular weights with acceptable polydispersity (PDI, weight-average molecular weight (M_w) / number-average molecular weight (M_n)) (Lavertu et al., 2006). These methods can be used to produce chitosans with controlled structural features.

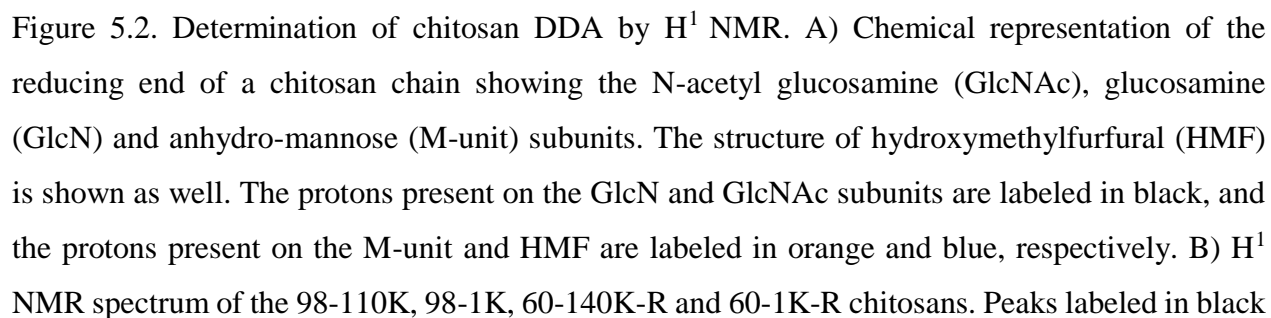
Previously, we showed that a 132 kDa 82% DDA, block-acetylated chitosan can induce M0, M1 and M2-polarized U937 human macrophages to release both pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , CXCL10), and higher levels of an anti-inflammatory cytokine IL-1ra (Fong et al., 2015). CXCL10 release was mediated by STAT-1 signaling and triggered in a delayed fashion by this partly-acetylated chitosan. By contrast, 128 kDa 98% DDA chitosan failed to induce CXCL10 release for reasons that remain unclear (Fong et al., 2015). 80% DDA chitosan-enhanced IL-1ra release was shown to be independent of STAT-6 activation and IL-1 β release, indicating that elevated production of this anti-inflammatory cytokine is mediated by a currently unknown signaling pathway (Fong et al., 2015). Altogether, these findings suggest that chitosan can activate partial M1 and M2 macrophage responses, raising the possibility that chitosan structural properties can be tailored to elicit specific anti-inflammatory cytokine responses such as IL-1ra release.

Several studies have compared macrophage responses to 2 or 3 chitosans with different DDA (Fong et al., 2015; Vasconcelos et al., 2013), or different molecular weight (Fong et al., 2015; Gudmundsdottir et al., 2015; Porporatto et al., 2003). A systematic and comprehensive study of pro- and anti-inflammatory macrophage responses to a library of chitosans with distinct DDA and a comprehensive range of molecular weights is currently lacking. In this work, we generated a library of twenty different chitosans, with DDAs of 60, 80 and 98%, discrete number-average molecular weights (M_n) of 1 to over 100 kDa, with block or random acetylation patterns. This library was used to identify the minimal structural properties required for chitosan to stimulate U937 macrophages to produce IL-1ra, CXCL10, IL-1 β and Prostaglandin E₂ (PGE₂). We then investigated the cellular mechanisms that lead to distinct cytokine responses and identified lysosomal disruption and IFN-beta (IFN- β) as the paracrine signaling pathway responsible for enhanced release of IL-1ra and CXCL10.

5.3 Results

Characterization of the chitosan library for structural features

Chitosan DDA was determined using the ratio of ^1H NMR peaks for H1D (5.2 ppm) and HAc (2.3 ppm) as previously assigned (Figure 5.2) (Lavertu et al., 2003). In comparison to the high molecular weight chitosans, proton spectra of the low molecular weight chitosans (below 5 kDa) showed additional peaks that were attributed to either protons on the 2,5-anhydro-D-mannose (M-unit) on the reducing end of the chitosan chain (3 peaks at 5.35, 4.5, 4.4 ppm) (Sugiyama et al., 2001), or protons on a by-product of nitrous acid depolymerisation, hydroxymethyl furfural (HMF) (4 peaks at 9.7, 7.8, 6.9, 4.88 ppm) (Figure 5.2) (Tommeraaas, Varum, Christensen, & Smidsrod, 2001b). The library on average was within 1% (80%, 98%) or 5% (60%) of the target DDA. Gel permeation chromatography (GPC) analysis confirmed that the chitosan library was consistent with the target M_n , with a PDI ranging from 1.2 to 2.5 (Table 5.1). For simplicity, the chitosans used in this study were termed according to the nomenclature DDA- M_n -B (block-acetylated) or DDA- M_n -R (random-acetylated) (Table 5.1).



on the spectra are attributed to protons on the GlcNAc and GlcN subunits shown in A). Peaks labeled in orange or blue on the spectra are attributed to protons shown in A) on the M-unit or HMF molecule, respectively. The peak $\alpha 4$ is attributed to the proton of carbon 4 on the non-reducing end of the chitosan chain.

	Chitosan	DDA (%)	M _n (kDa)	PDI
98% DDA Chitosans	98-110K	98	113	2.0
	98-10K	99	9	1.2
	98-5K	99	4	1.6
	98-3K	99	3	1.5
	98-1K	98	1	1.3
80% DDA B-acetylated Chitosans	80-190K-B	82	188	2.2
	80-10K-B	83	11	1.5
	80-5K-B	81	5	1.8
	80-3K-B	83	3	1.1
	80-1K-B	80	1	1.5
80% DDA R-acetylated Chitosans	80-140K-R	80	144	1.8
	80-10K-R	80	11	1.4
	80-5K-R	81	5	1.5
	80-3K-R	81	3	1.5
	80-1K-R	81	1	1.3
60% DDA R-acetylated Chitosans	60-140K-R	65	152	1.7
	60-10K-R	62	16	1.3
	60-5K-R	53	4	1.6
	60-3K-R	59	3	2.5
	60-1K-R	61	1	1.8

Table 5.1. Properties of the chitosans generated and tested in this study.

IL-1ra/CXCL10 and PGE₂/IL-1 β release are differentially induced by 98% DDA and 80% DDA Block-acetylated chitosan in a dose-dependent manner.

Using a 4-analyte factor array consisting in IL-1ra, CXCL10, IL-1 β and PGE₂, two mutually exclusive macrophage cytokine response patterns were observed depending on the chitosan and dose. At lower dose levels (5, 50 μ g/mL), 10 to 190 kDa 80% DDA block and 3, 5, and 10 kDa 98% DDA chitosans induced CXCL10 and IL-1ra release (Figure 5.3A-B). Paradoxically, chitosan induction of CXCL10 and IL-1ra tapered off as the dose was increased. At the highest chitosan dose (150 μ g/mL), all 98% DDA chitosans over 3 kDa induced inflammasome activation, which lead to increased IL-1 β and PGE₂ release (Fig. 5.3C-D). IL-1 β and PGE₂ release intensified as the molecular weight and dose of the >3 kDa 98% DDA chitosans increased (Figure 5.3C-D). Random-acetylated chitosans and 1 kDa oligomers failed to induce any significant release of cytokines or PGE₂ (Figure 5.3). In control cultures, macrophages produced several orders of magnitude higher IL-1ra when stimulated by IL-4 or LPS compared to chitosan (Figure S5.7A). Only IFN- γ induced CXCL10, at 20-fold higher levels than the optimal dose of 98-10K chitosan (Figure 5.7B). Only LPS induced IL-1 β and PGE₂ (Figure 5.7C-D). These data showed that chitosan-induced cytokine responses were distinct from canonical cytokine and TLR-4 mediated endotoxin responses.

The level of IL-1 β released to the medium was found to correlate with Lactate dehydrogenase (LDH) leakage, with the 98% DDA chitosans above 3 kDa inducing the most cell death (Figure 5.8). Induction of IL-1 β release, PGE₂ generation, and LDH leakage correlated with chitosan tendency to precipitate and aggregate, as measured by turbidity at neutral pH (Figure 5.9).

In summary, our 4-analyte factor array showed that a sub-set of structurally distinct chitosans can induce the release of two distinct cytokine signatures: one signature consisted of co-induction of IL-1ra and CXCL10 at low chitosan doses ($R^2=0.72$, $p<0.000$, Figure 5.10A), and the other cytokine signature consisted of inflammasome activation (IL-1 β and PGE₂ co-release; $R^2=0.93$, $p<0.000$, Figure 5.10B) at high chitosan concentrations.

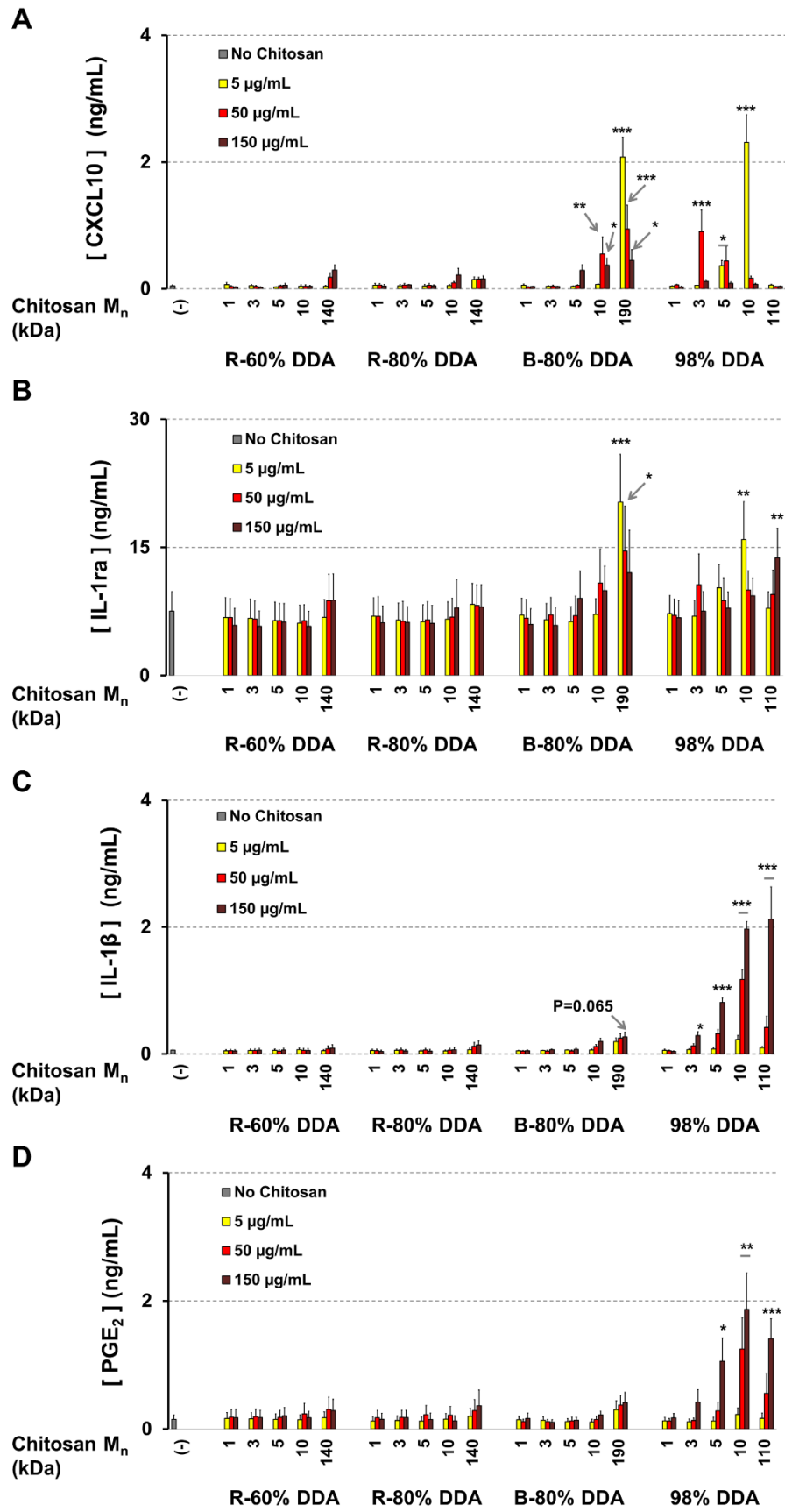


Figure 5.3. Release of (A) CXCL10, (B) IL-1ra, (C) IL-1 β and (D) PGE₂ from macrophages stimulated for 24 hours with the chitosan library. 98% DDA and 80% block-acetylated chitosans at low doses co-stimulated the release of (A) CXCL10 and (B) IL-1ra. 98% DDA chitosans in a dose-dependent manner stimulated (C) IL-1 β and (D) PGE₂ release. Random-acetylated chitosans and block-acetylated oligomers 80-5K-B, 80-3K-B and 80-1K-B failed to stimulate cytokine release. Data show mean \pm standard error mean for n=4 independent cultures. Significant differences between chitosan-treated cells and unstimulated cells (-): * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

Chitosan induces a type 1 IFN response to stimulate the release of IL-1ra and CXCL10.

We previously reported that 132 kDa 82% DDA, block-acetylated chitosan induced delayed STAT-1 phosphorylation and CXCL10 secretion in U937 macrophages starting at 10 hours post-stimulation (Fong et al., 2015). In line with these observations, inhibition of translation or transcription prevented 80-190K-B chitosan from inducing STAT-1 phosphorylation (Figure 5.11A), indicating that *de novo* gene expression was essential for the chitosan-induced STAT-1/CXCL10 response. Both type II (IFN- γ) and type I IFN (IFN- α/β) can induce STAT-1 factor activation leading to CXCL10 expression, however only IFN- α/β can induce STAT-2 phosphorylation (Platanias, 2005). Conditioned medium (CM) collected from U937 cells stimulated for 1 hour with 98-10K chitosan failed to induce STAT-1 or STAT-2 activation whereas 24 hour-CM was able to specifically induce STAT-1 and STAT-2 phosphorylation in U937 cells, to a similar extent as CM from cells stimulated with IFN- α/β (Figure 5.4A). Neutralization of IFN- β , but not IFN- α with blocking antibodies suppressed the ability of the 98-10K chitosan to induce STAT-2 phosphorylation (Figure 5.4B-C), and to stimulate IL-1ra and CXCL10 release (Figure 5.4D). Neutralization of IFN- α or IFN- β had no effect on IL-1 β release (Figure 5.4D). These data demonstrated that IFN- β is a paracrine factor induced by low doses of 98-10K chitosan that induces *de novo* STAT-1/STAT-2 activation and enhances CXCL10 and IL-1ra secretion.

It was previously reported that PGE₂ can inhibit IFN- α/β secretion, suggesting that the inflammasome serves as a feedback loop to shut down the type I IFN response in infected cells (McNab et al., 2015). However, to our knowledge, it has never been reported that a biomaterial can induce this same feedback loop. U937 cells challenged with both 98-10K chitosan and increasing doses of PGE₂ showed that high doses of PGE₂ attenuated the ability of 98-10K chitosan

to induce STAT-2 phosphorylation and IL-1ra production, and completely abrogated CXCL10 production (Figure 5.4C-D). PGE₂ showed biphasic effects on IL-1 β release in chitosan-stimulated cells, where the lowest dose of PGE₂ (0.1 μ g/mL) potentiated IL-1 β release, and the highest dose of PGE₂ (10 μ g/mL) suppressed the effects of chitosan on this cytokine (Figure 5.4D). Altogether, our data showed that chitosan elicited a type 1 IFN response by inducing IFN- β release, which was necessary and sufficient to induce CXCL10 and enhance IL-1ra production. Induction of the type 1 IFN response was suppressed by PGE₂ and mutually exclusive of chitosan-induced inflammasome activation.

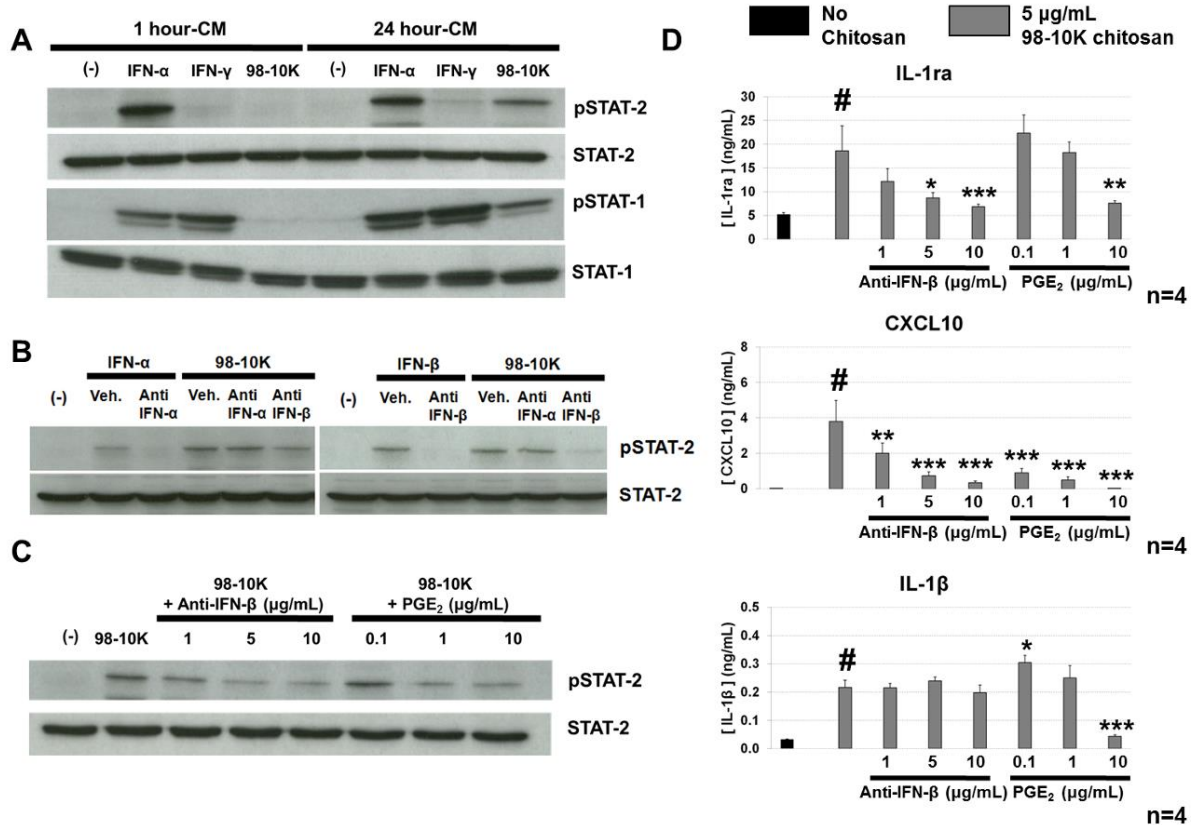


Figure 5.4. Chitosan induces a delayed type 1 IFN cytokine response that involves paracrine IFN- β activity to stimulate IL-1ra and CXCL10 release. A) STAT-1 and STAT-2 western blots from lysates of U937 macrophages incubated for 1 hour with conditioned medium from other U937 macrophages previously stimulated for 1 hour (1 hour-CM) or 24 hours (24 hour-CM) with 10 ng/mL IFN- α , 20 ng/mL IFN- γ , 5 μ g/mL 98-10K chitosan. B) pSTAT-2 western blots from macrophages stimulated for 24 hours with IFN- α , IFN- β or 5 μ g/mL 98-10K chitosan in presence of neutralizing antibodies against IFN- α (Anti-IFN- α , 1 μ g/mL) or IFN- β (Anti-IFN- β , 1 μ g/mL).

C) pSTAT-2 western blots of macrophages stimulated for 24 hours with 5 $\mu\text{g/mL}$ of 98-10K chitosan in presence of increasing doses of Anti-IFN- β or PGE $_2$. D) IL-1ra, CXCL10 and IL-1 β release from macrophages stimulated for 24 hours with 5 $\mu\text{g/mL}$ of 98-10K chitosan in presence of increasing doses of Anti-IFN- β or PGE $_2$. Panels D-F: Data show mean \pm standard error mean. #: $p < 0.01$ between non-stimulated cells and chitosan-stimulated cells alone; * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ between IFN- β or PGE $_2$ and 98-10K versus 98-10K alone.

Lysosomal rupture is critical for chitosan-elicited type 1 IFN response and inflammasome activation

Recent work reported a linear relationship between IFN- α/β production and early phagosomal rupture induced by *Mycobacterium tuberculosis* (Simeone et al., 2015). Others have also suggested lysosomal escape to be necessary for activation of the inflammasome by chitosan (Bueter et al., 2014). Some forms of chitosan were shown to escape the lysosome through a proton-sponge effect where acidifying lysosomes induce protonation of the chitosan chains leading to an accumulation of mobile anions that results in an osmotic lysis (Thibault, M. et al., 2011). We therefore examined whether the chitosan-induced type 1 IFN response was dependent on lysosomal acidification. Following stimulation with Rhodamine Isothiocyanate-conjugated 98-10K chitosan (98-10K-RITC), we found that inhibiting lysosomal acidification using chloroquine or bafilomycin prevented the cytosolic diffusion of RITC-chitosan, and instead, the RITC-chitosan was confined to intracellular and extracellular vesicles (Figure 5.5A). Furthermore, blockage of lysosomal acidification not only suppressed the effects of chitosan on inflammasome activation (IL-1 β and PGE $_2$, Figure 5.5B), it also suppressed the type 1 IFN cytokine response (IL-1ra and CXCL10, Figure 5.5B). Suppression of the type I IFN response to chitosan was more sensitive to bafilomycin which blocks the proton pump than chloroquine which impedes acidification through a buffering action (Fig. 5.4B). These findings altogether confirmed that functional lysosomes were required not only for chitosan to activate the inflammasome and drive IL-1 β release, but also to trigger the type 1 IFN response that promotes IL-1ra and CXCL10 release.

Our findings suggested that lysosomal rupture induced by chitosan is an essential initiating event of the type I IFN response. Lysosomal rupture is expected to trigger an autophagy response which can be measured by increased expression of LC3-II, the lipidated form of LC3 associated with newly formed autophagosomes (Klionsky et al., 2008). We found that 98-10K chitosan

induced LC3-II expression relative to β -actin in a dose-dependent manner (Figure 5.5C and 5.5D). However, autophagy is a dynamic process and increased LC3-II could be explained by a net increase in autophagosome formation, or to an inhibition in autophagy flux. Blockage of autophagy flux with bafilomycin or chloroquine led to LC3-II accumulation that was not further enhanced by increasing doses of chitosan (Figure 5.5C and 5.5D). These data refuted the hypothesis that chitosan induces a net increase in autophagosome formation. Instead, these data suggested that chitosan created defective lysosomes that were incapable of fusing with autophagosomes, which led to slowed autophagy flux and higher LC3-II levels in chitosan-treated cells.

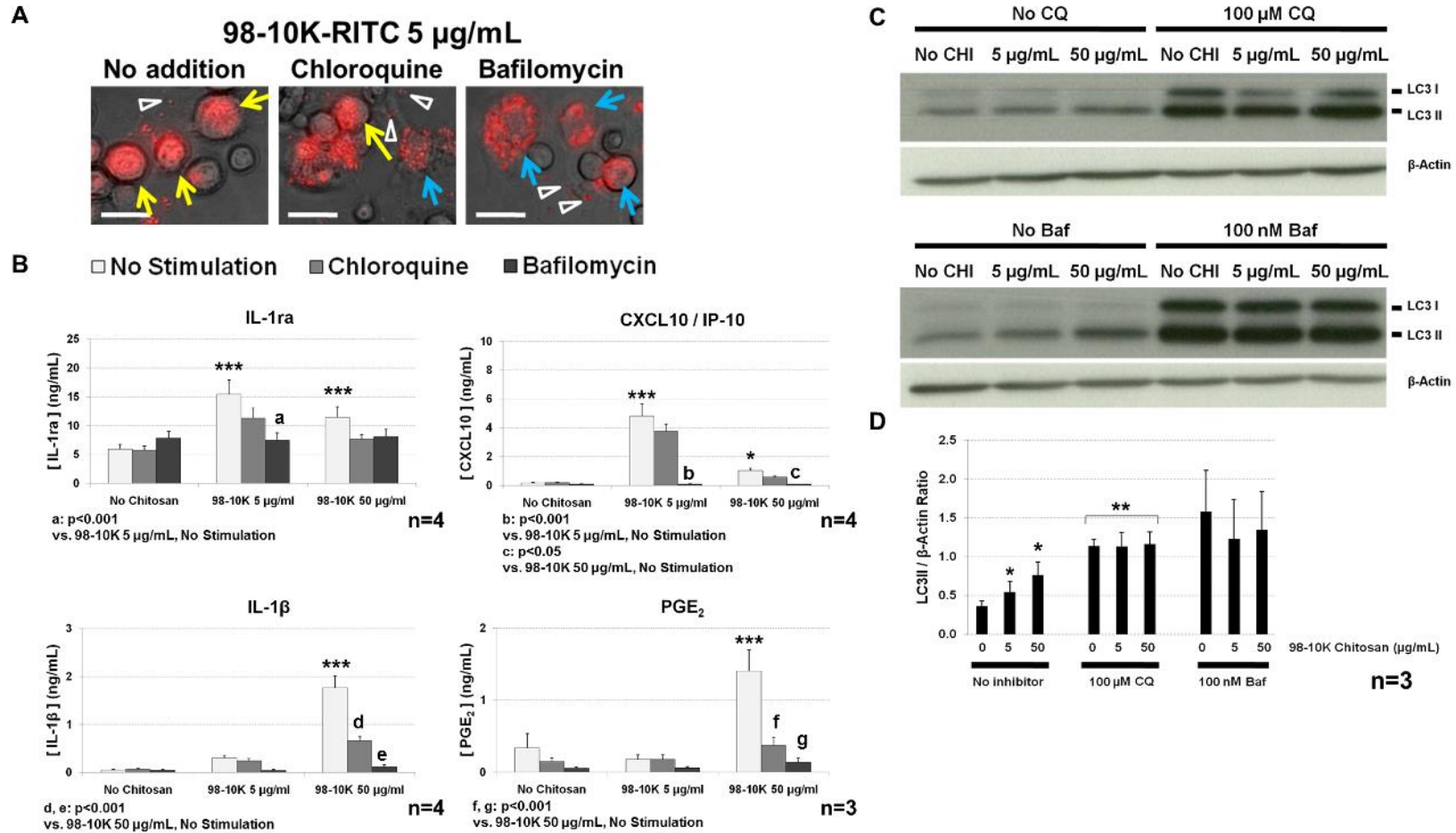


Figure 5.5. Chitosan-induced cytokine responses are dependent on lysosomal acidification and are accompanied by slowed autophagy flux. A) Phase-contrast images of macrophages stimulated for 18 hours with 5 $\mu\text{g/mL}$ RITC-conjugated 98-10K chitosan in presence of 100 μM chloroquine or 100 nM bafilomycin. Yellow arrows show cells where RITC-chitosan is diffused in the cytosol. Blue arrows show cells where RITC-chitosan is in intracellular vesicles. White arrowheads show chitosan-containing extracellular vesicles. B) IL-1 α , CXCL10 and IL-1 β release from macrophages stimulated for 24 hours with 5 or 50 $\mu\text{g/mL}$ 98-10K chitosan alone, or in presence of chloroquine or bafilomycin. C) LC3 western blots from macrophages stimulated with 5 or 50 $\mu\text{g/mL}$ 98-10K chitosan in presence of chloroquine or bafilomycin. D) Band densitometry showing LC3/ β -Actin ratio of western blots shown in C). Scale bar = 10 μm . Data show mean \pm standard error mean. Significant differences between chitosan-treated cells and unstimulated cells: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

We next tested the hypothesis that lysosomal disruption is specific to chitosans that induce a type I IFN response. Intact lysosome levels in U937 cells, as measured by fluorescence intensity of cells loaded with LysoTracker dye, were significantly decreased in macrophages stimulated with the 98-10K chitosan at a higher dose (50 $\mu\text{g/mL}$), but not with the 80-10K-R chitosan, a chitosan that failed to stimulate any cytokine responses (Figure 5.6A-B).

To provide further evidence that chitosan 98-10K, but not 80-10K-R, induces lysosomal rupture, we looked at the distribution of galectin-3 in chitosan-stimulated macrophages. Galectin-3 and galectin-8 have been identified as cytosolic lectins that can sense and target vesicles damaged by intracellular pathogens through the interaction with glycoproteins in lysosomes (Paz et al., 2010; Thurston et al., 2012). We hypothesized that galectin-3 colocalizes with the 98-10K-RITC chitosan, but not with the RITC-conjugated 80-10K-R (80-10K-R-RITC) chitosan, in a time-dependent manner. In unstimulated cells, galectin-3 was diffuse in the cytosol (Figure 5.6C). We observed an accumulation of galectin-3 that colocalized with large punctated RITC-chitosan (Galectin-3/RITC-chitosan structures (GCS)) when macrophages were stimulated with the 98-10K-RITC chitosan even at a lower dose (5 $\mu\text{g/mL}$), but not with the 80-10K-R-RITC chitosan (Figure 5.6C-D). These data suggested that even at a lower dose, 98-10K-chitosan introduced some degree of lysosomal rupture, which was recognized by cytosolic galectin-3, but not detectable by the method using LysoTracker dye. Significant levels of GCS were observed at 10 and 18 hours

post-stimulation with the 98-10K chitosan (Fig. 5.6D). Formation of these GCS suggest that 98-10K chitosan ruptured lysosomes (Figure 5.6C-D) likely through a proton sponge-dependent mechanism. Consistent with our previous observation suggesting that autophagosome accumulation was a result of chitosan-mediated lysosomal disruption (Figure 5.5C-D), we found that cells stimulated with the 98-10K-RITC , but not 80-10K-R-RITC, accumulated LC3 punctates that either remained in the cytosol (Figure 5.6E), or colocalized with GCS (Figure 5.12). This altogether indicates that the differential capacity of the chitosans to elicit a type 1 IFN response or activate the inflammasome depends on the severity of lysosomal disruption once internalized.

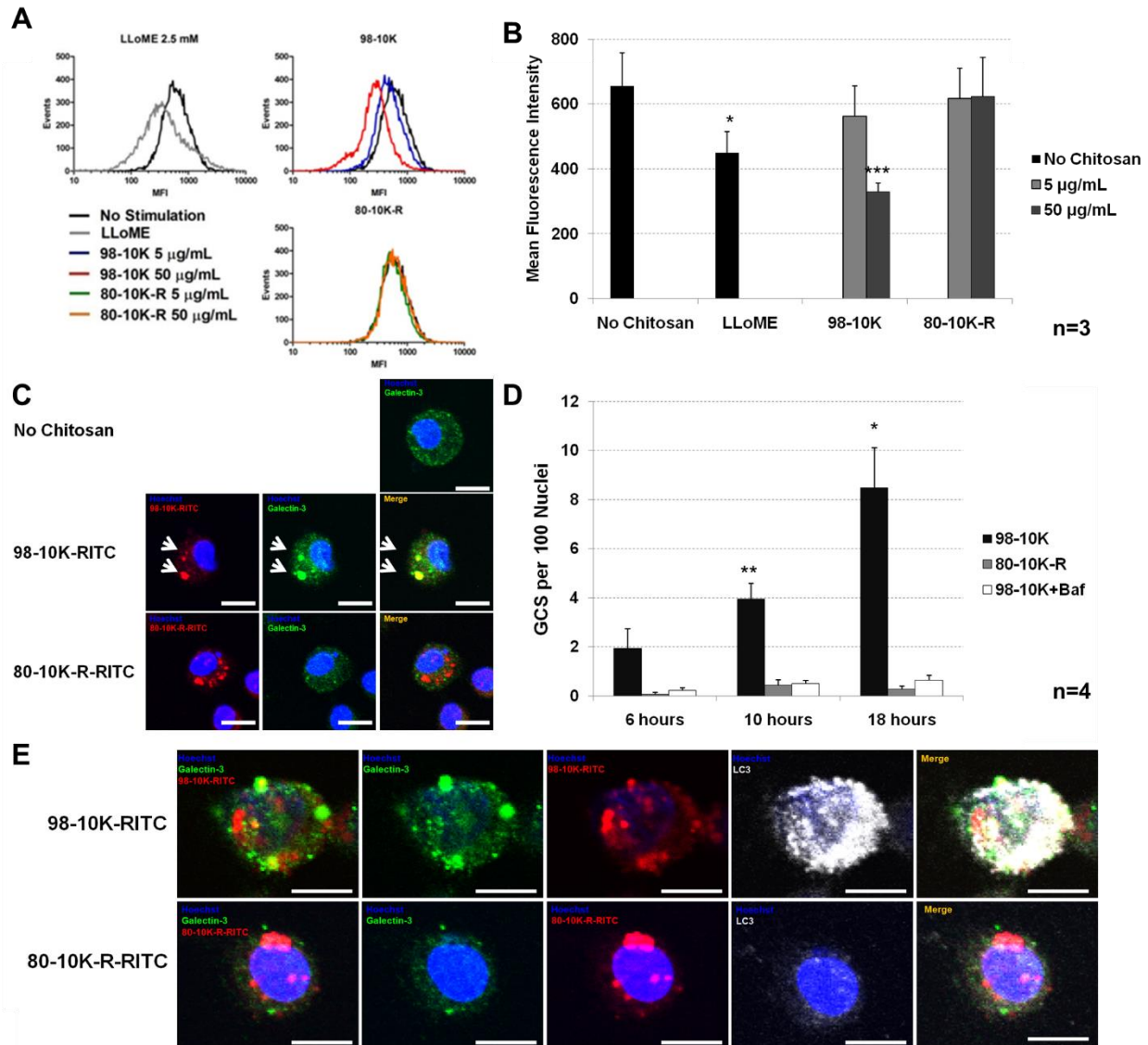


Figure 5.6. Chitosans that stimulate cytokine release induce lysosomal disruption, which leads to galectin-3 recruitment to chitosan-containing vesicles and slowed autophagy flux. A) Flow cytometry histograms of macrophages stained with LysoTracker after 24 hours of stimulation with 2.5 mM LLoME (a lysosomal disrupting agent), 5 or 50 µg/mL 98-10K or 80-10K-R chitosan. B) LysoTracker mean fluorescence intensity of macrophages stimulated with the different conditions shown in A). C) Confocal microscopy image showing Galectin-3 (green) and RITC-chitosan (red) localization in cells stimulated with the 98-10K-RITC (5 µg/mL) or 80-10K-R-RITC (50 µg/mL) chitosan after 18 hours. White arrows indicate GCS. GCS were only detected when cells were stimulated with the 98-10K-RITC chitosan alone. D) Quantification of the number of GCS per 100 nuclei after 6, 10 and 18 hours of stimulation. E) Confocal microscopy image showing Galectin-3

(green), RITC-chitosan, and LC3 (Grey) localization in cells stimulated with the 98-10K-RITC or 80-10K-R-RITC chitosan after 18 hours. GCS and LC3 punctate formation were detected in cells stimulated with the 98-10K-RITC, but not the 80-10K-R-RITC chitosan. Data show mean \pm standard error mean. Scale bar = 10 μ m. Panel B) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs non-stimulated cells. Panel D) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$: 98-10K alone vs chitosan (80-10K-R or 98-10K) with Bafilomycin.

5.4 Discussion

This study reports that a narrow range of chitosans (3 to 10 kDa, 98% DDA; 10 to 190 kDa, 80% DDA, block-acetylated) at low doses escape the lysosome and stimulate a delayed IFN- β paracrine response leading to STAT-1 and STAT-2 phosphorylation, *de novo* CXCL10 expression, and enhanced IL-1 α production. Our data suggest that the unique ability of selected chitosans at certain doses to induce this type 1 IFN response is related to their capacity to disrupt lysosomes as long as they do not induce significant inflammasome activation and cell death. Higher doses of chitosan, especially the 98% DDA chitosans that have greater neutral insolubility, were shown to induce inflammasome activation as marked by an IL-1 β and PGE₂ response. McNab et al. recently proposed a model whereby macrophage infection by intracellular pathogens induces IL-1 α production through a IFN- α/β response that can compete and suppress the inflammasome mediator IL-1 β , until excessive inflammasome activation produces PGE₂ release which suppresses IFN- α/β secretion (McNab et al., 2015). Here, we demonstrate that like intracellular pathogens, at the concentrations that activate the inflammasome, chitosan particles induced high levels of PGE₂, which suppressed chitosan-mediated STAT-1/STAT-2 activation and CXCL10 release. Chitosan's ability to induce the type 1 IFN response was influenced by DDA, molecular weight and level of GlcNAc clustering. At 98% DDA, activation of the inflammasome was attenuated by decreasing molecular weight, which increases chitosan neutral-solubility and potentially limits the mass of chitosan internalized per phagosome. At 80% DDA, only the block-acetylated chitosans above 10 kDa stimulated a type 1 IFN response also suggesting that part of the requirements for chitosan to induce type I IFNs may depend on a minimal quantity of glucosamine chains (i.e., 3000 Da of consecutive glucosamine monomers) and phagosomal uptake which then induces lysosomal rupture.

In this work, we show that chitosan-mediated type 1 IFN response and inflammasome activation were mutually exclusive. Although these cytokine responses have been described in separate reports (Bueter et al., 2011; Bueter et al., 2014; Carroll et al., 2016), our findings contribute significant insights on how these specific cytokine responses are linked, and more importantly how they are differentially elicited as a function of chitosan properties or dosage. This feature, which has not been thoroughly addressed previously, has important relevance for the use of chitosan as a vaccine adjuvant. Carroll et al. showed that 2-8 $\mu\text{g/mL}$ of a partially characterized chitosan (75-90% DDA, molecular weight 150-400 kDa) induces dendritic cells to release type 1 IFNs *in vitro* (Carroll et al., 2016). Consistent with this previous report, our findings suggest that this adjuvant effect is restricted to specific chitosans and doses, especially since type 1 IFN downstream cytokine responses (i.e. IL-1 α and CXCL10) were abrogated at higher chitosan doses, and led to significant cytotoxicity for some chitosans. Taken together, our work suggests that only selected chitosans with specific structural properties may serve as potent adjuvants. Data here also raise the caution that safety and effective desirable immunomodulatory effects of chitosan critically depend on its dose.

Several studies have suggested that the use of chitosan to drive specific macrophage responses, such as M2 activation, could be beneficial for wound repair (Fong et al., 2015; Hoemann, C. D. et al., 2010; Oliveira et al., 2012; Vasconcelos et al., 2013). However, identifying which chitosans will lead to these responses has been a significant challenge due in most part to disparities in the properties and concentrations of the chitosans used across diverse studies. The results from the chitosan library generated in this study predict that chitosans that are chemically modified to have higher neutral-solubility (i.e. reacylated chitosans, PEGylated chitosan), and the chitosans that induce strong PGE₂ will have no capacity to induce CXCL10 and IL-1 α release. Our study further predicts that chitosans that are more insoluble, highly deacetylated, and have a particle size amenable to phagocytosis will have a greater capacity to activate the inflammasome. Although many other immunological read-outs need to be assessed to fully comprehend the immunomodulatory properties of chitosan, our findings bridge an important gap in the literature in identifying which chitosans will lead to inflammasome activation in macrophages, and which ones will not.

Chitosan likely activates immune cells through multiple mechanisms that are mostly unknown. Currently, two mechanisms have been identified to be involved in chitosan-mediated

immune activation, the cGAS-STING/type 1 IFN pathway and NLRP3/inflammasome activation/IL-1 β release (Bueter et al., 2011; Bueter et al., 2014; Carroll et al., 2016). We hypothesize that lysosomal rupture following chitosan phagocytosis is an essential initiating event that precedes both the cGAS-STING pathway and the inflammasome, and downstream cytokine responses. Firstly, our data show that the magnitude of the CXCL10 response correlated with a time-dependent increase in lysosomal disruption (Figure 5.5A, 5.6C-D) (Fong et al., 2015). Secondly, bafilomycin prevented chitosan at different doses from inducing CXCL10 (Figure 4B) or IL-1 β release (Fig 5.5B) (Bueter, 2011). It was previously reported that a 75-90% DDA, 150-400 kDa chitosan induces mitochondrial changes after 3 hours of stimulation followed by IFN- β release after 24 hours through a cGAS and STING-sensitive pathway (Carroll et al., 2016). However, the effect of bafilomycin was not investigated in this previous study. Our data show that agents that block lysosomal acidification are sufficient to prevent chitosan from inducing a type I IFN response. It would be interesting to test whether bafilomycin can prevent chitosan from inducing early mitochondrial changes in macrophages. Our data are also consistent with the notion that the intensified release of IL-1 α by IFN- β can suppress low-level inflammasome induction of PGE₂ (McNab et al., 2015). Conversely, chitosans that induce an overwhelming release of lysosomal content led to robust activation of the inflammasome and IL-1 β secretion, which can out-compete extracellular IL-1 α leading to COX-2 activation, PGE₂ generation, and suppress type 1 IFN secretion (McNab et al., 2015).

It is interesting to note that LC3-II co-localized with the GCS (Figure 5.12). During bacterial intracellular infection, galectin-3, 8 and 9 detect damaged vesicles by recognizing lysosomal glycans that are exposed to the cytosol and galectin-8 targets them for autophagy as a means to restrict pathogen proliferation following infection (Paz et al., 2010; Thurston et al., 2012). Our results suggest that galectin-3 can sense vesicles damaged by chitosan and also provide evidence that chitosan-disrupted lysosomes are targeted to autophagosomes.

This study was conducted in a U937 macrophage model which is limited by prior exposure to PMA, which is known to enhance COX-2 expression and potentially induce type I but not type II IFN gene expression (Lu & Pitha, 2001; Medeiros, Peres-Buzalaf, Fortino Verdan, & Serezani, 2012). However, our findings are highly consistent, in terms of chitosan properties and concentration used, with previous findings by Bueter, Carroll, and respective colleagues who have reported the ability of chitosan to elicit type 1 IFN responses or activation the inflammasome in

primary macrophages or dendritic cells (Bueter et al., 2011; Bueter et al., 2014; Carroll et al., 2016). Furthermore, we previously showed that PMA-priming was necessary for chitosan (80% DDA, 130 kDa, Block-acetylated) to induce CXCL10 expression in unpolarised human primary macrophages (Fong et al., 2015). Hence, it is possible that chitosan may only trigger a type I IFN response *in vivo* when phagocytosed by activated macrophages. Primary dendritic cells produced *in vitro* by extended culture in GM-CSF were able to respond to a partly acetylated chitosan with IFN- β release (Carroll et al., 2016). These data suggest that tissue niches where GM-CSF or other dendritic cell polarization factors are present will facilitate chitosan-induced type I IFN when chitosan is administered at the optimal structure and dose.

We found that chitosan stimulates IL-1ra release through paracrine type 1 IFN activity. Although 80% DDA block acetylated chitosans were identified as effective adjuvants for vaccine therapy (Carroll et al., 2016; Jean et al., 2009), our work suggests that chitosan-mediated type 1 IFN responses may have other important therapeutic benefits in context of regenerative medicine. For instance, type 1 IFNs play important role in skin reepithelization following wounding (Gregorio et al., 2010). Others have also shown that type 1 IFN promotes IL-1ra expression in liver tissues to yield a protective effect against fibrosis (Roh et al., 2014). In osteochondral repair, IL-1ra is the physiological inhibitor of IL-1 β , an important cytokine that contributes to the development of cartilage breakdown and osteoarthritis (Iqbal & Fleischmann, 2007). Although intra-articular type I IFN is detected in joints with chronic rheumatoid arthritis (Tak, 2004), IFN- β was previously tested in several clinical trials as a therapeutic to suppress joint inflammation (van Holten et al., 2005). Further work is needed to determine whether chitosan can be used to induce therapeutic type 1 IFN responses that are clinically beneficial for tissue engineering and wound repair. Our data highlight the importance of using lower doses to elicit IL-1ra release.

Chitosan has robust immunomodulatory properties that can have pivotal effects on the performance of a biomedical device. The unique chitosan library generated in this study highlights the potential to fine-tune chitosan use, in terms of dose or structural properties, to bring forth, or shun specific immunomodulatory responses by macrophages in order to improve the performance of chitosan-based biomedical devices. These findings provide new advancement on understanding the immunological properties of chitosan, which will contribute to a better use of chitosan in a widespread of biomedical applications

5.5 Experimental procedures

Reagents

RPMI-1640, fetal bovine serum (FBS), LysoTracker® Green DND-26, Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgGs and Hoechst 33342 were purchased from Thermo Fisher Scientific (Burlington, ON, Canada). Recombinant human IL-4, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , neutralizing antibodies against IFN- α (Clone MMHA-11) and IFN- β (#AF814), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits for IL-1 β , IL-1ra and CXCL10/IP-10 were purchased from R&D Systems (Minneapolis, MN, USA). Express ELISA kits for PGE₂ were purchased from Cayman chemical (Ann Arbor, MI, USA). Antibodies for phosphorylated STAT-1 (#7649, Tyr701, clone D4A7), STAT-1 (#9172), LC3A/B (#12741, Clone D3U4C), Alexa Fluor 647-conjugated LC3A/B (#13394), β -Actin and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-rabbit secondary antibodies were purchased from New England Biolabs (Cell Signaling Technologies, Pickering, ON, Canada). Antibodies for phosphorylated STAT-2 (#07-224, Tyr689) and STAT-2 (#07-140) were purchased from EMD Millipore (Etobicoke, ON, Canada). Mouse monoclonal antibody for Galectin-3 (Clone B2C10) was purchased from BD Biosciences (Mississauga, ON, Canada). EDTA-free Complete™ protease inhibitor cocktail was purchased from Roche (Laval, QC, Canada). RITC, Mouse isotype IgG1 (Clone MOPC-21), LPS (from *Salmonella typhosa*), PGE₂, PMA, chloroquine, bafilomycin, Leu-Leu methyl ester hydrobromide (LLOME), Actinomycin D, Cyclohexamide and all other chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada).

Generation of the chitosan library

Chitosans (endotoxin units <500 EU.g⁻¹, protein content <0.2%, heavy metals < 5 ppm) with 82% DDA, block acetylation, and M_n 188 kDa (termed 80-190K-B), or 98% DDA and M_n 113 kDa (termed 98-110K) were provided by BioSyntech (now Smith & Nephew, Mississauga, ON, Canada). 98% DDA and 80% DDA block-acetylated chitosans with target M_n of 1, 3, 5 or 10 kDa were obtained through nitrous acid depolymerisation of the 98-110K and 80-190K-B chitosan, respectively, as previously described (Lavertu et al., 2006). 60 and 80% DDA random-acetylated chitosans were generated from a starting chitosan (89.6% DDA and M_n 151 kDa) that was deacetylated to 98% DDA using two consecutive hot alkaline treatments (25% NaOH (w/v), 110°C, 30 minutes), then nitrous acid-depolymerised to target M_n of 1, 3, 5 or 10 kDa. The 98% DDA

chitosans with different M_n were reacylated to 60 or 80% DDA using acetic anhydride as previously described (Lavertu et al., 2012). The depolymerisation and reacylation reactions were stopped by addition of 1M NaOH until alkaline pH was reached. Alkaline-insoluble chitosans above 10 kDa precipitated and were extensively washed in double-deionized water (ddH₂O) by repeated centrifugation and resuspension until the supernatant reached neutral pH. Chitosans below 10kDa were dialyzed (Biotech CE MWCO 100-500 Da, Spectrum Laboratories, CA, USA) five times against ddH₂O over 48 hours. Free base chitosans were flash-frozen in liquid nitrogen and freeze-dried. Selected chitosans were labelled to 0.5% mol RITC per mol chitosan as previously described (Ma, O. et al., 2008). All reactions were performed using depyrogenized glassware and endotoxin-free reagents. Chitosans were characterized for DDA, M_n and weight-average molecular weight (M_w) using ¹H NMR and GPC as described previously (Lavertu et al., 2003; Nguyen et al., 2009). PDI was calculated as M_w / M_n . Chitosans were solubilized at 5 mg.mL⁻¹ in dilute HCl (resulting in 90% protonation), 0.22 µm filter-sterilized and kept at -80°C until use.

Macrophage differentiation and chitosan stimulation

U937 cells (ATCC # CRL-15932.2) were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA), were maintained and differentiated to macrophages as described previously (Fong et al., 2015). Briefly, U937 macrophages were differentiated in RPMI-1640 supplemented 10% FBS and 100 nM PMA for 72 hours, manually resuspended, and reseeded at a density of 5×10^5 cells.cm⁻² in 24-well plates in 100 nM PMA-containing medium overnight. Macrophages were stimulated for 24 hours with 5, 50 or 150 µg/mL of each chitosan, or with 100 ng/mL LPS, 20 ng/mL IFN-γ or 20 ng/mL IL-4 as controls. In other experiments, macrophages were stimulated for 24 hours in presence of 5 or 50 µg/mL 98-10K chitosan in presence of 100 µM Chloroquine or 100 nM Bafilomycin. Following stimulation, the macrophage conditioned medium (CM) was centrifuged at 200 g for 10 minutes and stored at -80°C until use.

Analysis of cell conditioned medium for cytokines, PGE₂ and lactate dehydrogenase

Macrophage CM was analyzed by ELISA for IL-1β, IL-1ra, CXCL10 and PGE₂ concentration according to the manufacturer's instructions. Leakage of cytosolic LDH into the macrophage CM was determined against an LDH standard curve using a colorimetric LDH assay (Clontech, Mountain View, CA, USA). Cytotoxicity was reported as the percentage of LDH

leakage in the CM = (LDH activity in the CM of the sample)/(total LDH activity in the cell lysate and CM of non-stimulated cells).

Immunoblotting

For analyses of STAT-1 and STAT-2 phosphorylation, cells were rinsed in cold PBS and lysed on ice in buffer containing 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2 mM Na_3VO_4 , 10 mM NaF, 1% Triton-X 100 and protease inhibitors. For analysis of LC3 expression, cells were rinsed in cold PBS and lysed on ice in buffer containing 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.04% Igepal CA-630, 2 mM EDTA, 0.5% sodium deoxycholate, 2 mM PMSF and protease inhibitors. Lysates were cleared by centrifugation at 21,000 g and kept at -80°C until use.

40 μg of protein was separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to PVDF membranes. Membranes were blocked for 1 hour in 5% w/v BSA in Tris-buffered saline with Tween-20, probed overnight at 4°C with primary antibody, and incubated with HRP-conjugated secondary antibodies for 1 hour. Bands were detected using a chemiluminescent system (ECL, GE Healthcare, Baie d'Urfe, QC, Canada). Band densitometry was carried out using Image J.

Immunohistofluorescence of Galectin-3, LC3 and confocal microscopy analyses

Macrophages were seeded in 8-chamber Labteks and stimulated with the 98-10K-RITC or 80-10K-R-RITC chitosans for 6, 10 or 18 hours in presence or absence of 100 nM Bafilomycin in medium with 100 nM PMA. Following stimulation, cells were fixed in ice-cold methanol for 15 minutes, incubated 1 hour in 5% normal donkey serum/0.3% Triton-X 100/PBS, followed by overnight incubation at 4°C with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-Galectin-3 and 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Alexa Fluor 647-conjugated anti-LC3A/B, then further incubated with Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-mouse antibodies to detect mouse monoclonal anti-Galectin-3 for 1 hour at room temperature. After washes in PBS, cells were counterstained with Hoechst 33342 and mounted in Mowiol.

Confocal imaging was performed using an Olympus FV1000 microscope using a 40X objective. Fluorophore signal detection was performed using sequential excitation/emission bandwidth 405 nm/425-475 nm (Hoechst 33342), 488 nm/500-530 nm (Alexa Fluor 488), 543 nm/555-625 (RITC), 635 nm/650 nm (Alexa Fluor 647). Imaged cells were analyzed for the presence of GCS, which were identified as structures where RITC-chitosan and Galectin-3

colocalized in vesicles greater than 1.7 μm in diameter. For each condition, four random fields were analyzed per Labtek chamber and averaged to produce N=4 measures per condition from 4 independent cultures.

Flow cytometry analysis

Macrophages were stimulated with 2.5 mM LLoME, 5 or 50 $\mu\text{g/mL}$ 98-10K or 80-10K-R chitosan for 24 hours. Cells were then stained with 100 nM LysoTracker for 2 hours according to the manufacturer's instruction. After washes, cells were analyzed using a FACSCalibur. Twenty thousand events were analyzed and data are reported as mean fluorescence intensity (MFI). The experiment was repeated in three independent cultures to generate N=3 measures.

Statistical analyses

Data are shown as mean \pm standard error of the mean. Statistical analyses were performed using Statistica (Statsoft, Tulsa, OK, USA). The Factorial ANOVA General Linear Model (GLM) with Fisher's Least Square Difference post-hoc analysis was used to determine differences in cytokine release, PGE₂ generation, and LDH leakage due to chitosan type and dose level as the categorical predictors (N=4 independent cultures). The GLM with Fisher's Least Square Difference was used to determine differences in cytokine concentration, LC3-II/ β -Actin band density, LysoTracker MFI, and GCS number as a function of treatment condition (98-10K chitosan, 80-10K-R chitosan, bafilomycin, chloroquine, neutralizing antibodies or PGE₂) (N=3 to 4 independent cultures).

5.6 Author contribution

Conceptualization: DF, CDH, SS, ML; Methodology: DF, CDH, ML, PGG; Validation: DF, PGG, APC, TM, CDH; Investigation: DF, PGG, APC, TM; Formal analysis: DF, CDH; Writing – Original Draft: DF, CDH; Writing – Review & Editing: DF, CDH, SS; Visualization: DF, CDH; Supervision: CDH; Project Administration: CDH; Funding acquisition: CDH. All authors read and approved the final version of the manuscript.

5.7 Acknowledgements

We would like to thank Dr. Vincent Darras, Dr. Nicolas Tran-Khan for experimental advice regarding to chitosan characterization and confocal microscopy analysis, Gaoping Chen and Jessica Guzman-Morales for technical assistance, and Julie Tremblay for quality assurance. This work was funded by the Canadian Institute of Health Research (MOP 303615-BME). Salary support was from the Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQ-S, CDH), Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies (FRQ-NT, DF), and NSERC summer scholarships (PGG, TM).

5.8 Conflicts of interest

CDH is a shareholder, on the Board of Directors and holds a research contract with Ortho RTi, and holds funds from the Canadian Institutes of Health Research, Fonds de la Recherche en Santé du Québec and Natural Sciences and Engineering Council of Canada. SS holds funds from the Canadian Institutes of Health Research and Canadian Glycomics Networks (Networks of Centre of Excellence of Canada). ML is a shareholder of Ortho RTi. All other authors have no competing interests to declare.

5.9 References

- Aiba, S. (1992). Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. *Int J Biol Macromol* 14, 225-228.
- Almeida, C.R., Serra, T., Oliveira, M.I., Planell, J.A., Barbosa, M.A., and Navarro, M. (2014). Impact of 3-D printed PLA- and chitosan-based scaffolds on human monocyte/macrophage responses: unraveling the effect of 3-D structures on inflammation. *Acta Biomaterialia* 10, 613-622.
- Bueter, C.L., Lee, C.K., Rathinam, V.A., Healy, G.J., Taron, C.H., Specht, C.A., and Levitz, S.M. (2011). Chitosan but not chitin activates the inflammasome by a mechanism dependent upon phagocytosis. *J Biol Chem* 286, 35447-35455.
- Bueter, C.L., Lee, C.K., Wang, J.P., Ostroff, G.R., Specht, C.A., and Levitz, S.M. (2014). Spectrum and mechanisms of inflammasome activation by chitosan. *Journal of Immunology* 192, 5943-5951.

- Carroll, E.C., Jin, L., Mori, A., Munoz-Wolf, N., Oleszycka, E., Moran, H.B., Mansouri, S., McEntee, C.P., Lambe, E., Agger, E.M., et al. (2016). The Vaccine Adjuvant Chitosan Promotes Cellular Immunity via DNA Sensor cGAS-STING-Dependent Induction of Type I Interferons. *Immunity* 44, 597-608.
- Fong, D., Ariganello, M.B., Girard-Lauziere, J., and Hoemann, C.D. (2015). Biodegradable chitosan microparticles induce delayed STAT-1 activation and lead to distinct cytokine responses in differentially polarized human macrophages in vitro. *Acta Biomaterialia* 12, 183-194.
- Gorzelanny, C., Poppelmann, B., Pappelbaum, K., Moerschbacher, B.M., and Schneider, S.W. (2010). Human macrophage activation triggered by chitotriosidase-mediated chitin and chitosan degradation. *Biomaterials* 31, 8556-8563.
- Gregorio, J., Meller, S., Conrad, C., Di Nardo, A., Homey, B., Lauerma, A., Arai, N., Gallo, R.L., Digiovanni, J., and Gilliet, M. (2010). Plasmacytoid dendritic cells sense skin injury and promote wound healing through type I interferons. *J Exp Med* 207, 2921-2930.
- Gudmundsdottir, S., Lieder, R., Sigurjonsson, O.E., and Petersen, P.H. (2015). Chitosan leads to downregulation of YKL-40 and inflammasome activation in human macrophages. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*.
- Guzman-Morales, J., Ariganello, M.B., Hammami, I., Thibault, M., Jolicoeur, M., and Hoemann, C.D. (2011). Biodegradable chitosan particles induce chemokine release and negligible arginase-1 activity compared to IL-4 in murine bone marrow-derived macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 405, 538-544.
- Hoemann, C.D., Chen, G., Marchand, C., Tran-Khanh, N., Thibault, M., Chevrier, A., Sun, J., Shive, M.S., Fernandes, M.J., Poubelle, P.E., et al. (2010). Scaffold-guided subchondral bone repair: implication of neutrophils and alternatively activated arginase-1+ macrophages. *The American Journal of Sports Medicine* 38, 1845-1856.
- Iqbal, I., and Fleischmann, R. (2007). Treatment of osteoarthritis with anakinra. *Curr Rheumatol Rep* 9, 31-35.
- Jean, M., Smaoui, F., Lavertu, M., Methot, S., Bouhdoud, L., Buschmann, M.D., and Merzouki, A. (2009). Chitosan-plasmid nanoparticle formulations for IM and SC delivery of recombinant FGF-2 and PDGF-BB or generation of antibodies. *Gene therapy* 16, 1097-1110.

- Klionsky, D.J., Abeliovich, H., Agostinis, P., Agrawal, D.K., Aliev, G., Askew, D.S., Baba, M., Baehrecke, E.H., Bahr, B.A., Ballabio, A., et al. (2008). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* 4, 151-175.
- Lamarque, G., Viton, C., and Domard, A. (2004). Comparative study of the first heterogeneous deacetylation of alpha- and beta-chitins in a multistep process. *Biomacromolecules* 5, 992-1001.
- Lavertu, M., Darras, V., and Buschmann, M.D. (2012). Kinetics and efficiency of chitosan reacetylation. *Carbohydr Polym* 87, 1192-1198.
- Lavertu, M., Methot, S., Tran-Khanh, N., and Buschmann, M.D. (2006). High efficiency gene transfer using chitosan/DNA nanoparticles with specific combinations of molecular weight and degree of deacetylation. *Biomaterials* 27, 4815-4824.
- Lavertu, M., Xia, Z., Serreqi, A.N., Berrada, M., Rodrigues, A., Wang, D., Buschmann, M.D., and Gupta, A. (2003). A validated ^1H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *J Pharm Biomed Anal* 32, 1149-1158.
- Lu, R., and Pitha, P.M. (2001). Monocyte differentiation to macrophage requires interferon regulatory factor 7. *J Biol Chem* 276, 45491-45496.
- Ma, O., Lavertu, M., Sun, J., Nguyen, S., Buschmann, M.D., Winnik, F.M., and Hoemann, C.D. (2008). Precise derivatization of structurally distinct chitosans with rhodamine B isothiocyanate. *Carbohydr Polym* 72, 616-624.
- McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., and O'Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 15, 87-103.
- Medeiros, A., Peres-Buzalaf, C., Fortino Verdan, F., and Serezani, C.H. (2012). Prostaglandin E2 and the suppression of phagocyte innate immune responses in different organs. *Mediators of Inflammation* 2012, 327568.
- Nguyen, S., Winnik, F.M., and Buschmann, M.D. (2009). Improved reproducibility in the determination of the molecular weight of chitosan by analytical size exclusion chromatography. *Carbohydr Polym* 75, 528-533.

- Oliveira, M.I., Santos, S.G., Oliveira, M.J., Torres, A.L., and Barbosa, M.A. (2012). Chitosan drives anti-inflammatory macrophage polarisation and pro-inflammatory dendritic cell stimulation. *Eur Cell Mater* 24, 136-153.
- Paz, I., Sachse, M., Dupont, N., Mounier, J., Cederfur, C., Enninga, J., Leffler, H., Poirier, F., Prevost, M.C., Lafont, F., and Sansonetti, P. (2010). Galectin-3, a marker for vacuole lysis by invasive pathogens. *Cellular Microbiology* 12, 530-544.
- Platanias, L.C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5, 375-386.
- Porporatto, C., Bianco, I.D., Riera, C.M., and Correa, S.G. (2003). Chitosan induces different L-arginine metabolic pathways in resting and inflammatory macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 266-272.
- Roh, Y.S., Park, S., Kim, J.W., Lim, C.W., Seki, E., and Kim, B. (2014). Toll-like receptor 7-mediated type I interferon signaling prevents cholestasis- and hepatotoxin-induced liver fibrosis. *Hepatology* 60, 237-249.
- Simeone, R., Sayes, F., Song, O., Groschel, M.I., Brodin, P., Brosch, R., and Majlessi, L. (2015). Cytosolic access of *Mycobacterium tuberculosis*: critical impact of phagosomal acidification control and demonstration of occurrence in vivo. *PLoS Pathogens* 11, e1004650.
- Stanish, W.D., McCormack, R., Forriol, F., Mohtadi, N., Pelet, S., Desnoyers, J., Restrepo, A., and Shive, M.S. (2013). Novel scaffold-based BST-CarGel treatment results in superior cartilage repair compared with microfracture in a randomized controlled trial. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume* 95, 1640-1650.
- Sugiyama, H., Hisamichi, K., Sakai, K., Usui, T., Ishiyama, J.I., Kudo, H., Ito, H., and Senda, Y. (2001). The conformational study of chitin and chitosan oligomers in solution. *Bioorg Med Chem* 9, 211-216.
- Tak, P.P. (2004). IFN-beta in rheumatoid arthritis. *Frontiers in Bioscience* 9, 3242-3247.
- Thibault, M., Astolfi, M., Tran-Khanh, N., Lavertu, M., Darras, V., Merzouki, A., and Buschmann, M.D. (2011). Excess polycation mediates efficient chitosan-based gene transfer by promoting lysosomal release of the polyplexes. *Biomaterials* 32, 4639-4646.

Thurston, T.L., Wandel, M.P., von Muhlinen, N., Foeglein, A., and Randow, F. (2012). Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* 482, 414-418.

Tommeraaas, K., Varum, K.M., Christensen, B.E., and Smidsrod, O. (2001). Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans. *Carbohydr Res* 333, 137-144.

Ueno, H., Nakamura, F., Murakami, M., Okumura, M., Kadosawa, T., and Fujinag, T. (2001). Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages. *Biomaterials* 22, 2125-2130.

van Holten, J., Pavelka, K., Vencovsky, J., Stahl, H., Rozman, B., Genovese, M., Kivitz, A.J., Alvaro, J., Nuki, G., Furst, D.E., et al. (2005). A multicentre, randomised, double blind, placebo controlled phase II study of subcutaneous interferon beta-1a in the treatment of patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 64, 64-69.

Varum, K.M., Anthonsen, M.W., Grasdalen, H., and Smidsrod, O. (1991). High-Field NMR-Spectroscopy of Partially N-Deacetylated Chitins (Chitosans) .1. Determination of the Degree of N-Acetylation and the Distribution of N-Acetyl Groups in Partially N-Deacetylated Chitins (Chitosans) by High-Field NMR-Spectroscopy. *Carbohydr Res* 211, 17-23.

Vasconcelos, D.P., Fonseca, A.C., Costa, M., Amaral, I.F., Barbosa, M.A., Aguas, A.P., and Barbosa, J.N. (2013). Macrophage polarization following chitosan implantation. *Biomaterials* 34, 9952-9959.

Wedmore, I., McManus, J.G., Pusateri, A.E., and Holcomb, J.B. (2006). A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: experience in current combat operations. *The Journal of Trauma* 60, 655-658.

5.10 Supplemental figures

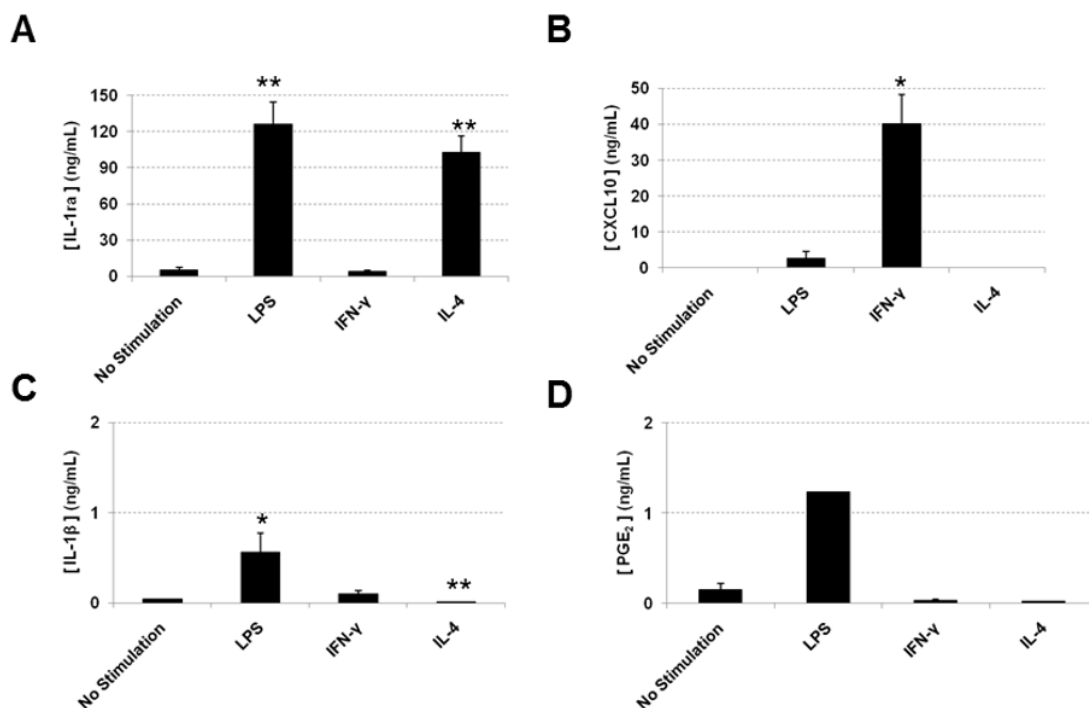


Figure 5.7. Positive controls for cytokine array, showing differential release of (A) IL-1ra and (B) CXCL10, (C) IL-1 β and (D) PGE₂ by macrophages after 24 hours of stimulation with 100 ng/mL LPS, 20 ng/mL IFN- γ or 20 ng/mL IL-4. Related to Figure 5.3. Data show mean \pm standard error mean. Asterisks indicate significant differences between treated and unstimulated cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

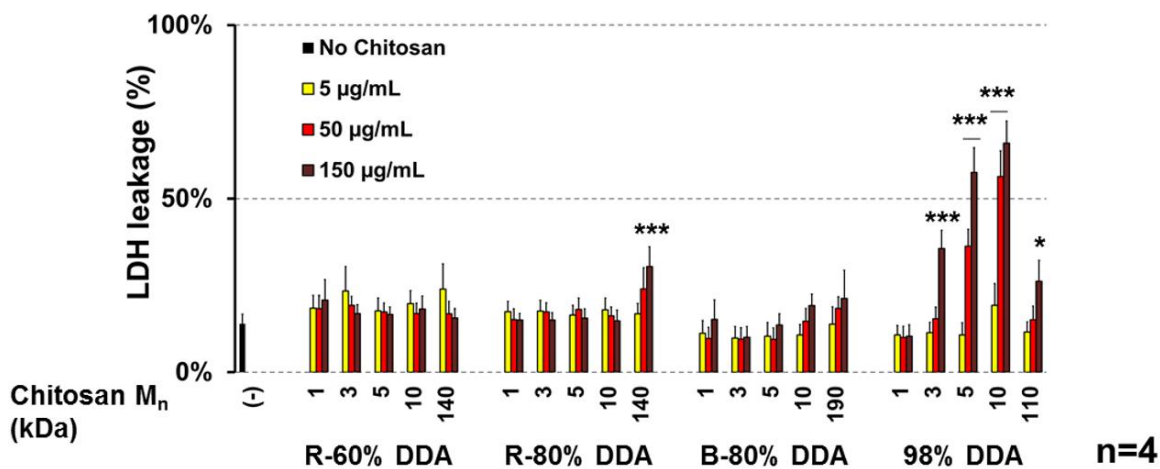


Figure 5.8. 98% DDA chitosans stimulate macrophages induce higher LDH leakage than partly-acetylated chitosans. Related to Figure 5.3. LDH leakage from U937 macrophages following stimulation with the chitosan library after 24 hours. Data show mean \pm standard error mean. Asterix indicate significant differences between chitosan-treated cells and unstimulated cells. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

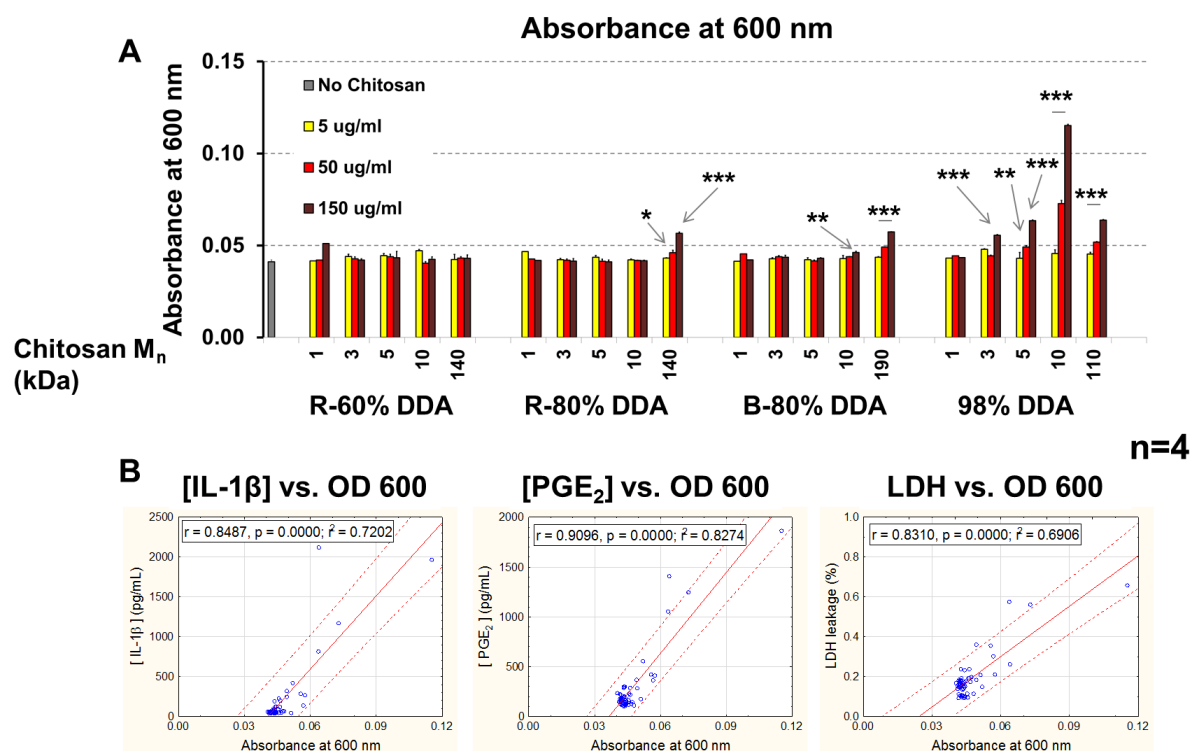


Figure 5.9. Chitosan tendency to precipitate and aggregate correlate with IL-1 β , PGE₂ and LDH leakage. Related to Figure 5.3. (A) Absorbance from turbidity assay showing that 98% DDA chitosans have a greater tendency to precipitate and aggregate at neutral pH than partly-acetylated chitosans. (B) Linear regression showing correlation for IL-1 β and PGE₂ release and LDH leakage as a function of chitosan tendency to precipitate and aggregate. Red-dotted lines indicate the 95% confidence interval. Data show mean \pm standard error mean. Asterisks indicate significant differences between OD₆₀₀ of the chitosan solutions vs. OD₆₀₀ of the solvent only. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

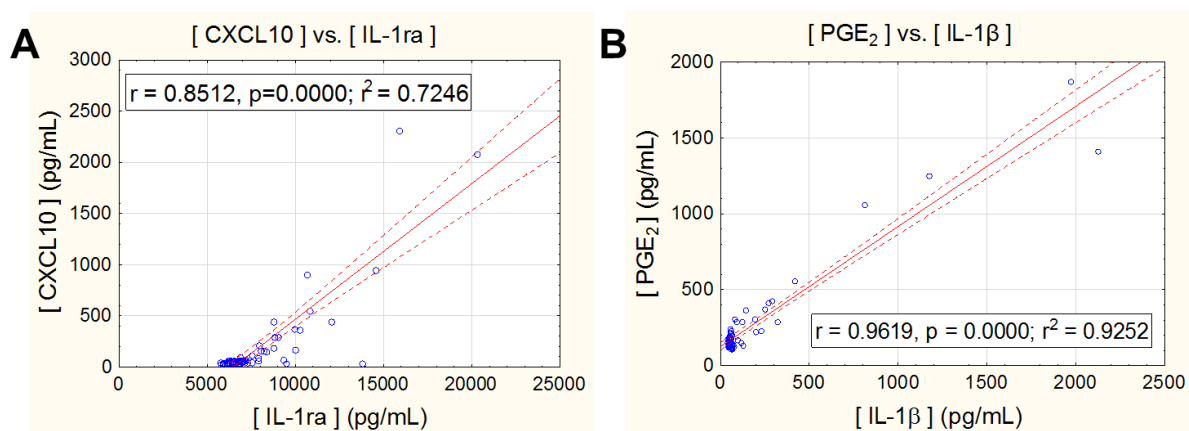


Figure 5.10. Chitosan either co-stimulates IL-1ra and CXCL10 release and co-stimulates IL-1β and PGE₂ release. Related to Figure 5.3. Linear regression showing correlation for (A) CXCL10 and IL-1ra release or (B) PGE₂ and IL-1β. Red-dotted lines indicate the 95% confidence interval.

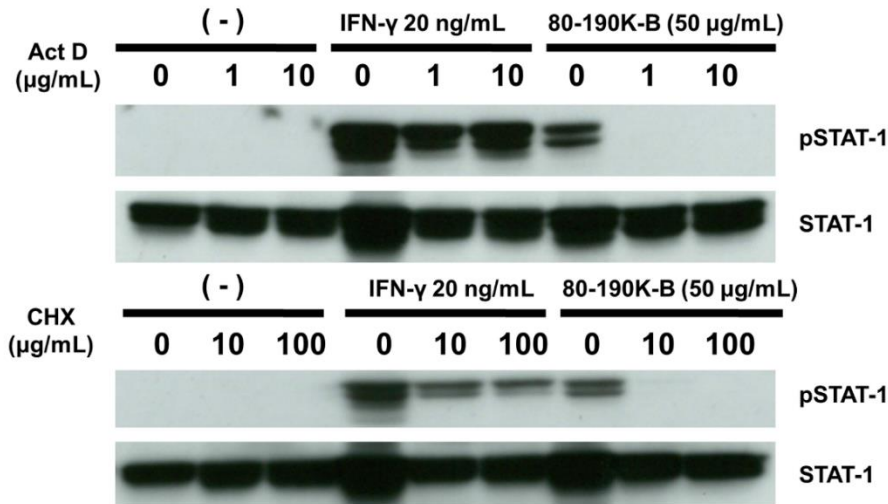
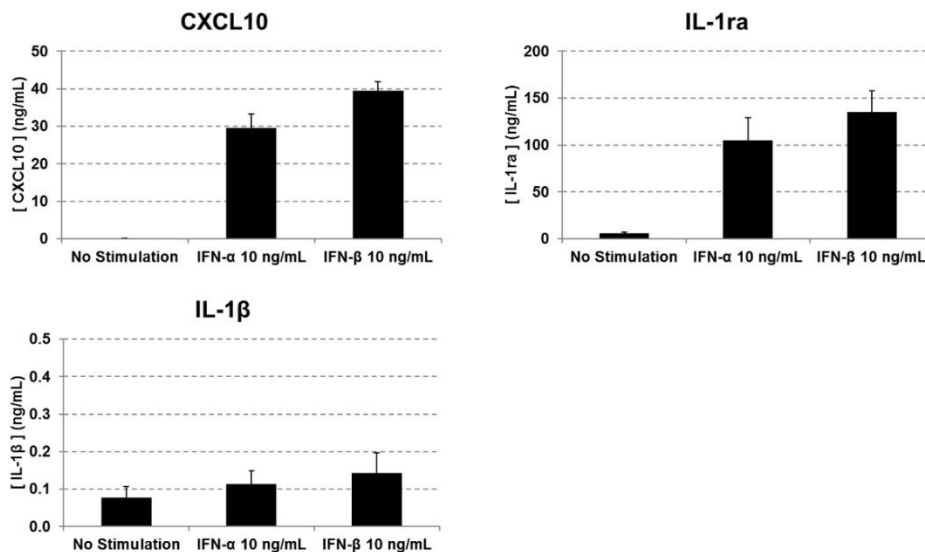
A**B**

Figure 5.11. Chitosan-mediated STAT-1 phosphorylation is dependent on *de novo* gene expression or protein synthesis. Related to Figure 5.4. U937 macrophages were stimulated with 50 µg/mL 80-190K-B chitosan alone, or with chitosan in presence of A) Actinomycin D or Cyclohexamide for 24 hours. Cell extracts were analyzed for STAT-1 phosphorylation and non-phosphorylated STAT-1 protein expression by Western Blot. IFN-γ was used as a positive control for STAT-1 phosphorylation. B) CXCL10, IL-1ra and IL-1β release following stimulation with IFN-α or IFN-β. Data show mean ± standard error mean for n=3 experiments.

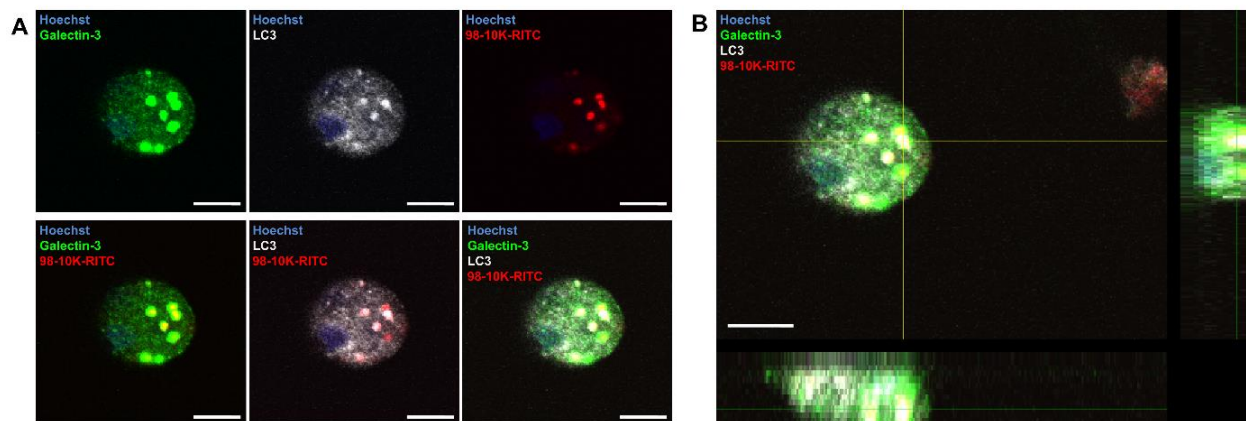


Figure 5.12. Chitosan 98-10K induces the formation of GCS that co-localize with LC3. Related to Figure 5.6. A) Confocal image taken at the middle of a cell (multinucleated cell). Galectin-3 (green), LC3 (grey) and RITC-chitosan (red) co-localize together in vesicles (identified as GCS). B) Confocal image showing the exact same cell shown in A, but also showing the localization of the GCS inside the cell. Scale bar = 10 μ m.

CHAPITRE 6 RÉSULTATS SUPPLÉMENTAIRES : INFLUENCE DES MÉTHODES DE DÉTACHEMENTS DES CELLULES SOUCHES MÉSENCHYMATEUSES SUR LEUR CAPACITÉ DE MIGRATION ET D'ADHÉSION CELLULAIRE DANS DES ESSAIS IN VITRO.

6.1 Préambule

Ce chapitre présente des travaux supplémentaires qui ont été réalisés dans le cadre de cette thèse. Les travaux présentés étudient l'influence des méthodes de détachements des MSC sur l'expression à la surface de la cellule du récepteur PDGF-BB et l'intégrine, et leur capacité à répondre au facteur chimiotactique PDGF-BB et à adhérer aux surfaces recouvertes de l'atélocollagène. Pour ce travail, j'aimerais remercier la contribution de M. Nicholas Duceppe dans l'obtention et l'analyse des résultats. J'aimerais également remercier la contribution technique de M. Serge Sénéchal pour l'assistance aux analyses de cytométrie en flux.

6.2 Introduction

Une stratégie envisagée pour la réparation du cartilage consiste à concevoir des approches thérapeutiques qui stimulent l'attraction de MSC endogènes dans les lésions ostéochondrales. Ces approches combinent souvent des facteurs solubles qui stimulent la migration des MSC. Les essais de migration Transwell sont couramment utilisés afin d'identifier ces différents facteurs solubles. Le principe de ces essais de migration a déjà été présenté dans la section 2.10.5 de cette thèse.

Étant donné que les MSC sont des cellules adhérentes, il est nécessaire de détacher ces cellules du pétri cellulaires afin de pouvoir réaliser l'essai de migration. En règle générale, les suspensions de MSC sont préparées en utilisant une solution de trypsine-éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) dont la concentration de trypsine varie entre 0.05% et 0.5% (p/v). La trypsine est une protéase capable de digérer les protéines transmembranaires impliquées dans l'adhésion aux substrats extracellulaire. En alternative, d'autres solutions protéolytiques commerciales (TrypLE ou l'Accutase) peuvent être utilisées pour le détachement des MSC en culture.

Tableau 6.1 : Résumé des méthodes de détachement cellulaires utilisées dans des essais de migration impliquant les MSC.

Méthode de détachement	Études
Méthode utilisant la trypsine dont la concentration n'est pas spécifiée.	(Chamberlain, Wright, Rot, Ashton, & Middleton, 2008; Fiedler, Etzel, & Brenner, 2004; Fiedler, Roderer, Gunther, & Brenner, 2002; Mishima & Lotz, 2008; Ozaki et al., 2007; Ruster, Grace, Seitz, Seifried, & Henschler, 2005)
0.05% Trypsine-EDTA	(Endres et al., 2010; Honczarenko et al., 2006; Thibault, M. M. et al., 2007; Von Luttichau et al., 2005)
0.25% Trypsine-EDTA	(Anton et al., 2012; Ponte et al., 2007; Sordi et al., 2005)
0.5% Trypsine-EDTA	(Kalwitz et al., 2010) (Ringe et al., 2007; Stich et al., 2008)
Tryp-LE & Accutase	(Garg et al., 2014)
PBS-EDTA	(Chamberlain et al., 2008; Garg et al., 2014)

Une étude récente a démontré que l'utilisation du TrypLE et de l'Accutase induit une dégradation des récepteurs de chimiokines présents à la surface des MSC (Garg et al., 2014). Par ce fait, les MSC affectées deviennent alors moins aptes à migrer aux différentes chimiokines. Les auteurs de cette étude ont proposé que des solutions sans protéases ou des tampons phosphate salin contenant uniquement de l'EDTA (PBS-EDTA) sont plus optimales pour le détachement des MSC car ils permettent un détachement adéquat des cellules tout en préservant l'intégrité des récepteurs transmembranaires. Une deuxième étude, comparant l'effet de la trypsine-EDTA (0.25% p/v) et du PBS-EDTA sur l'expression des récepteurs de chimiokines à la surface des MSC, a rapporté des observations similaires (Chamberlain et al., 2008). Ensemble, ces études suggèrent que l'utilisation de la trypsine, la protéase la plus couramment utilisée pour le détachement des MSC (Tableau 6.1), peut dramatiquement affecter l'intégrité des récepteurs à la surface des cellules et que cela peut influencer de manière significative le comportement des MSC dans des essais de migrations cellulaires. Toutefois, il demeure obscur comment la concentration ou le temps d'exposition de la trypsine sur les MSC influencent la capacité de ces cellules à répondre à des facteurs chimiotactiques.

Dans les expériences présentées dans ce chapitre, nous évaluons l'effet de différentes méthodes de détachement des MSC sur l'intégrité des récepteurs PDGF-R (Récepteur du PDGF-BB) et CD29. PDGF-R facilite la migration des MSC induites par PDGF-BB tandis que CD29 est l'intégrine $\beta 1$ impliquée dans l'adhésion des cellules au collagène. Nous avons comparé quatre méthodes de détachement : détachement avec de la trypsine EDTA 0.25% pour une période de 5 (TE5) ou 2 minutes (TE2); détachement en utilisant un tampon de dissociation cellulaire sans enzyme et de la trypsine-EDTA 0.05% pour une période de 30 secondes (CDB); détachement avec un traitement de PBS-EDTA 0.5 mM pour une période de 5 minutes (PE).

6.3 Matériels et méthodes

6.3.1 Réactifs

Le milieu de culture α -MEM (Milieu essentiel minimum de Eagle Alpha), la trypsine-EDTA (numéro de catalogue 25200072), le milieu de dissociation CDB (numéro de catalogue 13151014), l'anticorps Alexa Fluor 488 anti-IgG1 de souris et l'Hoechst 33342 proviennent de chez Life Technologies (Burlington, Ontario, Canada). Le sérum fœtal bovin (FBS) a été acheté chez Atlanta Biologics (Atlanta, Georgie, É-U). Le PDGF-BB recombinant humain provient de chez R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, É-U). L'atélocollagène était fourni par Smith & Nephew (Andover, MA, É-U). L'anticorps polyclonal de lapin anti-PDGF-R (Numéro de produit sc-432) provient de chez Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Californie, É-U). L'anticorps β -Actin provient de chez New England Biolabs (Cell Signaling Technologies, Pickering, Ontario, Canada). L'anticorps contrôle isotypique (Clone MOPC-1, isotype de souris IgG1), l'inhibiteur de trypsine *Soybean* (du *Glycine max*, numéro de catalogue T6522) et le reste des réactifs chimiques proviennent de chez Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada).

6.3.2 Cultures des MSC

Sous approbation des protocoles par les comités éthiques institutionnels, les MSC humaines dérivées de la moelle osseuse ont été fournies par l'institut en médecine régénératrice de l'université Texas A&M (Temple, Texas, É-U). Les MSC sont récoltés à partir de la crête iliaque de volontaires avec consentement en bonne santé (N=4, âgés entre 22 et 27 ans, deux hommes et deux femmes). Les cellules ont été caractérisées par le fournisseur par cytométrie en flux, où plus

de 98% des cellules exprimaient des marqueurs des MSC (CD29, CD44, CD90, CD105, CD166). Moins de 2% des cellules exprimaient des marqueurs associés aux cellules hématopoïétiques (CD14, CD34, CD36 et CD45). Les MSC au passage 2 ont été cultivées et maintenues dans un milieu de culture complet (CCM) composé d' α -MEM contenant 16% v/v de FBS, 4 mM de L-glutamine, 22 mM de bicarbonate de sodium, 100 unités/mL de Penicilline et 100 μ g/mL de Streptomycine. Les cellules ont été cultivées dans des flacons T 75 cm² (T75) à 10,000 cellules par T75. Le milieu de culture a été remplacé tous les deux jours et le passage des cellules a été réalisé de manière hebdomadaire.

6.3.3 Essais de migration Transwell

Les essais de migrations ont été réalisés avec des chambres de migration Transwell contenant des pores de 8 μ m (Corning, Cambridge, Massachusetts, É-U). Le jour avant les essais de migration, les MSC ont d'abord été récupérées en utilisant de la trypsine-EDTA 0.25% etensemencées dans des T75 à une concentration de 300,000 cellules par flacon. Après une période d'adhésion de 8 heures dans du CCM, le CCM est enlevé et remplacé par du α -MEM contenant 0.5% FBS afin de rendre les cellules plus aptes à migrer vers le PDGF-BB (Thibault, M. M. et al., 2007).

Le lendemain, les MSC sont détachées des flacons en utilisant une des quatre méthodes de détachement mentionnées ci-dessous et résumé dans le tableau 6.2. Brièvement, les MSC ont été rincées avec du PBS sans Ca²⁺ ou Mg²⁺ pour ensuite être détachées en utilisant une des quatre méthodes :

- 1) **Méthode TE5** : Détachement obtenu suite à un traitement avec de la trypsine-EDTA 0.25% pour une période de 5 minutes.
- 2) **Méthode TE2** : Détachement obtenu suite à un traitement avec de la trypsine-EDTA 0.25% pour une période de 2 minutes.
- 3) **Méthode CDB** : Détachement obtenu suite à deux incubations de 2 minutes avec du tampon de dissociation cellulaire sans enzyme suivie d'un traitement avec de la trypsine-EDTA 0.05% (préparée par une dilution 1:5 de la trypsine-EDTA 0.25% avec du PBS) pour une période de 30 secondes. L'utilisation du tampon de dissociation cellulaire permet de réduire de manière reproductible le temps d'exposition à la trypsine nécessaire de 5 minutes à 30 secondes (Thibault, M. M. et al., 2007).

- 4) **Méthode PE :** Détachement obtenu suite à un traitement avec du PBS-EDTA 0.5 mM pour une période de 5 minutes.

Après les périodes d'incubation, 10 mL de CCM est ajouté directement aux flacons contenant soit le PBS-EDTA, la trypsine à 0.05 ou 0.25%. Les cellules sont ensuite récupérées dans différents tubes 50 mL et sont centrifugées à 190 g pour 5 minutes. Le culot cellulaire est resuspendu dans 4 mL de CMM contenant 1 mg/mL d'inhibiteur de trypsine. Le nombre de cellules récoltées et la viabilité cellulaire sont déterminés par l'utilisation d'un compteur cellulaire automatisé et par la technique d'exclusion du Bleu de Trypan (Countess, Life Technologies). Après comptage, les cellules étaient resuspendues dans du α -MEM sans FBS etensemencées dans les compartiments supérieurs des chambres de migration à 50,000 cellules viables par chambre. Les cellules sont ensuite mises en contact avec du milieu contenant uniquement du α -MEM (contrôle négatif), ou bien du α -MEM contenant 10 ng/mL de PDGF-BB pendant une période de 4 heures at 37°C.

Tableau 6.2 : Manipulations réalisées lors des quatre méthodes de détachement cellulaire évaluées dans ce chapitre.

Méthode	TE5	TE2	CDB	PE
Préparation cellulaire	Cellulesensemencées à 300,000 cellules par flacons dans des T75 pendant 8 heures. Incubation dans un milieu 0.5% sérum pendant 18 heures			
Prétraitement	Cellules rincées au PBS			
Méthode de détachement cellulaire	Exposition de 5 minutes à la trypsine-EDTA 0.25% à 37°C	Exposition de 5 minutes à la trypsine-EDTA 0.25% à 37°C	2 expositions de 2 minutes au tampon de dissociation à température ambiante Exposition de 30 secondes à la trypsine-EDTA 0.05% à 37°C	Exposition de 5 minutes au PBS-EDTA 0.5 mM à 37°C
Préparation de la suspension cellulaire	Ajout du 10 mL de CCM. Centrifugation			
	Resuspension dans 4 mL de CMM contenant 1 mg/mL d'inhibiteur de trypsine.			Resuspension dans 4 mL de CCM
	Compte cellulaire, centrifugation et resuspension dans du milieu α -MEM sans sérum pour les essais de migration et d'adhésion			

6.3.4 Coloration des cellules au Hoechst et quantification de la migration cellulaire

À la fin de la période de migration cellulaire, les chambres de migration sont rincées avec du PBS tiède et les cellules sont fixées dans du PBS contenant 1% v/v de glutaraldéhyde. Après lavage, le noyau des cellules (les cellules ayant migré ou non) est marqué avec 1 μ g/mL de Hoechst 33342. Les cellules restantes dans le compartiment supérieur sont enlevées à l'aide d'un coton-tige. Pour la quantification des cellules ayant migré, quatre champs aléatoires (770 x 1,030 μ m) de la surface

de la membrane poreuse étaient prises par microscopie en fluorescence et ensuite analysés à l'aide du logiciel Image J (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, É-U). Le nombre de noyaux présents, qui témoignent du nombre de cellules ayant migré, est déterminé par l'algorithme <<Particle analysis>>. Les noyaux adjacents sont départagés à l'aide de l'algorithme <<Watershed>>. La moyenne des comptes obtenus pour les quatre champs est déterminée afin d'estimer le nombre total de cellules ayant migré.

6.3.5 Essais d'adhésion cellulaires

Les essais d'adhésion cellulaires ont été réalisés dans des plaques de 96-puits non traités pour la culture cellulaire. Le jour avant l'essai d'adhésion, les plaques ont été recouvertes de 10 µg d'atélocollagène pendant 18 heures. Pour les essais de migration, les MSC sont détachées des pétris en utilisant les méthodes de détachements mentionnés dans la section 6.2. Après compte cellulaire, 10,000 cellules sontensemencées sur les puits (recouverts d'atélocollagène ou non). Les cellules sont incubées à 37°C pendant 1 heure et ensuite sont rincées trois dans du PBS. Les cellules sont ensuite fixées dans du PBS contenant 1% v/v de glutaraldéhyde. Le noyau des cellules est ensuite marqué avec 1 µg/mL de Hoechst 33342. La quantification des cellules adhérentes est réalisée à l'aide du logiciel Image J comme décrite dans la section précédente.

6.3.6 Buvarpage de type western pour l'analyse de l'expression de PDGF-R

Les MSC en culture ont été détachées ou non en utilisant les quatre différentes méthodes mentionnées dans la section 6.3.3. Après détachement et collecte dans les différents tubes, les cellules ont été lavées dans du PBS, centrifugées et lysées dans un tampon à base de Tris (TBS, 50 mM Tris pH 7.2, 150 mM NaCl) contenant 1% de Triton-X 100 et des inhibiteurs de protéase (Complete™, Roche, Laval, QC) pendant 20 minutes à 4°C. Selon un dosage de protéines par l'analyse Bradford, 10 µg de protéines ont été séparées par SDS-PAGE et transférées à des membranes de PVDF. Les membranes sont ensuite saturées dans du TBS contenant 5% de lait en poudre et 0.1% de Tween 20. Les membranes sont ensuite incubées en présence des anticorps anti-PDGF-R pendant 18 heures à 4°C. Après lavage et incubation avec des anticorps secondaires conjugués avec la HRP. Les anticorps sont détectés par un système de chimiluminescence. La densité des bandes du buvardage a été évaluée en utilisant le logiciel Image J (N=4 expériences distinctes avec N=3 donneurs).

6.3.7 Analyses de cytométrie en flux pour l'expression de CD29

Les MSC détachées avec les différentes méthodes mentionnées précédemment (50,000 cellules par condition) ont été bloquées dans 1% d'albumine de sérum bovin pendant 20 minutes. Ensuite, les cellules ont été incubées avec 0.5 µg d'anticorps anti-CD29 (Clone 12G10), ou bien un anticorps contrôle isotypique de souris IgG1 pour 30 minutes. Les cellules ont ensuite été incubées avec 0.5 µg d'anticorps anti-souris IgG1 conjugués avec l'Alexa Fluor 488. Les cellules marquées ont été analysées au cytomètre en flux (Cytomation, Denver, Colorado, É-U). Les résultats sont présentés en tant qu'intensité de fluorescence moyenne (MFI).

6.3.8 Analyses statistiques

Le modèle linéaire généralisée (GLM) avec test de Fisher post-hoc a été utilisée pour déterminer l'effet des méthodes de détachement cellulaire sur la migration des MSC au PDGF-BB, sur l'adhésion cellulaire, l'expression de PDGF-R en buvardage de type western et l'expression de CD29. L'effet du PDGF-BB sur la migration des MSC (en comparaison à l' α -MEM seul) a été déterminé par un test de Student.

6.4 Résultats

Récolte des cellules suivant le détachement des MSC

L'étape préliminaire d'ensemencement des MSC le jour avant l'essai de migration cellulaire nous a permis d'évaluer l'efficacité de chaque méthode de détachement pour récolter les cellules adhérentes des flacons T75. En supposant que le nombre de MSC dans chaque flacon est de 300,000 cellules, il a été observé que les méthodes TE2 et TE5 permettaient de récupérer 98 ± 4.5 % des cellules dans le flacon. 75.5 ± 5.4 % des cellules ont été récupérées en utilisant la méthode CDB. La méthode PE a été la méthode moins efficace pour récupérer les cellules du flacon, car uniquement 52.2 ± 6.2 % des cellules ont pu être récupérées ($p < 0.001$ PE vs. TE2 et $p < 0.01$ PE vs. CDB). Pour les quatre méthodes évaluées, une viabilité cellulaire excédant 90% a été obtenue.

La concentration de trypsine affecte l'expression de PDGF-R et la migration des MSC vers le facteur PDGF-BB

Les lysats provenant de suspensions cellulaires préparées en utilisant les méthodes TE5, TE2, CDB et PE ont été analysées pour l'intégrité de PDGF-R par buvardage de type western. Des lysats

provenant de cellules adhérentes non détachées ont été également analysés comme condition contrôle. En comparaison aux lysats cellulaires préparés par les méthodes CDB ou PE, les lysats de cellules détachés par la méthode TE5 présentent en moyenne une plus forte dégradation de PDGFR (Figure 6.1, $p < 0.05$ TE5 vs. CDB et PE). Les lysats provenant des MSC détachées avec les méthodes CDB ou PE ont montré des niveaux d'expression de PDGFR similaire aux lysats provenant de MSC intactes.

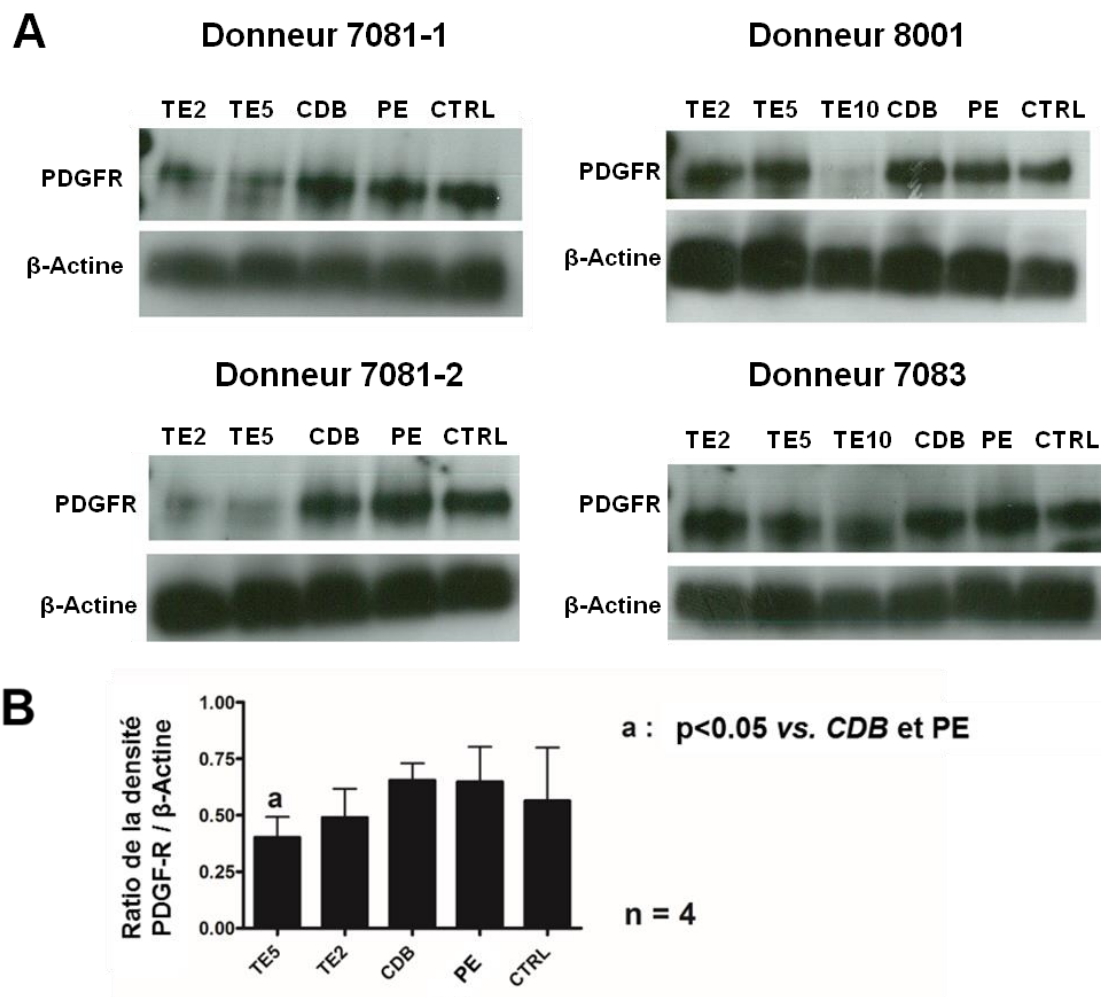


Figure 6.1 : Analyses de buvardage de type western montrant que les méthodes de détachement cellulaire à base de trypsine mènent à la dégradation de PDGFR chez les MSC humains. A) Buvardage de type western montrant l'expression de PDGFR et β -Actine chez les lysats cellulaires de MSC détachées en utilisant les méthodes TE2, TE5, CDB et PE, dans 4 expériences avec 3 donneurs. La condition TE10 indique un témoin positif où les MSC ont été détachées suite à une exposition de 10 minutes à la trypsine-EDTA 0.25%. B) Analyses densitométriques présentant la

moyenne du ratio de la densité PDGF-R/ β -Actine (N=4). L'étiquette CTRL correspond aux MSC qui ont été lysées directement dans le pétri sans être détachées. Les barres d'erreurs présentées correspondent à l'écart type.

Un premier contrôle réalisé après la période de migration est d'évaluer la distribution des cellules adhérentes à la surface de la membrane de la chambre de migration afin de s'assurer que celle-ci est homogène. Les MSC détachées en utilisant les méthodes TE5, TE2 et CDB ont adhéré de manière homogène à travers la membrane poreuse. En revanche, lorsque la méthode PE a été utilisée, les MSC ont eu tendance à s'agréger dans la chambre de migration, avec une morphologie « toile d'araignée ». Il est possible alors d'observer des zones sur le filtre poreux où aucune cellule n'a adhéré sur la membrane (Figure 6.2, onglet A).

La migration des MSC détachées par les méthodes TE5, TE2, CDB et PE au facteur de croissance PDGF-BB (10 ng/mL) a été mesurée (Figure 6.2, onglets B et C). La migration des cellules vers le milieu α -MEM sans sérum a été utilisée comme témoin négatif. Dans le cas des méthodes TE5, TE2 et CDB, entre 2300 et 2900 cellules ont migré en moyenne au contrôle négatif α -MEM. Lorsque la méthode PE a été utilisée, moins de MSC ont migré vers le α -MEM (Figure 6.2, onglets B et C, $p < 0.05$ PE vs. CDB et $p < 0.05$ PE vs. TE5).

L'effet chimiotactique de PDGF-BB sur les MSC était variable en fonction de la méthode de détachement utilisée. En comparaison à leur contrôle α -MEM respectif, le PDGF-BB a induit une augmentation de la migration des MSC par un facteur de 2 lorsque les cellules ont été détachées avec la méthode TE5 ($p = 0.11$ PDGF-BB vs. α -MEM) ou TE2 ($p < 0.05$ PDGF-BB vs. α -MEM). Lorsque les cellules ont été détachées avec la méthode PE ou CDB, le PDGF-BB a augmenté la migration des MSC par un facteur de 3.5 à 4 respectivement (Méthode PE: $p < 0.08$ PDGF-BB vs. α -MEM; méthode CDB: $p < 0.01$ PDGF-BB vs. α -MEM). Toutefois, le plus grand nombre de MSC ayant migré au PDGF-BB a été observé lorsque les cellules ont été détachées par la méthode CDB ($p < 0.01$ CDB vs. TE5, TE2 et PE).

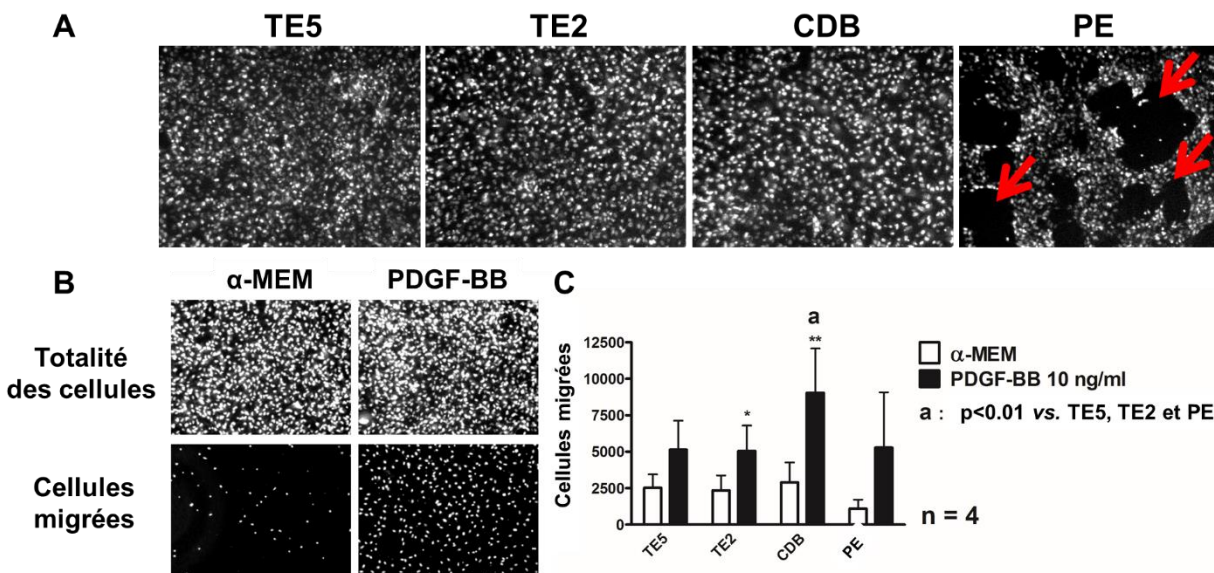


Figure 6.2 : Résultats des essais de migration Transwell. La migration des MSC au PDGF-BB est plus élevée lorsque les cellules sont détachées en utilisant la méthode CDB en comparaison aux méthodes TE5 et TE2. A) Images représentatives de l'adhésion des MSC qui ont été détachées en utilisant la méthode TE5, TE2, CDB ou PE. Les cellules détachées en utilisant la méthode TE5, TE2 ou CDB adhèrent de manière homogène sur la membrane des chambres de migration. Les cellules détachées en utilisant la méthode PE s'agregent. Les flèches rouges indiquent des espaces où les cellules n'ont pas adhéré. B) Images représentative des essais de migration avec des cellules détachées en utilisant la méthode CDB. Les images du haut présentent des champs contenant la totalité des cellules ensemencées dans la chambre. Les images du bas montrent des champs contenant uniquement les cellules ayant migré. C) Migration cellulaire estimée après 4 heures. Les astérisques indiquent les différences significatives entre les cellules migrant au PDGF-BB et l' α -MEM pour chaque méthode respective. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Les barres d'erreurs présentées correspondent à l'écart type.

La concentration de trypsine affecte l'expression en surface de CD29 et l'adhésion des MSC à l'atélocollagène.

Les MSC expriment le récepteur CD29 qui est l'intégrine qui permet l'adhésion des cellules au collagène. Dans notre analyse, CD29 a été détectée à la surface des MSC peu importe la méthode de détachement utilisée (Figure 6.3, onglet A). Toutefois, les méthodes TE5 et TE2 ont induit une

diminution de l'expression de CD29 en comparaison aux méthodes CDB et EDTA (Figure 6.3, onglets A et B, $p < 0.001$). Cette diminution de l'expression de CD29 corrèle avec la capacité d'adhésion des MSC sur l'atélcollagène (Figure 6.3, onglet C).

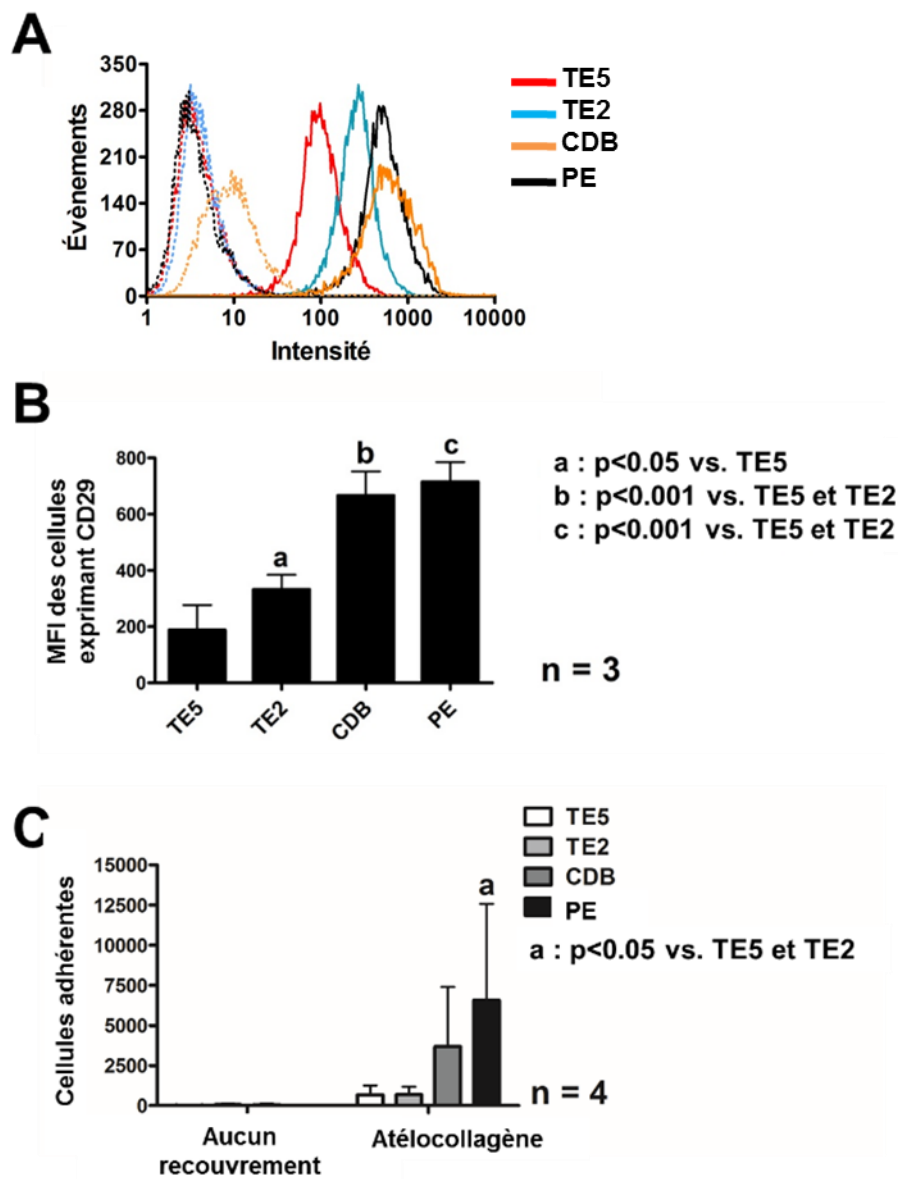


Figure 6.3 : Expression de CD29 et adhésion des MSC sur l'atélcollagène. A) Histogrammes représentatifs de cytométrie en flux de cellules détachées en utilisant la méthode TE5 (rouge), TE2 (bleu clair), CDB (noir) et PE (orange) marquées avec l'anti-CD29 (lignes pleines) ou le contrôle isotypique (lignes pointillées). B) MFI des MSC exprimant CD29. C) Moyenne du nombre de MSC

adhérentes obtenu lors des essais d'adhésion cellulaire sur des surfaces non traitées, ou recouvertes avec de l'atélocollagène. Les barres d'erreurs présentées correspondent à l'écart type.

6.5 Discussion et conclusions

Cette étude confirme l'hypothèse que des concentrations plus élevées de trypsine induit une dégradation significative des récepteurs à la surface des MSC. Cette dégradation est associée à une perte de la capacité des MSC à migrer au PDGF-BB et à s'adhérer aux surfaces recouvertes d'atélocollagène. En comparaison, les méthodes n'utilisant pas de trypsine (méthode PE) ou une concentration réduite de trypsine (méthode CDB) permettent d'obtenir des suspensions de MSC dont l'intégrité des récepteurs est maintenue. Ainsi, les cellules obtenues ont conservé une plus forte capacité de migrer au PDGF-BB et à s'adhérer aux surfaces recouvertes d'atélocollagène.

Les résultats présentés dans ce chapitre sont cohérents avec les précédentes études par Garg, Chamberlain et collègues respectifs rapportant que l'utilisation de solutions contenant des enzymes protéolytiques mène à la dégradation des domaines extracellulaires des récepteurs à chimiokines. Basées sur ces observations, Garg et al. ont recommandé l'utilisation de solution non enzymatique, comme le PBS-EDTA (qui est similaire à la méthode PE évaluée dans ce chapitre), pour la récolte des MSC à partir des pétris en culture car ces solutions permettent d'obtenir des suspensions cellulaires de meilleure qualité dont l'intégrité des récepteurs est conservée. Toutefois, nos travaux rapportent des contraintes techniques importantes qui n'ont pas été révélées par Garg, Chamberlain et collègues respectifs. En effet, nous avons observé que l'utilisation du PBS-EDTA pour détacher les MSC est moins efficace pour récolter les cellules, et mène à l'obtention d'une suspension de cellules agrégées, ce qui mène à une adhésion non homogène des cellules sur les surfaces. Cette agrégation de cellules représente une variable non contrôlée et soulève des incertitudes importantes concernant les résultats obtenus pour les essais de migration et d'adhésion.

Malgré que l'usage de la trypsine induise une dégradation des récepteurs et affecte le comportement des MSC, nos travaux suggèrent que celle-ci est nécessaire afin de briser les interactions cellule-cellule afin de produire des suspensions cellulaires non agrégées où les cellules peuvent être ensemencées de manière homogène dans les chambres de migration. Nos résultats démontrent toutefois qu'il est possible d'utiliser une concentration réduite de la trypsine pour préparer des suspensions cellulaires non agrégées dont l'intégrité des récepteurs membranaires est conservée.

Les travaux présentés dans ce chapitre soulèvent que des points techniques importants doivent être considérés pour la préparation des MSC dans des essais *in vitro*. Dans les précédentes études qui ont étudié la migration des MSC aux facteurs solubles, le traitement à la trypsine a été la méthode la plus adoptée pour la préparation des suspensions cellulaires. Malgré que plusieurs de ces études n'ont pas divulgué de détails concernant l'utilisation de la trypsine, la majorité des études ont utilisé une concentration d'au moins 0.25% pour détacher les MSC qui ont été analysées pour des essais de migration et l'expression de récepteurs de surface. Les différences significatives ont été obtenues précédemment utilisant une incubation de 2 minutes et 0.25% trypsine pour détacher les cellules MSC d'un seul donateur dans les travaux de Li et collègues (Li et al., 2015). Nos données suggèrent qu'il existe des variations dans la résistance à la trypsine des récepteurs à la surface des MSCs d'un donateur à l'autre. Les études qui utilisent plusieurs donneurs de MSC peuvent montrer une plus grande écart-type dans les données avec le protocole de détachement de 2 minutes avec 0.25% trypsine. Les travaux présentés dans ce chapitre indiquent que l'usage de la trypsine à 0.25% peut nuire à l'exactitude des données obtenues au niveau des essais de migration et des analyses de protéines transmembranaires. Toutefois, la trypsine est nécessaire afin de produire des suspensions cellulaires uniformes, mais celle-ci devrait être utilisée à des concentrations plus faibles afin d'obtenir des cellules dont l'intégrité et le comportement sont minimalement affectés. Cette étude clarifie pourquoi la méthode de détachement des MSCs optimale consiste à l'incubation dans un tampon CDB suivi par la trypsine diluée à 0.05%. Ce protocole était utilisé pour produire les données de migration de cellules MSC aux milieux conditionnés par les macrophages pour le Chapitre 4.

CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE

Grâce à leur plasticité phénotypique, les macrophages jouent des rôles déterminants dans l'homéostasie de l'articulation et la réparation du cartilage articulaire induite par stimulation osseuse (Fahy et al., 2014; Hoemann, C. D. et al., 2010). Les travaux présentés dans cette thèse évaluent la possibilité d'utiliser le chitosane afin de moduler le comportement des macrophages pour guider la libération de facteurs endogènes qui permettront d'améliorer la réparation du cartilage et préviendront le catabolisme de l'articulation à plus long terme. Toutefois, le chitosane est également utilisé comme biomatériau dans la thérapie génique (Buschmann et al., 2013), la régénération des tissus osseux et cardiaques, la livraison de médicaments et la conception de vaccins (Carroll et al., 2016; Jean et al., 2009). De plus, les macrophages sont également impliqués dans la majorité des processus de réparation tissulaire (Brown, Ratner, et al., 2012). Par conséquent, les nouvelles connaissances développées au cours de ces travaux ne sont pas uniquement restreintes à l'utilisation du chitosane dans les articulations, mais sont également pertinentes pour une multitude d'applications biomédicales où l'utilisation du chitosane est prévue.

Influence du chitosane sur le comportement des macrophages polarisés

Dans l'article #1, le chitosane (chitosane acétylé en bloc, 81.5% DDA, M_n 132 kDa) que nous avons étudié sur les macrophages possédait des propriétés structurales proches aux implants de chitosane utilisé précédemment pour améliorer la réparation du cartilage (chitosanes acétylés en bloc, 77-82.6% DDA, M_n 176 kDa) (Chevrier, A. et al., 2007; Hoemann, C. D. et al., 2010). Ainsi, les résultats obtenus dans cet article pouvaient être mis directement en lien avec les observations *in vivo* rapportées antérieurement (Chevrier, A. et al., 2007; Hoemann, C. D. et al., 2010). En répondant au premier objectif de cette thèse, l'article #1 est la première étude qui évalue la réponse de macrophages polarisés vers différents phénotypes aux particules de chitosane. Ce modèle nous a permis d'étudier les interactions entre les macrophages et le chitosane en fonction des différents phénotypes que ces cellules pourraient adopter durant la réparation tissulaire.

Nous avons mesuré la libération de cytokines et l'expression de molécules de surface qui sont caractéristiques des phénotypes M1, M2a et M2c afin de valider que les différents phénotypes étaient obtenus après stimulation avec l'IFN- γ /LPS, l'IL-4 et l'IL-10. Malgré que l'analyse des molécules de surface en cytométrie de flux n'ait pu fournir plus d'information concernant la

polarisation vers les phénotypes M1 ou M2, les profils des différentes cytokines produites ont confirmé que nous avons pu obtenir des macrophages M1 et M2a, mais pas des macrophages M2c.

Les deux premiers objectifs énumérés dans la section 3.2.1 nous ont permis d'identifier des aspects importants permettant de définir et délimiter le rôle des macrophages dans la réparation du cartilage induite par le chitosane. Les analyses protéomiques multiplexes nous ont permis d'identifier qu'en absence de molécules induisant la polarisation M1 ou M2, la stimulation au chitosane induit une activation partiellement M1 et M2 où la libération simultanée de molécules pro- et anti-inflammatoires est observée. De manière plus intéressante, nous avons observé que le chitosane stimulait une forte libération d'IL-1ra et d'IL-10 en excès de la molécule IL-1 β chez les macrophages M0 et M2. Toutefois, si les macrophages sont déjà polarisés vers un phénotype M1 ou M2, la stimulation au chitosane amplifie uniquement la sécrétion de cytokines associées à ce phénotype.

Nous avons examiné la libération de CXCL10/IP-10, CCL2/MCP-1, CXCL12/SDF-1 α , CCL4/MIP-1 β , PDGF-BB et VEGF car ces molécules ont été identifiées comme chimiotactiques pour les MSC. Nous avons observé que le chitosane stimule la libération de CXCL10/IP-10, CCL2/MCP-1 et CCL4/MIP-1 β . Toutefois, ces augmentations n'ont pas mené à une plus forte migration des MSC comparé à la migration des MSC aux facteurs libérés par les macrophages qui n'ont pas été stimulés au chitosane. Les essais de migration, qui ont été optimisés grâce aux travaux présentés dans le chapitre 7, ont montré que les macrophages M0 ou M2a sécrètent déjà une abondance de facteurs chimiotactiques pour les MSC. En revanche, les macrophages M1 ont montré un effet inhibiteur sur la migration cellulaire qui n'a pas pu être renversé par la stimulation au chitosane.

Ainsi, les données de cette thèse nous suggèrent que l'attraction de macrophages M0 ou M2 aux microparticules de chitosane dans un implant vont favoriser la migration des MSC à l'implant déposé dans une lésion ostéochondrale. Le chitosane peut être utilisé afin de stimuler à partir de ces macrophages la libération des facteurs IL-1ra et IL-10, des facteurs anti-inflammatoires puissants contribuant positivement à la réparation du cartilage. Toutefois, nos analyses délimitent également le potentiel immunomodulateur du chitosane sur les macrophages et suggèrent que celui-ci possède une capacité minimale à stimuler des réponses bénéfiques chez les macrophages lorsque l'environnement moléculaire de l'articulation est majoritairement catabolique.

Identification des mécanismes cellulaires régulant la libération des cytokines par le chitosane.

Parmi les 12 cytokines analysées dans l'article #1, nous avons observé que le chitosane induisait trois types de réponses moléculaires qui consistent à la production de chimiokines (CXCL10/IP-10, CCL2/MCP-1 et CCL4/MIP-1 β), de facteurs anti-inflammatoires (IL-1ra et IL-10) et de l'IL-1 β . Il est connu que la libération d'IL-1 β induite par le chitosane est régulée par l'inflammasome (Bueter et al., 2011; Bueter et al., 2014). Toutefois, en ce qui concerne CXCL10/IP-10 et IL-1ra, les mécanismes moléculaires n'étaient pas connus. L'expression de CXCL10/IP-10 et d'IL-1ra est régulée de manière respective par les cytokines qui activent les axes de signalisations JAK/STAT: IFN- γ /STAT-1 et IL-4/STAT-6 (Tamiya et al., 2011). Afin de répondre au troisième objectif de cette thèse, nous avons testé l'hypothèse que le chitosane induit la phosphorylation de STAT-1 et STAT-6. Nous avons décidé d'évaluer l'état de phosphorylation de ces deux protéines à travers un laps de temps relativement long (jusqu'à 24 heures) étant donné que les effets du chitosane peuvent dépendre de la phagocytose du chitosane et de l'initiation de la transcription de nouvelles molécules.

Nous avons pu observer que le chitosane induit une phosphorylation différée de la protéine STAT-1 pour mener à la libération de CXCL10/IP-10 et que cette activation est dépendante de la présence de groupement N-acétyl (20% GlcNAc). Traditionnellement, l'expression de CXCL10/IP-10 est associée à une réponse IFN de type 1 ou de type 2. Lors d'une réponse IFN de type 1, IFN- α ou IFN- β se lie aux récepteurs IFNAR1 et IFNAR2 (Récepteur de l'interféron-alpha 1 et 2) pour induire la phosphorylation et l'hétérodimérisation des protéines STAT-1 et STAT-2 qui est responsable de la transcription du gène CXCL10/IP-10 (Platanias, 2005). Dans le cas d'une réponse IFN de type 2, IFN- γ se lie aux récepteurs IFNGR1 et IFNGR2 (Récepteur de l'interféron-alpha 1 et 2) pour induire la phosphorylation et l'homodimérisation des protéines STAT-1 pour initier la transcription du gène CXCL10/IP-10 (Platanias, 2005). Ainsi, suite aux résultats de l'article #1, nous avons démontré dans l'article #2 que le chitosane induit également la phosphorylation de STAT-2 et ainsi confirme que le chitosane induit une réponse IFN de type 2 afin de guider la libération de CXCL10/IP-10.

En ce qui concerne IL-1ra, nos analyses au niveau de STAT-6 ont montré que la stimulation d'IL-1ra par le chitosane est indépendante de cette voie de signalisation. McNab et al. a récemment présenté un modèle où, suite à une infection intracellulaire, les réponses IFN de type 1 induisent la

production de l'IL-1ra (McNab et al., 2015). Basés sur ces propositions, nous avons pu démontrer dans l'article #2 que la libération d'IL-1ra par le chitosane est initiée par une réponse IFN de type 1 impliquant IFN- β et non pas IFN- α . Cette découverte suggère plusieurs avenues de recherche concernant le rôle de l'IFN- β dans la réparation du cartilage. Il est encore sous-débat si l'IFN- β joue un rôle pro- ou anti-inflammatoire dans les divers tissus sains et pathologiques dans l'organisme. Toutefois, l'IFN- β jouent des rôles critiques dans la réparation des lésions cutanées et stimule la libération d'IL-1ra afin de protéger le foie contre la fibrose induite par toxine (Gregorio et al., 2010; Roh et al., 2014). Il a également été suggéré que l'IFN- β pourrait avoir un rôle protecteur contre l'arthrite rhumatoïde et l'injection sous-cutanée d'IFN- β recombinant a déjà été évaluée pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde (Tak, 2004; van Holten et al., 2005). Ensemble, ces études suggèrent que les IFN de type 1 pourraient avoir un rôle important dans les processus de réparation du cartilage en stimulant la production endogène de molécules anti-inflammatoires qui pourraient contrer les molécules cataboliques présentes dans l'articulation durant le processus de formation de nouveaux tissus cartilagineux.

Génération de la librairie d'oligomères de chitosane

Malgré le nombre important d'études qui ont évalué la réponse des macrophages au chitosane (Almeida et al., 2014; Bueter et al., 2011; Bueter et al., 2014; Fong et al., 2015; Gorzelanny et al., 2010; Gudmundsdottir et al., 2015; Guzman-Morales et al., 2011; Hoemann, C. D. et al., 2010; Oliveira et al., 2012; Porporatto et al., 2003; Ueno et al., 2001; Vasconcelos et al., 2013), les études antérieures aux travaux réalisés dans cette thèse ne permettent pas de prédire la réponse des macrophages en fonction des propriétés structurales du chitosane utilisé. Une raison majeure contribuant à cette ambiguïté est la large gamme de chitosanes structurellement distincts ainsi que la large gamme de concentration utilisée dans les diverses études. Afin de répondre au deuxième objectif de cette thèse, nous avons généré une librairie de chitosanes dont le DDA variait entre 60 et 98% DDA et le poids moléculaire variait entre 1 et 190 kDa. Cette librairie nous permettait d'étudier de façon systématique l'impact de varier une propriété structurale du chitosane sur la libération de cytokines par les macrophages. Le choix d'étudier cette gamme de DDA, poids moléculaire et concentration s'est basé sur les précédentes études dans la littérature :

- Malgré que la majorité des études ont évalué la réponse des macrophages à des chitosanes dont le DDA variait entre 75 et 98%, Shibata, Reese et collègues respectifs ont également rapporté

des effets de la chitine sur les macrophages (Reese et al., 2007; Shibata, Metzger, & Myrvik, 1997). La génération des chitosanes avec 60% de DDA permettait ainsi d'offrir plus d'information concernant la réponse des macrophages au chitosane si le DDA est inférieur à 75% et ainsi possédait un DDA plus proche de la chitine. Nous avons également étudié l'effet du patron d'acétylation du chitosane sur la réponse des macrophages car il a été rapporté que l'effet du patron d'acétylation affecte le taux de dégradation du chitosane.

- Pour le choix des poids moléculaires à étudier, nos résultats préliminaires ont montré que les monomères de glucosamine ou N-acétyl glucosamine et les dimères de glucosamine étaient incapable de stimuler la libération de CXCL10/IP-10, d'IL-1 α et d'IL-1 β par les macrophages U937 (données non publiées). Ces résultats ont suggéré donc que le chitosane requiert un poids moléculaire minimum pour stimuler la libération de cytokines *in vitro*. Nos résultats dans l'article #1 ont montré qu'à 80% de DDA, le chitosane de 10 kDa démontrait une même cinétique d'activation de STAT-1 que le chitosane 80M. Ainsi, le poids moléculaire minimum requis pour la stimulation de cytokines est en dessous de 10 kDa. Dans la littérature, les oligosaccharides de chitosane rapportés ont des degrés de polymérisation entre 3 et 8, ce qui correspond approximativement à des poids moléculaires entre 600 et 1,600 Daltons. Ainsi, une gamme de chitosane à poids moléculaire entre 1 à 190 kDa, avec une emphase sur la génération de chitosane de 1, 3, 5 et 10 kDa, a été conçue.
- Nous avons montré dans l'article #1 que malgré que la viabilité cellulaire ne soit pas affectée, le chitosane 80M stimulait plus de CXCL10/IP-10 et d'IL-1 α à 5 μ g/mL qu'à 50 μ g/mL, cela nous a donné un premier indice que la dose avait un effet important sur l'induction la réponse IFN de type 1. Des études antérieures ont suggéré qu'à des doses au-dessus de 100 μ g/mL, la chitosane a des effets cytotoxiques et mène à l'activation de l'inflammasome chez les macrophages (Bueter et al., 2011; Bueter et al., 2014; Huang, Khor, & Lim, 2004). Pour cette raison, nous avons choisi les doses de 5, 50 et 150 μ g/mL comme étant pertinentes pour induire une réponse cellulaire et présenter une forte dose de chitosane potentiellement cytotoxique.

Un facteur pouvant influencer de manière significative la réponse des macrophages au chitosane est la présence d'impuretés, et plus spécifiquement la présence d'endotoxines dans les préparations de chitosane (Hoemann & Fong, 2017). Dans le cadre de nos travaux, plusieurs précautions ont été prises afin d'assurer que les résultats obtenus n'étaient pas des artéfacts associés à la présence

d'impuretés et d'endotoxines. Les chitosanes originaux utilisés pour générer la librairie de chitosane sont de grades médicaux et ont été analysés, validés pour un niveau négligeable d'endotoxine et d'impureté et documenté avec des certificats d'analyses (BioSyntech, Laval, QC, Canada). Lors des manipulations du chitosanes, les réactifs utilisés étaient stériles et recommandés pour la culture cellulaire. De plus, toute la verrerie a été traitée à chaud à 200°C pendant trois heures afin d'éliminer tout pyrogène. Tout autre matériel a été stérilisé à l'aide d'un autoclave ou par traitement avec de l'isopropanol.

Identification des motifs structuraux du chitosane menant à la libération des différentes cytokines chez les macrophages

Dans les travaux présentés dans l'article #2, nous avons émis l'hypothèse que nous pouvions identifier des motifs structuraux (DDA, M_n et dose) capables de stimuler strictement la libération d'IL-1 α tout en minimisant l'activation de l'inflammasome et la libération d'IL-1 β . Nous avons également évalué la libération de CXCL10/IP-10 et PGE₂. CXCL10/IP-10 a été évalué, car c'était une des molécules fortement induites par le chitosane, et son analyse permettrait d'aider à interpréter les résultats obtenus. PGE₂ a été évalué car cette molécule est associée à l'activation de l'inflammasome et contribuerait également à l'interprétation des résultats.

Notre analyse nous a permis d'identifier que le chitosane induit deux types de réponses en fonction de la dose et des propriétés structurales du chitosane. Un nombre limité de chitosanes, incluant les chitosanes de 98% de DDA dont le M_n varie entre 3-10 kDa et les chitosanes de 80% de DDA acétylé dont le M_n est supérieur à 10 kDa, induisaient à de faibles concentrations (inférieur à 50 μ g/mL) une réponse IFN de type 1 menant à la libération de CXCL10/IP-10 et IL-1 α . Cependant, à plus forte dose, ces chitosanes induisent l'activation de l'inflammasome, ce qui menait à la libération d'IL-1 β et PGE₂. PGE₂ agit ensuite d'une manière autocrine afin de réprimer la réponse IFN de type 1. Un aspect fascinant de ces travaux est que le modèle cellulaire décrivant l'activation des macrophages par le chitosane est similaire à un modèle cellulaire décrit par McNab et collègues suggérant que les pathogènes intracellulaires induisent également au sein des macrophages l'activation d'une réponse IFN de type 1 afin d'empêcher l'activation de l'inflammasome. Ainsi, ces travaux démontrent pour la première fois que le chitosane possède des propriétés biomimétiques associées à des pathogènes intracellulaires et que ces propriétés dictent l'induction de réponses pro- et anti-inflammatoires chez les macrophages.

Les travaux présentés dans l'article #2 montrent que la capacité d'un chitosane d'induire une réponse IFN de type 1 ou bien l'activation de l'inflammasome dépend notamment de sa capacité à briser les lysosomes lorsque le chitosane est internalisé dans la cellule. Afin de démontrer que le chitosane induit une rupture des lysosomes, nous avons utilisé trois approches :

- Nous avons premièrement mesuré directement la présence de lysosomes dans les cellules en utilisant le marqueur fluorescent LysoTracker et la cytométrie en flux. Toutefois, ce marqueur n'est pas tout à fait spécifique, car il se lie uniquement aux vésicules dont le pH est acide. Nos résultats ont montré que le chitosane 98-10K a spécifiquement induit une perte de fluorescence du LysoTracker dans les macrophages, suggérant ainsi une baisse du nombre total des lysosomes par cellule.
- La deuxième approche utilisée est l'immunomarquage de la protéine Galectine-3, précédemment suggéré comme un marqueur de vésicules déchirées. Nous avons observé que la protéine Galectine-3 se localisait spécifiquement avec une sous-population de vésicules de chitosane-RITC dans 1 à 6% des cellules stimulées par le chitosane (98% DDA, M_n 10 kDa).
- La troisième approche a été d'évaluer l'expression de LC3-II. Notre raisonnement était que la rupture des lysosomes par le chitosane mène à une baisse de lysosomes fonctionnels capable de dégrader les autophagosomes, menant ainsi à une accumulation d'autophagosomes dans les macrophages stimulés au chitosane. En effet, nous avons observé que la stimulation au chitosane augmentait l'accumulation d'autophagosomes.

Nos travaux ont ainsi démontré que la rupture des lysosomes par le chitosane était un évènement intracellulaire déclencheur qui mène à la libération de cytokines par les macrophages. De plus, nous avons montré que l'étendue de la rupture lysosomale était proportionnelle à la dose de chitosane utilisée et dictait la nature des cytokines sécrétées. Une faible dose de chitosane, qui induit une faible rupture des lysosomes, induit une réponse IFN de type 1, tandis qu'une dose élevée de chitosane, qui induit une rupture massive des lysosomes, mène à l'activation de l'inflammasome dont les médiateurs en aval répriment la sécrétion d'IFN- β .

En somme, nos travaux nous ont permis de mieux définir les propriétés immunologiques du chitosane sur les macrophages humains. Plusieurs de nos conclusions sont pertinentes et transposables à d'autres applications biomédicales où le chitosane est utilisé :

- Le chitosane a été proposé comme un adjuvant efficace lors de la conception de vaccins. Cette capacité d'adjuvant dépend en outre de la capacité du chitosane à induire une réponse IFN de type 1. Ici, nous identifions que cette capacité est limitée uniquement à une gamme étroite de chitosanes capable d'induire une rupture des lysosomes.
- L'analyse de la librairie de chitosane identifie les chitosanes qui pourront être utilisés pour stimuler la libération d'IL-1 α . Nos travaux répondent à une question de recherche importante, qui consiste à identifier les motifs structuraux du chitosane qui stimulent des réponses anti-inflammatoires chez les macrophages. Nos travaux montrent que les chitosanes qui sont solubles à pH neutre et les chitosanes qui stimulent une forte libération de PGE₂ auront une faible capacité d'induire la libération d'IL-1 α .
- Nos travaux suggèrent que les chitosanes qui sont insolubles auront une plus forte capacité à activer l'inflammasome. Toutefois, l'activation de l'inflammasome dépend également de la dose utilisée. Malgré que plusieurs autres analyses immunologiques doivent être réalisées afin de complètement comprendre les propriétés immunologiques du chitosane, nos travaux identifient les chitosanes qui mèneront à l'activation de l'inflammasome et ceux qui seront relativement inertes.

Le modèle cellulaire de macrophages humain U937

La majorité de cette étude a été réalisée dans une lignée cellulaire macrophagique humaine U937. Le nombre élevé de conditions à analyser au cours de ces travaux justifie l'usage de ces cellules au lieu d'utiliser des cultures de macrophages primaires. En effet, le nombre de conditions testées n'aurait pas pu être réalisé si on avait utilisé des macrophages primaires. Toutefois, il faut souligner que malgré que ce modèle représente bien le phénotype des macrophages, les cellules U937 demeurent un modèle de cellules tumorales et il existe toujours des variations entre les macrophages dérivés de cellules U937 et les macrophages primaires.

Cependant, nos travaux et résultats ont également été reproduits en partie dans des cellules de macrophages primaires pré-traités avec le PMA dans le cadre de l'article #1. Nous avons également reproduit une partie de nos résultats présentés dans l'article #2 dans la lignée cellulaire THP-1 (données non publiées). Les cellules THP-1 sont une lignée cellulaire également utilisée pour étudier le comportement des macrophages (Daigneault, Preston, Marriott, Whyte, & Dockrell, 2010). Le modèle U937 a été choisi pour cette thèse car les monocytes U937 sont à un état de

différenciation plus avancé vers le phénotype macrophage que les cellules THP-1 (Baek et al., 2009). De plus, les U937 sont d'origine tissulaire (lymphome histiocytaire isolé de la plèvre) (Sundstrom & Nilsson, 1976), et reflètent mieux le comportement des macrophages dans les tissus en comparaison aux cellules THP-1 qui sont d'origine sanguine (leucémie) (Chanput et al., 2014; Tsuchiya et al., 1980). Finalement, lors de la réalisation de nos expériences, les cellules U937 possédaient un avantage majeur, car ces cellules se divisaient beaucoup plus rapidement que les cellules THP-1 (données non publiées), ce qui permet une amplification plus efficace avant la différenciation induite par PMA. Ainsi pour accomplir les objectifs de l'article #2 qui demandaient un nombre important de cellules, le modèle U937 était plus avantageux.

Finalement, la majorité de nos résultats sont cohérents avec la majorité des études récentes portant sur le chitosane et les macrophages primaires car :

- Carroll et al. ont montré chez des cultures primaires de cellules dendritiques d'origine murines que le chitosane (2 à 8 µg/mL, 75-90% DDA, M_w 150-400 kDa) peut stimuler une réponse IFN de type 1. Dans cette précédente étude, les cellules dendritiques ont été obtenues par culture avec du GM-CSF (Carroll et al., 2016). De plus, Guzman-Morales et al. ont montré que le chitosane (100 à 500 µg/mL, 80% DDA, M_n 40 kDa) peut stimuler chez des macrophages primaires murins la production de GM-CSF (Guzman-Morales et al., 2011). Ensemble, ces études suggèreraient ainsi qu'*in vivo*, la présence de GM-CSF dans l'environnement permettrait au chitosane d'induire cette réponse IFN de type 1 chez les macrophages.
- Bueter et al. ont montré chez des macrophages et cellules dendritiques d'origine murins, ainsi que des cellules mononucléaires dérivées du sang périphérique que le chitosane (100-200 µg/mL, 76% DDA, M_w inconnu) peut activer l'inflammasome, ce qui mène à la libération d'IL-1 β (Bueter et al., 2014).

Par conséquent, les observations réalisées dans le cadre de nos travaux sont transposables et applicables à ces modèles de cellules primaires. Il est important de souligner que les travaux de cette thèse se sont concentrés uniquement sur les effets du chitosane sur les macrophages. Plusieurs autres cellules du système immunitaire, incluant les neutrophiles, les mastocytes et les cellules dendritiques contribuent dans la réponse inflammatoire induite par le chitosane (Carroll et al., 2016; Farrugia et al., 2014; Lafantaisie-Favreau et al., 2013; Simard et al., 2009). Ces autres

cellules peuvent libérer un éventail de facteurs susceptibles d'influencer l'environnement moléculaire dans lequel les macrophages répondent au chitosane.

CHAPITRE 8 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Les travaux présentés dans cette thèse évaluent l'approche innovatrice d'utiliser le chitosane afin de moduler le comportement des macrophages afin de guider la production endogène de cytokines anti-inflammatoires et anaboliques pour l'articulation. Nos travaux nous ont permis d'identifier le rôle que le chitosane joue au sein des macrophages afin d'augmenter le recrutement de MSC dans les lésions ostéochondrales. Nos travaux montrent que le chitosane possède une capacité marginale d'augmenter la migration des MSC induite par les macrophages et suggèrent que la hausse de migration des MSC par le chitosane est due à une plus forte attraction de macrophages portant des phénotypes M0 ou M2. Ainsi, les approches thérapeutiques qui permettront de maintenir l'activité de macrophages M2 tout en minimisant la présence de molécules induisant l'activation M1 des macrophages pourraient augmenter l'attraction de MSC et auront le potentiel d'augmenter la réparation du cartilage articulaire induite par stimulation osseuse.

Nous avons identifié que le chitosane peut stimuler la libération des facteurs IL-1ra et IL-10 en large excès du facteur IL-1 β chez les macrophages de type M0 et M2. Ces deux molécules jouent des rôles importants dans la protection de l'articulation suite à une blessure et durant la réparation du cartilage articulaire (Lieberthal et al., 2015; Scanzello & Goldring, 2012). Nos travaux suggèrent ainsi que nous pouvons utiliser le chitosane afin de stimuler la libération endogène d'IL-1ra et IL-10 à partir des macrophages présents dans l'articulation. L'utilisation du chitosane pour stimuler la production endogène de ces deux cytokines est beaucoup plus pratique, sécuritaire et moins couteuse que les autres méthodes disponibles (comme l'injection de cytokines recombinantes ou bien l'utilisation de vecteurs viraux pour induire la production de ces cytokines *in situ*). Des études futures oeuvrant sur la libération d'IL-1ra et IL-10 dans les liquides synoviaux suivant l'injection de chitosane dans des modèles d'étude pré-cliniques seraient intéressantes.

Nous avons identifié plusieurs voies de signalisations cellulaires impliquées dans l'activation des macrophages par le chitosane. En outre, nous avons démontré que le chitosane stimule les macrophages à libérer IL-1ra et CXCL10/IP-10 par le biais du facteur IFN- β . Nos travaux suggèrent ainsi que la molécule IFN- β , qui est la molécule en amont responsable des effets anaboliques du chitosane sur les macrophages, pourraient jouer un rôle bénéfique significatif dans la réparation du cartilage induite par stimulation osseuse et l'homéostasie de l'articulation. Récemment, il a été découvert que les IFN de type 1 jouent des rôles importants dans la réparation

des lésions cutanées et dans la protection contre la fibrose (Gregorio et al., 2010). De plus, l'injection sous-cutanée d'IFN- β recombinant est évaluée pour le traitement de l'arthrite rhumatoïde (Tak, 2004; van Holten et al., 2005). Les travaux dans cette thèse suggèrent ainsi que le chitosane pourrait être utilisé pour induire la production endogène d'IFN- β , et cela pourrait avoir un effet protecteur sur l'articulation. Des études futures évaluant l'expression des IFN de type 1 dans la réparation du cartilage induite par microfracture s'avèreraient intéressantes et pourraient révéler un rôle important de ces molécules dans la réparation ostéocondrale.

Les effets immunomodulateurs du chitosane sur les macrophages ont premièrement été rapportés il y a plus de 20 ans. Malgré cela, il a toujours été difficile de prédire comment les macrophages répondront à un chitosane donné. La librairie de chitosanes générée dans nos travaux est unique et permet d'établir un modèle cellulaire capable de prédire l'effet pro- ou anti-inflammatoire du chitosane en fonction de ses propriétés structurales ou de la dose. Le chitosane est un biomatériau polysaccharide unique pouvant être utilisé dans une vaste gamme d'applications biomédicales. Ainsi, nos travaux soulignent la possibilité d'utiliser, en fonction de la dose ou des propriétés structurales, ce polysaccharide afin d'induire ou réprimer différentes réponses immunologiques chez les macrophages dans le but ultime d'augmenter la performance des biomatériaux à base de chitosane. Cette thèse contribue ainsi à mieux comprendre les propriétés immunologiques du chitosane, ce qui permettra à la conception de nouvelles approches thérapeutiques incorporant le chitosane qui seront plus performantes et plus sécuritaires.

BIBLIOGRAPHIE

- ARTHRITIS COMMUNITY RESEARCH AND EVALUATION UNIT (ACREU) (2013). "ARTHRITIS IN CANADA".
- AIBA, S. (1991). STUDIES ON CHITOSAN: 3. EVIDENCE FOR THE PRESENCE OF RANDOM AND BLOCK COPOLYMER STRUCTURES IN PARTIALLY N-ACETYLATED CHITOSANS. *INT J BIOL MACROMOL*, 13(1), 40-44.
- AIBA, S. (1992). STUDIES ON CHITOSAN: 4. LYSOZYMIC HYDROLYSIS OF PARTIALLY N-ACETYLATED CHITOSANS. *INT J BIOL MACROMOL*, 14(4), 225-228.
- ALAAEDDINE, N., DI BATTISTA, J. A., PELLETIER, J. P., KIANSA, K., CLOUTIER, J. M., & MARTEL-PELLETIER, J. (1999). INHIBITION OF TUMOR NECROSIS FACTOR ALPHA-INDUCED PROSTAGLANDIN E2 PRODUCTION BY THE ANTIINFLAMMATORY CYTOKINES INTERLEUKIN-4, INTERLEUKIN-10, AND INTERLEUKIN-13 IN OSTEOARTHRITIC SYNOVIAL FIBROBLASTS: DISTINCT TARGETING IN THE SIGNALING PATHWAYS. *ARTHRITIS RHEUM*, 42(4), 710-718.
- ALEXANDER, K. A., CHANG, M. K., MAYLIN, E. R., KOHLER, T., MULLER, R., WU, A. C., . . . PETTIT, A. R. (2011). OSTEAL MACROPHAGES PROMOTE IN VIVO INTRAMEMBRANOUS BONE HEALING IN A MOUSE TIBIAL INJURY MODEL. *J BONE MINER RES*, 26(7), 1517-1532.
- ALFORD, J. W., & COLE, B. J. (2005). CARTILAGE RESTORATION, PART 1: BASIC SCIENCE, HISTORICAL PERSPECTIVE, PATIENT EVALUATION, AND TREATMENT OPTIONS. *AM J SPORTS MED*, 33(2), 295-306. T
- ALLAN, G. G., & PEYRON, M. (1995A). MOLECULAR-WEIGHT MANIPULATION OF CHITOSAN .1. KINETICS OF DEPOLYMERIZATION BY NITROUS-ACID. *CARBOHYDRATE RESEARCH*, 277(2), 257-272.
- ALLAN, G. G., & PEYRON, M. (1995B). MOLECULAR-WEIGHT MANIPULATION OF CHITOSAN .2. PREDICTION AND CONTROL OF EXTENT OF DEPOLYMERIZATION BY NITROUS-ACID. *CARBOHYDRATE RESEARCH*, 277(2), 273-282.
- ALMEIDA, C. R., SERRA, T., OLIVEIRA, M. I., PLANELL, J. A., BARBOSA, M. A., & NAVARRO, M. (2014). IMPACT OF 3-D PRINTED PLA- AND CHITOSAN-BASED SCAFFOLDS ON HUMAN MONOCYTE/MACROPHAGE RESPONSES: UNRAVELING THE EFFECT OF 3-D STRUCTURES ON INFLAMMATION. *ACTA BIOMATERIALIA*, 10(2), 613-622.
- AMBARUS, C. A., KRAUSZ, S., VAN EIJK, M., HAMANN, J., RADSTAKE, T. R., REEDQUIST, K. A., . . . BAETEN, D. L. (2012). SYSTEMATIC VALIDATION OF SPECIFIC PHENOTYPIC MARKERS FOR IN VITRO POLARIZED HUMAN MACROPHAGES. *JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS*, 375(1-2), 196-206.

- ANDREW, J. G., ANDREW, S. M., FREEMONT, A. J., & MARSH, D. R. (1994). INFLAMMATORY CELLS IN NORMAL HUMAN FRACTURE HEALING. *ACTA ORTHOP SCAND*, 65(4), 462-466.
- ANRAKU, Y., MIZUTA, H., SEI, A., KUDO, S., NAKAMURA, E., SENBA, K., & HIRAKI, Y. (2009). ANALYSES OF EARLY EVENTS DURING CHONDROGENIC REPAIR IN RAT FULL-THICKNESS ARTICULAR CARTILAGE DEFECTS. *J BONE MINER METAB*, 27(3), 272-286.
- ANTON, K., BANERJEE, D., & GLOD, J. (2012). MACROPHAGE-ASSOCIATED MESENCHYMAL STEM CELLS ASSUME AN ACTIVATED, MIGRATORY, PRO-INFLAMMATORY PHENOTYPE WITH INCREASED IL-6 AND CXCL10 SECRETION. *PLOS ONE*, 7(4), E35036.
- ARIGANELLO, M. B., LABOW, R. S., & LEE, J. M. (2009). RESPONSE OF MACROPHAGE-LIKE U937 CELLS TO DECELLULARIZED TISSUE HEART VALVE MATERIALS. *J HEART VALVE DIS*, 18(2), 187-197.
- ARIGANELLO, M. B., SIMIONESCU, D. T., LABOW, R. S., & LEE, J. M. (2011). MACROPHAGE DIFFERENTIATION AND POLARIZATION ON A DECELLULARIZED PERICARDIAL BIOMATERIAL. *BIOMATERIALS*, 32(2), 439-449.
- ARNOLD, L., HENRY, A., PORON, F., BABA-AMER, Y., VAN ROOIJEN, N., PLONQUET, A., . . . CHAZAUD, B. (2007). INFLAMMATORY MONOCYTES RECRUITED AFTER SKELETAL MUSCLE INJURY SWITCH INTO ANTIINFLAMMATORY MACROPHAGES TO SUPPORT MYOGENESIS. *J EXP MED*, 204(5), 1057-1069.
- ATHANASIOU, K. A., SHAH, A. R., HERNANDEZ, R. J., & LEBARON, R. G. (2001). BASIC SCIENCE OF ARTICULAR CARTILAGE REPAIR. *CLIN SPORTS MED*, 20(2), 223-247.
- AZAB, A. K., DOVINER, V., ORKIN, B., KLEINSTERN, J., SREBNIK, M., NISSAN, A., & RUBINSTEIN, A. (2007). BIOCOMPATIBILITY EVALUATION OF CROSSLINKED CHITOSAN HYDROGELS AFTER SUBCUTANEOUS AND INTRAPERITONEAL IMPLANTATION IN THE RAT. *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH. PART A*, 83(2), 414-422.
- BAEK, Y. S., HAAS, S., HACKSTEIN, H., BEIN, G., HERNANDEZ-SANTANA, M., LEHRACH, H., . . . SEITZ, H. (2009). IDENTIFICATION OF NOVEL TRANSCRIPTIONAL REGULATORS INVOLVED IN MACROPHAGE DIFFERENTIATION AND ACTIVATION IN U937 CELLS. *BMC IMMUNOL*, 10, 18.
- BARBOSA, J. N., AMARAL, I. F., AGUAS, A. P., & BARBOSA, M. A. (2010). EVALUATION OF THE EFFECT OF THE DEGREE OF ACETYLATION ON THE INFLAMMATORY RESPONSE TO 3D POROUS CHITOSAN SCAFFOLDS. *J BIOMED MATER RES A*, 93(1), 20-28.

- BEDI, A., FEELEY, B. T., & WILLIAMS, R. J., 3RD. (2010). MANAGEMENT OF ARTICULAR CARTILAGE DEFECTS OF THE KNEE. *J BONE JOINT SURG AM*, 92(4), 994-1009.
- BERRIDGE, M. V., HERST, P. M., & TAN, A. S. (2005). TETRAZOLIUM DYES AS TOOLS IN CELL BIOLOGY: NEW INSIGHTS INTO THEIR CELLULAR REDUCTION. *BIOTECHNOL ANNU REV*, 11, 127-152.
- BHATTARAM, P., & CHANDRASEKHARAN, U. (2016). THE JOINT SYNOVIUM: A CRITICAL DETERMINANT OF ARTICULAR CARTILAGE FATE IN INFLAMMATORY JOINT DISEASES. *SEMIN CELL DEV BIOL*.
- BRANCATO, S., & ALBINA, J. (2011). WOUND MACROPHAGES AS KEY REGULATORS OF REPAIR. *AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY*, 178(1), 19-25.
- BREINAN, H. A., MARTIN, S. D., HSU, H. P., & SPECTOR, M. (2000). HEALING OF CANINE ARTICULAR CARTILAGE DEFECTS TREATED WITH MICROFRACTURE, A TYPE-II COLLAGEN MATRIX, OR CULTURED AUTOLOGOUS CHONDROCYTES. *J ORTHOP RES*, 18(5), 781-789.
- BRITTBERG, M., LINDAHL, A., NILSSON, A., OHLSSON, C., ISAKSSON, O., & PETERSON, L. (1994). TREATMENT OF DEEP CARTILAGE DEFECTS IN THE KNEE WITH AUTOLOGOUS CHONDROCYTE TRANSPLANTATION. *N ENGL J MED*, 331(14), 889-895.
- BROWN, B. N., LONDONO, R., TOTTEY, S., ZHANG, L., KUKLA, K. A., WOLF, M. T., . . . BADYLAK, S. F. (2012). MACROPHAGE PHENOTYPE AS A PREDICTOR OF CONSTRUCTIVE REMODELING FOLLOWING THE IMPLANTATION OF BIOLOGICALLY DERIVED SURGICAL MESH MATERIALS. *ACTA BIOMATER*, 8(3), 978-987.
- BROWN, B. N., RATNER, B. D., GOODMAN, S. B., AMAR, S., & BADYLAK, S. F. (2012). MACROPHAGE POLARIZATION: AN OPPORTUNITY FOR IMPROVED OUTCOMES IN BIOMATERIALS AND REGENERATIVE MEDICINE. *BIOMATERIALS*, 33(15), 3792-3802.
- BUECHLER, C., RITTER, M., ORSO, E., LANGMANN, T., KLUCKEN, J., & SCHMITZ, G. (2000). REGULATION OF SCAVENGER RECEPTOR CD163 EXPRESSION IN HUMAN MONOCYTES AND MACROPHAGES BY PRO- AND ANTIINFLAMMATORY STIMULI. *JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY*, 67(1), 97-103.
- BUETER, C. L., LEE, C. K., RATHINAM, V. A., HEALY, G. J., TARON, C. H., SPECHT, C. A., & LEVITZ, S. M. (2011). CHITOSAN BUT NOT CHITIN ACTIVATES THE INFLAMMASOME BY A MECHANISM DEPENDENT UPON PHAGOCYTOSIS. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 286(41), 35447-35455.

- BUETER, C. L., LEE, C. K., WANG, J. P., OSTROFF, G. R., SPECHT, C. A., & LEVITZ, S. M. (2014). SPECTRUM AND MECHANISMS OF INFLAMMASOME ACTIVATION BY CHITOSAN. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, 192(12), 5943-5951.
- BUSCHMANN, M. D., MERZOUKI, A., LAVERTU, M., THIBAUT, M., JEAN, M., & DARRAS, V. (2013). CHITOSANS FOR DELIVERY OF NUCLEIC ACIDS. *ADVANCED DRUG DELIVERY REVIEWS*, 65(9), 1234-1270.
- C.-H. LAFANTAISIE FAVREAU, J. G.-M., J. SUN, A. HARRIS, T.D. SMITH, A. CARLI, J., & HENDERSON, W. D. S., C.D. HOEMANN. (2010). NOVEL PRE-SOLIDIFIED CHITOSAN/BLOOD IMPLANT PROVIDES LOCAL BONE-MARROW STIMULATION-ASSOCIATED BIOLOGICAL ACTIVITY IN SKELETALLY AGED RABBITS AFTER A THREE WEEK TREATMENT. *9TH ANNUAL CONGRESS OF THE INTERNATIONAL CARTILAGE REPAIR SOCIETY, SEPT. 26 TO 29 2010, SITGES, SPAIN, E-POSTER: P54*.
- CARROLL, E. C., JIN, L., MORI, A., MUNOZ-WOLF, N., OLESZYCKA, E., MORAN, H. B., . . . LAVELLE, E. C. (2016). THE VACCINE ADJUVANT CHITOSAN PROMOTES CELLULAR IMMUNITY VIA DNA SENSOR CGAS-STING-DEPENDENT INDUCTION OF TYPE I INTERFERONS. *IMMUNITY*, 44(3), 597-608.
- CHAMBERLAIN, G., WRIGHT, K., ROT, A., ASHTON, B., & MIDDLETON, J. (2008). MURINE MESENCHYMAL STEM CELLS EXHIBIT A RESTRICTED REPERTOIRE OF FUNCTIONAL CHEMOKINE RECEPTORS: COMPARISON WITH HUMAN. *PLOS ONE*, 3(8), E2934.
- CHANG, M. K., RAGGATT, L. J., ALEXANDER, K. A., KULIWABA, J. S., FAZZALARI, N. L., SCHRODER, K., . . . PETTIT, A. R. (2008). OSTEAL TISSUE MACROPHAGES ARE INTERCALATED THROUGHOUT HUMAN AND MOUSE BONE LINING TISSUES AND REGULATE OSTEOBLAST FUNCTION IN VITRO AND IN VIVO. *J IMMUNOL*, 181(2), 1232-1244.
- CHANPUT, W., MES, J. J., & WICHES, H. J. (2014). THP-1 CELL LINE: AN IN VITRO CELL MODEL FOR IMMUNE MODULATION APPROACH. *INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY*, 23(1), 37-45.
- CHEN. (2010). ACUTE OSTEOCLAST ACTIVITY FOLLOWING SUBCHONDRAL DRILLING IS PROMOTED BY CHITOSAN AND ASSOCIATED WITH IMPROVED CARTILAGE REPAIR TISSUE INTEGRATION. *CARTILAGE*, APR;2(2):173-85
- CHENITE, A., CHAPUT, C., WANG, D., COMBES, C., BUSCHMANN, M. D., HOEMANN, C. D., . . . SELMANI, A. (2000). NOVEL INJECTABLE NEUTRAL SOLUTIONS OF CHITOSAN FORM BIODEGRADABLE GELS IN SITU. *BIOMATERIALS*, 21(21), 2155-2161.
- CHEONG, H., LU, C., LINDSTEN, T., & THOMPSON, C. B. (2012). THERAPEUTIC TARGETS IN CANCER CELL METABOLISM AND AUTOPHAGY. *NAT BIOTECHNOL*, 30(7), 671-678.

- CHEVRIER, A., HOEMANN, C. D., SUN, J., & BUSCHMANN, M. D. (2007). CHITOSAN-GLYCEROL PHOSPHATE/BLOOD IMPLANTS INCREASE CELL RECRUITMENT, TRANSIENT VASCULARIZATION AND SUBCHONDRAL BONE REMODELING IN DRILLED CARTILAGE DEFECTS. *OSTEOARTHRITIS CARTILAGE*, 15(3), 316-327.
- CHEVRIER, A., HOEMANN, C. D., SUN, J., & BUSCHMANN, M. D. (2011). TEMPORAL AND SPATIAL MODULATION OF CHONDROGENIC FOCI IN SUBCHONDRAL MICRODRILL HOLES BY CHITOSAN-GLYCEROL PHOSPHATE/BLOOD IMPLANTS. *OSTEOARTHRITIS CARTILAGE*, 19(1), 136-144.
- CHEVRIER, C. D. H., JUN SUN, MICHAEL BUSCHMANN. (2010). CHITOSAN-GLYCEROL PHOSPHATE/BLOOD IMPLANTS ALTER MATURATION AND LOCATION OF CHONDROGENIC FOCI IN MARROW STIMULATED CARTILAGE REPAIR. 2010 ANNUAL MEETING OF THE INTERNAL CARTILAGE REPAIR SOCIETY, BARCELONA.
- CLARKE, B. (2008). NORMAL BONE ANATOMY AND PHYSIOLOGY. *CLIN J AM SOC NEPHROL*, 3 SUPPL 3, S131-139.
- COLBURN, N. T., ZAAL, K. J., WANG, F., & TUAN, R. S. (2009). A ROLE FOR GAMMA/DELTA T CELLS IN A MOUSE MODEL OF FRACTURE HEALING. *ARTHRITIS RHEUM*, 60(6), 1694-1703.
- DAIGNEAULT, M., PRESTON, J. A., MARRIOTT, H. M., WHYTE, M. K., & DOCKRELL, D. H. (2010). THE IDENTIFICATION OF MARKERS OF MACROPHAGE DIFFERENTIATION IN PMA-STIMULATED THP-1 CELLS AND MONOCYTE-DERIVED MACROPHAGES. *PLOS ONE*, 5(1), E8668.
- DALEY, J. M., BRANCATO, S. K., THOMAY, A. A., REICHNER, J. S., & ALBINA, J. E. (2010). THE PHENOTYPE OF MURINE WOUND MACROPHAGES. *J LEUKOC BIOL*, 87(1), 59-67.
- DALEY, J. M., REICHNER, J. S., MAHONEY, E. J., MANFIELD, L., HENRY, W. L., JR., MASTROFRANCESCO, B., & ALBINA, J. E. (2005). MODULATION OF MACROPHAGE PHENOTYPE BY SOLUBLE PRODUCT(S) RELEASED FROM NEUTROPHILS. *J IMMUNOL*, 174(4), 2265-2272.
- DONALDSON, J. G. (2001). IMMUNOFLUORESCENCE STAINING. DANS *CURRENT PROTOCOLS IN CELL BIOLOGY*: JOHN WILEY & SONS, INC.
- DOVI, J. V., HE, L. K., & DIPIETRO, L. A. (2003). ACCELERATED WOUND CLOSURE IN NEUTROPHIL-DEPLETED MICE. *J LEUKOC BIOL*, 73(4), 448-455.
- DOVI, J. V., SZPADERSKA, A. M., & DIPIETRO, L. A. (2004). NEUTROPHIL FUNCTION IN THE HEALING WOUND: ADDING INSULT TO INJURY? *THROMB HAEMOST*, 92(2), 275-280.

- EMING, S. A., KRIEG, T., & DAVIDSON, J. M. (2007). INFLAMMATION IN WOUND REPAIR: MOLECULAR AND CELLULAR MECHANISMS. *J INVEST DERMATOL*, 127(3), 514-525.
- ENDRES, M., ANDREAS, K., KALWITZ, G., FREYMAN, U., NEUMANN, K., RINGE, J., . . . KAPS, C. (2010). CHEMOKINE PROFILE OF SYNOVIAL FLUID FROM NORMAL, OSTEOARTHRITIS AND RHEUMATOID ARTHRITIS PATIENTS: CCL25, CXCL10 AND XCL1 RECRUIT HUMAN SUBCHONDRAL MESENCHYMAL PROGENITOR CELLS. *OSTEOARTHRITIS CARTILAGE*, 18(11), 1458-1466.
- ENGVALL, E. (2010). THE ELISA, ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY. *CLIN CHEM*, 56(2), 319-320.
- FAHY, N., DE VRIES-VAN MELLE, M. L., LEHMANN, J., WEI, W., GROTENHUIS, N., FARRELL, E., . . . VAN OSCH, G. J. (2014). HUMAN OSTEOARTHRITIC SYNOVIUM IMPACTS CHONDROGENIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS VIA MACROPHAGE POLARISATION STATE. *OSTEOARTHRITIS AND CARTILAGE / OARS, OSTEOARTHRITIS RESEARCH SOCIETY*, 22(8), 1167-1175.
- FAHY, N., FARRELL, E., RITTER, T., RYAN, A. E., & MURPHY, J. M. (2015). IMMUNE MODULATION TO IMPROVE TISSUE ENGINEERING OUTCOMES FOR CARTILAGE REPAIR IN THE OSTEOARTHRITIC JOINT. *TISSUE ENG PART B REV*, 21(1), 55-66.
- FARRUGIA, B. L., WHITELOCK, J. M., JUNG, M., MCGRATH, B., O'GRADY, R. L., MCCARTHY, S. J., & LORD, M. S. (2014). THE LOCALISATION OF INFLAMMATORY CELLS AND EXPRESSION OF ASSOCIATED PROTEOGLYCANS IN RESPONSE TO IMPLANTED CHITOSAN. *BIOMATERIALS*, 35(5), 1462-1477.
- FEARING, B. V., & VAN DYKE, M. E. (2014). IN VITRO RESPONSE OF MACROPHAGE POLARIZATION TO A KERATIN BIOMATERIAL. *ACTA BIOMATERIALIA*, 10(7), 3136-3144.
- FENG, J., ZHAO, L., & YU, Q. (2004). RECEPTOR-MEDIATED STIMULATORY EFFECT OF OLIGOCHITOSAN IN MACROPHAGES. *BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN*, 317(2), 414-420.
- FICHTNER-FEIGL, S., STROBER, W., KAWAKAMI, K., PURI, R. K., & KITANI, A. (2006). IL-13 SIGNALING THROUGH THE IL-13ALPHA2 RECEPTOR IS INVOLVED IN INDUCTION OF TGF-BETA1 PRODUCTION AND FIBROSIS. *NAT MED*, 12(1), 99-106.
- FIEDLER, J., ETZEL, N., & BRENNER, R. E. (2004). TO GO OR NOT TO GO: MIGRATION OF HUMAN MESENCHYMAL PROGENITOR CELLS STIMULATED BY ISOFORMS OF PDGF. *J CELL BIOCHEM*, 93(5), 990-998.

- FIEDLER, J., RODERER, G., GUNTHER, K. P., & BRENNER, R. E. (2002). BMP-2, BMP-4, AND PDGF-BB STIMULATE CHEMOTACTIC MIGRATION OF PRIMARY HUMAN MESENCHYMAL PROGENITOR CELLS. *J CELL BIOCHEM*, 87(3), 305-312.
- FILION, D., LAVERTU, M., & BUSCHMANN, M. D. (2007). IONIZATION AND SOLUBILITY OF CHITOSAN SOLUTIONS RELATED TO THERMOSENSITIVE CHITOSAN/GLYCEROL-PHOSPHATE SYSTEMS. *BIOMACROMOLECULES*, 8(10), 3224-3234.
- FONG, D., ARIGANELLO, M. B., GIRARD-LAUZIERE, J., & HOEMANN, C. D. (2015). BIODEGRADABLE CHITOSAN MICROPARTICLES INDUCE DELAYED STAT-1 ACTIVATION AND LEAD TO DISTINCT CYTOKINE RESPONSES IN DIFFERENTIALLY POLARIZED HUMAN MACROPHAGES IN VITRO. *ACTA BIOMATERIALIA*, 12, 183-194.
- FREYTES, D. O., KANG, J. W., MARCOS-CAMPOS, I., & VUNJAK-NOVAKOVIC, G. (2013). MACROPHAGES MODULATE THE VIABILITY AND GROWTH OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS. *JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY*, 114(1), 220-229.
- FRISBIE, D. D., OXFORD, J. T., SOUTHWOOD, L., TROTTER, G. W., RODKEY, W. G., STEADMAN, J. R., . . . MCILWRAITH, C. W. (2003). EARLY EVENTS IN CARTILAGE REPAIR AFTER SUBCHONDRAL BONE MICROFRACTURE. *CLIN ORTHOP RELAT RES*(407), 215-227.
- GALLAGHER, S. R. (2001). ONE-DIMENSIONAL SDS GEL ELECTROPHORESIS OF PROTEINS. DANS *CURRENT PROTOCOLS IN CELL BIOLOGY*: JOHN WILEY & SONS, INC.
- GAO, Y., MORITA, I., MARUO, N., KUBOTA, T., MUROTA, S., & ASO, T. (1998). EXPRESSION OF IL-6 RECEPTOR AND GP130 IN MOUSE BONE MARROW CELLS DURING OSTEOCLAST DIFFERENTIATION. *BONE*, 22(5), 487-493.
- GARG, A., HOULIHAN, D. D., ALDRIDGE, V., SURESH, S., LI, K. K., KING, A. L., . . . NEWSOME, P. N. (2014). NON-ENZYMATIC DISSOCIATION OF HUMAN MESENCHYMAL STROMAL CELLS IMPROVES CHEMOKINE-DEPENDENT MIGRATION AND MAINTAINS IMMUNOSUPPRESSIVE FUNCTION. *CYTOTHERAPY*, 16(4), 545-559.
- GEISSMANN, F., JUNG, S., & LITTMAN, D. R. (2003). BLOOD MONOCYTES CONSIST OF TWO PRINCIPAL SUBSETS WITH DISTINCT MIGRATORY PROPERTIES. *IMMUNITY*, 19(1), 71-82.
- GORDON, S. (2003). ALTERNATIVE ACTIVATION OF MACROPHAGES. *NAT REV IMMUNOL*, 3(1), 23-35.
- GORDON, S., & MARTINEZ, F. O. (2010). ALTERNATIVE ACTIVATION OF MACROPHAGES: MECHANISM AND FUNCTIONS. *IMMUNITY*, 32(5), 593-604.

- GORZELANNY, C., POPPELMANN, B., PAPPELBAUM, K., MOERSCHBACHER, B. M., & SCHNEIDER, S. W. (2010). HUMAN MACROPHAGE ACTIVATION TRIGGERED BY CHITOTRIOSIDASE-MEDIATED CHITIN AND CHITOSAN DEGRADATION. *BIOMATERIALS*, 31(33), 8556-8563.
- GRASSI, F., CATTINI, L., GAMBARI, L., MANFERDINI, C., PIACENTINI, A., GABUSI, E., . . . LISIGNOLI, G. (2016). T CELL SUBSETS DIFFERENTLY REGULATE OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF HUMAN MESENCHYMAL STROMAL CELLS IN VITRO. *J TISSUE ENG REGEN MED*, 10(4), 305-314.
- GREGORIO, J., MELLER, S., CONRAD, C., DI NARDO, A., HOMEY, B., LAUERMA, A., . . . GILLIET, M. (2010). PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS SENSE SKIN INJURY AND PROMOTE WOUND HEALING THROUGH TYPE I INTERFERONS. *J EXP MED*, 207(13), 2921-2930.
- GUDMUNDSDOTTIR, S., LIEDER, R., SIGURJONSSON, O. E., & PETERSEN, P. H. (2015). CHITOSAN LEADS TO DOWNREGULATION OF YKL-40 AND INFLAMMASOME ACTIVATION IN HUMAN MACROPHAGES. *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH. PART A*.
- GUIHARD, P., DANGER, Y., BROUNAIS, B., DAVID, E., BRION, R., DELECRIN, J., . . . BLANCHARD, F. (2012). INDUCTION OF OSTEOGENESIS IN MESENCHYMAL STEM CELLS BY ACTIVATED MONOCYTES/MACROPHAGES DEPENDS ON ONCOSTATIN M SIGNALING. *STEM CELLS*, 30(4), 762-772.
- GUO, H., CALLAWAY, J. B., & TING, J. P. (2015). INFLAMMASOMES: MECHANISM OF ACTION, ROLE IN DISEASE, AND THERAPEUTICS. *NAT MED*, 21(7), 677-687.
- GUZMAN-MORALES, J., ARIGANELLO, M. B., HAMMAMI, I., THIBAUT, M., JOLICOEUR, M., & HOEMANN, C. D. (2011). BIODEGRADABLE CHITOSAN PARTICLES INDUCE CHEMOKINE RELEASE AND NEGLIGIBLE ARGINASE-1 ACTIVITY COMPARED TO IL-4 IN MURINE BONE MARROW-DERIVED MACROPHAGES. *BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN*, 405(4), 538-544.
- GUZMAN-MORALES, J., EL-GABALAWY, H., PHAM, M. H., TRAN-KHANH, N., MCKEE, M. D., WU, W., . . . HOEMANN, C. D. (2009). EFFECT OF CHITOSAN PARTICLES AND DEXAMETHASONE ON HUMAN BONE MARROW STROMAL CELL OSTEOGENESIS AND ANGIOGENIC FACTOR SECRETION. *BONE*, 45(4), 617-626.
- HAMILTON, J. A. (1997). CSF-1 SIGNAL TRANSDUCTION. *JOURNAL OF LEUKOCYTE BIOLOGY*, 62(2), 145-155.
- HAN, Y., ZHAO, L., YU, Z., FENG, J., & YU, Q. (2005). ROLE OF MANNOSE RECEPTOR IN OLIGOCHITOSAN-MEDIATED STIMULATION OF MACROPHAGE FUNCTION. *INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY*, 5(10), 1533-1542.
- HARRIS, J. (2013). AUTOPHAGY AND IL-1 FAMILY CYTOKINES. *FRONT IMMUNOL*, 4, 83.

- HARRIS, J., DE HARO, S. A., MASTER, S. S., KEANE, J., ROBERTS, E. A., DELGADO, M., & DERETIC, V. (2007). T HELPER 2 CYTOKINES INHIBIT AUTOPHAGIC CONTROL OF INTRACELLULAR MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS. *IMMUNITY*, 27(3), 505-517.
- HARRIS, J., HARTMAN, M., ROCHE, C., ZENG, S. G., O'SHEA, A., SHARP, F. A., . . . LAVELLE, E. C. (2011). AUTOPHAGY CONTROLS IL-1BETA SECRETION BY TARGETING PRO-IL-1BETA FOR DEGRADATION. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 286(11), 9587-9597.
- HASLAM, G., WYATT, D., & KITOS, P. A. (2000). ESTIMATING THE NUMBER OF VIABLE ANIMAL CELLS IN MULTI-CELL CULTURES BASED ON THEIR LACTATE DEHYDROGENASE ACTIVITIES. *CYTOTECHNOLOGY*, 32(1), 63-75.
- HOEMANN, & FONG. (2017). IMMUNOLOGICAL PROPERTIES OF CHITOSAN FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS. *CHITOSAN-BASED BIOMATERIALS VOLUME 1: FUNDAMENTALS*, 45-76.
- HOEMANN, C. D., CHEN, G., MARCHAND, C., TRAN-KHANH, N., THIBAUT, M., CHEVRIER, A., . . . EL-GABALAWY, H. (2010). SCAFFOLD-GUIDED SUBCHONDRAL BONE REPAIR: IMPLICATION OF NEUTROPHILS AND ALTERNATIVELY ACTIVATED ARGINASE-1+ MACROPHAGES. *AM J SPORTS MED*, 38(9), 1845-1856.
- HOEMANN, C. D., GUZMAN-MORALES, J., TRAN-KHANH, N., LAVALLEE, G., JOLICOEUR, M., & LAVERTU, M. (2013). CHITOSAN RATE OF UPTAKE IN HEK293 CELLS IS INFLUENCED BY SOLUBLE VERSUS MICROPARTICLE STATE AND ENHANCED BY SERUM-INDUCED CELL METABOLISM AND LACTATE-BASED MEDIA ACIDIFICATION. *MOLECULES*, 18(1), 1015-1035.
- HOEMANN, C. D., HURTIG, M., ROSSOMACHA, E., SUN, J., CHEVRIER, A., SHIVE, M. S., & BUSCHMANN, M. D. (2005). CHITOSAN-GLYCEROL PHOSPHATE/BLOOD IMPLANTS IMPROVE HYALINE CARTILAGE REPAIR IN OVINE MICROFRACTURE DEFECTS. *J BONE JOINT SURG AM*, 87(12), 2671-2686.
- HOEMANN, C. D., SUN, J., MCKEE, M. D., CHEVRIER, A., ROSSOMACHA, E., RIVARD, G. E., . . . BUSCHMANN, M. D. (2007). CHITOSAN-GLYCEROL PHOSPHATE/BLOOD IMPLANTS ELICIT HYALINE CARTILAGE REPAIR INTEGRATED WITH POROUS SUBCHONDRAL BONE IN MICRODRILLED RABBIT DEFECTS. *OSTEOARTHRITIS CARTILAGE*, 15(1), 78-89.
- HONCZARENKO, M., LE, Y., SWIERKOWSKI, M., GHIRAN, I., GLODEK, A. M., & SILBERSTEIN, L. E. (2006). HUMAN BONE MARROW STROMAL CELLS EXPRESS A DISTINCT SET OF BIOLOGICALLY FUNCTIONAL CHEMOKINE RECEPTORS. *STEM CELLS*, 24(4), 1030-1041.
- HORNBECK, P. V. (1991). ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAYS. *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, 2.1. 1-2.1. 23.

- HUANG, M., KHOR, E., & LIM, L. Y. (2004). UPTAKE AND CYTOTOXICITY OF CHITOSAN MOLECULES AND NANOPARTICLES: EFFECTS OF MOLECULAR WEIGHT AND DEGREE OF DEACETYLATION. *PHARM RES*, 21(2), 344-353.
- HWANG, S. M., CHEN, C. Y., CHEN, S. S., & CHEN, J. C. (2000). CHITINOUS MATERIALS INHIBIT NITRIC OXIDE PRODUCTION BY ACTIVATED RAW 264.7 MACROPHAGES. *BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN*, 271(1), 229-233.
- IQBAL, I., & FLEISCHMANN, R. (2007). TREATMENT OF OSTEOARTHRITIS WITH ANAKINRA. *CURRENT RHEUMATOLOGY REPORTS*, 9(1), 31-35.
- JAMES, T. L. (1998). FUNDAMENTALS OF NMR. *ONLINE TEXTBOOK: DEPARTMENT OF PHARMACEUTICAL CHEMISTRY, UNIVERSITY OF CALIFORNIA, SAN FRANCISCO*, 1-31.
- JANSEN, N. W., ROOSENDAL, G., HOOVELD, M. J., BIJLSMA, J. W., VAN ROON, J. A., THEOBALD, M., & LAFEVER, F. P. (2008). INTERLEUKIN-10 PROTECTS AGAINST BLOOD-INDUCED JOINT DAMAGE. *BR J HAEMATOL*, 142(6), 953-961.
- JEAN, M., SMAOUI, F., LAVERTU, M., METHOT, S., BOUHDOD, L., BUSCHMANN, M. D., & MERZOUKI, A. (2009). CHITOSAN-PLASMID NANOPARTICLE FORMULATIONS FOR IM AND SC DELIVERY OF RECOMBINANT FGF-2 AND PDGF-BB OR GENERATION OF ANTIBODIES. *GENE THER*, 16(9), 1097-1110.
- JEON, S. B., YOON, H. J., CHANG, C. Y., KOH, H. S., JEON, S. H., & PARK, E. J. (2010). GALECTIN-3 EXERTS CYTOKINE-LIKE REGULATORY ACTIONS THROUGH THE JAK-STAT PATHWAY. *J IMMUNOL*, 185(11), 7037-7046.
- KALWITZ, G., ANDREAS, K., ENDRES, M., NEUMANN, K., NOTTER, M., RINGE, J., . . . KAPS, C. (2010). CHEMOKINE PROFILE OF HUMAN SERUM FROM WHOLE BLOOD: MIGRATORY EFFECTS OF CXCL-10 AND CXCL-11 ON HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS. *CONNECT TISSUE RES*, 51(2), 113-122.
- KIM, K. H., & SEDERSTROM, J. M. (2001). ASSAYING CELL CYCLE STATUS USING FLOW CYTOMETRY. *DANS CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*: JOHN WILEY & SONS, INC.
- KING, W., VAN DER WEEGEN, W., VAN DRUMPT, R., SOONS, H., TOLER, K., & WOODSELL-MAY, J. (2016). WHITE BLOOD CELL CONCENTRATION CORRELATES WITH INCREASED CONCENTRATIONS OF IL-1RA AND IMPROVEMENT IN WOMAC PAIN SCORES IN AN OPEN-LABEL SAFETY STUDY OF AUTOLOGOUS PROTEIN SOLUTION. *J EXP ORTHOP*, 3(1), 9.
- KLIONSKY, D. J., ABELIOVICH, H., AGOSTINIS, P., AGRAWAL, D. K., ALIEV, G., ASKEW, D. S., . . . DETER, R. L. (2008). GUIDELINES FOR THE USE AND INTERPRETATION OF ASSAYS FOR MONITORING AUTOPHAGY IN HIGHER EUKARYOTES. *AUTOPHAGY*, 4(2), 151-175.

- KNUTSEN, G., DROGSET, J. O., ENGBRETSSEN, L., GRONTVEDT, T., ISAKSEN, V., LUDVIGSEN, T. C., . . . JOHANSEN, O. (2007). A RANDOMIZED TRIAL COMPARING AUTOLOGOUS CHONDROCYTE IMPLANTATION WITH MICROFRACTURE. FINDINGS AT FIVE YEARS. *J BONE JOINT SURG AM*, 89(10), 2105-2112.
- KNUTSEN, G., ENGBRETSSEN, L., LUDVIGSEN, T. C., DROGSET, J. O., GRONTVEDT, T., SOLHEIM, E., . . . JOHANSEN, O. (2004). AUTOLOGOUS CHONDROCYTE IMPLANTATION COMPARED WITH MICROFRACTURE IN THE KNEE. A RANDOMIZED TRIAL. *J BONE JOINT SURG AM*, 86-A(3), 455-464.
- KODELJA, V., MULLER, C., TENORIO, S., SCHEBESCH, C., ORFANOS, C. E., & GOERDT, S. (1997). DIFFERENCES IN ANGIOGENIC POTENTIAL OF CLASSICALLY VS ALTERNATIVELY ACTIVATED MACROPHAGES. *IMMUNOBIOLOGY*, 197(5), 478-493.
- KOH, T. J., & DIPIETRO, L. A. (2011). INFLAMMATION AND WOUND HEALING: THE ROLE OF THE MACROPHAGE. *EXPERT REV MOL MED*, 13, E23.
- KREUZ, P. C., ERGGELET, C., STEINWACHS, M. R., KRAUSE, S. J., LAHM, A., NIEMEYER, P., . . . SUDKAMP, N. (2006). IS MICROFRACTURE OF CHONDRAL DEFECTS IN THE KNEE ASSOCIATED WITH DIFFERENT RESULTS IN PATIENTS AGED 40 YEARS OR YOUNGER? *ARTHROSCOPY*, 22(11), 1180-1186.
- LAFANTAISIE-FAVREAU, C. H., GUZMAN-MORALES, J., SUN, J., CHEN, G., HARRIS, A., SMITH, T. D., . . . HOEMANN, C. D. (2013). SUBCHONDRAL PRE-SOLIDIFIED CHITOSAN/BLOOD IMPLANTS ELICIT REPRODUCIBLE EARLY OSTEOCHONDRAL WOUND-REPAIR RESPONSES INCLUDING NEUTROPHIL AND STROMAL CELL CHEMOTAXIS, BONE RESORPTION AND REPAIR, ENHANCED REPAIR TISSUE INTEGRATION AND DELAYED MATRIX DEPOSITION. *BMC MUSCULOSKELET DISORD*, 14(1), 27.
- LAMARQUE, G., CRETENET, M., VITON, C., & DOMARD, A. (2005). NEW ROUTE OF DEACETYLATION OF ALPHA- AND BETA-CHITINS BY MEANS OF FREEZE--PUMP OUT--THAW CYCLES. *BIOMACROMOLECULES*, 6(3), 1380-1388.
- LAMARQUE, G., VITON, C., & DOMARD, A. (2004A). COMPARATIVE STUDY OF THE FIRST HETEROGENEOUS DEACETYLATION OF ALPHA- AND BETA-CHITINS IN A MULTISTEP PROCESS. *BIOMACROMOLECULES*, 5(3), 992-1001.
- LAMARQUE, G., VITON, C., & DOMARD, A. (2004B). COMPARATIVE STUDY OF THE SECOND AND THIRD HETEROGENEOUS DEACETYLATIONS OF ALPHA- AND BETA-CHITINS IN A MULTISTEP PROCESS. *BIOMACROMOLECULES*, 5(5), 1899-1907.
- LAVERTU, M., DARRAS, V., & BUSCHMANN, M. D. (2012). KINETICS AND EFFICIENCY OF CHITOSAN REACETYLATION. *CARBOHYDRATE POLYMERS*, 87(2), 1192-1198.

- LAVERTU, M., FILION, D., & BUSCHMANN, M. D. (2008). HEAT-INDUCED TRANSFER OF PROTONS FROM CHITOSAN TO GLYCEROL PHOSPHATE PRODUCES CHITOSAN PRECIPITATION AND GELATION. *BIOMACROMOLECULES*, 9(2), 640-650.
- LAVERTU, M., METHOT, S., TRAN-KHANH, N., & BUSCHMANN, M. D. (2006). HIGH EFFICIENCY GENE TRANSFER USING CHITOSAN/DNA NANOPARTICLES WITH SPECIFIC COMBINATIONS OF MOLECULAR WEIGHT AND DEGREE OF DEACETYLATION. *BIOMATERIALS*, 27(27), 4815-4824.
- LAVERTU, M., XIA, Z., SERREQUI, A. N., BERRADA, M., RODRIGUES, A., WANG, D., . . . GUPTA, A. (2003). A VALIDATED ¹H NMR METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE DEGREE OF DEACETYLATION OF CHITOSAN. *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOMEDICAL ANALYSIS*, 32(6), 1149-1158.
- LAWRENCE, T., & NATOLI, G. (2011). TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF MACROPHAGE POLARIZATION: ENABLING DIVERSITY WITH IDENTITY. *NAT REV IMMUNOL*, 11(11), 750-761.
- LEIBOVICH, S. J., & ROSS, R. (1975). THE ROLE OF THE MACROPHAGE IN WOUND REPAIR. A STUDY WITH HYDROCORTISONE AND ANTIMACROPHAGE SERUM. *AM J PATHOL*, 78(1), 71-100.
- LI, X., CONTRERAS-GARCIA, A., LOVETRI, K., YAKANDAWALA, N., WERTHEIMER, M. R., DE CRESCENZO, G., & HOEMANN, C. D. (2015). FUSION PEPTIDE P15-CSP SHOWS ANTIBIOFILM ACTIVITY AND PRO-OSTEOGENIC ACTIVITY WHEN DEPOSITED AS A COATING ON HYDROPHILIC BUT NOT HYDROPHOBIC SURFACES. *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART A*, 103(12), 3736-3746.
- LIEBERTHAL, J., SAMBAMURTHY, N., & SCANZELLO, C. R. (2015). INFLAMMATION IN JOINT INJURY AND POST-TRAUMATIC OSTEOARTHRITIS. *OSTEOARTHRITIS CARTILAGE*, 23(11), 1825-1834.
- LIU, F. T., & RABINOVICH, G. A. (2005). GALECTINS AS MODULATORS OF TUMOUR PROGRESSION. *NAT REV CANCER*, 5(1), 29-41.
- LOLMEDE, K., CAMPANA, L., VEZZOLI, M., BOSURGI, L., TONLORENZI, R., CLEMENTI, E., . . . ROVERE-QUERINI, P. (2009). INFLAMMATORY AND ALTERNATIVELY ACTIVATED HUMAN MACROPHAGES ATTRACT VESSEL-ASSOCIATED STEM CELLS, RELYING ON SEPARATE HMGB1- AND MMP-9-DEPENDENT PATHWAYS. *J LEUKOC BIOL*, 85(5), 779-787.
- LU, R., & PITHA, P. M. (2001). MONOCYTE DIFFERENTIATION TO MACROPHAGE REQUIRES INTERFERON REGULATORY FACTOR 7. *J BIOL CHEM*, 276(48), 45491-45496.

- LUCAS, T., WAISMAN, A., RANJAN, R., ROES, J., KRIEG, T., MULLER, W., . . . EMING, S. A. (2010). DIFFERENTIAL ROLES OF MACROPHAGES IN DIVERSE PHASES OF SKIN REPAIR. *J IMMUNOL*, 184(7), 3964-3977.
- MA, L. M., SUN J. , NGUYEN S., BUSCHMANN MD. , WINNIK F. AND HOEMANN CD. (2008). PRECISE DERIVATIZATION OF STRUCTURALLY DISTINCT CHITOSANS WITH RHODAMINE B ISOTHIOCYANATE. *CARBOHYDRATE POLYMER*, 72(4), 616-624.
- MA, O., LAVERTU, M., SUN, J., NGUYEN, S., BUSCHMANN, M. D., WINNIK, F. M., & HOEMANN, C. D. (2008). PRECISE DERIVATIZATION OF STRUCTURALLY DISTINCT CHITOSANS WITH RHODAMINE B ISOTHIOCYANATE. *CARBOHYDRATE POLYMERS*, 72(4), 616-624.
- MACKINNON, A. C., FARNWORTH, S. L., HODKINSON, P. S., HENDERSON, N. C., ATKINSON, K. M., LEFFLER, H., . . . SETHI, T. (2008). REGULATION OF ALTERNATIVE MACROPHAGE ACTIVATION BY GALECTIN-3. *J IMMUNOL*, 180(4), 2650-2658.
- MANTOVANI, A., SICA, A., SOZZANI, S., ALLAVENA, P., VECCHI, A., & LOCATI, M. (2004). THE CHEMOKINE SYSTEM IN DIVERSE FORMS OF MACROPHAGE ACTIVATION AND POLARIZATION. *TRENDS IMMUNOL*, 25(12), 677-686.
- MARTINEZ, F. O., GORDON, S., LOCATI, M., & MANTOVANI, A. (2006). TRANSCRIPTIONAL PROFILING OF THE HUMAN MONOCYTE-TO-MACROPHAGE DIFFERENTIATION AND POLARIZATION: NEW MOLECULES AND PATTERNS OF GENE EXPRESSION. *J IMMUNOL*, 177(10), 7303-7311.
- MATHESON, L. A., LABOW, R. S., & SANTERRE, J. P. (2002). BIODEGRADATION OF POLYCARBONATE-BASED POLYURETHANES BY THE HUMAN MONOCYTES-DERIVED MACROPHAGE AND U937 CELL SYSTEMS. *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH*, 61(4), 505-513.
- MCDADE, J. K., BRENNAN-PIERCE, E. P., ARIGANELLO, M. B., LABOW, R. S., & MICHAEL LEE, J. (2013). INTERACTIONS OF U937 MACROPHAGE-LIKE CELLS WITH DECELLULARIZED PERICARDIAL MATRIX MATERIALS: INFLUENCE OF CROSSLINKING TREATMENT. *ACTA BIOMATERIALIA*, 9(7), 7191-7199.
- MCNAB, F., MAYER-BARBER, K., SHER, A., WACK, A., & O'GARRA, A. (2015). TYPE I INTERFERONS IN INFECTIOUS DISEASE. *NAT REV IMMUNOL*, 15(2), 87-103.
- MCNALLY, A. K., MACEWAN, S. R., & ANDERSON, J. M. (2008). FOREIGN BODY-TYPE MULTINUCLEATED GIANT CELL FORMATION REQUIRES PROTEIN KINASE C BETA, DELTA, AND ZETA. *EXPERIMENTAL AND MOLECULAR PATHOLOGY*, 84(1), 37-45.
- MEDEIROS, A., PERES-BUZALAF, C., FORTINO VERDAN, F., & SEREZANI, C. H. (2012). PROSTAGLANDIN E2 AND THE SUPPRESSION OF PHAGOCYTE INNATE

- IMMUNE RESPONSES IN DIFFERENT ORGANS. *MEDIATORS INFLAMM*, 2012, 327568.
- MISHIMA, Y., & LOTZ, M. (2008). CHEMOTAXIS OF HUMAN ARTICULAR CHONDROCYTES AND MESENCHYMAL STEM CELLS. *J ORTHOP RES*, 26(10), 1407-1412.
- MITHOEFER, K., WILLIAMS, R. J., 3RD, WARREN, R. F., POTTER, H. G., SPOCK, C. R., JONES, E. C., . . . MARX, R. G. (2005). THE MICROFRACTURE TECHNIQUE FOR THE TREATMENT OF ARTICULAR CARTILAGE LESIONS IN THE KNEE. A PROSPECTIVE COHORT STUDY. *J BONE JOINT SURG AM*, 87(9), 1911-1920.
- MIZUSHIMA, N., & YOSHIMORI, T. (2007). HOW TO INTERPRET LC3 IMMUNOBLOTTING. *AUTOPHAGY*, 3(6), 542-545.
- MOSSER, D. M., & EDWARDS, J. P. (2008). EXPLORING THE FULL SPECTRUM OF MACROPHAGE ACTIVATION. *NAT REV IMMUNOL*, 8(12), 958-969.
- NAHRENDORF, M., SWIRSKI, F. K., AIKAWA, E., STANGENBERG, L., WURDINGER, T., FIGUEIREDO, J. L., . . . PITTET, M. J. (2007). THE HEALING MYOCARDIUM SEQUENTIALLY MOBILIZES TWO MONOCYTE SUBSETS WITH DIVERGENT AND COMPLEMENTARY FUNCTIONS. *J EXP MED*, 204(12), 3037-3047.
- NGUYEN, S., WINNIK, F. M., & BUSCHMANN, M. D. (2009). IMPROVED REPRODUCIBILITY IN THE DETERMINATION OF THE MOLECULAR WEIGHT OF CHITOSAN BY ANALYTICAL SIZE EXCLUSION CHROMATOGRAPHY. *CARBOHYDRATE POLYMERS*, 75(3), 528-533.
- NICOLAIDOU, V., WONG, M. M., REDPATH, A. N., ERSEK, A., BABAN, D. F., WILLIAMS, L. M., . . . HORWOOD, N. J. (2012). MONOCYTES INDUCE STAT3 ACTIVATION IN HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS TO PROMOTE OSTEOBLAST FORMATION. *PLOS ONE*, 7(7), E39871.
- OHMORI, Y., SMITH, M. F., JR., & HAMILTON, T. A. (1996). IL-4-INDUCED EXPRESSION OF THE IL-1 RECEPTOR ANTAGONIST GENE IS MEDIATED BY STAT6. *J IMMUNOL*, 157(5), 2058-2065.
- OKAMOTO, Y., WATANABE, M., MIYATAKE, K., MORIMOTO, M., SHIGEMASA, Y., & MINAMI, S. (2002). EFFECTS OF CHITIN/CHITOSAN AND THEIR OLIGOMERS/MONOMERS ON MIGRATIONS OF FIBROBLASTS AND VASCULAR ENDOTHELIUM. *BIOMATERIALS*, 23(9), 1975-1979.
- OLIVEIRA, M. I., SANTOS, S. G., OLIVEIRA, M. J., TORRES, A. L., & BARBOSA, M. A. (2012). CHITOSAN DRIVES ANTI-INFLAMMATORY MACROPHAGE POLARISATION AND PRO-INFLAMMATORY DENDRITIC CELL STIMULATION. *EUR CELL MATER*, 24, 136-153.

- OMAR, O. M., GRANELI, C., EKSTROM, K., KARLSSON, C., JOHANSSON, A., LAUSMAA, J., . . . THOMSEN, P. (2011). THE STIMULATION OF AN OSTEOGENIC RESPONSE BY CLASSICAL MONOCYTE ACTIVATION. *BIOMATERIALS*, 32(32), 8190-8204.
- OTT, T. R., PAHUJA, A., LIO, F. M., MISTRY, M. S., GROSS, M., HUDSON, S. C., . . . ALLEVA, D. G. (2005). A HIGH-THROUGHPUT CHEMOTAXIS ASSAY FOR PHARMACOLOGICAL CHARACTERIZATION OF CHEMOKINE RECEPTORS: UTILIZATION OF U937 MONOCYTIC CELLS. *JOURNAL OF PHARMACOLOGICAL AND TOXICOLOGICAL METHODS*, 51(2), 105-114.
- OZAKI, Y., NISHIMURA, M., SEKIYA, K., SUEHIRO, F., KANAWA, M., NIKAWA, H., . . . KATO, Y. (2007). COMPREHENSIVE ANALYSIS OF CHEMOTACTIC FACTORS FOR BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS. *STEM CELLS DEV*, 16(1), 119-129.
- PARK, C. J., GABRIELSON, N. P., PACK, D. W., JAMISON, R. D., & WAGONER JOHNSON, A. J. (2009). THE EFFECT OF CHITOSAN ON THE MIGRATION OF NEUTROPHIL-LIKE HL60 CELLS, MEDIATED BY IL-8. *BIOMATERIALS*, 30(4), 436-444.
- PARK, J. E., & BARBUL, A. (2004). UNDERSTANDING THE ROLE OF IMMUNE REGULATION IN WOUND HEALING. *AM J SURG*, 187.
- PAZ, I., SACHSE, M., DUPONT, N., MOUNIER, J., CEDERFUR, C., ENNINGA, J., . . . SANSONETTI, P. (2010). GALECTIN-3, A MARKER FOR VACUOLE LYSIS BY INVASIVE PATHOGENS. *CELL MICROBIOL*, 12(4), 530-544.
- PERAL DE CASTRO, C., JONES, S. A., NI CHEALLAIGH, C., HEARNDEN, C. A., WILLIAMS, L., WINTER, J., . . . HARRIS, J. (2012). AUTOPHAGY REGULATES IL-23 SECRETION AND INNATE T CELL RESPONSES THROUGH EFFECTS ON IL-1 SECRETION. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, 189(8), 4144-4153.
- PETTIT, A. R., CHANG, M. K., HUME, D. A., & RAGGATT, L. J. (2008). OSTEAL MACROPHAGES: A NEW TWIST ON COUPLING DURING BONE DYNAMICS. *Bone*, 43(6), 976-982.
- PLATANIAS, L. C. (2005). MECHANISMS OF TYPE-I- AND TYPE-II-INTERFERON-MEDIATED SIGNALLING. *NAT REV IMMUNOL*, 5(5), 375-386.
- PONTE, A. L., MARAIS, E., GALLAY, N., LANGONNE, A., DELORME, B., HERAULT, O., . . . DOMENECH, J. (2007). THE IN VITRO MIGRATION CAPACITY OF HUMAN BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS: COMPARISON OF CHEMOKINE AND GROWTH FACTOR CHEMOTACTIC ACTIVITIES. *STEM CELLS*, 25(7), 1737-1745.
- PORPORATTO, C., BIANCO, I. D., RIERA, C. M., & CORREA, S. G. (2003). CHITOSAN INDUCES DIFFERENT L-ARGININE METABOLIC PATHWAYS IN RESTING AND INFLAMMATORY MACROPHAGES. *BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN*, 304(2), 266-272.

- RAMANA, C. V., GIL, M. P., SCHREIBER, R. D., & STARK, G. R. (2002). STAT1-DEPENDENT AND -INDEPENDENT PATHWAYS IN IFN-GAMMA-DEPENDENT SIGNALING. *TRENDS IMMUNOL*, 23(2), 96-101.
- REESE, T. A., LIANG, H. E., TAGER, A. M., LUSTER, A. D., VAN ROOIJEN, N., VOEHRINGER, D., & LOCKSLEY, R. M. (2007). CHITIN INDUCES ACCUMULATION IN TISSUE OF INNATE IMMUNE CELLS ASSOCIATED WITH ALLERGY. *NATURE*, 447(7140), 92-96.
- RICHTER, W. (2009). MESENCHYMAL STEM CELLS AND CARTILAGE IN SITU REGENERATION. *J INTERN MED*, 266(4), 390-405.
- RINGE, J., STRASSBURG, S., NEUMANN, K., ENDRES, M., NOTTER, M., BURMESTER, G. R., . . . SITTINGER, M. (2007). TOWARDS IN SITU TISSUE REPAIR: HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS EXPRESS CHEMOKINE RECEPTORS CXCR1, CXCR2 AND CCR2, AND MIGRATE UPON STIMULATION WITH CXCL8 BUT NOT CCL2. *J CELL BIOCHEM*, 101(1), 135-146.
- ROH, Y. S., PARK, S., KIM, J. W., LIM, C. W., SEKI, E., & KIM, B. (2014). TOLL-LIKE RECEPTOR 7-MEDIATED TYPE I INTERFERON SIGNALING PREVENTS CHOLESTASIS- AND HEPATOTOXIN-INDUCED LIVER FIBROSIS. *HEPATOLOGY*, 60(1), 237-249.
- RUSTER, B., GRACE, B., SEITZ, O., SEIFRIED, E., & HENSCHLER, R. (2005). INDUCTION AND DETECTION OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELL MIGRATION IN THE 48-WELL REUSABLE TRANSWELL ASSAY. *STEM CELLS AND DEVELOPMENT*, 14(2), 231-235.
- SCANZELLO, C. R., & GOLDRING, S. R. (2012). THE ROLE OF SYNOVITIS IN OSTEOARTHRITIS PATHOGENESIS. *BONE*, 51(2), 249-257.
- SCAPINI, P., LAPINET-VERA, J. A., GASPERINI, S., CALZETTI, F., BAZZONI, F., & CASSATELLA, M. A. (2000). THE NEUTROPHIL AS A CELLULAR SOURCE OF CHEMOKINES. *IMMUNOL REV*, 177, 195-203.
- SCHAFER, M., & BARBUL, A. (1998). LYMPHOCYTE FUNCTION IN WOUND HEALING AND FOLLOWING INJURY. *BR J SURG*, 85. DOI:10.1046/J.1365-2168.1998.00734.X
- SCHLUNDT, C., SCHELL, H., GOODMAN, S. B., VUNJAK-NOVAKOVIC, G., DUDA, G. N., & SCHMIDT-BLEEK, K. (2015). IMMUNE MODULATION AS A THERAPEUTIC STRATEGY IN BONE REGENERATION. *J EXP ORTHOP*, 2(1), 1.
- SCHMIDT-BLEEK, K., SCHELL, H., KOLAR, P., PFAFF, M., PERKA, C., BUTTGEREIT, F., . . . LIENAU, J. (2009). CELLULAR COMPOSITION OF THE INITIAL FRACTURE HEMATOMA COMPARED TO A MUSCLE HEMATOMA: A STUDY IN SHEEP. *J ORTHOP RES*, 27(9), 1147-1151.

- SCHUTTE, R. J., PARISI-AMON, A., & REICHERT, W. M. (2009). CYTOKINE PROFILING USING MONOCYTES/MACROPHAGES CULTURED ON COMMON BIOMATERIALS WITH A RANGE OF SURFACE CHEMISTRIES. *JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH. PART A*, 88(1), 128-139.
- SESLIA, S. B., DUHR, R., MEDEIROS DA CUNHA, C., TODOROV, A., SCHAELEN, S., PADOVAN, E., . . . BARBERO, A. (2015). ANTI-INFLAMMATORY/TISSUE REPAIR MACROPHAGES ENHANCE THE CARTILAGE-FORMING CAPACITY OF HUMAN BONE MARROW-DERIVED MESENCHYMAL STROMAL CELLS. *J CELL PHYSIOL*, 230(6), 1258-1269.
- SHAPIRO, F., KOIDE, S., & GLIMCHER, M. J. (1993). CELL ORIGIN AND DIFFERENTIATION IN THE REPAIR OF FULL-THICKNESS DEFECTS OF ARTICULAR CARTILAGE. *J BONE JOINT SURG AM*, 75(4), 532-553.
- SHIBATA, Y., METZGER, W. J., & MYRVIK, Q. N. (1997). CHITIN PARTICLE-INDUCED CELL-MEDIATED IMMUNITY IS INHIBITED BY SOLUBLE MANNAN: MANNOSE RECEPTOR-MEDIATED PHAGOCYTOSIS INITIATES IL-12 PRODUCTION. *JOURNAL OF IMMUNOLOGY*, 159(5), 2462-2467.
- SHIVE M. S., H. C. D., RESTREPO A., HURTIG M. B., DUVAL N., RANGER P., STANISH W. AND BUSCHMANN M. D. (2006). BST-CARGEL: IN SITU CHONDROINDUCTION FOR CARTILAGE REPAIR. *OPERATIVE TECHNIQUES IN ORTHOPAEDICS*, 16(NA): 271-278.
- SIMARD, P., GALARNEAU, H., MAROIS, S., RUSU, D., HOEMANN, C. D., POUBELLE, P. E., . . . FERNANDES, M. J. (2009). NEUTROPHILS EXHIBIT DISTINCT PHENOTYPES TOWARD CHITOSANS WITH DIFFERENT DEGREES OF DEACETYLATION: IMPLICATIONS FOR CARTILAGE REPAIR. *ARTHRITIS RES THER*, 11(3), R74.
- SIMEONE, R., SAYES, F., SONG, O., GROSCHEL, M. I., BRODIN, P., BROSC, R., & MAJLESSI, L. (2015). CYTOSOLIC ACCESS OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS: CRITICAL IMPACT OF PHAGOSOMAL ACIDIFICATION CONTROL AND DEMONSTRATION OF OCCURRENCE IN VIVO. *PLOS PATHOG*, 11(2), E1004650.
- SMITH, C. L. (2001). BASIC CONFOCAL MICROSCOPY. *DANS CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*: JOHN WILEY & SONS, INC.
- SMITH, M. D. (2011). THE NORMAL SYNOVIUM. *OPEN RHEUMATOL J*, 5, 100-106.
- SORDI, V., MALOSIO, M. L., MARCHESI, F., MERCALLI, A., MELZI, R., GIORDANO, T., . . . PIEMONTE, L. (2005). BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS EXPRESS A RESTRICTED SET OF FUNCTIONALLY ACTIVE CHEMOKINE RECEPTORS CAPABLE OF PROMOTING MIGRATION TO PANCREATIC ISLETS. *BLOOD*, 106(2), 419-427.

- STANISH, W. D., MCCORMACK, R., FORRIOL, F., MOHTADI, N., PELET, S., DESNOYERS, J., . . . SHIVE, M. S. (2013). NOVEL SCAFFOLD-BASED BST-CARGEL TREATMENT RESULTS IN SUPERIOR CARTILAGE REPAIR COMPARED WITH MICROFRACTURE IN A RANDOMIZED CONTROLLED TRIAL. *J BONE JOINT SURG AM*, 95(18), 1640-1650.
- STICH, S., LOCH, A., LEINHASE, I., NEUMANN, K., KAPS, C., SITTINGER, M., & RINGE, J. (2008). HUMAN PERIOSTEUM-DERIVED PROGENITOR CELLS EXPRESS DISTINCT CHEMOKINE RECEPTORS AND MIGRATE UPON STIMULATION WITH CCL2, CCL25, CXCL8, CXCL12, AND CXCL13. *EUR J CELL BIOL*, 87(6), 365-376.
- STRAND, V., KIMBERLY, R., & ISAACS, J. D. (2007). BIOLOGIC THERAPIES IN RHEUMATOLOGY: LESSONS LEARNED, FUTURE DIRECTIONS. *NAT REV DRUG DISCOV*, 6(1), 75-92.
- STRAUSS, E. J., BARKER, J. U., KERCHER, J. S., COLE, B. J., & MITHOEFER, K. (2010). AUGMENTATION STRATEGIES FOLLOWING THE MICROFRACTURE TECHNIQUE FOR REPAIR OF FOCAL CHONDRAL DEFECTS. *CARTILAGE*, 1(2), 145-152.
- SUGIYAMA, H., HISAMICHI, K., SAKAI, K., USUI, T., ISHIYAMA, J. I., KUDO, H., . . . SENDA, Y. (2001). THE CONFORMATIONAL STUDY OF CHITIN AND CHITOSAN OLIGOMERS IN SOLUTION. *BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY*, 9(2), 211-216.
- SUNDSTROM, C., & NILSSON, K. (1976). ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF A HUMAN HISTIOCYTIC LYMPHOMA CELL LINE (U-937). *INT J CANCER*, 17(5), 565-577.
- TAK, P. P. (2004). IFN-BETA IN RHEUMATOID ARTHRITIS. *FRONT BIOSCI*, 9, 3242-3247.
- TAMIYA, T., KASHIWAGI, I., TAKAHASHI, R., YASUKAWA, H., & YOSHIMURA, A. (2011). SUPPRESSORS OF CYTOKINE SIGNALING (SOCS) PROTEINS AND JAK/STAT PATHWAYS: REGULATION OF T-CELL INFLAMMATION BY SOCS1 AND SOCS3. *ARTERIOSCLER THROMB VASC BIOL*, 31(5), 980-985.
- TEBO, J. M., KIM, H. S., GAO, J., ARMSTRONG, D. A., & HAMILTON, T. A. (1998). INTERLEUKIN-10 SUPPRESSES IP-10 GENE TRANSCRIPTION BY INHIBITING THE PRODUCTION OF CLASS I INTERFERON. *BLOOD*, 92(12), 4742-4749.
- THIBAULT, M., ASTOLFI, M., TRAN-KHANH, N., LAVERTU, M., DARRAS, V., MERZOUKI, A., & BUSCHMANN, M. D. (2011). EXCESS POLYCATION MEDIATES EFFICIENT CHITOSAN-BASED GENE TRANSFER BY PROMOTING LYSOSOMAL RELEASE OF THE POLYPLEXES. *BIOMATERIALS*, 32(20), 4639-4646.
- THIBAULT, M. M., HOEMANN, C. D., & BUSCHMANN, M. D. (2007). FIBRONECTIN, VITRONECTIN, AND COLLAGEN I INDUCE CHEMOTAXIS AND HAPTOTAXIS

OF HUMAN AND RABBIT MESENCHYMAL STEM CELLS IN A STANDARDIZED TRANSMEMBRANE ASSAY. *STEM CELLS DEV*, 16(3), 489-502.

THURSTON, T. L., WANDEL, M. P., VON MUHLINEN, N., FOEGLEIN, A., & RANDOW, F. (2012). GALECTIN 8 TARGETS DAMAGED VESICLES FOR AUTOPHAGY TO DEFEND CELLS AGAINST BACTERIAL INVASION. *NATURE*, 482(7385), 414-418.

TOBEN, D., SCHROEDER, I., EL KHASSAWNA, T., MEHTA, M., HOFFMANN, J. E., FRISCH, J. T., . . . DUDA, G. N. (2011). FRACTURE HEALING IS ACCELERATED IN THE ABSENCE OF THE ADAPTIVE IMMUNE SYSTEM. *J BONE MINER RES*, 26(1), 113-124.

TOMIHATA, K., & IKADA, Y. (1997). IN VITRO AND IN VIVO DEGRADATION OF FILMS OF CHITIN AND ITS DEACETYLATED DERIVATIVES. *BIOMATERIALS*, 18(7), 567-575.

TOMMERAAS, K., VARUM, K. M., CHRISTENSEN, B. E., & SMIDSROD, O. (2001A). PREPARATION AND CHARACTERISATION OF OLIGOSACCHARIDES PRODUCED BY NITROUS ACID DEPOLYMERISATION OF CHITOSANS. *CARBOHYDRATE RESEARCH*, 333(2), 137-144.

TOMMERAAS, K., VARUM, K. M., CHRISTENSEN, B. E., & SMIDSROD, O. (2001B). PREPARATION AND CHARACTERISATION OF OLIGOSACCHARIDES PRODUCED BY NITROUS ACID DEPOLYMERISATION OF CHITOSANS. *CARBOHYDRATE RESEARCH*, 333(2), 137-144.

TSUCHIYA, S., YAMABE, M., YAMAGUCHI, Y., KOBAYASHI, Y., KONNO, T., & TADA, K. (1980). ESTABLISHMENT AND CHARACTERIZATION OF A HUMAN ACUTE MONOCYTIC LEUKEMIA CELL LINE (THP-1). *INTERNATIONAL JOURNAL OF CANCER. JOURNAL INTERNATIONAL DU CANCER*, 26(2), 171-176.

UENO, H., NAKAMURA, F., MURAKAMI, M., OKUMURA, M., KADOSAWA, T., & FUJINAG, T. (2001). EVALUATION EFFECTS OF CHITOSAN FOR THE EXTRACELLULAR MATRIX PRODUCTION BY FIBROBLASTS AND THE GROWTH FACTORS PRODUCTION BY MACROPHAGES. *BIOMATERIALS*, 22(15), 2125-2130.

USAMI, Y., OKAMOTO, Y., TAKAYAMA, T., SHIGEMASA, Y., & MINAMI, S. (1998). CHITIN AND CHITOSAN STIMULATE CANINE POLYMORPHONUCLEAR CELLS TO RELEASE LEUKOTRIENE B4 AND PROSTAGLANDIN E2. *J BIOMED MATER RES*, 42(4), 517-522.

VAN HOLTEN, J., PAVELKA, K., VENCovsky, J., STAHL, H., ROZMAN, B., GENOVESE, M., . . . TAK, P. P. (2005). A MULTICENTRE, RANDOMISED, DOUBLE BLIND, PLACEBO CONTROLLED PHASE II STUDY OF SUBCUTANEOUS INTERFERON BETA-1A IN THE TREATMENT OF PATIENTS WITH ACTIVE RHEUMATOID ARTHRITIS. *ANN RHEUM DIS*, 64(1), 64-69.

- VARUM, K. M., ANTHONSEN, M. W., GRASDALEN, H., & SMIDSROD, O. (1991A). DETERMINATION OF THE DEGREE OF N-ACETYLATION AND THE DISTRIBUTION OF N-ACETYL GROUPS IN PARTIALLY N-DEACETYLATED CHITINS (CHITOSANS) BY HIGH-FIELD N.M.R. SPECTROSCOPY. *CARBOHYDR RES*, 211(1), 17-23.
- VARUM, K. M., ANTHONSEN, M. W., GRASDALEN, H., & SMIDSROD, O. (1991B). HIGH-FIELD NMR-SPECTROSCOPY OF PARTIALLY N-DEACETYLATED CHITINS (CHITOSANS) .1. DETERMINATION OF THE DEGREE OF N-ACETYLATION AND THE DISTRIBUTION OF N-ACETYL GROUPS IN PARTIALLY N-DEACETYLATED CHITINS (CHITOSANS) BY HIGH-FIELD NMR-SPECTROSCOPY. *CARBOHYDRATE RESEARCH*, 211(1), 17-23.
- VARUM, K. M., OTTOY, M. H., & SMIDSROD, O. (2001). ACID HYDROLYSIS OF CHITOSANS. *CARBOHYDRATE POLYMERS*, 46(1), 89-98.
- VASCONCELOS, D. P., FONSECA, A. C., COSTA, M., AMARAL, I. F., BARBOSA, M. A., AGUAS, A. P., & BARBOSA, J. N. (2013). MACROPHAGE POLARIZATION FOLLOWING CHITOSAN IMPLANTATION. *BIOMATERIALS*, 34(38), 9952-9959.
- VERHOECKX, K. C., BIJLSMA, S., DE GROENE, E. M., WITKAMP, R. F., VAN DER GREEF, J., & RODENBURG, R. J. (2004). A COMBINATION OF PROTEOMICS, PRINCIPAL COMPONENT ANALYSIS AND TRANSCRIPTOMICS IS A POWERFUL TOOL FOR THE IDENTIFICATION OF BIOMARKERS FOR MACROPHAGE MATURATION IN THE U937 CELL LINE. *PROTEOMICS*, 4(4), 1014-1028.
- VON LUTTICHAU, I., NOTOHAMIPRODJO, M., WECHSELBERGER, A., PETERS, C., HENGER, A., SELIGER, C., . . . NELSON, P. J. (2005). HUMAN ADULT CD34-PROGENITOR CELLS FUNCTIONALLY EXPRESS THE CHEMOKINE RECEPTORS CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, AND CCR10 BUT NOT CXCR4. *STEM CELLS AND DEVELOPMENT*, 14(3), 329-336.
- WANG, Q. J., ACS, P., GOODNIGHT, J., GIESE, T., BLUMBERG, P. M., MISCHAK, H., & MUSHINSKI, J. F. (1997). THE CATALYTIC DOMAIN OF PROTEIN KINASE C-DELTA IN RECIPROCAL DELTA AND EPSILON CHIMERAS MEDIATES PHORBOL ESTER-INDUCED MACROPHAGE DIFFERENTIATION OF MOUSE PROMYELOCYTES. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 272(1), 76-82.
- WEDMORE, I., MCMANUS, J. G., PUSATERI, A. E., & HOLCOMB, J. B. (2006). A SPECIAL REPORT ON THE CHITOSAN-BASED HEMOSTATIC DRESSING: EXPERIENCE IN CURRENT COMBAT OPERATIONS. *J TRAUMA*, 60(3), 655-658.
- WILGUS, T. A., ROY, S., & MCDANIEL, J. C. (2013). NEUTROPHILS AND WOUND REPAIR: POSITIVE ACTIONS AND NEGATIVE REACTIONS. *ADV WOUND CARE (NEW ROCHELLE)*, 2(7), 379-388.

- WOJDASIEWICZ, P., PONIATOWSKI, L. A., & SZUKIEWICZ, D. (2014). THE ROLE OF INFLAMMATORY AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINES IN THE PATHOGENESIS OF OSTEOARTHRITIS. *MEDIATORS INFLAMM*, 2014, 561459.
- WOLTERBEEK, H. T., & VAN DER MEER, A. J. (2005). OPTIMIZATION, APPLICATION, AND INTERPRETATION OF LACTATE DEHYDROGENASE MEASUREMENTS IN MICROWELL DETERMINATION OF CELL NUMBER AND TOXICITY. *ASSAY DRUG DEV TECHNOL*, 3(6), 675-682.
- YOON, H. J., MOON, M. E., PARK, H. S., IM, S. Y., & KIM, Y. H. (2007). CHITOSAN OLIGOSACCHARIDE (COS) INHIBITS LPS-INDUCED INFLAMMATORY EFFECTS IN RAW 264.7 MACROPHAGE CELLS. *BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN*, 358(3), 954-959.
- ZHANG, X., EDWARDS, J. P., & MOSSER, D. M. (2009). THE EXPRESSION OF EXOGENOUS GENES IN MACROPHAGES: OBSTACLES AND OPPORTUNITIES. *METHODS MOL BIOL*, 531, 123-143.

ANNEXE A – CERTIFICATS D'ÉTHIQUE DE LA RECHERCHE AVEC DES ÊTRES HUMAINS DE L'ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Certificats d'approbation éthique et biosécurité pour les projets de recherche conduits durant cette thèse doctorale



RENOUVELLEMENT CERTIFICAT D'ACCEPTATION D'UN PROJET
DE RECHERCHE PAR LE COMITÉ D'ÉTHIQUE DE LA
RECHERCHE AVEC DES ÊTRES HUMAINS DE L'ÉCOLE
POLYTECHNIQUE

Montréal, le 26 juin 2014

Mme Caroline Hoemann
Département de génie chimique
Polytechnique Montréal

N/Réf : Dossier CÉR-05/06-26

Monsieur,

Je vous remercie d'avoir produit votre rapport annuel pour le projet de recherche intitulé « *Effet du chitosane sur les cellules stromales provenant de la moelle* » impliquant des êtres humains.

Étant donné que vous n'avez soulevé aucun problème particulier dans le déroulement dudit projet, votre certificat de conformité éthique est renouvelé pour une année supplémentaire.

Votre certificat est maintenant valide du **26 juin 2014 au 25 juin 2015**.

Veuillez noter que conformément aux exigences des organismes subventionnaires, nous vous demanderons de produire à nouveau un rapport annuel si votre projet n'est pas terminé d'ici un an.

Entre temps, n'oubliez pas de m'informer sans délai de toute modification qui pourrait être apportée à votre protocole expérimental, ou de tout problème imprévu pouvant avoir une incidence sur la santé et la sécurité des personnes impliquées dans votre projet.

Bonne continuation dans la poursuite de vos travaux de recherche.

Anne-Marie Bourret, ing.
Secrétaire
Comité d'éthique de la recherche avec des êtres humains

**Comité d'éthique de la recherche
avec des êtres humains**
Pavillon principal
Téléphone : 514 340-4722
Télécopieur : 514 340-4992
Anne-Marie Bourret, ing., secrétaire
Courriel : anne-marie.bourret@polymtl.ca

Membres réguliers du comité :
Marie-Josée Bernard, avocate et étudiante
Mario Bourdault, mathématiques et génie industriel
Farida Cheriet, génie informatique et génie logiciel*
Sophie De Serres, IRSST
Delphine Périé-Curnier, génie mécanique
Élodie Petit, juriste et étudiante
Jean-Marc Robert, mathématiques et génie industriel
* présidente du Comité

Campus de l'Université de Montréal
2900, boul. Édouard-Montpetit
2500, chemin de Polytechnique
Montréal (Québec) Canada H3T 1J4

Adresse postale
C.P. 6079, succ. Centre-Ville
Montréal (Québec) Canada H3C 3A7



**Direction de la
recherche, de
l'innovation et des
affaires
internationales**

Adresse civique
Campus de
l'Université de Montréal
2900, boul. Édouard-Montpetit
École Polytechnique
2500, chemin de Polytechnique
Montréal (Québec) H3T 1J4

Adresse postale
C.P. 6070, succursale Centre-ville
Montréal (Québec) H3C 3A7

Téléphone : (514) 340-4990
Télécopieur : (514) 340-4992

**CERTIFICAT D'ACCEPTATION D'UN PROJET DE RECHERCHE
PRÉSENTANT DES RISQUES BIOLOGIQUES**

Montréal, le 3 septembre 2015

M. David Fong
Mme Caroline Hoemann
Département de génie chimique
École Polytechnique de Montréal

N/Réf : Dossier BIO-14/15-08

Madame, Monsieur,

J'ai le plaisir de vous informer que votre projet de recherche intitulé « *Analysis of primary human blood cell responses to biomaterials (macrophages cultures)* » financé par les IRSC (subvention MOP-303615) a été évalué par notre agente de biosécurité, Mme Carole Savoie.

Votre projet satisfait aux exigences de Polytechnique relativement aux travaux de recherche impliquant des risques biologiques et peut, par conséquent, aller de l'avant, sur la base de l'information que vous nous avez fournie, ainsi que l'avis de la responsable de la biosécurité de Polytechnique.

Il est entendu que le présent certificat est valable pour le projet ci-dessus, tel qu'attesté par notre agente de biosécurité. Cette dernière devra être informée de toute modification qui pourrait être apportée ultérieurement au projet de recherche, de même que de tout problème imprévu pouvant survenir dans le cadre de celui-ci.

Je vous prie de me faire parvenir un bref rapport annuel faisant état de l'avancement de vos travaux ainsi qu'un avis à la fin de ceux-ci.

Je vous souhaite bonne chance dans vos travaux de recherche,

Céline Roehrig, M.A., M.Sc.A.
Coordonnatrice administrative
Recherche avec des risques biologiques

c.c. : Olivier Grenier, BRCDT
Brigitte Coté, Service des finances
Carole Savoie, Direction de l'administration, Secteur santé-sécurité



Direction de la
recherche, de
l'innovation et des
affaires
internationales

adresse civique
Campus de
Université de Montréal
900, boul. Édouard-Montpetit
École Polytechnique
500, chemin de Polytechnique
Montréal (Québec) H3T 1J4

adresse postale
C.P. 6079, succursale Centre-ville
Montréal (Québec) H3C 3A7

téléphone : (514) 340-4990
télécopieur : (514) 340-4992

**CERTIFICAT D'ACCEPTATION D'UN PROJET DE RECHERCHE
PRÉSENTANT DES RISQUES BIOLOGIQUES**

Montréal, le 3 septembre 2015

M. David Fong
Mme Caroline Hoemann
Département de génie chimique
École Polytechnique de Montréal

N/Réf : Dossier BIO-14/15-05

Madame, Monsieur,

J'ai le plaisir de vous informer que votre projet de recherche intitulé « *Cultures of primary human bone marrow-stromal cells and human cell lines for analysis of cellular responses to biomaterials* » financé par les IRSC (subvention MOP-303615) a été évalué par notre agente de biosécurité, Mme Carole Savoie.

Votre projet satisfait aux exigences de Polytechnique relativement aux travaux de recherche impliquant des risques biologiques et peut, par conséquent, aller de l'avant, sur la base de l'information que vous nous avez fournie, ainsi que l'avis de la responsable de la biosécurité de Polytechnique.

Il est entendu que le présent certificat est valable pour le projet ci-dessus, tel qu'attesté par notre agente de biosécurité. Cette dernière devra être informée de toute modification qui pourrait être apportée ultérieurement au projet de recherche, de même que de tout problème imprévu pouvant survenir dans le cadre de celui-ci.

Je vous prie de me faire parvenir un bref rapport annuel faisant état de l'avancement de vos travaux ainsi qu'un avis à la fin de ceux-ci.

Je vous souhaite bonne chance dans vos travaux de recherche,

Céline Roehrig, M.A., M.Sc.A.
Coordonnatrice administrative
Recherche avec des risques biologiques

c.c. : Olivier Grenier, BRCDT
Brigitte Coté, Service des finances
Carole Savoie, Direction de l'administration, Secteur santé-sécurité



**Direction de la
recherche, de
l'innovation et des
affaires internationales**

Adresse civique :

Campus de l'Université de
Montréal
2900, boul. Édouard-Montpetit
École Polytechnique
2500, chemin de Polytechnique
Montréal (Québec) H3T 1J4

Adresse postale :

C.P. 6079, succursale Centre-ville
Montréal (Québec) H3C 3A7

Téléphone : (514) 340-4990
Télécopieur : (514) 340-4992

**RENOUVELLEMENT CERTIFICAT D'ACCEPTATION D'UN
PROJET DE RECHERCHE PRÉSENTANT DES RISQUES
BIOLOGIQUES**

Le 2 septembre 2016

Mme Caroline Hoemann
M. David Fond
Mme Jessica Guzman-Morales
Département de génie chimique
École Polytechnique de Montréal

N/Réf : Dossier BIO-1415-05

Mesdames, Monsieur,

J'ai le plaisir de vous informer que nous avons bien reçu votre rapport annuel faisant état de l'avancement de votre projet de recherche intitulé « *Cultures of primary human bone marrow-stromal cells and human cell lines for analysis of cellular responses to biomaterials* ».

Étant donné qu'aucun problème particulier n'a été soulevé dans votre rapport, votre certificat d'acceptation est renouvelé pour une période d'un an.

Le présent certificat est valide du **2 septembre 2016 au 1^{er} septembre 2017**.

Veuillez noter que conformément aux exigences des organismes subventionnaires, nous vous demanderons de produire à nouveau un rapport annuel si votre projet n'est pas terminé d'ici un an.

Je tiens à profiter de l'occasion pour vous rappeler de nous informer de toute modification qui pourrait être apportée ultérieurement au protocole expérimental, ou de tout problème imprévu qui pourrait survenir dans le cadre de ce projet.

Salutations cordiales,

Céline Roehrig, M.A., M.Sc.A.
Coordonnatrice administrative
Travaux de recherche comportant des risques biologiques

ANNEXE B – AUTORISATION DE L'ÉDITEUR ELSEVIER POUR DROITS D'AUTEURS

Autorisation de l'éditeur Elsevier pour la présentation du contenu de l'article #1 présenté dans cette thèse.

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS
Oct 21, 2016

This Agreement between David Fong ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	3967230970697
License date	Oct 13, 2016
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Acta Biomaterialia
Licensed Content Title	Biodegradable chitosan microparticles induce delayed STAT-1 activation and lead to distinct cytokine responses in differentially polarized human macrophages in vitro
Licensed Content Author	David Fong, Marianne B. Ariganello, Joël Girard-Lauzière, Caroline D. Hoemann
Licensed Content Date	15 January 2015
Licensed Content Volume Number	12
Licensed Content Issue Number	n/a
Licensed Content Pages	12
Start Page	183
End Page	194
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	full article
Format	electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	No
Order reference number	
Title of your thesis/dissertation	IDENTIFICATION DES PROPRIÉTÉS STRUCTURALES DU CHITOSANE INDUISANT LA LIBÉRATION DE CYTOKINES PRO-RÉGÉNÉRATRICES CHEZ LES MACROPHAGES HUMAINS
Expected completion date	Dec 2016
Estimated size (number of	170

pages)
 Elsevier VAT number GB 494 6272 12
 David Fong
 2900 boul. Édouard-Montpetit

 Requestor Location Montreal, QC h3C 3A7
 Canada
 Attn: David Fong
 Total 0.00 USD
 Terms and Conditions

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier

Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com)

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. **Reservation of Rights:** Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. **License Contingent Upon Payment:** While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. **Warranties:** Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. **Indemnity:** You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. **No Transfer of License:** This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these

terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting,

copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- – immediately
 - via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
 - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
 - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
 - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- – after the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- – link to the formal publication via its DOI
- – bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- – if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all

value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. For book authors the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. Thesis/Dissertation: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission

from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- – Associating advertising with the full text of the Article
- – Charging fees for document delivery or access
- – Article aggregation
- – Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.8

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.
