



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**UNIVERSITE HENRI POINCARE - NANCY 1**  
**2011**

---

**FACULTE DE PHARMACIE**

**L'acide hyaluronique :  
Production microbiologique et applications**

Présentée et soutenue publiquement

**Le 25 octobre 2011**

pour obtenir

**le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie**

par **Mathieu POINSOT**

né le 18 juillet 1985 à Nancy (54)

**Membres du Jury**

**Président :** **Pierre LEROY,** **Professeur, Faculté de Pharmacie de Nancy**

**Directeur :** **Emmanuel RONDAGS,** **Maitre de Conférences, ENSAIA**

**Juges :** **Jacques MAGDALOU,** **Docteur, Directeur de Recherche, CNRS**

**Joël COULON,** **Maitre de Conférences, Faculté de Pharmacie de Nancy**

UNIVERSITÉ Henri Poincaré, NANCY 1

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année universitaire 2010-2011

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Président de la Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Président de la Commission Prospective Facultaire

Jean-Yves JOUZEAU

Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS : Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la filière Officine : Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie : Isabelle LARTAUD, Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier : Jean-Michel SIMON

Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. : Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. : Bertrand RIHN

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Marie-Madeleine GALTEAU

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Dominique NOTTER

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANT HONORAIRE

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

**ENSEIGNANTS****Section CNU\* Discipline d'enseignement****PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**

Chantal FINANCE	82	Virologie, Immunologie
Jean-Yves JOUZEAU	80	Bioanalyse du médicament
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

Gilles AULAGNER	86	Pharmacie clinique
Jean-Claude BLOCK	87	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Max HENRY	87	Botanique, Mycologie
Pierre LABRUDE	86	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	32	Chimie organique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Louis MERLIN	87	Biologie cellulaire
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Nathalie THILLY	81	Santé publique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Mariette BEAUD	87	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël COULON	87	Biochimie
Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie

ENSEIGNANTS (suite)	Section CNU*	Discipline d'enseignement
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie
Béatrice FAIVRE	87	Hématologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Caroline GAUCHER-DI STASIO	85/86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Frédéric JORAND	87	Santé publique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie
Francine KEDZIEREWICZ	85	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Faten MERHI-SOUSSI	87	Hématologie
Christophe MERLIN	87	Microbiologie
Blandine MOREAU	86	Pharmacognosie
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Francine PAULUS	85	Informatique
Christine PERDICAKIS	86	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Mohamed ZAIOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

ENSEIGNANTS (suite)

Section CNU\* Discipline d'enseignement

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER 86 Sémiologie

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD 11 Anglais

\*Discipline du Conseil National des Universités :

80ème et 85ème : Sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81ème et 86ème : Sciences du médicament et des autres produits de santé

82ème et 87ème : Sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32ème : Chimie organique, minérale, industrielle

11ème : Langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

# SERMENT DES APOTHICAires



**Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :**

**D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.**

**D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.**

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.**

**Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.**



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,  
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES,  
CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDERES COMME  
PROPRES A LEUR AUTEUR ».

## Remerciements

Au Professeur Pierre LEROY, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury.

Pour votre disponibilité et votre confiance dans ce travail.

Pour votre enseignement que j'ai pu apprécier pendant mes premières années d'études supérieures.

A monsieur Emmanuel RONDAGS, Maitre de conférences, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de diriger ce travail.

Pour m'avoir inspiré le sujet de cette thèse.

Pour avoir partager avec moi vos connaissances et votre expérience.

Au Docteur Jacques MAGDALOU, qui me fait l'honneur de siéger dans ce jury.

Pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail.

Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères et profonds remerciements.

A monsieur Joël COULON, Maitre de conférences, qui me fait l'honneur de siéger dans ce jury.

Pour vos conseils avisés.

Veuillez trouver ici le témoignage de mon plus profond respect et de ma plus vive reconnaissance.

A ma famille et tout particulièrement mes parents, pour leur soutien et leur confiance tout au long de mon (long) cursus.

A mes amis des bancs de la faculté, de paillasse et aux membres des associations étudiantes AHNEP et AAEPNI, pour les moments partagés.

# Sommaire

Liste des abréviations .....	16
Liste des tableaux .....	18
Liste des figures .....	19
Liste des annexes .....	21
Introduction générale .....	22
Partie 1 : Généralités .....	25
1. Structure chimique .....	25
2. Propriétés physicochimiques .....	25
2.1. Masse moléculaire .....	26
2.2. Solubilité et viscosité .....	26
2.3. Etudes en phase solide .....	27
2.4. Sensibilité aux agents physiques, chimiques et enzymatiques .....	28
3. Biologie animale .....	28
3.1. Répartition .....	28
3.2. Biosynthèse et dégradation .....	30
3.2.1. Biosynthèse d'acide hyaluronique chez les animaux .....	30
3.2.2. Dégradation .....	31
3.3. Rôles de l'acide hyaluronique .....	32
3.3.1. Rôles dans la cicatrisation .....	33
3.3.2. Rôle au sein des articulations .....	34
3.3.3. Malignité .....	37
3.3.4. Pathologies pulmonaires .....	38
Partie 2 : Les voies d'obtention .....	39
1. Origine animale, Extraction .....	39
1.1. Introduction .....	39

1.2. Etat de l'art .....	39
1.3. Avantages et inconvénients .....	40
2. Production par voie microbienne.....	41
2.1. Introduction.....	41
2.2. Les micro-organismes producteurs .....	42
2.2.1. Présentation du genre <i>Streptococcus</i> .....	42
2.2.1.1. Classification.....	42
2.2.1.2. Caractères microscopiques .....	42
2.2.1.3. Caractères macroscopiques et de culture.....	42
2.2.1.4. <i>Streptococcus zooepidemicus</i> .....	44
2.2.2. Rôle de la capsule d'acide hyaluronique .....	45
2.3. Métabolisme de l'acide hyaluronique chez <i>Streptococcus zooepidemicus</i> .....	46
2.3.1. Voies de biosynthèse de l'acide hyaluronique .....	46
2.3.2. Dégradation.....	50
2.4. Optimisation de la production microbienne .....	51
2.4.1. Contexte, objectifs et critères d'amélioration .....	51
2.4.2. Modification des souches par ingénierie métabolique .....	52
2.4.2.1. Mutagenèse.....	52
2.4.2.2. Sélection et caractérisation.....	55
2.4.3. Conditions de culture .....	57
2.4.3.1. Influence de différentes sources carbonées .....	57
2.4.3.2. Influence de différentes sources azotées.....	59
2.4.3.3. Influence des acides aminés sur la production d'acide hyaluronique .....	60
2.4.3.4. Influence des acides organiques .....	62
2.4.3.5. Influence des sources minérales .....	63
2.4.3.6. Influence des sources phosphatées .....	63
2.4.3.7. Effet de l'addition de lysozyme .....	64

2.4.3.8. Influence de l'ajout de hyaluronidase dans le milieu.....	65
2.4.3.9. Influence de la température.....	65
2.4.3.10. Influence du pH .....	67
2.4.3.11. Influence de l'agitation.....	68
2.4.3.12. Rôle de l'aération .....	70
2.4.4. Mode de mise en œuvre .....	72
2.4.4.1. Mode discontinu.....	72
2.4.4.2. Mode discontinu alimenté .....	74
2.4.4.3. Mode continu .....	74
2.4.4.4. Mode discontinu répété .....	75
2.4.4.5 Mode recharge - récolte.....	75
2.4.5. Optimisation.....	75
2.4.5.1 Optimisation du milieu par approche classique.....	76
2.4.5.2. Optimisation des conditions de culture .....	79
3. Modifications chimiques .....	81
4. Conclusions.....	83
Partie Contrôle Qualité.....	84
1. Essais selon la Pharmacopée européenne .....	84
2. Méthodes de quantification .....	85
2.1. Quantification de l'AH par la méthode au carbazole .....	85
2.2. Quantification de l'AH par détermination de la turbidité.....	86
3. Caractérisation de la masse moléculaire.....	86
3.1. Détermination de la distribution de taille moléculaire de l'AH par chromatographie d'exclusion de taille (SEC).....	86
3.2. Caractérisation de la distribution de taille moléculaire de l'AH par technique électrophorétique .....	87
3.3. Détermination de la masse moléculaire globale de l'AH par mesure de la viscosité .....	88
4. Séparation de l'acide hyaluronique.....	88

5. Purification de l'acide hyaluronique.....	89
5.1. Les techniques classiques de purification .....	89
5.2. Exemples d'amélioration des techniques de purification .....	90
6. Conclusions.....	92
Partie Aspects pharmaceutiques.....	93
1. Introduction.....	93
2. Formation d'hydrogels .....	93
3. Applications.....	94
3.1. Chirurgie .....	95
3.1.1. Arthrose, cartilage et articulations.....	95
3.1.2. Œil.....	98
3.2. Chirurgie esthétique.....	99
3.2.1. Implants mammaires.....	99
3.2.2. Injection dermique .....	99
3.3. Autres applications en ingénierie tissulaire .....	100
3.3.1. Délivrance de cellules : exemple du transfert de kératinocytes pour la cicatrisation de plaies .....	100
3.3.2. Régénération dermique .....	101
3.3.3. Réparation cardiaque .....	101
3.3.4. Ingénierie valvulaire .....	101
3.4. Microsystèmes .....	102
3.5. Cosmétologie.....	102
3.6. Indicateur de maladies .....	102
3.7. Systèmes de délivrance de médicaments et d'ADN.....	103
3.8. Recouvrement de matériaux.....	104
4. Les différentes spécialités .....	104
5. Effets secondaires.....	107

5.1. Les réactions immédiates .....	107
5.2. Les réactions semi-retardées .....	108
5.3. Les complications retardées .....	109
6. Législation des produits injectables à base d'AH .....	111
6.1. Mise sur le marché .....	111
6.2. Surveillance du marché .....	112
6.3. Traçabilité et matériovigilance .....	113
Conclusions générales .....	114
Annexes .....	116
Bibliographie.....	122

## Liste des abréviations

ADH : dihydrazide adipique

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ADP : Adénosine Diphosphate

Afssaps : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

AH : Acide Hyaluronique

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : Adénosine Triphosphate

BHI : Brain Heart Infusion

CD : Cluster of Differentiation

CE : Communauté Européenne

CIA : Collagen-Induced Arthritis

CTAB : cétyltriméthylammonium

Da : Dalton

DEAE : Diéthylaminoéthyl cellulose

DMT : dexaméthasone

D.O. : Densité Optique

EGF : Epidermal Growth Factor, facteur de croissance épidermique

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EMEA : agence européenne du médicament

ENSAIA : Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

FDA : Food and Drug Administration

GAG : Glycosaminoglycans

GTP : Guanosine TriPhosphate

HAS : Acide Hyaluronique Synthase

Hb : Hémoglobine

HRP : Horseradish Peroxidase

HYAL : hyaluronidase

IL : Interleukine

LAL : Lysat d'Amoebocyte de Limule

LALLS : Low Angle Laser Light Scattering

MEC : Matrice Extracellulaire

MSC : Mesenchymal Strain Cells, Cellules Souches Myéloïdes dérivées du mésenchyme

NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide

NTG : Nitrosoguanidine

OD : Oxygène Dissous

PBS : Phosphate Buffered Saline

PFC : Perfluorocarbones

Ph. Eur. : Pharmacopée Européenne

PDGF : Platelet Derived Growth Factor

QPSO : Quantum-behaved Particle Swarm Optimization

RANK(L) : Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa$  B (Ligand)

RBF : Radial Basis Functions

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RSM : Response Surface Methodology

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SEC : Size Exclusion Chromatography

tpm : tours par minute

Tyr : Tyramine

UDP : Uracile Diphosphate      UDPG : Uridine diphospho-glucose

UE : Union Européenne

UGDH : UDP-glucose 6-déshydrogénase

U.I. : Unité Internationale

UV : Ultra-Violet

UTP : Uracile Triphosphate

VIC : Cellular Interstitial Cells, cellules valvulaires interstitielles

vvm : volume d'air par volume de liquide par minute

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Masse molaire moyenne de l'acide hyaluronique en fonction de son origine, d'après Laurent et Balazs (1970) .....	26
Tableau 2 : Concentration en acide hyaluronique en fonction de l'origine tissulaire, d'après Laurent et Balazs (1970) .....	29
Tableau 3 : Les principales Acide Hyaluronique Synthétases chez l'Homme et la souris, d'après Bastow <i>et al.</i> (2008).....	30
Tableau 4 : Hyaluronidases et clusters chez l'Homme et la souris, d'après Bastow <i>et al.</i> (2008) .....	32
Tableau 5 : Effet de la nature du sucre sur le métabolisme, le titre final d'AH, le rendement et la masse moléculaire, d'après Jagannath et Ramachandran (2010).....	58
Tableau 6 : Effet de la source azotée sur le métabolisme, le titre final d'AH, le rendement et la masse moléculaire, d'après S. Jagannath, K.B. Ramachandran (2010).....	60
Tableau 7 : Effet de l'adition de lysozyme sur la production d'acide hyaluronique, d'après Kim <i>et al.</i> (1996). .....	65
Tableau 8 : Effet du type d'agitateur sur la production d'acide hyaluronique, d'après Kim <i>et al.</i> (1996).....	69
Tableau 9 : Plan d'expériences orthogonal L16 pour la production d'AH, d'après Im <i>et al.</i> (2009) .....	77
Tableau 10 : Table des réponses, moyenne et rapport S/N, d'après Im <i>et al.</i> (2009) .....	77
Tableau 11 : Plan d'expérience de Box - Behnken avec trois variables indépendantes, d'après Liu <i>et al.</i> (2008) .....	79
Tableau 12 : Résultats de l'analyse du plan de Box - Behnken pour la production d'AH, d'après Liu <i>et al.</i> (2008) .....	80
Tableau 13 : Récapitulatif des étapes de purification mises en place par Rangaswamy et Jain (2008).....	90
Tableau 14 : Classification des dispositifs médicaux.....	112

## Liste des figures

Figure 1 : Structure de l'acide hyaluronique, d'après Akdamar <i>et al.</i> (2009) .....	25
Figure 2 : Formation d'un gel à l'extrémité d'une feuille d'acide hyaluronique, d'après Price <i>et al.</i> (2007) .....	27
Figure 3 : Localisation de l'acide hyaluronique au niveau cutané (Fruminet, 2010) .....	29
Figure 4 : Rôles de l'AH et de ses fragments : recrutement des ostéoblastes (OB) à partir des cellules souches de la moëlle osseuse (bmSC), formation, minéralisation et résorption de l'os. D'après Bastow et al. (2008).....	35
Figure 5 : Rôles de l'AH en fonction du type de contraintes physiques : a) lubrifiant, b) amortisseur, d'après Laroui (2007) .....	35
Figure 6 : Structure schématique d'un récepteur CD44 associé à de l'AH, d'après Laroui (2007) .....	37
Figure 7 : Photographie en microscopie électronique d'une chaîne de <i>Streptococcus equimilis</i> , englobée dans une capsule d'acide hyaluronique (Fruminet, 2010).....	45
Figure 8 : Les voies de biosynthèse de l'acide hyaluronique chez <i>Streptococcus zooepidemicus</i> , d'après Fong Chong et Nielsen (2003) .....	49
Figure 9 : Principe d'action de la hyaluronidase sur une chaîne d'acide hyaluronique (Fruminet, 2010)51	
Figure 10 : Les différentes étapes pour l'obtention de souches hyperproductrices .....	52
Figure 11 : Structure chimique et schéma du principe d'action de la nitrosoguanidine, d'après J. Fruminet (2010) .....	54
Figure 12 : Protocole de sélection de <i>Streptococcus equi</i> KFCC 10830, d'après Kim <i>et al.</i> (1996) .....	54
Figure 13 : Influence de différentes sources carbonées sur la concentration d'AH obtenue après 24 h de culture à 37 °C, à 120 tr/min, chez <i>Streptococcus</i> sp. ID9102, d'après Im <i>et al.</i> (2009) .....	58
Figure 14 : Effet de différentes sources azotées sur la concentration d'AH obtenue après 24 h de culture à 37 °C, à 120 tr/min, chez <i>Streptococcus</i> sp. ID9102, d'après Im <i>et al.</i> (2009). .....	59
Figure 15 : Effet de l'ajout de glutamine et du glutamate, dans un milieu optimisé par la méthode de Tagushi, sur la concentration d'AH obtenue après 24 h de culture à 37 °C, à 120 tr/mn, chez <i>Streptococcus</i> sp. ID9102 (Im <i>et al.</i> , 2009) .....	61
Figure 16 : Effet du pH et de la température sur la productivité en AH et sur sa masse moléculaire, d'après Armstrong et Jones (1997). .....	62
Figure 17 : Effet des acides organiques sur la concentration d'AH obtenue après 24 h de culture à 37 °C, à 120 tr/mn, chez <i>Streptococcus</i> sp. ID9102 (Im <i>et al.</i> , 2009) .....	63

Figure 18 : Effet de différentes sources phosphatées sur la concentration d'AH obtenue après 24 h de culture à 37 °C, à 120 tr/mn, chez <i>Streptococcus</i> sp. ID9102 (Im <i>et al.</i> , 2009) .....	64
Figure 19 : Effet de la température sur la production d'AH, d'après Kim <i>et al</i> (1996). .....	67
Figure 20 : Effect du pH sur la production d'acide hyaluronique, d'après Kim et al (1996). .....	68
Figure 21 : Effet de la vitesse d'aération (vvm) sur la croissance et sur la concentration d'AH, d'après Kim <i>et al.</i> (2006). .....	71
Figure 22 : Evolution de la croissance cellulaire (a), concentration en glucose (b), concentration en AH (c), masse moléculaire de l'AH (d) pendant la culture de <i>Streptococcus</i> sp. ID9102, d'après Im <i>et al.</i> (2009). 73	73
Figure 23 : Suivi des paramètres en cours de culture discontinue de <i>S. zooepidemicus</i> pour la production d'AH, d'après Liu <i>et al.</i> (2008). .....	74
Figure 24 : Graphique des effets principaux pour la moyenne (a) et le rapport S/N (b) pour différentes concentrations en extrait de levure (A), peptone de caséine (B), K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (C), MgCl <sub>2</sub> (D), d'après Im <i>et al.</i> (2008). .....	78
Figure 25 : Exemple de tracé de surface de réponse montrant les effets de la vitesse d'agitation (X1), du taux d'aération (X2) et leur interaction sur la concentration en AH produit par <i>S. zooepidemicus</i> , avec un nombre optimal de pâles de 3, d'après Liu <i>et al.</i> (2008).....	80
Figure 26 : Fonctionnalisation de l'AH par le dihydrazide adipique, d'après Prestwich <i>et al.</i> (1997)... 82	82
Figure 27 : Injection d'acide hyaluronique dans l'articulation du genou, d'après Fruminet (2010).... 95	95
Figure 28 : Photographies de pattes de rats normaux et de rats CIA (n=5) avant et après traitement,96	96
Figure 29 : Analyse histologique des tissus articulaires à 4 semaines, d'après Kim <i>et al.</i> (2011)..... 97	97
Figure 30 : Comparaison de la constitution d'une peau jeune et d'une peau âgée (dreamstime.com)99	99
Figure 31 : Spécificité tissulaire des composés à base d'AH non animal stabilisé Restylane©, d'après Romagnoli et Belmontesi (2008)..... 106	106
Figure 32 : Spécialités à base d'AH stabilisé non animal de Q-Med, d'après Romagnoli et Belmontesi (2008) .....	106
Figure 33 : Coupes histopathologiques de réaction de granulomatose par l'AH, coloration hématoxyline et éosine, d'après Requena <i>et al.</i> (2011)..... 110	110

## **Liste des annexes**

Annexe 1 : Monographie du hyaluronate de sodium, d'après la Pharmacopée Européenne (2011)	116
Annexe 2 : Liste des produits injectables de comblement des rides déclarés en France, d'après l'Afssaps (2010) .....	119

## Introduction générale

Au siècle dernier la mise en place de campagnes de santé publiques, le changement des modes de vie et les progrès de la médecine ont permis une augmentation importante de l'espérance de vie humaine. Cette dernière est synonyme de vieillissement et par la même occasion de modifications physiologiques et physiques. L'évolution de notre visage avec l'âge ne fait qu'appuyer ce constat. En effet le « miroir de l'âme », est la partie de notre corps la plus exposée aux ravages du temps.

Du mythe de la fontaine de Jouvence au livre « le portrait de Dorian Gray » d'Oscar Wilde, nombreux sont les légendes ou récits sur la jeunesse éternelle. Depuis des millénaires, ces histoires soulignent bien le désir du genre humain de préserver son apparente jeunesse.

Aujourd'hui avec l'avènement de la cosmétique et de la chirurgie esthétique le mythe semble devenir réalité.

Parmi les méthodes « miracle » actuelles, les plus connues du grand public sont :

- **Les liftings** qui sont les techniques chirurgicales du rajeunissement du visage. Elles redonnent un aspect lisse et ferme à la peau par un effet de tension. On peut également agir au niveau musculaire. Des techniques endoscopiques ont aussi été mises en place. L'hospitalisation liée à ces interventions est très courte mais nécessaire (en moyenne 24 heures) et se conclut avec la prescription d'anti-inflammatoires pour le traitement post opératoire.

- **Le Botox®** qui est le produit le plus connu et le plus utilisée dans le traitement local des rides. Il représente une technique de lifting par injection. Son nom vient de son principal composant : la toxine botulique. Issue d'une bactérie, cette molécule est très toxique (quarante millions de fois plus dangereux que le cyanure). Elle agit après injection locale au niveau des rides d'expression du visage en paralysant la contraction des muscles pour une durée moyenne de six mois. La pratique de ces injections a conduit notamment aux Etats-Unis à plusieurs accidents dont certains mortels. La FDA (Food and Drug Administration) a mis en garde contre les risques potentiels de diffusion de cette toxine en dehors de la zone d'injection qui entraînerait des problèmes au niveau de la déglutition, de pénétration du contenu gastrique dans le système respiratoire ou encore de faiblesse musculaire. L'agence européenne du médicament (EMEA) a, quand à elle, décidé de renforcer les précautions d'emploi et d'allonger la liste des effets indésirables des médicaments qui contiennent cette substance.

Les méthodes citées ci-dessus sont soit des techniques chirurgicales soit des techniques présentant des effets indésirables importants.

Depuis quelques années la médecine cosmétique a évolué pour proposer un comblement des « imperfections » par l'injection de collagène ou d'acide hyaluronique.

L'injection de collagène est la technique de référence de « rajeunissement » cependant ce polymère présente des risques allergiques si sa source d'obtention n'est pas humaine.

Au cours de mon année de spécialisation « Biotechnologies » à l'ENSAIA (Diplôme d'ingénieur obtenu en octobre 2011), j'ai eu l'opportunité de participer à un projet expérimental portant sur la production d'acide hyaluronique par voie microbienne.

L'acide hyaluronique (AH) est un biopolymère naturel et plus précisément un glycosaminoglycane (GAG) largement répandu dans les tissus conjonctifs, épithéliaux et nerveux. Il a été décrit pour la première fois en 1934 par Meyer et Palmer qui réussir à l'isoler à partir de l'humeur vitrée de l'œil de bœuf et à définir chimiquement sa structure primaire. L'étymologie de ce mot provient du grec *hyalos* qui signifie vitreux et uronique car il possède un taux élevé d'acides uroniques. Ce polysaccharide est fréquemment référencé sous le terme de hyaluronane car à l'état biologique, il existe sous forme de polyanion et non sous forme d'acide libre.

Dans une première partie, nous aborderons des points généraux comme sa structure chimique, ses propriétés physico-chimiques, sa biochimie et ses rôles physiopathologiques chez l'homme.

Initialement, l'acide hyaluronique était obtenu par extraction des tissus animaux. Cependant, les risques de transmission d'agents pathogènes issus de matières premières d'origine animale et le fait que sa structure moléculaire est hautement conservée dans le règne animal font que la recherche et le développement se tournent désormais vers la production d'acide hyaluronique par voie microbienne.

Dans une seconde partie, nous envisagerons donc les différentes sources pour l'obtention de cette molécule. L'accent sera mis sur la production par voie microbienne et notamment sur l'amélioration des souches productrices et l'optimisation des conditions de culture. Les principales souches productrices d'acide hyaluronique sont des *Streptococci* potentiellement pathogènes des groupes sérologiques A et C pour lesquels la production d'une capsule de ce polymère sert à la fois de protection contre le système immunitaire de l'hôte animal, ainsi que de réserve nutritive.

L'acide hyaluronique étant destiné le plus souvent à être injecté, un haut niveau de qualité est donc demandé aux produits le contenant. Le contrôle qualité avec les méthodes de purification, de quantification et de caractérisation de la masse molaire sera traité dans une troisième partie.

La quatrième partie portera sur les aspects pharmaceutiques comme les applications, la pharmacologie, les spécialités, les effets secondaires et indésirables et la législation des produits injectables.

# Partie 1 : Généralités

## 1. Structure chimique

L'acide hyaluronique est un biopolymère naturel appartenant à la famille des glycosaminoglycanes. Il est composé de dimères d'acide glucuronique et de N-acétyl-glucosamine liées alternativement par des liaisons glycosidiques  $\beta(1-3)$  et  $\beta(1-4)$  (Figure 1).

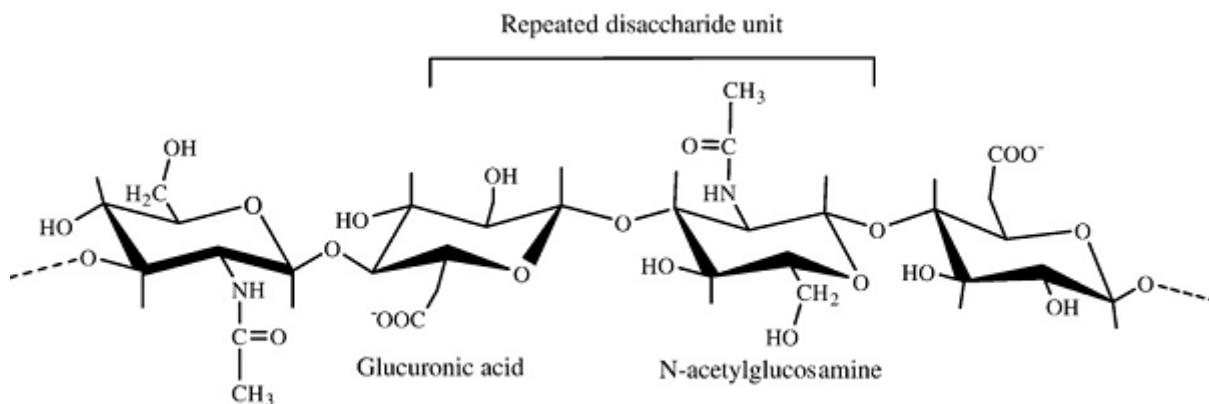


Figure 1 : Structure de l'acide hyaluronique, d'après Akdamar et al. (2009)

Il peut exister sous forme acide, l'acide hyaluronique, ou sous forme de sel, essentiellement de sodium, le hyaluronate de sodium. Il n'est jamais sulfaté à l'état naturel.

## 2. Propriétés physicochimiques

L'acide hyaluronique joue un rôle important au sein de notre organisme du fait de ses propriétés rhéologiques et structurales uniques. En relation avec le réseau de faisceaux de collagène, les structures supramoléculaires d'AH déterminent la forme et l'organisation architecturale des tissus. Il leur confère des propriétés mécaniques (amortisseur des cartilages, élasticité des vaisseaux sanguins), tout en contribuant au maintien de l'intégrité et de l'hydratation de nombreux tissus comme la peau et le cerveau (Asari et al., 2000).

## 2.1. Masse moléculaire

Les polymères de cette unité récurrente peuvent avoir une taille de  $10^2$  à  $10^4$  kDa *in vivo* et la longueur des chaînes peut varier de 2000 à 50000 dimères.

**Tableau 1 : Masse molaire moyenne de l'acide hyaluronique en fonction de son origine, d'après Laurent et Balazs (1970)**

Origine de l'acide hyaluronique		Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )
Cordon ombilical humain		$3,4 \times 10^6$
Humeur vitrée bovine		$7,7 \times 10^4$ à $1,7 \times 10^6$
Liquide synovial bovin		$14 \times 10^6$
Liquide synovial	sain	$6 \times 10^6$
	dégénéré	$2,7 \times 10^6$
Crêtes de coq		$1,2 \times 10^6$

## 2.2. Solubilité et viscosité

L'AH est un polyélectrolyte. De ce fait, dans l'eau pure, aux faibles concentrations, les répulsions électrostatiques entre les fonctions carboxylates génèrent une expansion des pelotes macromoléculaires, se traduisant par une augmentation de la viscosité en solution. Il est donc parfaitement soluble en solution aqueuse.

Grâce à son fort pouvoir hygroscopique, l'AH peut former des gels viscoélastiques (Figure 2) et il est donc une molécule clé de l'hydratation cutanée, capable d'attirer et de fixer jusqu'à 1000 fois son poids en eau. La viscosité du gel produit est dépendante de la longueur des chaînes ainsi que des enchevêtrements, du pH et des modifications chimiques (Price *et al.*, 2007).

Sa conformation exacte en phase aqueuse n'est pas encore établie. La rigidité de sa chaîne diminue avec l'augmentation de la température, cela s'explique par une dissociation des liaisons hydrogènes. Son pKa est égal à 2,9 +/- 0,1. L'addition progressive d'acide chlorhydrique provoque la formation d'un gel au pH de 2,5. En effet un degré de dissociation diminué des groupements acides carboxyliques favorise les interactions intermoléculaires et les liaisons hydrogènes.

De plus, un pH acide conduit à la protonation des groupements acétamides et donc à la génération de répulsion électrostatiques.

La haute solubilité de l'acide hyaluronique est problématique dans le développement de polymères pour l'ingénierie cellulaire. En revanche cela peut être bénéfique dans certaines applications comme par exemple la chirurgie orthopédique. En ingénierie cellulaire, il est nécessaire d'avoir une stabilité structurale qui pourra être apportée par des modifications chimiques (*cf Partie 2, chapitre 3*).



Figure 2 : Formation d'un gel à l'extrémité d'une feuille d'acide hyaluronique, d'après Price *et al.* (2007)

En situation physiologique, il durcit par des liaisons hydrogènes et des interactions avec le solvant et l'environnement. Il s'organise en un ruban dont la taille est variable et qui a tendance à occuper un maximum d'espace. Cette occupation spatiale permet la diffusion de petites molécules et empêche la diffusion des grandes molécules. Il forme des pores de diamètre variable qui autorisent des vitesses de diffusion hydrodynamique différentes (Barbucci *et al.*, 2002).

### 2.3. Etudes en phase solide

A l'état solide, la structure de l'AH a été principalement étudiée par diffraction des rayons X. Winter *et al.* (1975) ont montré que ce polysaccharide possédait une conformation en hélice stabilisée par des liaisons hydrogène. Les différentes conformations hélicoïdales dépendent aussi du contre-ion ( $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ). D'après des études RMN menées par Darke *et al.* (1975), la chaîne d'AH serait constituée par l'alternance de portions rigides ordonnées, maintenues par les liaisons hydrogène, et de zones désordonnées flexibles.

## **2.4. Sensibilité aux agents physiques, chimiques et enzymatiques**

Il peut être dégradé par : les rayonnements UV, les rayons  $\gamma$ , les ultrasons, l'action enzymatique des hyaluronidases (cf 3.2.) et par dépolymérisation oxydo-réductrice (par le peroxyde d'hydrogène et ou l'ascorbate) (Liu *et al.*, 2008 ; Tokita et Okamoto, 1995)

Les caractéristiques physiques les plus importantes pour un polymère sont la distribution de sa masse moléculaire, sa masse moléculaire moyenne et sa viscosité intrinsèque. Les deux premières caractéristiques citées seront celles qui seront étudiées en priorité lors du contrôle qualité du produit.

## **3. Biologie animale**

### **3.1. Répartition**

L'acide hyaluronique est très présent dans de nombreux tissus comme les tissus épithéliaux, conjonctifs, et nerveux. Par exemple, il est retrouvé en grande quantité dans l'humeur vitrée de l'œil, le liquide synovial et la peau. Il constitue également l'un des principaux composants de la matrice extracellulaire.

Sa concentration dans le corps humain varie en fonction de sa localisation. Il existe sous de nombreuses formes ; librement circulant, associé au sein de tissu, inséré dans la matrice extracellulaire. Il participe toujours à la préservation de la structure environnante.

Chez l'Homme, plus de 50% de l'acide hyaluronique de l'organisme est présent dans la peau. Cependant, dans la peau sénile, la quasi-totalité de l'AH a disparu de l'épiderme. Cela explique en grande partie la formation des rides sur le visage humain.

Sa structure est restée identique durant l'évolution, de *Pseudomonas* aux mammifères comme le rat, le lapin ou encore l'homme. Cette ubiquité dans les organismes vivants explique son excellente tolérance par le système immunitaire, sa biocompatibilité et le faible risque d'allergies lors d'un traitement basé sur cette molécule (Ke *et al.*, 2008).

Tableau 2 : Concentration en acide hyaluronique en fonction de l'origine tissulaire, d'après Laurent et Balazs (1970)

Origine de l'acide hyaluronique	Concentration (g / 100 g de tissu)
Humeur vitreuse humaine	0,02
Peau (adulte)	0,03 à 0,09
Liquide synovial (adulte)	0,14 à 0,36
Cordon ombilical humain	0,3
Crêtes de coq	0,75
Cerveau de bœuf	0,015

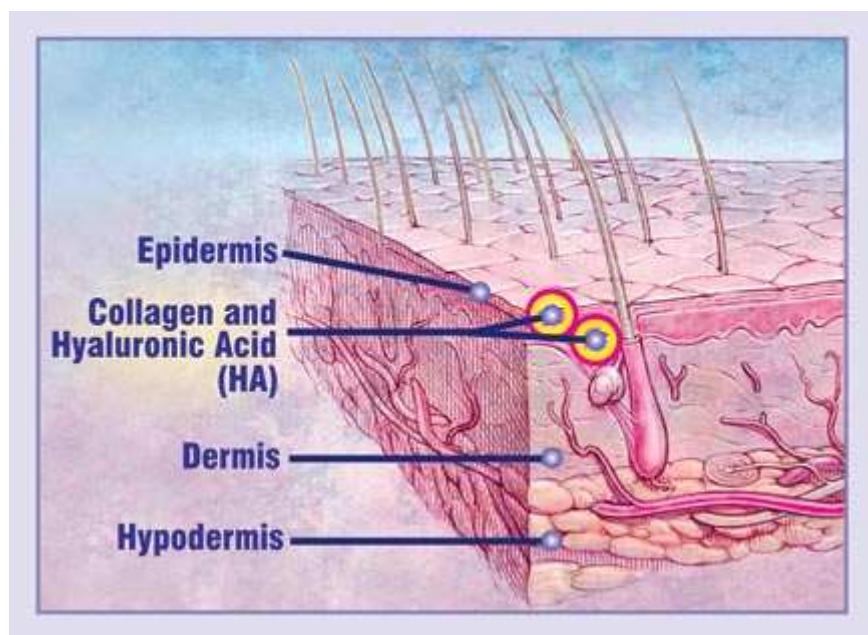


Figure 3 : Localisation de l'acide hyaluronique au niveau cutané (Fruminet, 2010)

## 3.2. Biosynthèse et dégradation

### 3.2.1. Biosynthèse d'acide hyaluronique chez les animaux

Chez les animaux et donc chez l'homme, l'acide hyaluronique est produit à la surface des fibroblastes par extrusion dans la matrice extra cellulaire en association étroite avec le récepteur CD44. Les fibroblastes sécrètent aussi les hyaluronidases, enzymes de la dégradation de l'AH.

Sa durée de vie est courte, il se renouvelle complètement en moins d'un jour au niveau de l'épiderme et d'un tiers par jour au niveau du derme (Menzel et Farr, 1998 ; Rinaudo, 2007).

Chez les vertébrés, l'AH est produit grâce à trois gènes codant pour l'acide hyaluronique synthétase (HAS) (Tableau 3) ; HAS1, HAS2 et HAS3 ainsi que des gènes codant pour les UGDH et UDPG phosphatases. La synthèse d'AH est essentielle pour le développement embryonnaire. Par exemple l'inactivation du gène HAS2 conduit à la mort de l'embryon chez la souris mais celle de HAS 1 ou 3 n'est pas létale.

Tableau 3 : Les principales Acide Hyaluronique Synthétases chez l'Homme et la souris, d'après Bastow *et al.* (2008)

Enzyme	Gène humain	Chromosome humain	Gène murin	Chromosome murin
HAS1	HAS1	19q13.4	has1	17A3.2
HAS2	HAS2	8g24.12	has2	15D1
HAS3	HAS3	16q22.1	has3	8D3

Les enzymes HAS polymérisent l'AH par liaison d'UDP-N-acétyl-D-glucosamine avec de l'UDP-acide glucuronique. Ce couplage libère la fonction UDP. A la différence des autres GAG, la synthèse de l'AH ne nécessite pas l'attachement à une protéine du noyau pour initier la polymérisation. L'AH est synthétisé à la face interne de la membrane plasmique puis est soit retenu dans la cellule ou exporté vers la matrice extracellulaire. Les chaînes d'AH ne sont pas modifiées par d'autres enzymes comme des N-acétyl transferases. L'homologie de séquence entre les trois HAS est très importante (environ 80%) mais ces enzymes diffèrent de part leur stabilité et de part la longueur de la chaîne d'AH produite (Itano *et al.*, 1999). Elles contiennent deux domaines N-terminaux et cinq domaines C-terminaux transmembranaires ainsi qu'une région centrale cytoplasmique.

La masse moléculaire de l'AH produit *in vitro* par des cellules exprimant HAS3 est de  $10^5$  à  $10^6$  Da alors que celui de cellules avec HAS1 et HAS2 est au moins deux fois plus long.

### **3.2.2. Dégradation**

*In vivo*, l’AH est dégradé par l’action de radicaux libres et de hyaluronidases (Schiller *et al.*, 2003 ; Csoka *et al.*, 2001). La majorité de l’AH est éliminé par les nodules lymphatiques ou le foie *via* des récepteurs spécifiques d’endocytose (Weigel et Weigel, 2003). Dans les os ou le cartilage, où l’AH est non circulant, d’autres récepteurs comme les CD44 interviennent dans sa capture. Une fois internalisé, ce polymère est dégradé dans les lysosomes par les hyaluronidases et des exoglycosidases. Les hyaluronidases de mammifères sont des endo- $\beta$ -N-acétylhexosaminidases qui dégradent aussi les GAG. Chez l’Homme, les gènes codant pour les hyaluronidases comprennent HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYALP1 et PH-20 et forment deux clusters sur deux chromosomes différents (Tableau 4).

HYAL1 et HYAL2 ont une expression ubiquitaire et sont considérées comme les principales enzymes de la dégradation de l’AH dans les tissus somatiques. HYAL2 commence par couper l’AH de haut poids moléculaire en fragments de taille intermédiaires (d’environ 20 kDa, 50 dissacharides). Son expression est limitée aux lysosomes et son action est optimale à pH 4. HYAL1 est la dernière enzyme de ce processus car elle clive le biopolymère en monosaccharides (Csoka *et al.*, 2001). Cette étape finale se déroule dans les lysosomes. Le rôle chez l’Homme des autres enzymes HYAL est moins connu.

Tableau 4 : Hyaluronidases et clusters chez l'Homme et la souris, d'après Bastow *et al.* (2008)

Enzyme	Gène humain	Chromosome humain	Gène murin	Chromosome murin
HYAL1	HYAL1	cluster 3p21.2	hyal1	cluster 9 F1-F2
HYAL2	HYAL2	cluster 3p21.2	hyal2	cluster 9 F1-F2
HYAL3	HYAL3	cluster 3p21.2	hyal3	cluster 9 F1-F2
HYAL4	HYAL4	cluster 7q31.3	hyal4	cluster 6A2
PH20	PH20	cluster 7q31.3	ph20	cluster 6A2
HYALP1	HYALP1	cluster 7q31.3	hyalp1 hyal5	cluster 6A2

On retrouve ces enzymes dans les organes comme la rate, la peau, les yeux, le foie et dans certains liquides corporels (larmes, sang, sperme).

### 3.3. Rôles de l'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique joue aussi un rôle essentiel dans la plasticité des tissus au niveau des espaces extracellulaires et par conséquent à un impact sur l'organisation tissulaire (Asari *et al.*, 2000 ; Rangaswamy *et al.*, 2008).

Il est aussi impliqué dans la circulation des nutriments, des hormones et des cellules. Il joue aussi un rôle important dans l'embryogenèse, l'angiogenèse, la transduction des signaux et est associé aux cancers et aux métastases. Il a un impact sur l'adhésion, la migration, la prolifération et la différentiation cellulaire. Hardingham et Fosang, 1992.

Olutoye *et al.* (1997) proposent que l'AH peut inhiber l'agrégation plaquettaire et qu'il interfère avec la libération du facteur de croissance PDGF-AB (Platelet Derived Growth Factor) par les plaquettes et ainsi inhibe l'inflammation. D'autres chercheurs ont suggéré que l'addition d'AH à des blessures favoriserait leur cicatrisation (Chen et Abatangelo, 1999). Par exemple, malgré sa faible concentration dans les tissus denses de connexion (tendons et les ligaments), l'AH joue un rôle dans leur réparation.

Détaillons un peu plus les rôles de l'AH dans les processus de cicatrisation et au sein des articulations.

### **3.3.1. Rôles dans la cicatrisation**

La forte capacité de rétention d'eau de l'AH permet une hydratation des tissus et maintient l'humidité de la peau. Les peaux jeunes contiennent un taux important d'AH.

Ce fort pouvoir hygroscopique n'est pas le seul avantage de l'AH au sein des tissus, ce dernier intervient aussi dans les mécanismes de cicatrisation.

#### *- Régénération de la matrice extracellulaire*

Le dépôt de collagène par les fibroblastes est l'un des facteurs clés de la reconstitution de la matrice au niveau du site de formation de la cicatrice. La nature de ce dépôt détermine la qualité de la cicatrice. *In vitro*, l'acide hyaluronique à longue chaîne stimule la prolifération des fibroblastes mais diminue la production totale de collagène cicatriciel par les fibroblastes dermiques adultes (Croce *et al.*, 2001).

L'application d'acide hyaluronique améliore le remodelage de la matrice extracellulaire et ordonne le dépôt de collagène. Paradoxalement, la hyaluronidase augmente la cicatrisation (par libération de nombreux fragments d'acide hyaluronique) alors que des niveaux hauts persistants d'acide hyaluronique diminuent la contraction des fibroblastes. La production fibroblastique d'acide hyaluronique peut être affectée par de nombreux facteurs de croissance et les produits de dégradation sont pro-angiogéniques (West *et al.*, 1991).

#### *- Régénération épithéliale*

L'application d'acide hyaluronique exogène améliore la prolifération des kératinocytes que ce soit *in vivo* ou *in vitro*. L'acide hyaluronique permet la migration des cellules de la cornée par un effet synergique avec la fibronectine ou le facteur de croissance endothéliale.

L'acide hyaluronique est un protecteur de l'épiderme car il piège les radicaux libres et les espèces réactives de l'oxygène générés par les ultraviolets.

#### *- Rôle dans l'initiation de la réponse à une lésion tissulaire*

Dans les conditions physiologiques, l'AH est un polymère de haut poids moléculaire de plus de  $10^6$  Da. Lors d'une blessure, des fragments d'AH de plus faible masse moléculaire s'accumulent. L'influence de la génération de ces fragments a été suggérée suite à des études *in vitro*.

Par exemple, des oligomères de 8 à 16 dissaccharides préparés par digestion enzymatique d'AH natif induisent l'angiogenèse alors que l'AH de haut poids moléculaire ne le fait pas.

La capacité de réponse des cellules diffère selon leur type. L'AH de haut poids moléculaire n'induit pas l'expression des gènes de l'inflammation mais active les cascades tyrosine dépendantes dans les cellules endothéliales. Cette activation est même plus importante en présence de fragments d'AH. Des résultats similaires ont été démontrés avec les cellules rénales, les cellules de carcinome ou encore les éosinophiles.

L'idée commune est donc que l'AH de haut poids moléculaire n'induit pas un programme d'expression de gènes tourné vers la prolifération, la migration ou l'activation cellulaire alors que les fragments d'AH régulent ces propriétés biologiques.

La fragmentation du hyaluronane *in vivo* pourrait résulter de l'expression régulée des hyaluronidases ou de processus d'oxydation. Cette fragmentation est requise pour l'acquisition de la fonctionnalité de signalisation de l'AH. La génération d'AH fragmentés dans des conditions de blessures tissulaires peut servir la fonction de signalisation dans l'organisme où l'homéostase normale a été perturbé (Noble, 2002).

### **3.3.2. Rôle au sein des articulations**

Le cartilage articulaire est un tissu connectif contenant un seul type de cellules ; les chondrocytes. Ces derniers synthétisent une MEC dense composée principalement de collagène, d'AH et de protéoglycans. Ces molécules jouent un rôle majeur dans les propriétés élastique et de résistance de ce tissu. Ils favorisent aussi l'interaction avec des substances actives comme les facteurs de croissance et les cytokines. Les chondrocytes ont une faible capacité métabolique dans des conditions d'hypoxie et d'absence de vascularisation. Dans des conditions physiopathologiques, comme l'arthrose, une dégradation irréversible des composants de la matrice est observée (Magdalou *et al.*, 2008)

La présence d'acide hyaluronique de haut poids moléculaire et en forte concentration dans le liquide synovial apporte une lubrification des articulations (de par sa capacité de rétention de l'eau) et permet une excellente absorption des chocs (de par ses propriétés mécaniques). De plus l'AH agit dans le cartilage par son implication dans des processus biologiques. Des thèses comme celles de Laroui (2007) présentent le rôle biologique de l'AH dans le cartilage (Figure 4).



Figure 4 : Rôles de l'AH et de ses fragments : recrutement des ostéoblastes (OB) à partir des cellules souches de la moëlle osseuse (bmSC), formation, minéralisation et résorption de l'os. D'après Bastow et al. (2008)

O-HA : oligosaccharides d'AH, OC : ostéoclastes, RANK(L) : Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa$  B (Ligand) , EC : endothelial cell.

- *Importance des propriétés rhéologiques et mécaniques au sein des articulations :*

Au cours de notre vie, nos articulations et tout particulièrement celles des genoux sont soumises à des chocs. Comme vu précédemment, l'AH joue un rôle d'amortisseur de ces chocs lors de contraintes de charges rapides mais aussi un rôle de lubrifiant lors de contraintes de cisaillement progressives (Figure 5). L'AH forme donc un film protecteur viscoélastique sur toute la surface interne de l'articulation (cartilage articulaire et synovie). Dans cette capsule, il lutte également contre les radicaux libres et d'autres facteurs inflammatoires. De plus l'AH forme un squelette de base pour les agrégats de protéoglycans essentiels à l'intégrité structurale et fonctionnelle du cartilage articulaire.

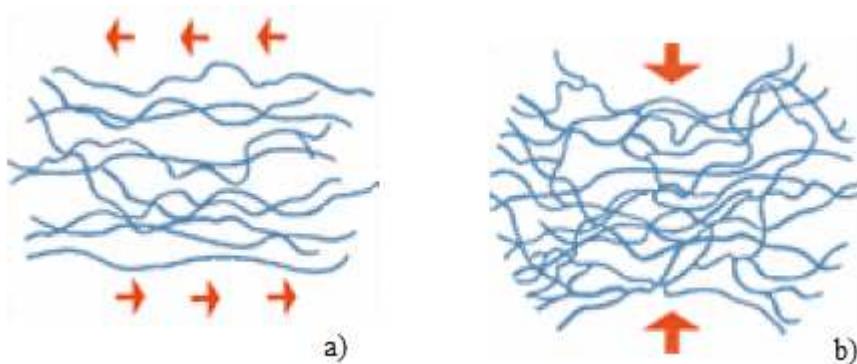


Figure 5 : Rôles de l'AH en fonction du type de contraintes physiques : a) lubrifiant, b) amortisseur, d'après Laroui (2007)

Dans les cas d'altérations dégénératives articulaires (arthrose), il est observé une diminution de la concentration et de la masse molaire de l'AH dans le liquide synovial. La protection du cartilage n'est alors plus assurée correctement, ce qui entraîne sa dégradation progressive. Cette dernière est à l'origine de l'apparition de douleurs et d'une réduction de la mobilité.

Physiologiquement, un équilibre existe entre la production et la dégradation du biopolymère. Au cours d'une pathologie comme l'arthrose ; la dégradation de l'AH est supérieure à la quantité nouvellement produite. Le liquide synovial devient alors plus fluide et ses propriétés lubrifiantes et protectrices sont fortement altérées.

#### *- Implication dans les processus biologiques*

L'AH et tout particulièrement sa masse molaire a d'importants effets au niveau des cellules de l'articulation (synoviocytes ou chondrocytes). Par le biais de récepteurs membranaires tels que le CD44, l'AH peut influer directement sur les propriétés biologiques de l'articulation.

Les AH de haut poids moléculaire engendrent une augmentation de l'expression des HAS. L'apport d'AH dans le liquide synovial peut engendrer une baisse de l'expression d'une cytokine proinflammatoire : l'interleukine IL1 $\beta$ . Dans ce cas, la réaction est directement liée à l'interaction spécifique entre l'AH exogène et le CD44 présent sur les synoviocytes.

Toujours par le biais des récepteurs CD44, l'AH possède aussi des effets biologiques vis-à-vis des chondrocytes. Les signaux sont transmis dans le compartiment intracellulaire de ces cellules par le biais du cytosquelette et notamment les filaments d'actine.

L'AH a un impact sur la prolifération, la migration cellulaire ou l'endocytose. Ces mécanismes ont comme point commun une déformation de la cellule par une modification du cytosquelette. Dans ce cas précis, l'interaction entre l'AH et le CD44 active la GTPase, enzyme permettant de libérer de l'énergie utilisée par l'actine pour modifier le cytosquelette dans des cellules cancéreuses (Figure 6).

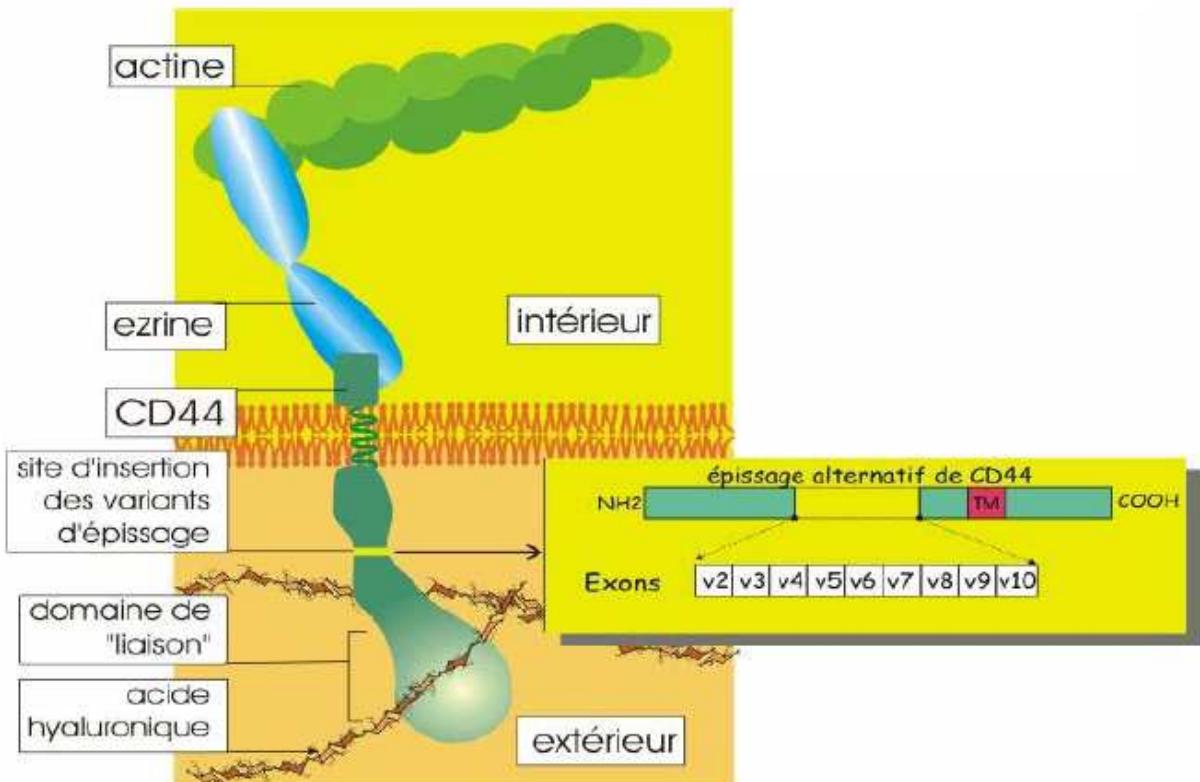


Figure 6 : Structure schématique d'un récepteur CD44 associé à de l'AH, d'après Laroui (2007)

### 3.3.3. Malignité

Il est reconnu que le développement de tumeurs néoplasiques est accompagné de changements de la MEC (particulièrement importants dans la régulation de la dissémination cancéreuse). L'AH, composant majeur de cette matrice, est un facteur non favorable dans le pronostic de nombreux cancers. L'adhésion et la migration cellulaire au travers de la MEC sont en relation avec le récepteur CD44 et l'acide hyaluronique. Par exemple, le hyaluronane et son récepteur CD44 sont impliqués dans le développement et la progression du cancer endométrial (Nykopp *et al.*, 2010). Il a été mis en évidence que ces molécules permettent donc l'attachement fibroblastique et le mouvement des cellules néoplasiques.

Les effets pro-angiogéniques de l'AH sont améliorés par une co-application de facteur de croissance vasculaire endothérial. Il pourrait donc aussi avoir une importance dans l'angiogenèse tumorale (Price *et al.*, 2007).

### **3.3.4. Pathologies pulmonaires**

Dans le poumon, l'AH améliore le microenvironnement des cils car il permet une transition douce entre haute et faible viscosité et le maintien de la perméabilité alvéolaire. Les enfants prématurés avec des maladies respiratoires ont des taux élevés d'AH qui peuvent être réduits par administration de stéroïdes maternels (afin de diminuer l'incidence du syndrome de détresse respiratoire néonatal). Dans les pathologies induites du poumon, les niveaux d'AH augmentent, les oedèmes pulmonaires peuvent être réduits par administration de hyaluronidase ou de stéroïdes (qui n'auront aucun effet sur la fibrose ultérieure) (Price *et al.*, 2007).

Yu *et al.* (2010) ont mis en évidence que l'hypersécrétion de mucus dans les pathologies chroniques inflammatoires des voies aériennes pouvait être liée à la dépolymérisation de l'AH (fragmentation) par des espèces réactives de l'oxygène. La liaison des fragments d'AH aux récepteurs CD44 induit l'activation d'une protéine qui clive les précurseurs des facteurs de croissance épidermiques (EGF) en facteurs actifs. Les fragments d'AH semblent être suffisants pour induire l'interaction CD44/EGFR qui conduit à l'hypersécrétion de mucus (Yu *et al.*, 2011).

## Partie 2 : Les voies d'obtention

Depuis près de trente ans, du fait de ces nombreux rôles et de ces propriétés, l'AH connaît un succès grandissant dans certains domaines thérapeutiques. Pour pouvoir répondre à la demande toujours plus importante en ce biopolymère, les voies d'obtention ont évolué avec les connaissances scientifiques.

Historiquement, les premières sources d'obtention d'AH étaient les tissus animaux car comme nous l'avons vu précédemment ce polymère se retrouve dans les crêtes de coq, le cordon ombilical, ou encore l'humeur vitrée bovine (Laurent et Balazs, 1970).

Aujourd'hui la production microbienne d'AH tend à remplacer son extraction de sources animales.

L'AH peut aussi être produit par voie enzymatique. Toutefois ce procédé reste très coûteux du fait de la complexité des manipulations. Ce processus sert principalement pour la production des standards d'AH qui ont une masse moléculaire définie.

### 1. Origine animale, Extraction

#### 1.1. Introduction

Dès 1949, des chercheurs ont étudié la nature chimique du matériel métachromatique des crêtes de coq. Ces dernières pouvant être considérées comme une structure cutanée modifiée, il leur est apparu possible que ce matériel soit de l'acide hyaluronique. Pour étayer leur hypothèse, ils ont choisi de s'appuyer sur les méthodes utilisées par Meyer et Palmer (1934) pour l'extraction d'acide hyaluronique à partir de cordon ombilical et d'humeur vitrée. L'identification du matériel extrait s'est faite par comparaison de différents paramètres (viscosité, turbidité (obtenue par action de la hyaluronidase), composition et profil électrophorétique) avec ceux de l'acide hyaluronique obtenu à partir d'autres sources (Boas, 1949).

#### 1.2. Etat de l'art

L'extraction d'AH à partir de tissus animaux est citée dans de nombreuses publications. L'AH de crêtes de coq est d'ailleurs souvent choisi comme biopolymère de référence dans des études comparatives

(Shiedline *et al.*, 2004). Une multitude de brevets existe sur la production d'AH à partir de tissus comme le cordon ombilical humain ou l'humeur de bœuf. Néanmoins, ces dix dernières années, on peut noter un déclin de ces techniques d'extraction.

Détaillons par exemple le procédé mis en place par Kang *et al.* (2010). Ces derniers ont simplifié la première méthode d'extraction afin de réduire le temps et les coûts de production.

Des crêtes de coq congelées sont broyées puis plongées dans de l'acétone et placées au froid afin de retirer la graisse contenue dans le tissu (par extraction solide / liquide). L'acétone est ensuite éliminée et remplacée par un nouveau bain. Cette opération est répétée dix fois. Après le dernier essorage, le solvant restant est évaporé. A ce stade du procédé, le rendement est de 80 g de crêtes séchées pour 500 g de crêtes congelées.

Un cycle de dix extractions avec une solution d'acétate de sodium à 5 % permet de récupérer un fluide visqueux qui est mélangé à un grand volume d'éthanol. Le précipité obtenu est centrifugé et dissous dans une nouvelle solution d'acétate de sodium puis re-centrifugé. Les impuretés comme les protéines sont retirées du surnageant par des mélanges successifs avec des solutions de chloroforme. La solution finale est dialysée et précipitée de nouveau à l'éthanol. Le précipité est séché par dessication, sa masse finale est de 500 mg.

Le rendement final de cette méthode d'extraction est donc de 1/1000.

### **1.3. Avantages et inconvénients**

Le principal avantage de cette source d'obtention d'acide hyaluronique réside dans la disponibilité des matières premières. En effet, les tissus utilisés sont souvent des sous-produits de l'industrie de l'abattage animal (5<sup>ème</sup> quartier). Les solvants employés sont couramment retrouvés en industrie chimique.

Mais comme vu dans l'exemple ci-dessus, l'extraction d'AH à partir de tissus demande de grandes quantités de solvants. Certains d'entre eux sont toxiques.

De plus lorsqu'il est extrait de tissus animaux, l'AH est souvent contaminé par la présence de protéines. Dans les crêtes de coq par exemple, il est complexé avec des protéoglycanes, ce qui rend la purification (par dialyse par exemple) de l'AH complexe, difficile et coûteuse.

L'utilisation de produits dérivés d'animaux présente d'autres inconvénients, ils peuvent être vecteurs d'agents pathogènes (principalement les virus) et provoquer des allergies.

Le rendement de ces méthodes et les coûts ne permettent pas de produire de l'AH à grande échelle industrielle.

Toutes ces raisons font que cette voie d'obtention est de plus en plus délaissée par les industriels au profit de la production par voie microbienne.

## 2. Production par voie microbienne

### 2.1. Introduction

La production d'AH par les bactéries est connue depuis plus de 50 ans. Les microorganismes les plus utilisés pour la production d'acide hyaluronique sont des bactéries du genre *Streptococcus* et plus précisément ceux des groupes sérologiques A (*Streptococcus pyogenes*) et C (*Streptococcus equi*) (classification de Lancefield).

Il faut noter qu'il est aussi possible de produire de l'acide hyaluronique à partir de cultures de micro-organisme recombinant comme *Bacillus subtilis* (Brown et Pummill, 2008 ; Chien et Lee, 2007), *Escherichia Coli* (Yu et Stephanopoulos, 2008), *Lactococcus lactis* (Chien et Lee, 2007).

Weigel et De Angelis (2005) ont conclu que n'importe quelle cellule contenant une UDP-glucose déshydrogénase fonctionnelle et une AH synthétase fonctionnelle peut produire ce polymère. Des souches d'hôtes modifiés génétiquement pour exprimer ces deux enzymes produisent en grande quantité l'AH.

Après fermentation et diverses étapes de traitement (dilution, filtration, précipitation éthanolique), on obtient de l'acide hyaluronique brut.

Les procédés microbiens présentent de nombreux avantages. En comparaison avec les voies d'extraction à partir de tissus animaux, ils ont un rendement de production plus important, la taille de l'AH est plus importante et la qualité du polymère produit est meilleure (Armstrong *et al.*, 1997 ; Fong-Chong *et al.*, 2004 ; Rangaswamy *et al.*, 2008). De plus, du fait des facilités de culture des microorganismes et de l'obtention de produit plus pur (taux de liaison aux protéines plus faible), les coûts de production sont réduits. En revanche, la production d'AH par fermentation est limitée par un faible taux de transfert de l'oxygène lié à la forte viscosité du milieu (Fong-Chong *et al.*, 2004).

Enfin, cette nouvelle approche de production permet d'éviter les transmissions virales inter-espèce.

Les risques liés à cette technique de production reposent sur l'existence d'éventuelles endotoxines bactériennes et sur la contamination du milieu de culture.

## 2.2. Les micro-organismes producteurs

### 2.2.1. Présentation du genre *Streptococcus*

#### 2.2.1.1. Classification

Le genre *Streptococcus* regroupe un vaste ensemble de microorganismes ubiquitaires et comprend de nombreuses espèces. En raison de leur nombre, on distingue les espèces pathogènes des espèces commensales et saprophytes.

Le pouvoir pathogène du genre *Streptococcus* se limite à certaines espèces et dépend énormément de leur activité hémolytique.

En 1928, Lancefield propose une classification antigénique qui remplace les classifications précédentes basées uniquement sur les propriétés hémolytiques. Elle est basée sur la présence dans la paroi des Streptococci d'un polyoside C spécifique. La classification des *Streptococci* peut se faire en sérogroupes de A à T. Certains *Streptococci* qui ne possèdent pas d'antigène permettant de les classer selon cette méthode sont dits « non groupables ».

#### 2.2.1.2. Caractères microscopiques

Ce sont des coques gram positif de 0,5 à 1 µm de diamètre, présentant un groupement typique en diplocoques (deux coques) ou en chaînettes de longueur variable, immobiles, et qui ne forment pas de spores.

#### 2.2.1.3. Caractères macroscopiques et de culture

##### Conditions de culture

Aéro-anaérobiose facultatifs, ils se développent aussi bien en absence d'oxygène qu'avec. Ils sont en revanche sensibles aux conditions de culture, notamment de température et pH (cf 2.4.). Les bactéries du

genre *Streptococcus* sont mésophiles (leur température optimale de croissance est de 37 °C) et neutrophiles (ils tolèrent très mal les milieux acides).

Ce sont des germes exigeants, auxotrophes multiples : ils demandent des milieux enrichis en nutriments. Ils ont des exigences très complexes en facteurs de croissance. Ils ne peuvent pas se développer en milieu synthétique simple composé de sels minéraux et d'une seule source organique d'énergie et de carbone. Le milieu doit être supplémenté en plusieurs vitamines, ainsi qu'en complément d'acides aminés et autres facteurs de croissance. En milieu naturel (épithéliums animaux), les principales sources d'énergie sont les acides organiques et les acides aminés. Les milieux pour la culture de *Streptococci* pathogènes sont additionnés de sang complet.

### **Milieux de culture**

Au cours de mes études à la faculté de pharmacie de Nancy ou à l'ENSAIA, j'ai eu l'opportunité de cultiver ces micro-organismes sur différents milieux.

**Exemple de milieux non sélectifs :** Le bouillon cœur-cervelle ou BHI (Brain Heart Infusion) est un milieu complexe, très nutritif, adapté pour les micro-organismes exigeants comme les *Streptococci*. Il est constitué de peptones, d'infusion cervelle cœur, d'extrait de levure...

**Exemple de milieux sélectifs :** La gélose au sang est un milieu solide contenant souvent du sang de mouton. Elle permet d'apprécier l'activité hémolytique (lyse des hématies) de certaines bactéries.

### **Caractéristiques de la culture**

- **Aspect en bouillon :** trouble souvent peu homogène (présence de coagulats ou culots).

- **Aspect sur gélose ordinaire :** petites colonies translucides aux diamètres variables.

- Sur gélose au sang la présence de colonies de certains *Streptococci* est dévoilée par un halo qui traduit le caractère hémolytique.

Le comportement de ces micro-organismes sur gélose au sang permet de les distinguer, il existe des *Streptococci* alpha-hémolytiques, bêta-hémolytiques et gamma-hémolytiques. Les *Streptococci* alpha-hémolytiques, transformant l'hémoglobine (Hb) en biliverdine, leurs colonies sont entourées d'un *halo verdâtre*, d'où leur nom courant de *Streptococcus viridans*. Les bactéries bêta-hémolytiques sont entourées d'un halo clair qui résulte de la lyse totale des hématies. Les bactéries gamma-hémolytiques enfin ne produisent aucune modification et sont donc en réalité non hémolytiques.

## Caractéristiques biochimiques

L'activité métabolique du genre *Streptococcus* varie, mais toutes les espèces se caractérisent par l'absence de catalase et d'oxydase. Ils ne réduisent pas les nitrates et ils utilisent la voie fermentaire pour la dégradation de certains glucides sans production de gaz.

Les bactéries du genre *Streptococcus* sont homolactiques. Dans des conditions d'anaérobiose, le principal produit de fermentation découlant du catabolisme du glucose est l'acide lactique, avec des niveaux minimes de formate, d'acéate et d'éthanol produit.

### 2.2.1.4. *Streptococcus zooepidemicus*

En 1984, Farrow et Collins (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2009) montrent que *Streptococcus equi* et *Streptococcus zooepidemicus* sont génétiquement apparentés (90% d'homologie) et forment une unique *genomospecies*. Ils proposent que ces souches soient reclassées au sein d'une sous-espèce de *Streptococcus equi*: *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* et *Streptococcus equi* subsp. *equi*.

Les souches les plus utilisées pour la production d'AH sont donc des bactéries des groupes A et C, possèdant une capsule, et tout particulièrement l'espèce *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (Kim et al., 1996 ; Shiedline et al., 2004 ; Rangaswamy et al., 2008 ; Jaggannath et Ramachandran, 2009).

## 2.2.2. Rôle de la capsule d'acide hyaluronique

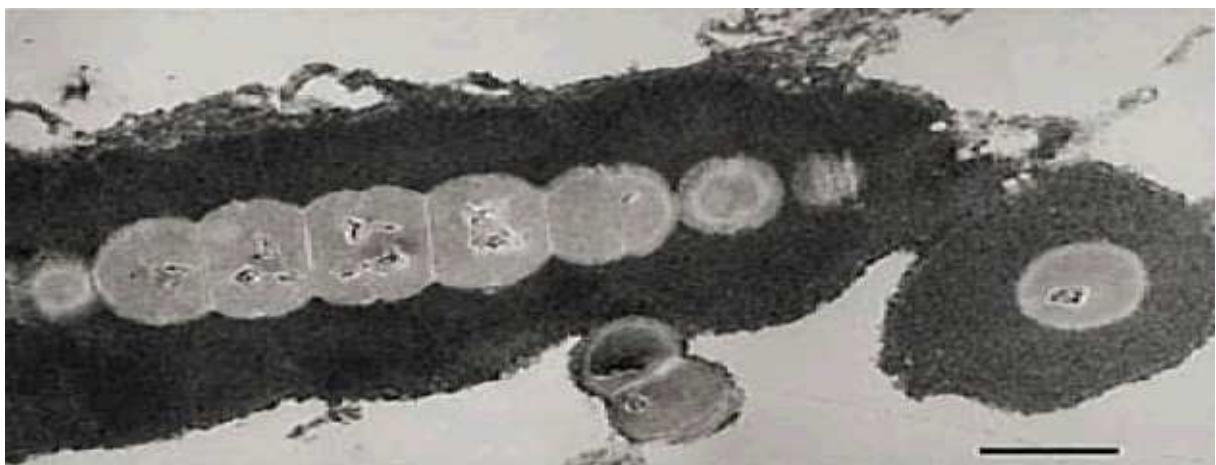


Figure 7 : Photographie en microscopie électronique d'une chaîne de *Streptococcus equimilis*, englobée dans une capsule d'acide hyaluronique (Fruminet, 2010)

L'acide hyaluronique est synthétisé dans la capsule extracellulaire des bactéries du genre *Streptococcus* pathogènes des groupes A et C (classification de Lancefield). Ces micro-organismes sont généralement arrangés en paires ou chaînes englobées par une capsule extracellulaire. Sur gélose au sang, les colonies de ces bactéries  $\beta$ -hémolytiques produisent une zone claire où l'acide hyaluronique peut être identifié comme un agent transparent mucoïde (Figure 7).

Les polymères d'AH synthétisés dans cette capsule sont semblables à ceux retrouvés dans les tissus de mammifères. L'AH provenant de capsules a en général un poids moléculaire supérieur à 3 MDa.

La capsule est une structure transitoire et facultative qui entoure la bactérie. Elle ne joue pas un rôle vital pour la bactérie et en l'absence de sa synthèse, la bactérie est capable de se multiplier. En revanche, la capsule d'acide hyaluronique est un facteur de virulence pour ces *Streptococci*. Ils peuvent moduler son expression en fonction du stade de l'infection.

De par son caractère ubiquitaire, il semblerait que l'acide hyaluronique empêche le système immunitaire des organismes supérieurs de reconnaître la capsule comme une entité étrangère (Wessels *et al.*, 1991). Cette dernière permet aussi de protéger la bactérie contre les radicaux libres libérés par les lymphocytes pour lutter contre l'infection. Enfin l'AH aide à la migration au travers de l'épithélium (par exemple l'épithélium pulmonaire) vers les tissus.

## 2.3. Métabolisme de l'acide hyaluronique chez *Streptococcus zooepidemicus*

### 2.3.1. Voies de biosynthèse de l'acide hyaluronique

Les micro-organismes du genre *Streptococcus* sont des bactéries lactiques. Les principaux produits du catabolisme du glucose sont l'acide lactique, l'acétate et l'éthanol.

Les besoins biosynthétiques sont majoritairement couverts par la source azotée donc le carbone apporté par le glucose se retrouve surtout dans les produits de fermentation et est faiblement utilisé pour la biomasse.

Les sous-unités acide D-glucuronique et N-acétyl glucosamine de l'acide hyaluronique dérivent respectivement du glucose-6-phosphate et du fructose-6-phosphate. Cela a pu être mis en évidence par des études RMN <sup>13</sup>C chez *Streptococcus zooepidemicus* (Matsubara *et al.*, 1991). La voie biosynthétique proposée est présentée en figure 8. La première réaction convertit le glucose-6-phosphate en glucose-1-phosphate, cette réaction est commune à beaucoup d'organismes et permet le stockage des polysaccharides grâce à l'α-phosphoglucomutase. L'UDP-glucose pyrophosphorylase catalyse la réaction de l'UTP et du glucose-1-phosphate pour produire de l'UDP-glucose. L'acide UDP-glucuronique est ensuite obtenu par une oxydation spécifique du groupement alcool primaire de l'UDP-glucose par l'UDP-glucose déshydrogénase. La voie de synthèse partant du fructose-6-phosphate conduit à la production de sucres aminés. Le transfert du groupe amine d'une glutamine au fructose-6-phosphate par une amidotransferase permet la formation de glucosamine-6-phosphate. Le transfert d'un groupement acétyl par une acétyltransférase forme la N-acétyl glucosamine-6-phosphate. Cette étape consomme de l'énergie qui est apportée par l'hydrolyse de la liaison thioester d'un acétyl-CoA (libère l'équivalent de l'hydrolyse d'un ATP). Le réarrangement du groupement phosphate par une mutase génère la N-acétyl glucosamine-1-phosphate à partir de N-acétyl glucosamine-6-phosphate. Enfin une pyrophosphorylase ajoute une molécule d'UDP pour obtenir de l'UDP-N-acétylglucosamine. La participation d'UTP dans ces réactions génère des donneurs de glycosyl activés qui peuvent être polymérisés en AH par l'acide hyaluronique synthétase. Un total de 4 molécules d'ATP est consommé pour produire une molécule de disaccharide. 2 molécules d'ATP sont consommées dans les deux réactions des glucokinases pour fournir un précurseur hexose phosphorylé à chacune des branches de la voie de synthèse. 2 autres molécules d'ATP sont utilisées pour régénérer les UTP. La réaction d'oxydation catalysée par l'UDP-glucose dehydrogenase génère deux molécules de NADH pour chaque molécule d'acide hyaluronique (monomère) synthétisé. Il est intéressant de noter que pour contrebalancer cette production de NADH, l'acétate et l'éthanol sont

synthétisés de façon équimolaire. Le taux d'AH combiné avec la production de NADH pour la formation d'acide UDP-glucuronique pousse la balance vers l'éthanol.

Dans les micro-organismes facultatifs qui produisent naturellement l'AH, ces équivalents de réduction ne peuvent pas être utilisés pour la génération d'énergie. En plus de fournir des précurseurs pour la synthèse d'AH, ces deux voies fournissent aussi les constituants structuraux de la paroi cellulaire bactérienne et notamment le peptidoglycane, les acides téichoïques et les polysaccharides antigéniques. Ces trois constituants majeurs de la paroi comptent pour près de 20% du poids sec de cellule et représentent une source importante de précurseurs pour la synthèse d'AH.

#### **Bilans matière et énergétique :**

L'AH est donc synthétisé essentiellement à partir de glucose (Glc) mais aussi d'acétylCoA, d'acide aminé, d'ion ammonium et d'énergie sous forme d'ATP :



Cette équation de base est totalement déséquilibrée en termes énergétiques et d'oxydo-réduction, et ne tient pas compte des sources réelles de carbone et d'azote apportées par le milieu. Elle doit donc être modifiée en fonction des rôles physiologiques des différents éléments présents dans le milieu.

- Source de carbone : Le carbone est apporté par le glucose, utilisé en tant que tel (2 molécules par molécule d'AH) mais il sert aussi à la synthèse d'acétylCoA.



Il faut donc  $\frac{1}{2}$  glucose pour obtenir 1 acétylCoA.

Au total, pour répondre aux besoins en carbone, il faut au minimum 2,5 glucose pour la production d'un monomère d'AH.

- Source d'azote : L'azote est le plus souvent apporté par un acide aminé. Celui-ci transfère sa fonction amine à l'AH, mais doit ensuite être régénéré à partir d'ion ammonium avec consommation d'une molécule d'ATP et d'un coenzyme NADPH + H<sup>+</sup> :



À partir de ces bilans-matière, il ne faut pas oublier de prendre en compte les besoins en énergie (apportée sous forme d'ATP) et le maintien du potentiel d'oxydo-réduction.

- Bilans en ATP :  $\text{Glucose} + 2 \text{ ADP} + 2 \text{ Pi} \rightarrow 2 \text{ ATP} + 2 \text{ Lactate}$

La synthèse d'un monomère d'AH consomme 4 ATP soit 2 Glc. La dégradation d'un glutamate consomme 1 ATP.

La production d'1 NADPH, H<sup>+</sup> consomme 1/12 glucose (voie des pentoses-phosphate).

Il faut donc 5,08 ATP pour 1 monomère d'AH soit 2,54 glucoses.

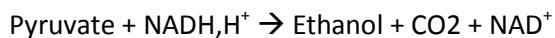
- Equilibre du potentiel d'oxydo-réduction :

Le potentiel redox dans le milieu doit toujours être équilibré. Cependant, lors de la production d'un AH, il y a libération de 6 molécules de NADH, H<sup>+</sup>. Un système de régulation du potentiel d'oxydo-réduction se met donc en place. Cette régulation peut provenir de différentes voies métaboliques :

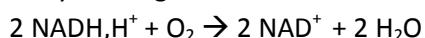
- Voie de la pyruvate-formate lyase



- Complexe pyruvate déshydrogénase



- Oxydation grâce à l'aération du milieu



La synthèse d'un AH libère 4 NADH, H<sup>+</sup> et 1 glucose donne 2 pyruvate. Dans le pire des cas (complexe pyruvate-déshydrogénase), 2 pyruvate utilisent 2 NADH, H<sup>+</sup>. Il faudrait ainsi 3 Glc de plus pour équilibrer le potentiel redox.

La production d'un monomère d'AH nécessite donc : 2,54 + 2,5 + 3 = 7,04 glucoses.

Il est donc préférable de réaliser cette fermentation avec un large excès de glucose afin de permettre à la fois la croissance bactérienne et la production d'AH.

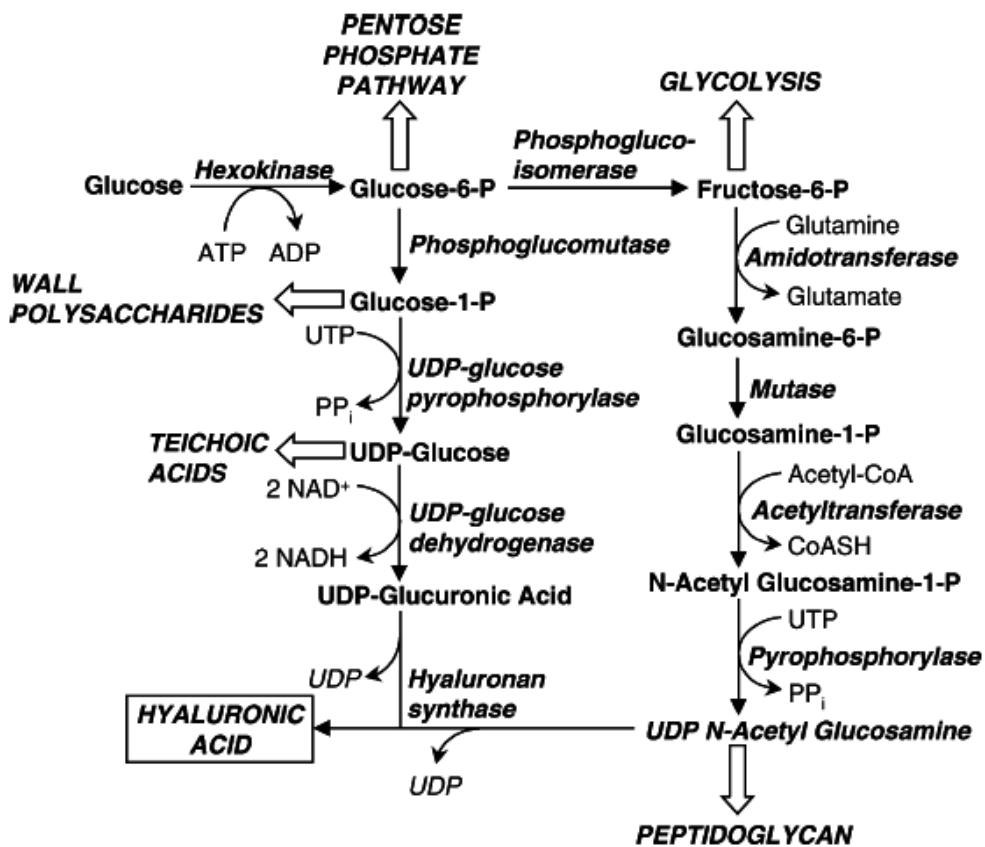


Figure 8 : Les voies de biosynthèse de l'acide hyaluronique chez *Streptococcus zooepidemicus*, d'après Fong Chong et Nielsen (2003)

Comme nous l'avons déjà vu, la masse moléculaire du hyaluronane est très important pour ces fonctions biologiques et rhéologiques. Chen *et al.* (2009) ont démontré que la surexpression des gènes impliqués dans la synthèse de l'acide UDP-glucuronique diminue la masse moléculaire alors que la surexpression des gènes impliqués dans la synthèse de l'UDP-N-acétylglucosamine augmente ce poids. Un haut poids moléculaire peut donc être atteint lorsqu'il existe une balance appropriée entre l'acide UDP-glucuronique et l'UDP-N-acétylglucosamine. Son contrôle peut se faire en fonction de la concentration en précurseurs glucidiques activés. Il est possible d'utilisé ce phénomène afin d'améliorer les souches productrices d'AH de haut poids moléculaire.

L'opéron bactérien HAS consiste en trois gènes hasA, hasB et hasC qui correspondent à l'HAS (hasA), l'UDP-glucose déshydrogénase (hasB, UGDH) et l'UDP-glucose pyrophosphorylase (hasC, UDPGPPase) (Blank *et al.*, 2008). Ces gènes sont localisés sur le chromosome bactérien. L'inhibition d'un de ces gènes empêche la synthèse d'AH et l'assemblage du glycocalix protecteur (riche en ce polymère). D'après Karousou *et al.* (2010), l'activité de l'HAS2 est régulée par dimérisation et ubiquitination.

### **2.3.2. Dégradation**

Les hyaluronates lyases ou hyaluronidases bactériennes sont produites par des micro-organismes, le plus souvent Gram positifs comme *Staphylococcus*, *Clostridium* ou encore *Streptococcus*. Toutes ces bactéries sont capables de provoquer des infections chez les animaux.

Les *Streptococci* du groupe A sont capables de synthétiser deux types de hyaluronidases. La dissémination de ces bactéries dans l'organisme et la progression de la maladie sont associées à l'expression de ces enzymes (Hynes *et al.*, 2000) qui sont donc des facteurs de virulence.

Les hyaluronidases bactériennes clivent l'AH au niveau de la liaison glycosidique  $\beta$ 1-4 et libèrent des oligosaccharides insaturés  $\Delta$ 4-5 (Figure 9). L'hydrolyse n'intervient pas dans leur activité.

Les AH lyases interagissent directement avec les tissus de l'hôte et permettent de dissimuler au système de défense la surface bactérienne. La dégradation enzymatique des composants de la matrice extracellulaire facilite l'invasion microbienne. La perméabilité améliorée de la matrice extracellulaire (MEC) par ces hyaluronidases joue un rôle majeur dans l'infection des plaies ou encore la pneumonie.

Cette activité de dégradation de l'AH peut faciliter l'adhésion, la colonisation et fournit des nutriments aux micro-organismes. Les dissacharides générés peuvent être transportés et métabolisés au niveau intracellulaire pour assurer la multiplication bactérienne. A la différence de l'AH de haut poids moléculaire, ces oligomères sont potentiellement de agents inflammatoires qui génèrent un environnement favorable au développement bactérien (Girish et Kempuraju, 2007)

Les hyaluronidases ont été très largement étudiées et sont très bien caractérisées. Malgré leur grande similarité, leur poids est variable même au sein du genre *Streptococcus*. L'étude aux rayons X indique que ce sont des protéines globulaires avec deux domaines distincts reliés par un court peptide « linker ». Le domaine N-terminal est une hélice  $\alpha$  alors que l'extrémité C-terminal est un feuillet  $\beta$ . Le site actif de ces enzymes est composé de deux parties principales : un groupement catalytique responsable de la dégradation du substrat et un site pour la sélection de la zone de clivage sur les chaînes d'AH.

Jedrzejas (2000, 2006) a proposé un mécanisme détaillé nommé « le mécanisme de donation et d'acceptation du proton ». L'enzyme accepte un proton et en rend un différent à l'oxygène glycosidique  $\beta$ 1-4.

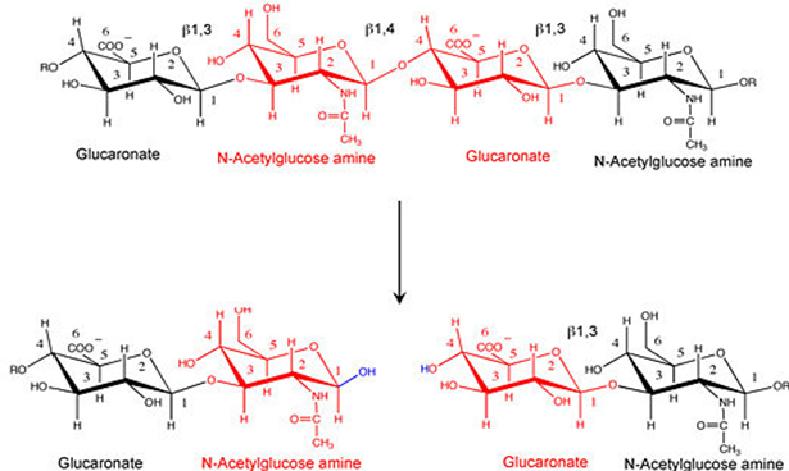


Figure 9 : Principe d'action de la hyaluronidase sur une chaîne d'acide hyaluronique (Fruminet, 2010)

## 2.4. Optimisation de la production microbienne

### 2.4.1. Contexte, objectifs et critères d'amélioration

L'acide hyaluronique est obtenu à partir de cultures bactériennes dont les conditions de mise en œuvre en bioréacteur sont souvent mal définies.

Ces dernières années, la recherche et le développement se sont axés principalement sur la production de ce métabolite dans des conditions quantitativement et qualitativement acceptables en utilisant des souches hautement productrices. L'objectif majeur est d'obtenir un procédé technologiquement et économiquement industrialisable. Ce procédé doit être sûr et ne doit donc pas utiliser de souches sauvages, potentiellement pathogènes.

Généralement l'optimisation de la production d'acide hyaluronique par voie microbienne passe par 4 grandes étapes qui sont :

- Pré-sélection de mutants performants non pathogènes
- Formulation d'un milieu de culture de référence
- Sélection et étude du comportement cinétique et physiologique de souches à potentialités productrices de haut niveau à l'échelle laboratoire de bioréacteur contrôlé
- Détermination des conditions optimales du procédé de production microbiologique

## 2.4.2. Modification des souches par ingénierie métabolique

Les stratégies d'amélioration (Figure 10) visent à accroître la concentration finale en produit, à réduire la production de co-métabolites indésirables ou l'expression d'enzymes de la dégradation de la molécule d'intérêt. Dans le cas des *Streptococcus*, ces stratégies cherchent aussi à supprimer l'activité hémolytique des souches utilisées.

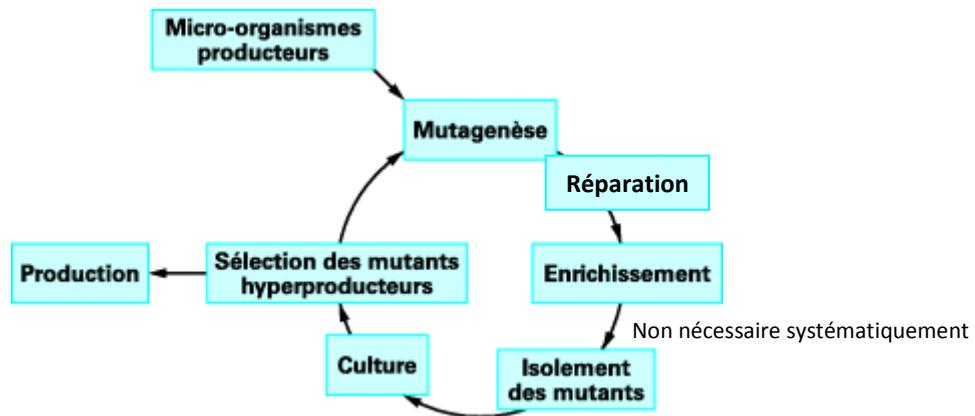


Figure 10 : Les différentes étapes pour l'obtention de souches hyperproductrices

### 2.4.2.1. Mutagenèse

Deux grandes catégories d'approches sont utilisées pour l'amélioration : la mutagenèse aléatoire et le génie métabolique. Ce dernier sera développé dans la partie production d'acide hyaluronique par organismes recombinants.

Historiquement, la sélection de souches est surtout un procédé aléatoire. L'utilisation d'agents mutagènes suivie par des étapes de réparation et d'enrichissement ont permis d'obtenir des mutants non-hémolytiques et hyaluronidase - (cribles simples). Cette technique de mutagenèse aléatoire a aussi été utilisée pour développer des souches productrices d'AH de haut poids moléculaire.

*In vivo*, l'évolution induite par ces mutations est très lente et n'est pas contrôlée par la bactérie.

Le principal avantage de la technique de la mutagenèse aléatoire réside dans le fait qu'aucune connaissance préalable du génome ou de la physiologie des souches traitées, n'est nécessaire. La mutagenèse induit des modifications génétiques au sein du génome sans que la localisation de ces dernières puisse *a priori* être connue.

Le génie métabolique est considéré comme la méthode de pointe, néanmoins la mutagenèse aléatoire continue à être utilisée majoritairement pour le développement des procédés. Elle a en effet permis

l'obtention de la quasi-totalité des améliorations des souches utilisées en industrie. L'approche par génie métabolique consiste à transférer les gènes qui codent pour les voies métaboliques qui synthétisent l'AH dans des bactéries non pathogènes. Avec cette approche, la mutagénèse est dite dirigée. Elle est très lourde et complexe à mettre en place.

L'introduction des mutations au sein du génome des micro-organismes d'intérêt se réalise le plus souvent par action d'agents mutagènes chimiques ou physiques (dont l'action sur le génome est différente d'un agent à l'autre), mais aussi parfois en réalisant un brassage génétique entre souches présentant un potentiel génétique différent, notamment grâce à la technique de fusion des protoplastes. Cette dernière ne sera pas développée.

Lorsqu'une mutagenèse est envisagée, il est nécessaire d'établir la concentration, le temps d'exposition ainsi que les conditions de traitement à utiliser qui permettent d'obtenir la plus forte proportion du type de mutants recherchés parmi les cellules ayant survécu à la mutagenèse. Ces paramètres sont généralement ceux qui permettent d'obtenir une mutation unique par cellule. Seule l'expérience permet de prévoir ces paramètres de mutagenèse. Il est généralement admis qu'un couple temps d'action/dose conduisant à une mortalité de 90 à 99 % est favorable à l'apparition de mutants intéressants parmi les cellules survivantes.

Les techniques de mutagenèse sont parfois décrites dans les publications comme celle de Kim *et al.* (1996). Le protocole employé est détaillé en figure 12. La méthyl-nitrosoguanidine (NTG) est un agent alkylant de l'ADN qui va principalement fixer un groupement méthyl sur la guanine (Figure 11). Cette alkylation aléatoire n'est pas toujours reconnue par les systèmes de réparation de l'ADN et entraîne un mésappariement lors du processus de réplication. Cela va engendrer une modification de la séquence de l'ADN bactérien et ainsi conférer ou supprimer certaines propriétés aux micro-organismes mutés (comme par exemple l'absence d'activité hémolytique).

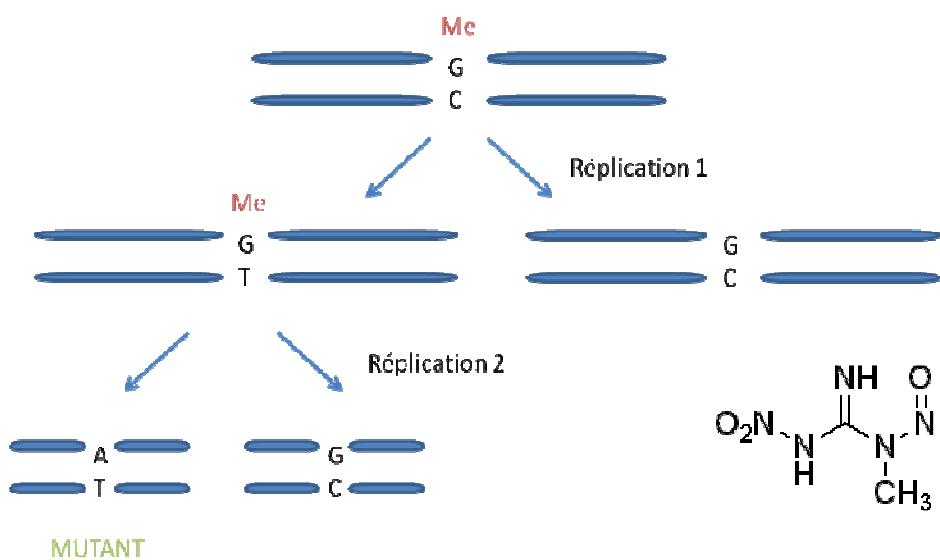


Figure 11 : Structure chimique et schéma du principe d'action de la nitrosoguanidine, d'après J. Fruminet (2010)

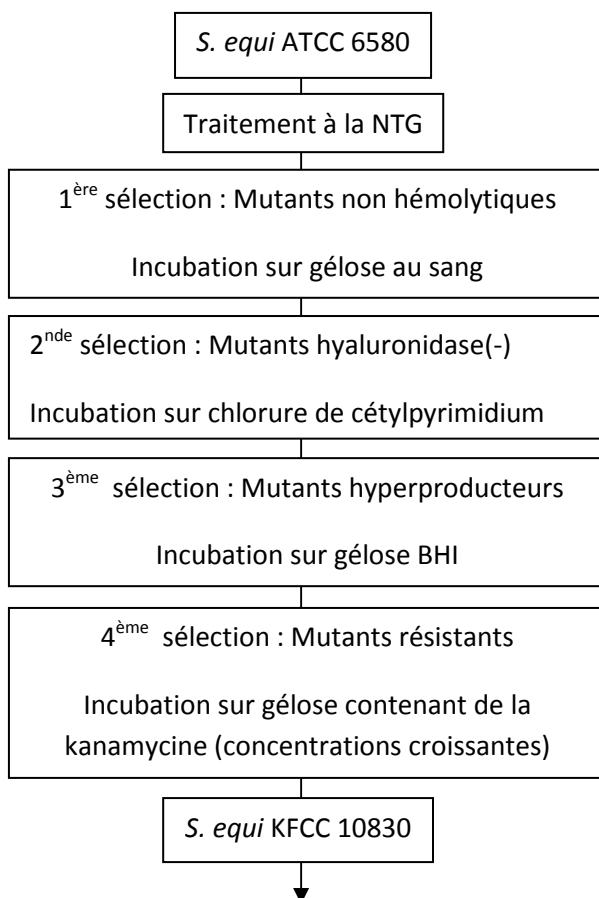


Figure 12 : Protocole de sélection de *Streptococcus equi* KFCC 10830, d'après Kim *et al.* (1996)

Les bactéries de la souche sauvage *S. equi* ATCC (American Type Culture Collection) 6580 ont été incubées à 37 °C pendant 24 h sur une gélose BHI. Une unique colonie a ensuite été inoculée dans un flacon contenant du bouillon BHI et incubée à 37 °C jusqu'à ce que la densité optique à 600 nm atteigne la valeur 1 (synonyme de multiplication bactérienne). Ensuite ce bouillon a été centrifugé et le culot cellulaire a été lavé du tampon phosphate. Les cellules ainsi récupérées sont mises en suspension dans un tampon contenant l'agent mutagène : la nitrosoguanidine (NTG). Elles sont ensuite incubées à 37 °C pendant 40 mn. Il existe aussi des techniques de mutations dites horizontales. Elles reposent sur des mécanismes qui sont à l'origine d'une grande partie de la diversité génétique des microorganismes et qui peuvent être regroupés en trois types : la transduction, la transformation et la conjugaison. Mon étude bibliographique ne m'a pas permis de trouver des publications portant sur la production d'AH par des micro-organismes mutants obtenus par de telles techniques.

#### **2.4.2.2. Sélection et caractérisation**

##### **2.4.2.2.1 Enrichissement**

La réalisation ou non d'une étape d'enrichissement en mutants dépend des propriétés recherchées chez ces derniers. Cette étape consiste à jouer sur les conditions environnementales du milieu dans lequel les cellules mutantes sont introduites, de façon à favoriser les mutants recherchés ou, inversement, à défavoriser les cellules ne présentant pas le phénotype désiré. Le choix d'un cible de sélection facilement utilisable est primordial.

L'enrichissement en mutants peut être réalisé en plaçant les micro-organismes ayant subi la mutagenèse en présence de concentrations croissantes d'antibiotique.

Une autre méthode est de placer les cellules mutantes dans un milieu minimal (milieu dans lequel les cellules auxotrophes ne pourront pas se développer), en présence d'un antibiotique détruisant uniquement les cellules en croissance, donc les non auxotrophes. L'antibiotique permettant cette sélection est le plus souvent une pénicilline dans le cas des bactéries.

Lorsqu'il est réalisable, l'enrichissement permet d'accroître considérablement la proportion en mutants désirés parmi la population microbienne venant de subir la mutagenèse.

Après l'étape de mutagenèse, Kim *et al.* (1996) ont mis les bactéries en incubation à 30 °C pendant 6 h dans un bouillon BHI puis étalées sur une gélose au sang afin de sélectionner les mutants non-hémolytiques. L'absence d'halo clair ou zone d'hémolyse autour de la colonie signe la présence de

bactéries non-hémolytiques. Cette colonie est ensuite repiquée dans un milieu agar contenant de l'AH. Après une nuit d'incubation, une solution de chlorure de cétylpirimidium (antiseptique) est versée sur le milieu de culture. Les colonies non transparentes sont sélectionnées comme étant des bactéries hyaluronidase négative. Elles sont ensuite repiquées sur un milieu BHI à 37 °C pendant 48 h. Les larges colonies à l'aspect visqueux ont été sélectionnées pour tester la production d'acide hyaluronique en fioles d'Erlenmeyer agitées. La viscosité du milieu de culture est ensuite mesurée par un viscosimètre capillaire. La plus forte viscosité correspond à la plus forte production d'AH dans le milieu. La souche mutante sélectionnée a été nommée *S. equi* KFCC 10830.

#### **2.4.2.2.2. Sélection des mutants performants (hyperproducteurs) non pathogènes**

Cette dernière phase intervient après l'étape d'isolement des différents clones obtenus après mutagenèse et enrichissement. Les différents clones doivent pouvoir être testés individuellement afin d'identifier ceux qui présentent les caractères recherchés. Cette étape de caractérisation peut s'effectuer « manuellement », clone par clone, ou bien être automatisée.

Dans le cadre d'une procédure d'amélioration de souche, plusieurs cycles de mutagenèse-sélection sont généralement réalisés en faisant varier la nature de l'agent mutagène utilisé. En effet, les différents types d'agents mutagènes ne sont pas associés aux mêmes dommages dans le génome. Les modifications phénotypiques qui découlent de ces cycles peuvent donc être variées.

#### **2.4.2.2.3. Caractérisation**

Les *Streptococci* ont des besoins particuliers et croissent préférentiellement sur des milieux complexes contenant des extraits de levures, des extraits animaux (cœur, cervelle), des peptones ou encore du sérum. Pour l'étude du métabolisme bactérien, il est préférable d'utiliser un milieu chimiquement défini.

Ce milieu est conçu de façon à pouvoir quantifier les phénomènes physiologiques majeurs des souches sauvages et mutées ainsi que la production d'AH. Cette dernière résulte à la fois du catabolisme et de l'anabolisme du biopolymère. La possibilité de réaliser des quantifications de flux métaboliques dans ce milieu est un pré-requis pour la caractérisation des souches d'intérêt.

L'objectif de la caractérisation cinétique des performances est, d'une part, de valider, le potentiel des souches mutées et, d'autre part, d'identifier les paramètres physiologiques sur lesquels influer pour améliorer leur capacité et la qualité de production d'AH (Don et Shoparwe, 2009).

### **2.4.3. Conditions de culture**

Le milieu de culture, comme la souche utilisée, joue un rôle dans la production d'AH. L'environnement biochimique des bactéries influence énormément leur croissance ainsi que la production de molécules.

La connaissance de l'impact des différents composants du milieu et des paramètres physico-chimiques ainsi que la compréhension de leurs effets conditionnent l'amélioration quantitative et qualitative de la production d'AH ainsi que l'augmentation de son poids moléculaire.

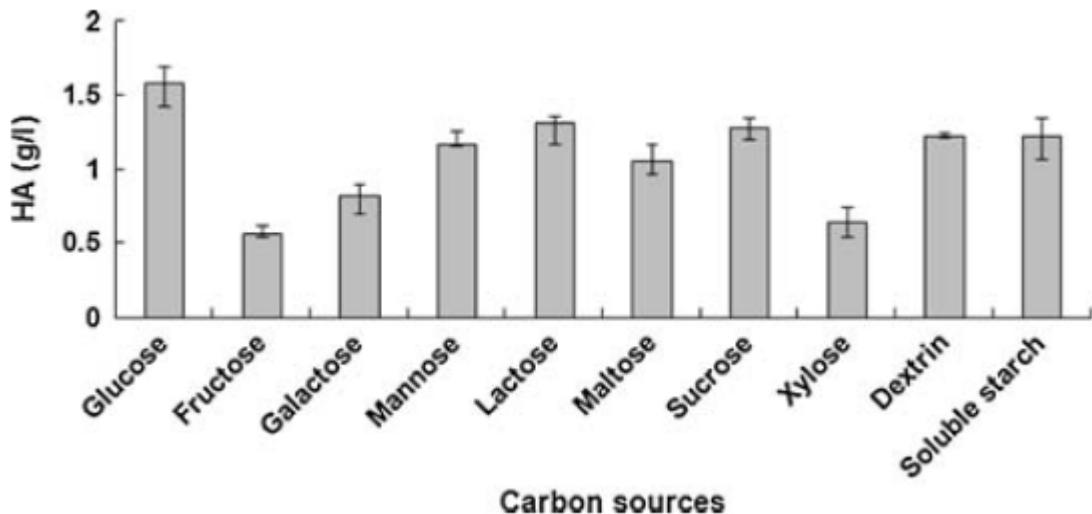
Les microorganismes exigeants comme les *Streptococci* se développent généralement dans/sur un milieu de culture complexe, contenant des extraits de levures ou d'animaux, de la peptone ou du sérum, 10 à 60 g/L de glucose, des acides aminés, des nucléotides, des minéraux (Pires *et al.*, 2010) et des vitamines (Chong *et al.*, 2005).

Kim *et al.* (1996) ont proposé un milieu destiné à la culture de la souche *S. equi* ATCC 6580. La composition suivante est définie pour 1 litre d'eau distillée : 30 g de glucose, 25 g de tryptone, 10 g MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O, 0,6 g MnSO<sub>4</sub>, 10 g de Mg SO<sub>4</sub>, 10 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,6 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>.

Plusieurs auteurs (Armstrong et Johns (1997), Kim *et al.* (1996), Kim *et al.* (2006), Chen *et al.* (2009)) ont étudié l'influence de la composition du milieu de culture et/ou des paramètres physico-chimiques tels la vitesse d'agitation, l'oxygénation, le pH, la température. L'optimisation de la composition du milieu permettra de mettre au point un milieu chimiquement semi-défini afin de répondre aux exigences de croissance des microorganismes et de production d'AH. Le processus d'optimisation sera détaillé dans la partie 2.4.5.

#### **2.4.3.1. Influence de différentes sources carbonées**

Le glucose est la source carbonée le plus souvent utilisée pour la production de métabolites par voie microbienne. Im *et al.* (2009) ne se sont pas arrêtés à ce constat et ont étudié l'influence d'autres sources carbonées sur la production d'AH. Les sources étudiées étaient le fructose, le galactose, le mannose, le saccharose, le xylose, les dextrines, l'amidon soluble, le lactose et le maltose. Ces sources carbonées ont été ajoutées individuellement dans le milieu, à la place du glucose, à raison d'une concentration de 40 g/L. La plus haute productivité (1,58 g/L) en AH a été obtenue avec comme source carbonée le glucose (Figure 13).



**Figure 13 : Influence de différentes sources carbonées sur la concentration d'AH obtenue après 24 h de culture à 37 °C, à 120 tr/min, chez *Streptococcus* sp. ID9102, d'après Im *et al.* (2009)**

Jagannath et Ramachandran (2010) ont aussi étudié l'influence de glucides comme le glucose sur la production d'AH. La voie de la glycolyse joue un rôle complexe car elle contribue à l'apport d'énergie, à l'apport des précurseurs pour l'AH et à la formation de la biomasse. Lorsque la quantité de glucose est doublée de 30 à 60 g/L, il y a saturation des enzymes glycolytiques, en amont. L'excès de dérivés du glucose est tourné vers la synthèse d'AH, la concentration augmente de 29 % et la masse moléculaire de 8 %. D'après ces auteurs, plus de 90 % du glucose entrant dans la cellule est utilisé dans la glycolyse. Le glucose est alors indisponible pour la synthèse d'AH. La nature des glucides modifie le flux glycolytique et, de ce fait, la disponibilité de ces substrats pour la biosynthèse de l'AH.

**Tableau 5 : Effet de la nature du sucre sur le métabolisme, le titre final d'AH, le rendement et la masse moléculaire, d'après Jagannath et Ramachandran (2010)**

Substrate (g L <sup>-1</sup> )	Yeast extract (g L <sup>-1</sup> )	Specific growth rate (h <sup>-1</sup> )	Specific HA rate (g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Specific lactate rate (g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Specific acetate rate (g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	HA titer (g L <sup>-1</sup> )	Yield (Y <sub>HA/X</sub> ) (g HA g Cell <sup>-1</sup> )	Weight average molecular weight (MDa)
Glucose 30	10	0.42	0.22	4.04	1.33	2.1	1.04	2.1
Glucose 60	10	0.52	0.24	4.29	0.63	2.7	0.82	2.4
Sucrose 30	10	0.57	0.29	3.27	1.35	1.97	1.01	2.3
Sucrose 60	20	0.43	0.19	2.53	1.77	2.97	0.96	2.1
Glucose 60	20	0.62	0.16	4.02	0.61	2.63	0.77	1.8

L'utilisation, par exemple, de glucides issus de l'amidon semble réduire la production de lactate et l'accumulation de glucose est utilisée pour la synthèse d'AH (Zhang *et al.*, 2005). Ainsi, le niveau et la complexité de la source carbonée pourraient limiter le procédé glycolytique et influer sur la masse

moléculaire d'AH. Cela a été confirmé par Jagannath et Ramachandran (2010) qui ont remplacé le glucose par du saccharose et ont ainsi observé une augmentation de 34 % du taux de synthèse d'AH (Tableau 5).

En conclusion, la nature, la concentration et la complexité de la source carbonée pourrait altérer le processus glycolytique et ainsi réguler la masse moléculaire de l'AH.

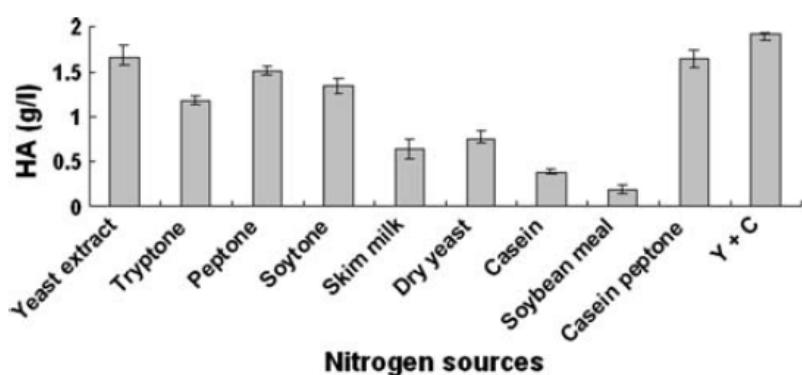
#### **2.4.3.2. Influence de différentes sources azotées**

Les sources azotées les plus utilisées sont des substances complexes contenant à la fois de l'azote, du carbone et des facteurs de croissance. Elles sont utiles pour la croissance microbienne ainsi que pour la production d'AH.

Im *et al.* (2009) ont remplacé l'extrait de levure par différentes sources azotées à une concentration de 5 g/L : la peptone, la peptone de caséine, le lait écrémé, la caséine, la peptone de soja, la levure sèche, le sulfate d'ammonium, le citrate d'ammonium, le chlorure d'ammonium, l'urée, la glycine, le nitrate de potassium, le nitrate de sodium.

L'extrait de levure et la peptone de caséine permettent d'obtenir la concentration la plus importante d'AH dans le milieu de culture (1,65 g/L) dans le milieu de culture. L'addition simultanée dans le milieu de culture d'extrait de levure et de peptone de caséine exerce un effet synergique sur la concentration d'AH produite (1,92 g/L) (Figure 14).

Il est préférable d'éviter l'utilisation de ces sources complexes pour la mise en place d'un milieu de référence. En effet la caractérisation des souches par la quantification des flux métaboliques majeurs ne sera possible qu'avec un milieu chimiquement défini.



**Figure 14 : Effet de différentes sources azotées sur la concentration d'AH obtenue après 24 h de culture à 37 °C, à 120 tr/min, chez *Streptococcus* sp. ID9102, d'après Im *et al.* (2009).**

Y + C = levure + peptone de caséine.

Pour Jagannath et Ramachandran (2010), l'augmentation de la concentration en source azotée permet l'augmentation de la vitesse spécifique de croissance. La supplémentation en sources azotées simples d'un milieu contenant initialement de l'extrait de levure conduit à une diminution du rendement AH/Biomasse (Tableau 6).

De haute concentration en précurseurs et une haute densité en AH synthétase ne sont pas souhaitable pour la production d'AH de haut poids moléculaire. Maintenir une source azotée complexe avec des nutriments limitant semble être une bonne stratégie pour éviter la compétition entre la formation de la biomasse et le processus synthétique de l'AH.

Le rapport carbone/azote est un élément important à prendre en compte pour la définition de la composition du milieu de culture de certains microorganismes exigeants comme les *Streptococci*. L'effet du ratio carbone/azote sur la concentration d'AH produit par *S. zooepidemicus* ATCC 39920 a notamment été étudié par Chen *et al.* (2009). Une valeur de 2/1 permettrait d'atteindre une concentration d'AH maximale dans les conditions d'étude indiquées. En absence de source azotée, presque tout le glucose résiduel est converti en acide lactique. L'ajout d'une source azotée permet de déplacer le flux de glucose vers la production d'AH.

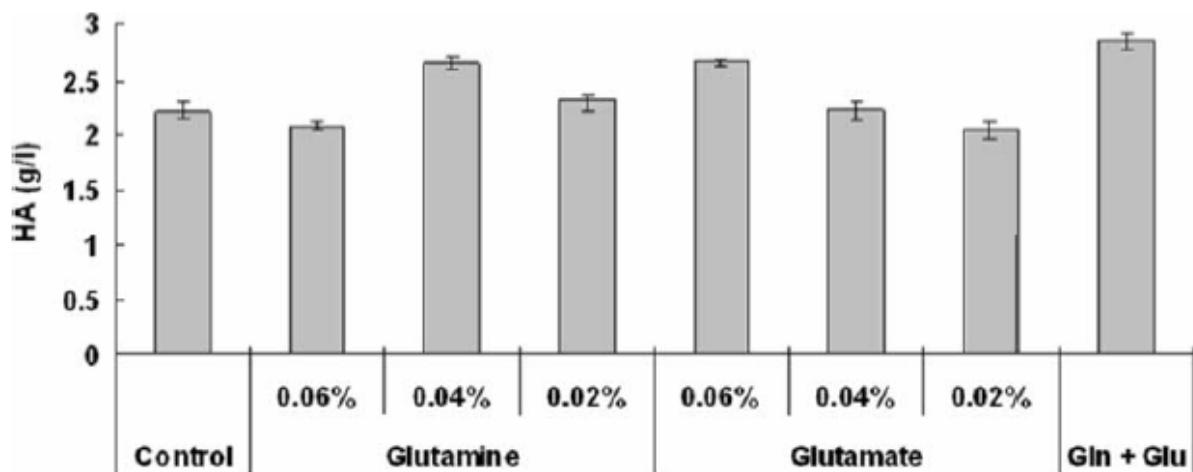
**Tableau 6 : Effet de la source azotée sur le métabolisme, le titre final d'AH, le rendement et la masse moléculaire, d'après S. Jagannath, K.B. Ramachandran (2010)**

Additional nitrogenous components (g L <sup>-1</sup> )	Yeast extract (g L <sup>-1</sup> )	Specific growth rate (h <sup>-1</sup> )	Specific HA rate (g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Specific lactate rate (g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Specific acetate rate (g g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	HA titer (g L <sup>-1</sup> )	Yield (Y <sub>HA/X</sub> ) (g HA g Cell <sup>-1</sup> )	Weight average molecular weight (MDa)
-	10	0.42	0.22	4.04	1.33	2.1	1.12	2.1
-	20	0.49	0.18	2.7	1.73	2.1	0.63	2.0
-	25	0.51	0.23	2.8	1.93	2.24	0.57	1.8
-	30	0.54	0.23	2.4	1.52	1.98	0.54	1.6
NH <sub>4</sub> OH (as base)	10	0.71	0.30	2.14	0.92	2.66	0.94	1.6
Glutamine-5 g L <sup>-1</sup>	10	0.76	0.28	2.74	0.85	2.34	0.78	1.8

#### **2.4.3.3. Influence des acides aminés sur la production d'acide hyaluronique**

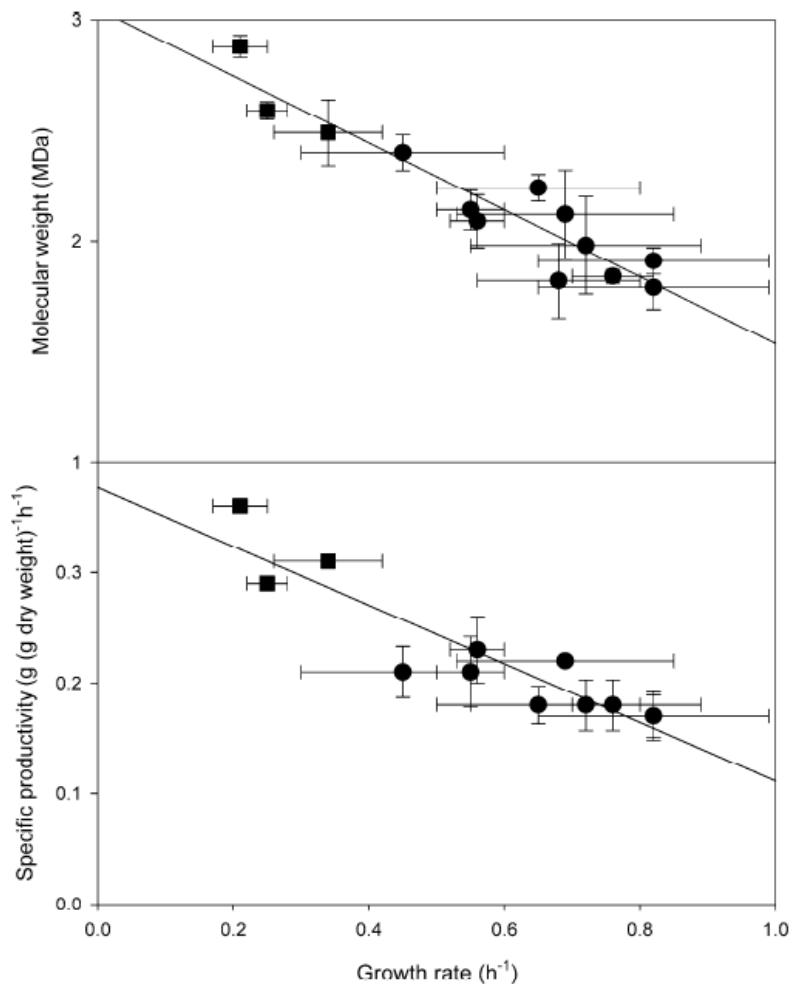
Im *et al.* (2009) ont aussi étudié l'influence des acides aminés sur la production d'AH. Dix-sept acides aminés ont été ajoutés individuellement à différentes concentrations (0,2 ; 0,4 ; 0,6 g/L) dans un milieu amélioré. Parmi les différents acides aminés utilisés, la glutamine et le glutamate permettent d'obtenir une concentration d'AH plus importante que pour les autres acides aminés. Une concentration de 0,04 % de glutamine ou de 0,06 % de glutamate permettent une production d'AH de 2,65 g/L (Figure 15). Lorsque

ces deux acides aminés sont simultanément ajoutés au milieu, dans les concentrations précédemment indiquées, la concentration d'AH augmente légèrement pour atteindre 2,76 g/L.



**Figure 15 : Effet de l'ajout de glutamine et du glutamate, dans un milieu optimisé par la méthode de Tagushi, sur la concentration d'AH obtenue après 24 h de culture à 37 °C, à 120 tr/mn, chez *Streptococcus* sp. ID9102 (Im *et al.*, 2009)**

Armstrong *et al.* (1997) ont montré l'importance de la présence de certains acides aminés dans un milieu chimiquement défini pour la production d'AH. Ils ont ainsi identifié douze acides aminés essentiels pour la croissance de *S. zooepidemicus* : la cystéine, la lysine, la méthionine, l'isoleucine, la valine, la leucine, la phénylalanine, la tyrosine, l'arginine, l'histidine. L'ajout de ces acides aminés a permis d'obtenir une masse moléculaire légèrement supérieure à celui d'un AH issu d'un milieu exempt de ces acides aminés essentiels ( $2600 \pm 100$  kDa contre  $2200 \pm 100$  kDa).



**Figure 16 : Effet du pH et de la température sur la productivité en AH et sur sa masse moléculaire, d'après Armstrong et Jones (1997).**

Différents taux de croissance ont été observés pour une gamme de température de 32 à 40°C et pour une gamme de pH de 6,3 à 7,5 dans un milieu complexe (□) et dans un milieu chimiquement défini (●) (contenant 12 acides aminés essentiels).

#### 2.4.3.4. Influence des acides organiques

Im *et al.* (2009) ont aussi étudié l'influence des acides organiques. Vingt-trois de ces molécules ont été ajoutés à une concentration de 0,5 g/L dans un milieu optimisé par la méthode de Tagushi. La quantité d'AH produite est la plus importante quand le milieu contient de l'acide oxalique. Une concentration en cet acide organique de 0,2 g/L ; elle permet d'atteindre une concentration de 2,75 g/L.

L'ajout « optimisé » de glutamine, de glutamate, d'acide oxalique dans le milieu conduit à une concentration légèrement supérieure d'AH de 2,96 g/L (Figure 17).

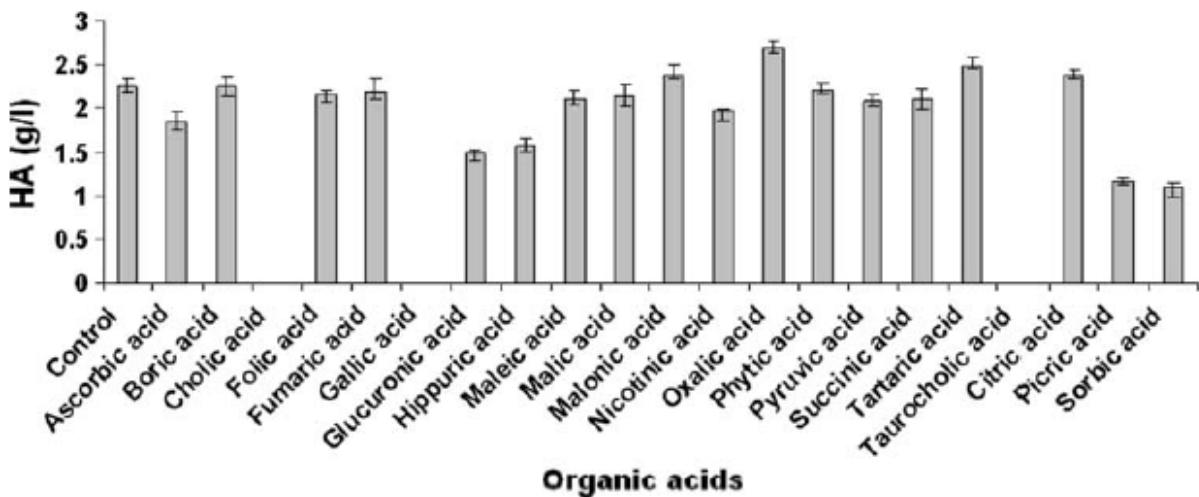


Figure 17 : Effet des acides organiques sur la concentration d'AH obtenue après 24 h de culture à 37 °C, à 120 tr/mn, chez *Streptococcus* sp. ID9102 (Im et al., 2009)

La recherche bibliographique ne m'a pas permis de trouver des publications portant sur l'influence des acides gras sur la production d'AH. Ces molécules sont pourtant très présentes sur la peau des mammifères, environnement naturel des *Streptococci*.

#### 2.4.3.5. Influence des sources minérales

Afin d'étudier les effets des sources minérales sur la production d'AH, Im et al. (2009) ont remplacé le sulfate de magnésium ( $MgSO_4$ ) classiquement employé pour la formulation de milieux par 13 autres sources :  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$ ,  $KCl$ ,  $FeCl_2$ ,  $FeSO_4$ ,  $MnSO_4$ ,  $BaCl_2$ ,  $CuCl_2$ ,  $CuSO_4$ ,  $CoSO_4$ ,  $ZnCl_2$ ,  $ZnSO_4$ , et  $NaF$ .  $MgSO_4$  et  $MgCl_2$  se sont révélés être utiles à une concentration de 0,05 %. Le  $Mg^{2+}$  est nécessaire pour la production d'AH, la concentration en AH s'élève à 1,98 g/L avec le  $MgSO_4$  et à 1,89 g/L avec le  $MgCl_2$ .

Le fer est à la fois un nutriment essentiel à la croissance des micro-organismes ainsi qu'un métal dangereux du fait de sa capacité à générer des espèces réactives de l'oxygène (Cornelis et al., 2011). Il aurait été intéressant d'étudier son influence sur la production d'AH.

#### 2.4.3.6. Influence des sources phosphatées

Parmi les sources phosphatées utilisées, Im et al. (2009) ont observé que la source de phosphate la plus intéressante pour la production d'AH par *Streptococcus* sp. ID9102 (KCTC 11935BP) est le  $K_2HPO_4$ . La concentration d'AH dans le milieu atteint alors 1,94 g/L (Figure 18).

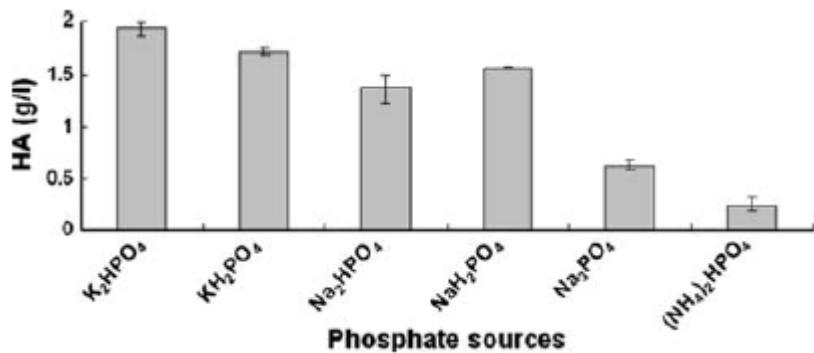


Figure 18 : Effet de différentes sources phosphatées sur la concentration d'AH obtenue après 24 h de culture à 37 °C, à 120 tr/mn, chez *Streptococcus* sp. ID9102 (Im *et al.*, 2009)

#### 2.4.3.7. Effet de l'addition de lysozyme

Le lysozyme est une enzyme qui dégrade spécifiquement le peptidoglycane, constituant majeur de la paroi des bactéries Gram positif. Plus spécifiquement, elle hydrolyse la liaison osidique entre le carbone C1 de l'acide N-acétylmuramique et le carbone C4 de la N-acétylglucosamine.

Kim *et al.* (1996) ont étudié l'ajout de lysozyme pour stimuler la production d'acide hyaluronique par la souche mutante de *S. equi* ATCC 6580. De petites quantités (20000 et 60000 U.I.) de lysozyme ont été ajoutées à deux moments différents d'une culture. Lorsque l'ajout se produit à une densité optique (D.O.) de 1 et de 3, la masse moléculaire de l'AH augmente de  $2,9 \times 10^6$  à  $3,8 \times 10^6$  Da et la concentration d'AH dans le milieu augmente de 3,65 g/L à 4,63 g/L (Tableau 7). En revanche, les différences de masse moléculaire observées en fonction de la quantité de lysozyme ajoutée ne sont pas significatives.

L'ajout limité de lysozyme dans le milieu de culture induirait donc une surproduction d'AH permettant ainsi aux bactéries de se protéger et de survivre dans des conditions critiques, en réponse à un stress extérieur.

Tableau 7 : Effet de l'addition de lysozyme sur la production d'acide hyaluronique, d'après Kim *et al.* (1996).

Conditions de culture : 37°C pendant 16 h, aération de 0,5 vvm, agitation à 400 tr / min et pH 7,0.

Addition de lysozyme ( $\text{UI}^{-1}$ )		Croissance (D.O. à 600 nm)	Concentration en AH (g/L)	Masse moléculaire (* $10^6$ Da)
D.O. <sub>600</sub> = 1	D.O. <sub>600</sub> = 3			
-	-	4,16	3,65	2,90
20000	20000	5,34	4,55	3,10
40000	40000	5,09	4,58	3,60
20000	60000	5,14	4,50	3,80
20000	120000	5,35	4,63	2,80

#### 2.4.3.8. Influence de l'ajout de hyaluronidase dans le milieu

Le taux d'oxygène dissous étant un facteur limitant pour la production d'AH par *Streptococcus zooepidemicus*, Liu *et al* (2008) ont étudié l'influence de l'ajout de hyaluronidase sur le transfert de ce gaz. Différentes concentrations d'enzyme ont été testées et pour une concentration de 0,15 g/L la production d'AH a été augmentée de  $5,0 \pm 0,1$  g/L (valeur pour le contrôle sans ajout de hyaluronidase) à  $6,0 \pm 0,1$  g/L. En revanche, la masse moléculaire diminue avec l'augmentation de la concentration en enzyme. Par exemple, une concentration en hyaluronidase de 0,25 g/L provoque une diminution de la masse moléculaire de 1300 kDa (contrôle) à 21 kDa.

L'acide hyaluronique de faible masse moléculaire formé ne peut pas être utilisé dans des applications cosmétiques ou chirurgicales. Les auteurs supposent qu'il pourrait fonctionner comme substance anti-angiogénique ou agent anti-tumoral.

#### 2.4.3.9. Influence de la température

L'impact de la température sur les conditions de production d'AH a été l'objet de plusieurs études (Armstrong et Johns, 1997 ; Kim *et al.*, 1996 ; Kim *et al.*, 2006 ; Jagannath et Ramachandran, 2010).

Lorsque la température de culture est inférieure à la température de croissance supposée optimale (37 °C), la synthèse de molécules de haute masse moléculaire semble être favorisée (Armstrong et Johns, 1997 ; Jagannath et Ramachandran, 2010). La diminution de la température ferait décroître le taux de croissance des microorganismes et augmenterait la masse moléculaire de l'AH.

Une corrélation a été mise en évidence entre la masse moléculaire et la croissance microbienne. Armstrong et Johns (1997) ont noté que la quantité d'AH produite et le taux de croissance microbienne sont des paramètres dépendants de la température. Une culture à une température de 32 °C (sous optimale pour la croissance) produit plus d'AH de haute masse moléculaire. Lorsque la température d'incubation est augmentée (de 32 °C jusqu'à 40 °C), la quantité d'AH synthétisée et la masse moléculaire diminuent. Une température trop importante tend donc à augmenter la production d'AH de faible masse moléculaire. Ces observations sont cohérentes avec la physiologie de l'infection cutanée par *Streptococcus* à des températures comprises entre 30 et 33 °C.

Jagannath et Ramachandran (2010) et Kim *et al.* (2006) ont constaté des résultats en adéquation avec ceux de leurs prédécesseurs.

Kim *et al.* (2006) ont étudié l'influence de la température pour quatre valeurs : 29, 32, 35 et 38 °C. La concentration maximale d'AH produit est de 5,1 g/L. Au-delà de 38 °C, la masse moléculaire d'AH diminue significativement. En dessous de 35 °C, une masse moléculaire maximale de  $2,9 \times 10^6$  Da est atteinte.

Ces auteurs se sont également intéressés à l'impact de la diminution de la température à différents stades de la croissance cellulaire. Lorsque la température de culture est maintenue à 32 °C pour les premiers stades de la croissance cellulaire (D.O. = 4), une masse moléculaire de  $2,8 \times 10^6$  Da est obtenue mais la concentration en AH est faible. Lorsque la diminution de la température se produit à une mesure de D.O. de 8, la concentration en AH maximum s'élève à 5,3 g/L ; la masse moléculaire, quand à elle, est de  $2,8 \times 10^6$  Da. Si la diminution de la température est réalisée quand la D.O. a atteint une valeur de 12, une bonne croissance des microorganismes et une concentration plus importante en AH sont constatées. Cependant la masse moléculaire est plus faible, de l'ordre de  $2,1 \times 10^6$  Da. La diminution de la température à différents stades de la croissance microbienne influence donc la concentration en AH ainsi que sa masse moléculaire.

Kim *et al.* (1996) ont rapporté qu'une température correspondant à la température optimale de 37 °C, pour une souche mutante de *S. equi* ATCC 6580 (KFCC 10830), est favorable à la production d'AH. L'expérience a été réalisée à 37 °C pendant 16 h dans un bioréacteur de 5 L, avec une vitesse d'aération de 0,5 vvm, une agitation de 400 tr/min et un pH de 7.

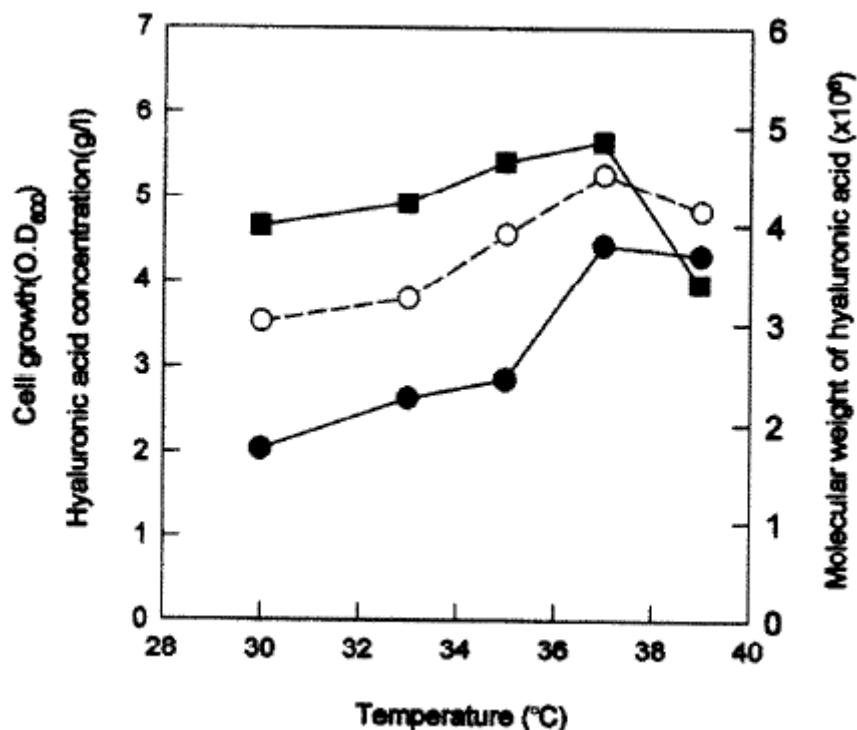


Figure 19 : Effet de la température sur la production d'AH, d'après Kim *et al* (1996).

Culture de 16h dans un fermenteur de 5 L sous 0,5 vvm d'aération, 400 tr/min d'agitation et pH 7. ○ : croissance cellulaire, ■ : concentration en AH et ● : masse moléculaire.

Dans le cadre de cette étude, une température inférieure à 37 °C se traduit par une diminution de la masse moléculaire de l'acide hyaluronique. La concentration maximale en AH est obtenue pour une température de 37 °C (Figure 19).

#### 2.4.3.10. Influence du pH

La valeur de pH considérée comme optimale dans beaucoup de publications est de 7 (Kim *et al.*, 1996 ; Kim *et al.*, 2006). Ces auteurs ont noté une diminution de la masse moléculaire et de la production d'AH à un pH supérieur à 8 (Figure 20). La masse moléculaire n'évolue pas entre un pH de 6 et de 8. Armstrong et Jones (1997) ont aussi rapporté qu'entre un pH de 6,3 et 8, il y a peu de différences de production d'AH mais à un pH de 5,5, la quantité du biopolymère produit devient faible (Figure 16).

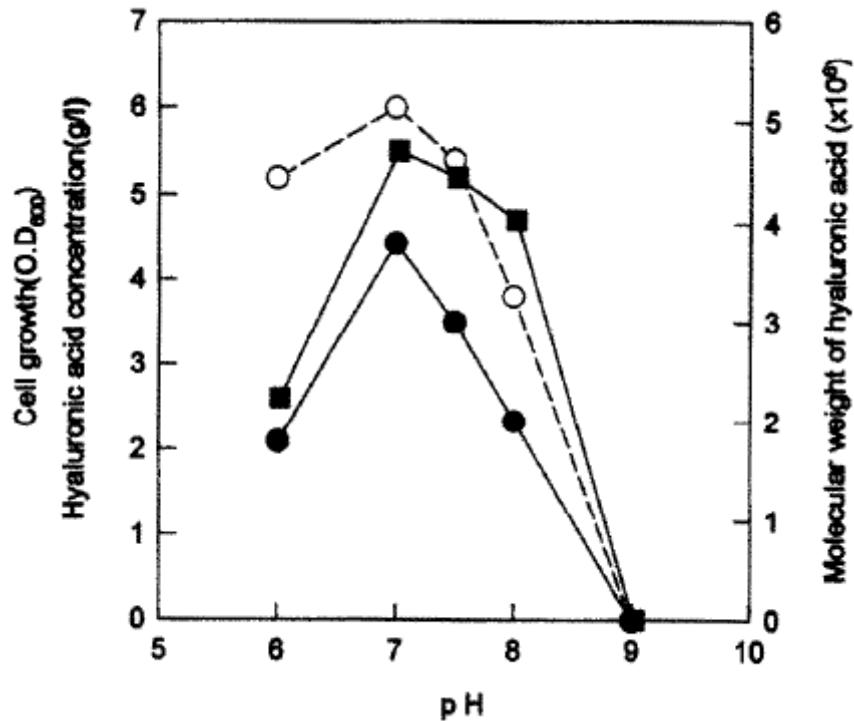


Figure 20 : Effect du pH sur la production d'acide hyaluronique, d'après Kim et al (1996).

Culture de 16h dans un fermenteur de 5 L sous 0,5 vvm d'aération, 400 tr/min d'agitation et pH 7. ○ : croissance cellulaire, ■ : concentration en AH et ● : masse moléculaire.

#### 2.4.3.11. Influence de l'agitation

L'agitation est un paramètre important puisqu'elle permet une homogénéisation du milieu et de bons transferts de matières, principalement le transfert de l'oxygène aux bactéries. Une agitation trop importante peut induire des ruptures du polymère (Armstrong et Johns, 1997). Le système d'agitation le plus souvent utilisé pour la production d'AH est une turbine à 2 x 6 pâles inclinées à 45 °C, ou non (Armstrong et Johns, 1997 ; Duan *et al.*, 2008 ; Im *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2010).

Kim *et al.* (1996) ont comparé deux types de turbines : des Rushton et des Intermig. Ces dernières sont reconnues pour leur efficacité dans le brassage de fluides non-newtoniens hautement visqueux. La concentration en acide hyaluronique est comparable quel que soit le type d'agitateur (Tableau 8). En revanche la masse moléculaire obtenue est plus importante avec des turbines Intermig ( $4,8 \times 10^6$  Da) qu'avec des turbines Rushton ( $3,8 \times 10^6$  Da). Lorsque l'agitation est maintenue à 300 tr/min pendant les cinq premières heures de culture puis augmenté à 1200 tr/min, la production d'acide hyaluronique et la croissance cellulaire diminuent mais la masse moléculaire de l'AH augmente jusqu'à  $5 \times 10^6$  Da.

Tableau 8 : Effet du type d'agitateur sur la production d'acide hyaluronique, d'après Kim *et al.* (1996)

Type d'agitateur	Nombre de pâles	Croissance (D.O. à 600 nm)	Concentration en AH (g/L)	Masse moléculaire (*10 <sup>6</sup> Da)
Rushton	3	5,80	4,19	3,8
Intermig	4	6,36	3,98	4,8

Armstrong et Johns (1997) ont évalué l'impact de l'agitation en modifiant la vitesse de rotation des agitateurs en cours de culture. Dans un bioréacteur en mode discontinu (batch), à 37 °C et à pH 6,7, l'agitation a été fixée à 300 tr/min au cours des 12 premières heures puis augmentée à 1000 tr/min pendant les 6 heures suivantes. La masse moléculaire de l'AH de  $2,1 \times 10^6$  Da obtenu est comparable à celle trouvée pour une agitation constante de 600 tr/min. Ils ont ainsi conclu qu'une variation de l'agitation de 300 à 1000 tr/min n'avait pas d'effet sur la masse moléculaire de l'AH.

Hasegawa *et al.* (1999) ont, quand à eux, étudié l'influence de l'agitateur Maxblend sur une culture à grande échelle (fermenteur de 2m<sup>3</sup>). La production d'AH a été augmentée de 20 % avec l'utilisation de cette turbine. En ce qui concerne la masse moléculaire, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les deux types de turbines étudiées ( $4,3 \times 10^6$  Da) sous les mêmes conditions d'agitation. De plus, la masse moléculaire de l'AH produit s'est avérée être indépendante de la vitesse d'agitation.

Kim *et al.* (2006) ont utilisé un bioréacteur contenant un volume de culture de 15 L. La cuve est agitée avec 3 turbines Rushton et est équipée de 4 chicanes. Ces auteurs ont étudié différentes vitesses d'agitation : 50, 100, 150, 200 et 300 tr/min. Selon eux, l'agitation optimale est de 100 tr/min. Au-delà de cette valeur, la croissance cellulaire et la production d'AH deviennent faibles.

Au lieu d'étudier l'influence de la nature de la turbine et de la vitesse d'agitation, il serait plus judicieux de caractériser le cisaillement sur le milieu pour chacune d'elle et de mesurer le stress de cisaillement qu'elles génèrent. De plus, les paramètres étudiés sont difficilement extrapolables à plus grande échelle. La caractérisation de la puissance dissipée et celle du régime d'écoulement dans les systèmes seraient plus pertinentes pour réaliser une extrapolation.

Une solution chargée en AH présente une viscosité élevée ; elle correspond à un fluide non-newtonien qui présente un comportement pseudo-plastique. La diminution de la viscosité de ces solutions d'AH en fonction du taux de cisaillement peut être attribuée, soit à un désenchevêtrement des chaînes favorisant

la baisse de la viscosité, soit à un clivage des chaînes d'AH induisant une diminution de la masse moléculaire d'AH.

Miyazaki *et al.* (1998) ont mesuré les variations de la masse moléculaire de l'AH en fonction de différents taux de cisaillement, au cours du temps. La masse moléculaire de l'AH a été déterminé par chromatographie par perméation de gel couplée à la diffusion de lumière (Low Angle Laser Light Scattering, LALLS). Plus la contrainte de cisaillement et la durée augmentent et plus la masse moléculaire diminue.

#### **2.4.3.12. Rôle de l'aération**

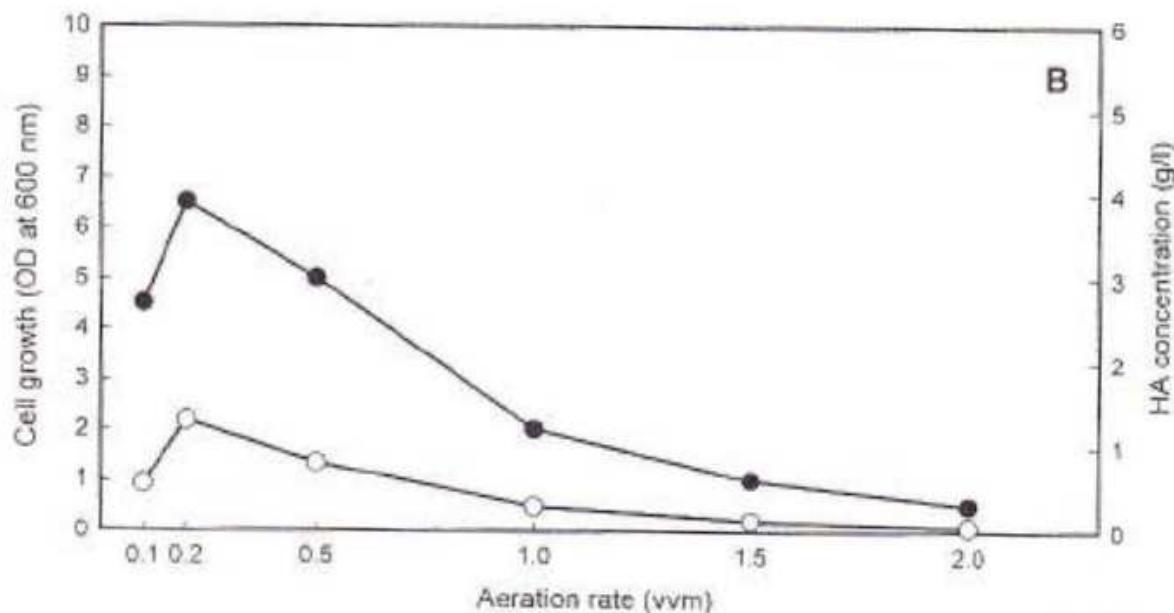
L'aération est un paramètre lié directement à l'agitation. Pour certaines souches de bactéries lactiques, elle est un moyen d'améliorer leur rendement énergétique (Fong Chong *et al.*, 2004). Les *Streptococci* sont en effet des anaérobies facultatives incapables de phosphorylation oxydative. Cependant l'oxygène peut être utilisé pour oxyder le NADH (par les NADH oxydases). La bactérie peut produire exclusivement de l'acéate ce qui conduit à un taux théorique de 4 ATP par glucose. En conditions d'aérobiose, la consommation de glucose et la vitesse de croissance sont augmentées et l'acéate est formé en plus grande quantité. Le métabolisme altéré provoque une augmentation de 50% de la productivité en AH et plus d'un doublement de la masse moléculaire. Cela peut être attribué à un taux énergétique plus grand qui réduit les besoins en ressource catabolique. Cela peut aussi refléter une plus grande capacité à retirer le NADH généré lors de la formation d'acide glucuronique.

En présence d'oxygène, *S. zooepidemicus* croît donc plus rapidement et la quantité de biomasse produite est plus importante. En ce qui concerne l'AH, Chong et Nielsen (2003) ont remarqué que sa quantité et sa masse moléculaire sont plus importantes que dans des conditions d'anaérobiose.

L'aération semble nécessaire à l'obtention d'une concentration suffisante d'AH et d'un poids moléculaire important (Armstrong et Johns, 1997 ; Chong et Nielsen, 2003 ; Duan *et al.*, 2008 ; Kim *et al.*, 2006).

Ogrodowski *et al* (2005) ont étudié les effets de l'aération sur la formation et les propriétés rhéologiques de l'AH. La viscosité des solutions d'AH a été déterminée par un rhéomètre. Les propriétés rhéologiques sont fortement influencées par la masse moléculaire des polymères à longue chaîne. Une aération forcée de 2 vvm augmente la production d'AH jusqu'à 3,75 g/L (elle est de 1,57 g/L dans les fioles d'Erlenmeyer témoins) ainsi que la masse moléculaire du polymère. Dans de telles conditions d'aération, la viscosité limite a été augmentée significativement.

Kim *et al.* (2006) ont caractérisé l'influence de la vitesse d'aération sur la quantité d'AH produite. Au-delà d'une aération à 0,2 vvm, la concentration d'AH diminue fortement (Figure 21). L'extrapolation de ce paramètre est possible si la vitesse d'aération reste inférieure à 0,5 vvm.



**Figure 21 : Effet de la vitesse d'aération (vvm) sur la croissance et sur la concentration d'AH, d'après Kim *et al.* (2006).**

Après 16 h de culture en bioréacteur de 15 L. ● : croissance cellulaire ; ○ : concentration en AH.

Duan *et al.* (2008) ont montré que l'oxygène dissous exerçait une influence sur la masse moléculaire de l'AH produit par *S. zooepidemicus*. Au-delà de 50 % d'oxygène dissous la masse moléculaire diminue. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que cela pouvait être du à la présence de radicaux libres qui dégradent l'AH.

Fong Chong *et al.* (2004) ont rapporté que l'oxygénéation pouvait engendrer une production de peroxyde par la pyruvate oxydase et d'autres enzymes induisant une dépolymérisation d'AH.

Armstrong et Johns (1997) ont appliqué des vitesses d'aération de 0,2 et 1 vvm. Selon eux, l'apport de dioxygène ne modifierait pas le taux de croissance de *S. zooepidemicus* mais améliorerait la production d'AH. Lorsque la concentration initiale en glucose est de 20 g/L, une oxygénéation accrue favoriserait une augmentation de la masse moléculaire de l'AH. Les meilleurs résultats sont observés pour des concentrations initiales en glucose plus élevées (40 à 60 g/L).

Liu *et al.* (2009) ont proposé trois approches de contrôle de l'oxygène dissous (OD) pour améliorer la production d'AH : un contrôle de la vitesse d'agitation durant trois phases de la fermentation (200 tr/min

de 0 à 8h, 400 tr/min de à 12h et 600 tr/min de 12 à 20h), un contrôle du pourcentage d'OD à deux étapes (10% de 0 à 8h, 5 % de 8 à 20h) et un contrôle par l'utilisation de perfluorocarbones (PFC). Ce sont des composés issus de l'industrie pétrochimique, à la fois stables et chimiquement inertes. Dans leur travail, ces auteurs ont utilisé les PFC comme vecteur d'oxygène pour améliorer le transfert d'oxygène dans la seconde phase (8 à 20h). Il a été montré que l'addition de PFC à une concentration de 3% améliore le taux d'OD moyen durant la phase 8-20h. Une concentration en PFC supérieure n'améliore pas le transfert de l'oxygène du fait de la viscosité augmentée du milieu.

La production d'AH a atteint une concentration de 5,5 g/L avec la première approche, 6,3 g/L avec la seconde et 6,6 g/L avec la troisième. Cela s'explique par le fait que cette dernière approche d'aération a le plus faible taux de cisaillement.

#### **2.4.4. Mode de mise en œuvre**

La production d'AH en bioréacteur est vite limitée par la viscosité très importante de la solution d'AH lorsque la concentration d'AH atteint 5 à 10 g/L en mode discontinu (batch) ou discontinu alimenté (fed-batch ou semi-continu). Cette limite de fermentation est rapidement atteinte, en 6 à 16h, pour ces modes de culture.

Selon Fong Chong *et al.* (2004), la production industrielle d'AH en mode discontinu reste majoritaire.

##### **2.4.4.1. Mode discontinu**

Il existe de nombreuses études portant sur les conditions optimales de culture pour la production d'AH en mode batch. Alors que la croissance optimale est observée pour des pH neutres et une température de 37°C, la plus haute productivité et la plus haute masse moléculaire sont observées pour des conditions sous optimales de croissance. Cette relation négative entre la vitesse de croissance et la productivité spécifique d'AH et masse moléculaire n'est vraie que quand l'inhibition de croissance n'est pas associée à la consommation du glucose réduit. Quand les conditions deviennent assez sévères pour inhiber la consommation de glucose, la productivité en AH puis la masse moléculaire diminuent. Cela indique bien que la production d'AH rivalise avec la génération de biomasse pour l'obtention des ressources limitées. La réduction des demandes en biomasse sans réduction de l'apport des ressources permet de produire un AH de haute masse moléculaire en grande quantité (Fong Chong *et al.*, 2004).

Kim *et al.* (1996) ont produit de l'AH dans un bioréacteur de 100 L. La concentration obtenue en fin de fermentation est d'environ 7 g/L. Après 5 h de culture, la masse moléculaire est de  $2,3 \times 10^6$  Da et atteint

$3,2 \times 10^6$  Da après 15h de culture. La masse moléculaire de l'AH obtenu semble donc varier en fonction de l'âge des cellules.

Rangaswamy et Jain (2008) ont également constaté que la masse moléculaire de l'AH était plus importante en fin de fermentation qu'en début : elle était de 5000 Da pour plus de 60 % des polymères en début de culture, tandis qu'elle était supérieur à 800 kDa pour 70 % des polymères après 22 h de culture.

Im *et al.* (2009) ont étudié la production de l'AH à une échelle pilote, dans des fermenteurs de 75 L avec un volume utile de 45 L. La fermentation de *Streptococcus* sp. ID9102 en mode discontinu a été réalisée à 36 °C, avec une vitesse d'aération de 0,5 vvm et une agitation de 400 tr/mn pendant 24 h (Figure 22). Le pH est régulé à 7 en ajoutant de la soude (concentration 10 N). Trois types de milieu (le milieu de base, le milieu optimisé au cours de l'étude d'Im *et al.* (2009) et un milieu optimisé supplémenté en acide oxalique, en glutamate et en glutamine) sont mis en jeu pour la production d'AH dans un fermenteur. La figure 22 présente les cinétiques de production d'AH à partir de *Streptococcus* sp. ID 9102. La fermentation, dans un milieu de culture optimisé par Im *et al.* (2009), permet d'obtenir une concentration d'AH de 5,88 g/L contre 3,27 g/L à échelle laboratoire. Le poids moléculaire augmente aussi de  $1,5 \times 10^6$  Da à  $3,6 \times 10^6$  Da en 24 h de culture à échelle pilote. Lorsque de l'acide oxalique, de la glutamine et du glutamate sont ajoutés dans le milieu de fermentation, la concentration d'AH atteint 6,94 g/L et la masse moléculaire atteint  $5,9 \times 10^6$  Da.

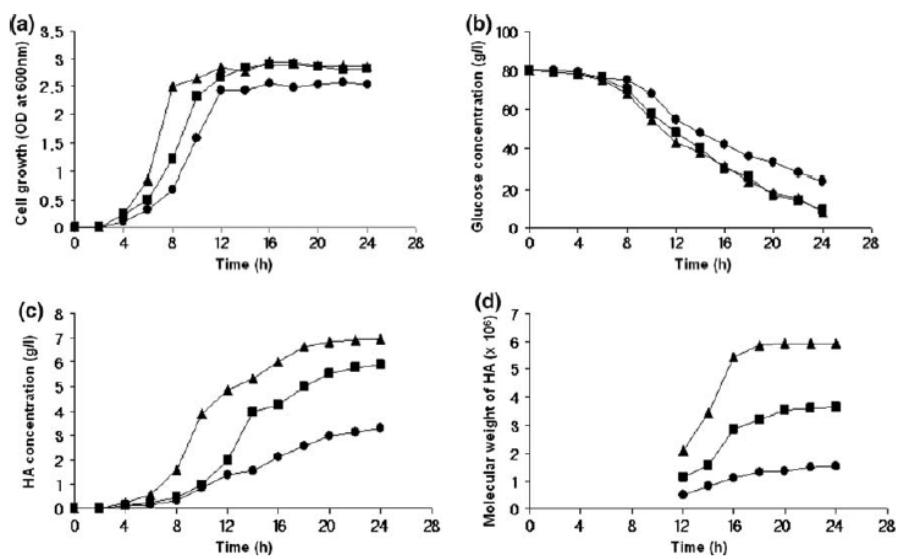


Figure 22 : Evolution de la croissance cellulaire (a), concentration en glucose (b), concentration en AH (c), masse moléculaire de l'AH (d) pendant la culture de *Streptococcus* sp. ID9102, d'après Im *et al.* (2009).

● : milieu basal, ■ : milieu optimisé sans glutamine, glutamate et acide oxalique, ▲ : milieu optimisé avec glutamine, glutamate et acide oxalique.

#### 2.4.4.2. Mode discontinu alimenté

Liu *et al.* (2008) ont, eux aussi, rapporté que la culture de *Streptococcus zooepidemicus* en mode discontinu est la plus adaptée pour la production d'AH. Le mode discontinu alimenté permet d'améliorer la croissance microbienne mais pas la production d'AH. La compétition entre la croissance cellulaire et la production du précurseur du polymère (l'UDP-glucose acétylCoA) ainsi que la production d'acide lactique inhibent fortement la production d'AH en mode discontinu alimenté. Une mode de culture innovant, en deux étapes, a été proposée avec, dans un premier temps, une phase en mode discontinu de 0 à 8 h, suivie par l'ajout d'une source glucidique avec poursuite en mode discontinu (Figure 23). La concentration en AH et la productivité ont été augmentées de plus de 33 % avec cette méthode originale de culture.

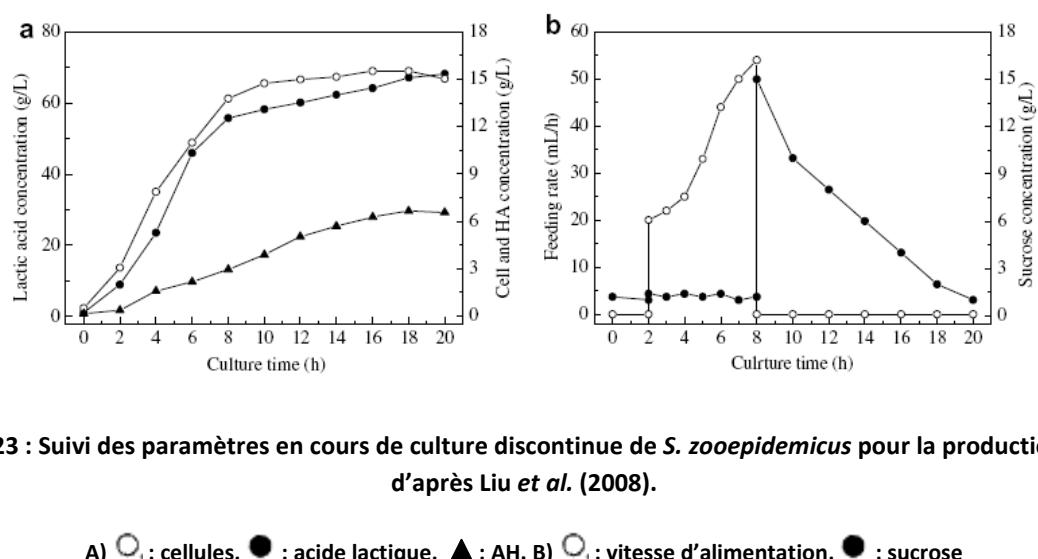


Figure 23 : Suivi des paramètres en cours de culture discontinue de *S. zooepidemicus* pour la production d'AH, d'après Liu *et al.* (2008).

#### 2.4.4.3. Mode continu

La culture en continu peut être intéressante pour augmenter la durée de culture. Elle peut réduire la contamination protéique en évitant la transition en phase stationnaire. Ces transitions de phases ont été décrites comme provoquant la sécrétion de protéines transmembranaires et de facteurs de pathogénicité. La production d'AH en chemostat (culture continue à haut taux de dilution) est limitée par l'instabilité phénotypique du polymère excrété par les souches hautement encapsulées du genre streptocoque.

De plus les bénéfices de la production continue sont contrebalancés par la faible productivité volumétrique. Cela explique l'utilisation majoritaire du batch dans la production d'AH à l'échelle industrielle.

#### **2.4.4.4. Mode discontinu répété**

Pour Huang *et al.* (2008), l'amélioration de la productivité volumétrique est cruciale pour la fermentation de l'AH. Ils ont étudié une approche de répétition de cultures discontinues. En équipant le réacteur d'un filtre intérieur, il est possible de retenir les cellules qui serviront d'inoculum pour le batch suivant. Ce filtre pourrait servir de support à des micro-organismes non producteurs d'AH (par contamination extérieure). L'utilisation d'un filtre extérieur (cartouche) pour retenir les bactéries lors du drainage du milieu permet d'envisager l'emploi de cette méthode pour la production d'AH.

#### **2.4.4.5 Mode recharge - récolte**

Chen *et al.* (2009) ont aussi rapporté que la culture en mode discontinu était la plus adaptée pour la production d'AH. Ces auteurs proposent de travailler en mode « recharge-récolte » où le milieu de culture serait changé à la fin de la phase de croissance.

### **2.4.5. Optimisation**

Comme vu précédemment, les performances des procédés de fermentation dépendent de nombreux facteurs comme le pH, la température, la force ionique, la vitesse d'agitation et le taux d'aération (pour les fermentations aérobies). Pour obtenir les meilleures performances, des stratégies « d'optimisation » ont été développées par les chercheurs.

La plus fréquemment utilisée est la stratégie du « un par un ». Cette approche est très chronophage et ne tient surtout pas compte des interactions entre les différents paramètres physico-chimiques. Elle doit donc être considérée comme une technique d'amélioration et non d'optimisation des conditions de culture.

L'optimisation du procédé de production d'AH par voie microbienne est basée sur un principe multicritère en agissant tant sur les actionneurs physiologiques que sur les facteurs physico-chimiques identifiés par l'expérience ou en relation avec la littérature. Cette étape fait appel à des cultures en bioréacteurs instrumentés. Elles sont réalisées dans le cadre d'une planification d'expérimentale.

La méthode des plans d'expériences a été développée vers 1920 par le statisticien britannique Ronald Fisher pour les études agronomiques. La nouveauté de la méthode des plans d'expériences réside dans le fait qu'une expérimentation factorielle est réalisée, tous les facteurs varient donc simultanément.

Le plan d'expériences sert à mettre en évidence et à quantifier l'influence des paramètres pris en compte. Un plan d'expériences est une suite d'essais organisée à l'avance de manière à déterminer en un minimum d'essais et avec un maximum de précision l'influence de multiples paramètres sur une ou plusieurs réponses. La définition d'un plan d'expériences particulier permet donc de réduire le nombre d'expérimentations à réaliser et de faciliter le processus d'optimisation au sens multicritère. Dans ce cadre, des objectifs cinétiques ou technologiques tels que la productivité, la concentration, la répartition de tailles moléculaires du polymère, sont combinés par exemple à des objectifs économiques.

#### **2.4.5.1 Optimisation du milieu par approche classique**

La méthode Taguchi (ou plan d'expérience) est une méthode d'expérimentation tournée vers un usage industriel. Ses objectifs sont : l'amélioration de la qualité, la baisse des coûts, la recherche de paramètres optimisés, le dimensionnement des installations à partir des coûts.

Par exemple, selon cette méthode, Im *et al.* (2009) ont déterminé que les meilleurs nutriments pour la production d'AH étaient le glucose, l'extrait de levure, la peptone de caséine, le  $MgCl_2$  et le  $K_2HPO_4$ . Une matrice orthogonale du même nom (L16) a été utilisée par ces auteurs pour l'optimisation de la composition d'un milieu de culture (Tableau 9) contenant de l'extrait de levure (A), de la peptone de caséine (B), du  $MgCl_2$  (C) et du  $K_2HPO_4$  (D). L'influence de ces quatre facteurs sur la production d'AH par la souche *Streptococcus* sp. ID9102 (KCTC 11935BP) a été étudiée à quatre niveaux différents. Le plan d'expérience a été développé et analysé avec le logiciel MINITAB 14 (MatLab).

Tableau 9 : Plan d'expériences orthogonal L16 pour la production d'AH, d'après Im et al. (2009)

Run	Factors				Medium components (%)				HA (g/l)
	A	B	C	D	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	0.25	0.25	0.15	0.03	1.123
2	1	2	2	2	0.25	0.5	0.25	0.05	1.934
3	1	3	3	3	0.25	0.75	0.35	0.07	1.724
4	1	4	4	4	0.25	1.0	0.45	0.09	1.232
5	2	1	2	3	0.5	0.25	0.25	0.07	1.345
6	2	2	1	4	0.5	0.5	0.15	0.09	1.616
7	2	3	4	1	0.5	0.75	0.45	0.03	1.447
8	2	4	3	2	0.5	1.0	0.35	0.05	2.428
9	3	1	3	4	0.75	0.25	0.35	0.09	1.567
10	3	2	4	3	0.75	0.5	0.45	0.07	1.835
11	3	3	1	2	0.75	0.75	0.15	0.05	2.092
12	3	4	2	1	0.75	1.0	0.25	0.03	2.246
13	4	1	4	2	1.0	0.25	0.45	0.05	1.970
14	4	2	3	1	1.0	0.5	0.35	0.03	1.728
15	4	3	2	4	1.0	0.75	0.25	0.09	2.067
16	4	4	1	3	1.0	1.0	0.15	0.07	1.562

Tableau 10 : Table des réponses, moyenne et rapport S/N, d'après Im et al. (2009)

Levels	A		B		C		D	
	Mean	S/N	Mean	S/N	Mean	S/N	Mean	S/N
1	1.483	3.203	1.493	3.281	1.592	3.818	1.529	3.949
2	1.706	4.4	1.77	4.943	1.887	5.357	2.096	6.388
3	1.932	5.639	1.827	5.135	1.852	5.225	1.609	4.073
4	1.831	5.203	1.863	5.085	1.621	4.044	1.618	4.034
Delta	0.45	2.437	0.37	1.854	0.295	1.539	0.487	2.439
Rank	2		3		4		1	

Les concentrations en glucose et en chlorure de sodium ont été maintenues, dans tous les milieux, respectivement à 4 % et 0,5 %. Les rangs situés en bas du tableau 10 classifient les effets des facteurs étudiés. Le delta mesure l'étendu de l'effet en calculant la différence entre la plus haute et la plus faible des moyennes pour un facteur. Plus la valeur du delta est importante, plus grand sera l'effet du composé. Le rang classe les facteurs du plus impactant au moins impactant sur la production d'AH par *Streptococcus*

*sp.* ID9102. Ainsi le  $MgCl_2$  semble avoir plus d'effet que l'extrait de levure, qui a lui-même plus d'effet que la peptone de caséine et le  $K_2HPO_4$ .

La figure 24 présente les effets principaux obtenus par chacun des composés étudiés : le niveau 3 pour l'extrait de levure (0,75 %), le niveau 4 (1 %) pour la peptone de caséine, le niveau 2 (0,25 %) pour le  $K_2HPO_4$  et enfin le niveau 2 (0,05 %) pour le  $MgCl_2$ . Ces auteurs ont confirmé leurs résultats en menant des expériences avec un milieu optimisé. La production d'AH s'est révélée être de 2,51 g/l (MINITAB avait prévu une concentration de 2,56 g/l) au lieu de 1,98 g/l avant l'optimisation.

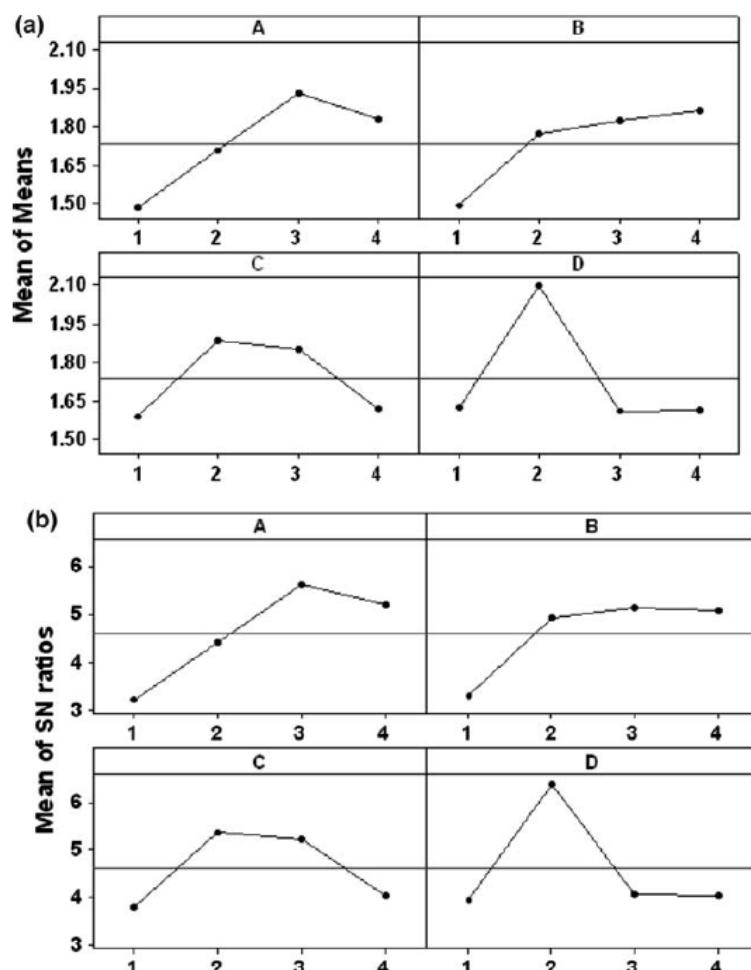


Figure 24 : Graphique des effets principaux pour la moyenne (a) et le rapport S/N (b) pour différentes concentrations en extrait de levure (A), peptone de caséine (B),  $K_2HPO_4$  (C),  $MgCl_2$  (D), d'après Im et al. (2008).

Les chiffres 1, 2, 3 et 4 représentent les niveaux de chaque composé.

#### 2.4.5.2. Optimisation des conditions de culture

La méthodologie des surfaces de réponse (RSM) qui inclut le design factoriel et l'analyse régression semble être une des meilleures méthodes pour obtenir une réponse maximale. La RSM est très largement utilisée dans l'optimisation des bioprocédés et elle conduit à un modèle qui décrit la relation entre les variables indépendantes et dépendantes du procédé. Les plus utilisés sont les modèles polynomiaux du second ordre.

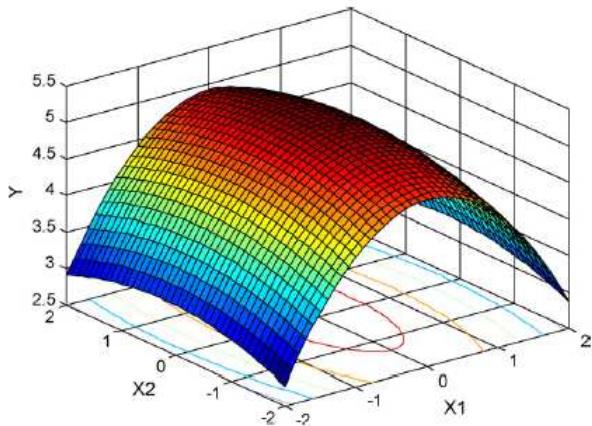
Liu *et al.* (2008) ont mis en place une technique d'optimisation des conditions de culture pour la production d'AH par *Streptococcus zooepidemicus* basée sur un algorithme QPSO (Quantum-behaved Particle Swarm Optimization). L'algorithme QPSO est une technique d'optimisation globale qui ne nécessite pas de modèles statistiques.

Ces auteurs ont couplé cet algorithme avec un réseau neural RBF (Radial Basis Functions) pour optimiser les conditions d'agitation qui jouent un rôle important dans l'amélioration de la productivité de l'AH. Un réseau de neurones artificiels est un modèle de calcul dont la conception est très schématiquement inspirée du fonctionnement des neurones biologiques. Liu *et al.* (2008) ont ainsi étudié, pour un type d'agitateur donné trois variables indépendantes : la vitesse d'agitation, le taux d'aération et le nombre de pâles nécessaires pour obtenir une production maximale d'AH. Le réseau neural RBF a été utilisé pour développer la fonction mathématique et l'algorithme QPSO pour exécuter les essais d'optimisation selon le plan d'expérience de Box - Behnken (Tableau 11). La méthodologie de surface de réponse a servi d'outil de référence pour la comparaison des approches.

L'utilisation de la matrice de Box - Behnken est intéressante pour l'optimisation mais les paramètres étudiés sont malheureusement difficilement extrapolables.

**Tableau 11 : Plan d'expérience de Box - Behnken avec trois variables indépendantes, d'après Liu *et al.* (2008)**

Run	Agitation speed (rpm)		Aeration rate (vvm)		Stirrer number		Experimental HA yield (g/l)	Predicted yield by RBF (g/l)
	$X_1$	Coding	$X_2$	Coding	$X_3$	Coding		
1	200	-1	2.0	1	3	-1	4.9	4.8
2	300	0	1.5	0	4	0	5.2	5.1
3	400	1	2.0	1	5	1	4.1	4.2
4	200	-1	1.0	-1	3	-1	4.5	4.5
5	300	0	1.5	0	2	-1.682	4.3	4.2
6	400	1	1.0	-1	3	-1	4.3	4.2
7	100	-1.682	1.5	0	4	0	3.6	3.7
8	300	0	1.5	0	4	0	5.2	5.1
9	300	0	1.5	0	4	0	5.2	5.1
10	300	0	1.5	0	4	0	5.2	5.2
11	200	1	1.0	-1	5	1	4.5	4.6
12	400	-1	2.0	1	3	-1	4.7	4.6
13	500	1.682	1.5	0	4	0	3.9	4.0
14	200	1	2.0	1	5	1	4.0	3.9
15	400	-1	1.0	-1	5	1	4.6	4.7
16	300	0	1.5	0	4	0	5.2	5.1
17	300	0	1.5	0	4	0	5.2	5.1
18	300	0	1.5	0	6	1.682	4.8	4.7
19	300	0	0.5	-1.682	4	0	4.7	4.8
20	300	0	2.5	-1.682	4	0	5.1	5.2



**Fig. 2.** The response surface plot showing the effects of agitation speed ( $X_1$ ), aeration rate ( $X_2$ ) and their mutual interaction on HA yield (Y) by *S. zooepidemicus*, with an optimum level of stirrer number of 3.0.

**Figure 25 : Exemple de tracé de surface de réponse montrant les effets de la vitesse d'agitation ( $X_1$ ), du taux d'aération ( $X_2$ ) et leur interaction sur la concentration en AH produit par *S. zooepidemicus*, avec un nombre optimal de pâles de 3, d'après Liu *et al.* (2008)**

La figure 25 montre une des représentations envisageables (tridimensionnelle) des effets des paramètres et de leur interaction sur la concentration en AH.

**Tableau 12 : Résultats de l'analyse du plan de Box - Behnken pour la production d'AH, d'après Liu *et al.* (2008)**

Term	Coefficient	P-value
Constant	5.1968	0.001
$X_1$	0.0223	0.002
$X_2$	0.0346	0.012
$X_3$	-0.0263	0.023
$X_1^2$	-0.4918	0.001
$X_2^2$	-0.0853	0.006
$X_3^2$	-0.2090	0.009
$X_1 X_2$	0.0012	0.002
$X_1 X_3$	0.0750	0.001
$X_2 X_3$	-0.225	0.013

L'approche d'optimisation par réseau neural RBF couplée à un algorithme QPSO a permis d'augmenter la concentration en AH jusqu'à 5,58 g/l. Les auteurs ont aussi conclu que cette méthodologie a une bonne prédictibilité pour l'optimisation de bioprocédés multi factoriels, non linéaires et variables dans le temps.

### 3. Modifications chimiques

Quel que soit l'origine de l'AH (animale ou microbienne), des modifications chimiques peuvent être élaborées pour obtenir un matériel mécaniquement et chimiquement robuste notamment vis à vis des agents oxydants et des actions enzymatiques. Les acides hyaluroniques modifiés ont des propriétés physicochimiques qui peuvent différer significativement de celles du polymère naturel. Néanmoins, ils conservent le plus souvent leur biocompatibilité et leur biodégradation.

L'estérification alcoolique est la méthode usuelle de stabilisation, l'alcool le plus utilisé pour cette réaction est l'alcool benzylique. Elle conduit à des molécules avec différentes solubilités.

D'après Asher *et al.* (2004), les réactions de réticulation sont utilisées pour les produits injectables en chirurgie plastique et dermatologique. Le principe consiste à lier les molécules entre elles grâce à un réticulant. Les principaux réticulants sont des époxydes et les plus utilisés d'entre eux sont le butanédiol diglycidyl éther, le formaldéhyde et le vinyl sulfone.

Prestwich *et al.* (1997) ont développé une méthode qui permet d'attacher des actifs thérapeutiques, des groupements d'intérêt ou des composés bioactifs à l'AH. Ils ont utilisé le couplage d'hydrazides aux fonctions acide carboxylique d'un nombre prédéfini d'acides glucuroniques contenus dans l'AH. Une large gamme de polymère (allant de 1200 Da à  $2 \times 10^6$  Da) peut être modifiée pour donner une macromolécule sous forme d'hydrogel. La liaison covalente du dihydrazide adipique (ADH) aux acides carboxylique de l'AH permet la formation de fonctions amino-hydrazides le long du squelette de hyaluronate (figure 26) qui peut ainsi être modifié par fixation de molécules d'intérêt.

Kim *et al.* (2011) ont quand à eux développé des hydrogels contenant de l'AH modifié par couplage à de la tyramine (Tyr). La nouvelle molécule a été synthétisée par formation de liaison amide entre l'acide carboxylique de l'AH et le groupement amine de la tyramine. L'injection intra-articulaire des hydrogels AH-Tyr renfermant de la dexaméthasone a conduit au traitement de l'arthrite rhumatoïde chez le rat.

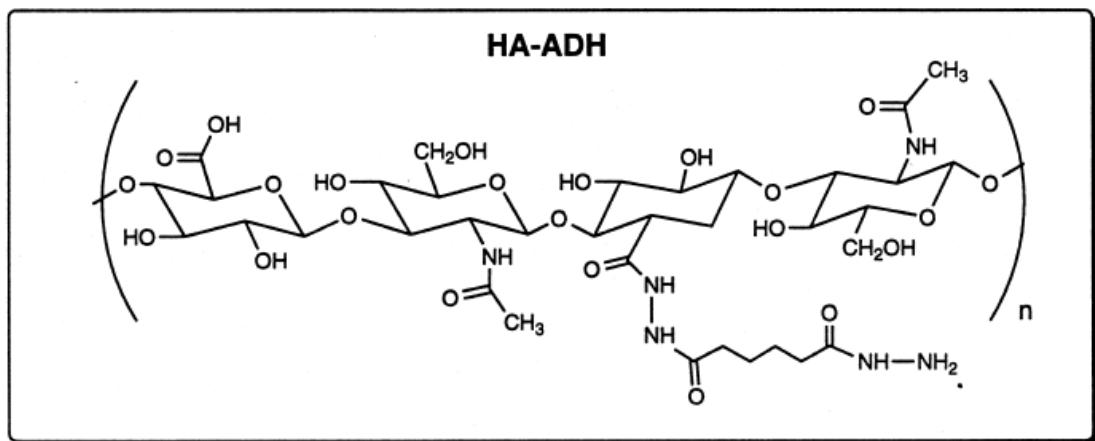
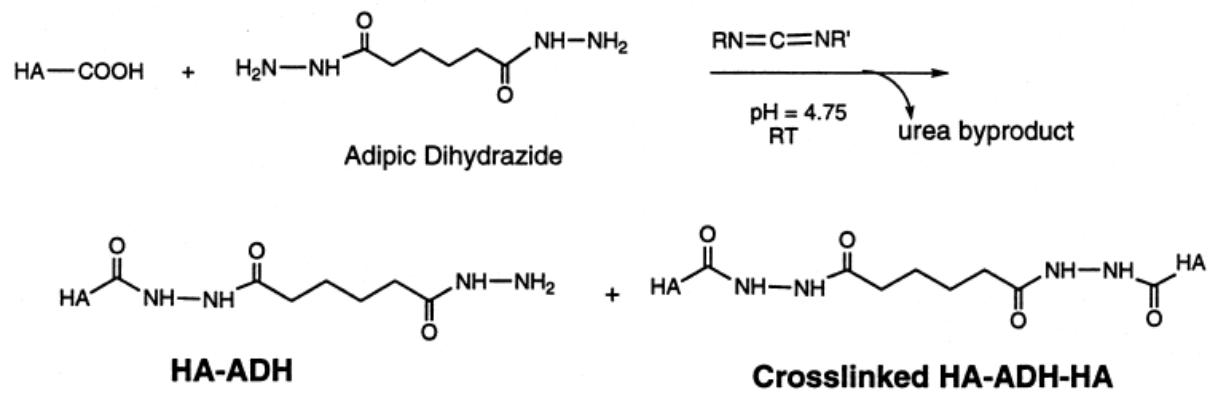


Fig. 1. Functionalization and crosslinking of HA with adipic dihydrazide (ADH).

Figure 26 : Fonctionnalisation de l'AH par le dihydrazide adipique, d'après Prestwich *et al.* (1997)

## 4. Conclusions

Les procédés de production d'AH par voie microbienne ont un rendement de production plus important que l'extraction à partir de tissus animaux. La taille de l'AH est plus importante et la qualité du polymère produit est meilleure.

L'espèce la plus utilisée pour la production d'AH est l'espèce *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Ces bactéries sont exigeantes en nutriments. La composition du milieu de culture permettant d'obtenir une quantité importante d'AH varie en fonction de la souche. De manière générale, le milieu doit contenir une source carbonée suffisamment importante, entre 10 et 60 g/L, ainsi qu'une source azotée, des vitamines et des minéraux. Certains acides aminés sont considérés comme essentiels pour une production notable d'AH, l'ajout de certains acides organiques et/ou de minéraux peut aussi avoir un effet positif. Les acides gras sont une des sources principales de nutrition dans l'environnement naturel de ces bactéries mais aucune des publications analysées n'étudie l'impact de ces molécules sur la production d'AH. Il paraît intéressant de comparer les besoins de différentes souches.

Les conditions de culture (température, pH, vitesse d'oxygénéation et d'agitation) influencent la production et la masse moléculaire de l'AH. En général, une température inférieure à une température dite optimale permet d'améliorer la quantité produite. Une compétition existe entre la production de l'AH et celle de la biomasse. Limiter la croissance des microorganismes en se plaçant dans des conditions sub-optimales favoriserait la synthèse d'AH. Un pH de 7 semble correspondre au pH optimal. Concernant l'oxygénéation, une fermentation se déroulant dans des conditions aérobies est décrite pour être favorable. Cependant, un taux d'oxygénéation trop élevé peut induire une production de radicaux libres qui provoquent alors la dépolymérisation de l'AH. De la même façon, l'agitation est indispensable pour permettre l'homogénéité du système mais une trop forte agitation induit, dans de nombreux cas, la cassure du polymère d'AH entraînant une diminution du poids d'AH.

La sélection de paramètres extrapolables est nécessaire en cas de changement d'échelle pour une industrialisation du procédé.

Le milieu de culture et les conditions de réalisation devront donc être optimisés en fonction de la souche mise en œuvre et du mode choisi afin d'obtenir la concentration en AH de haute masse moléculaire la plus importante possible.

Enfin le polymère produit pourra subir des modifications chimiques afin d'acquérir les propriétés physicochimiques souhaitées pour sa future utilisation.

## Partie Contrôle Qualité

Comme vu précédemment, la culture microbienne permet, *a priori*, une production d'AH de haute masse moléculaire mieux contrôlée, plus standardisée et « plus propre ». Cependant, les AH de grande taille produits par culture microbienne sont essentiellement associés aux parois des cellules, dans un milieu de culture qui est un mélange complexe de différents composés.

Il doit donc être démontré que le procédé de production utilisé permet de limiter ou d'éliminer les composants de la paroi cellulaire à caractère pyrogène ou inflammatoire.

Ainsi, cette voie d'obtention de l'AH implique la conception d'un procédé de purification maîtrisée et extrapolable, devant intégrer trois étapes successives :

- la séparation / extraction de l'AH associé aux parois bactériennes,
- la purification des AH du milieu de culture et/ou des cellules,
- puis l'enrichissement du mélange d'AH purifié en AH de grande taille moléculaire.

Quel que soit son mode de fabrication, l'AH doit satisfaire aux normes de la Pharmacopée Européenne (Ph. Eur.). Cette dernière précise les essais qui doivent être réalisés sur l'hyaluronate de sodium, sel de l'AH (Annexe 1).

### 1. Essais selon la Pharmacopée européenne

D'un point de vue macroscopique, l'AH se présente sous forme de poudre blanche, très hygroscopique ou sous forme d'agrégat fibreux. Comme vu en partie 1, l'AH est soluble dans l'eau. Il est insoluble dans l'acétone et dans l'éthanol anhydre.

Son identification se fait par spectrophotométrie d'absorption dans l'infrarouge par comparaison avec un spectre de référence (Ph. Eur.). Il peut aussi être identifié grâce à la réaction du sodium quand il est sous forme de sel.

Le critère d'acceptation pour la contamination microbienne est de  $10^2$  UFC/g.

En ce qui concerne les endotoxines bactériennes, elles doivent être recherchées pour tout produit injectable. Le dosage des endotoxines dans les produits est effectué par la méthode au lysat d'aérobocyte de limule (LAL). Le LAL réagit avec les endotoxines bactériennes ou le

lipopolysaccharide (LPS, composant de la paroi des bactéries Gram négatives). Il existe trois méthodes de test LAL: le test gel-caillot, le test turbidimétrique et le test chromogénique.

Si l'AH est destiné à la fabrication de préparations parentérales sans autre procédé approprié d'élimination, le taux d'endotoxines doit être inférieur à 0,5 UI/mg. Si l'AH est destiné à la préparation de formes pharmaceutiques administrées par voie intra-oculaire ou intra-articulaire sans autre procédé d'élimination, ce taux doit être inférieur à 0,05 UI/mg.

## 2. Méthodes de quantification

### 2.1. Quantification de l'AH par la méthode au carbazole

Selon la Pharmacopée Européenne, la détermination de la teneur en acide glucuronique se fait grâce à la réaction au carbazole proposée par Bitter et Muir (1962). Cette méthode de quantification de l'AH est souvent rapportée dans la littérature (Duan *et al.*, 2008 ; Hong *et al.*, 2004 ; Rangaswany *et al.*, 2008) et reste la méthode de référence. Le principe est la réaction du carbazole avec les acides uroniques qui permet d'obtenir une coloration pouvant être quantifiée. Cette coloration est due à la formation d'un dérivé du furfural obtenu par chauffage en milieu sulfurique et condensation avec le carbazole. La réaction se fait avec tous les hexoses.

La quantité d'acide uronique est estimée en comparaison à une gamme étalon d'acide uronique d'une source commerciale. Le tétraborate de sodium est placé dans un tube en verre refroidi à 4 °C. L'échantillon (à doser ou de la gamme) est ajouté puis les tubes sont fermés, agités puis incubés pendant 10 mn, à 100 °C. Après la mise à température ambiante des échantillons, le carbazole (0,125 % dans de l'éthanol) est ajouté. Les tubes sont alors à nouveau agités, puis incubés 15 min, à 100 °C. Après refroidissement à température ambiante, l'absorbance est mesurée à 530 nm. Pour la gamme étalon, la courbe d'absorbance en fonction de la concentration en acide uronique est tracée. La concentration en acide uronique d'un échantillon est obtenue en rapportant l'absorbance lue sur la courbe étalon.

Il faut noter que cette méthode n'est pas sélective et ne permet donc pas de doser l'AH au sein d'un milieu de culture contenant des glucides, car ceux-ci réagissent également au dosage au carbazol. Elle nécessite plusieurs étapes de purification qui alourdissent le protocole (l'estimation de la concentration d'AH doit être réalisée après élimination des différents résidus, des contaminants, du matériel cellulaire) (Chaabane, 2010).

## 2.2. Quantification de l'AH par détermination de la turbidité

D'autres méthodes ont été proposées pour quantifier l'acide hyaluronique contenu dans le milieu de culture.

Song *et al.* (2009) ont ainsi proposé une méthode de quantification de l'AH basée sur des mesures de turbidité, générée par la formation de complexes insolubles entre l'acide hyaluronique et le bromure de cétyltriméthylammonium (CTAB).

La turbidité désigne le trouble d'un liquide, causé par des particules colloïdales qui provoquent une diffraction de la lumière incidente et donc la diminution de la puissance de rayonnement. La lumière transmise à travers un milieu trouble dépend de la concentration en colloïdes. Pour de faibles concentrations, l'intensité transmise peut être déterminée par la loi de Beer-Lambert. La mesure de l'intensité transmise permet ainsi, de remonter à la distribution de taille et à la concentration en particules. Plus la quantité de particules contenue dans le liquide est importante et plus le signal de la lumière dispersée est important. La mesure de la quantité d'AH contenu dans un milieu se fait par complexation du polymère avec du CTAB. Le trouble formé est mesuré à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm.

Contrairement à la méthode de dosage au carbazol, la mesure de turbidité ne nécessite pas de purification préalable de l'AH car la complexation est sélective. La mesure peut être réalisée *in situ*, directement dans le milieu de production après retrait des cellules.

## 3. Caractérisation de la masse moléculaire

### 3.1. Détermination de la distribution de taille moléculaire de l'AH par chromatographie d'exclusion de taille (SEC)

La chromatographie d'exclusion de taille (SEC) a montré de bonnes performances dans la séparation des macromolécules. La SEC est une méthode chromatographique de séparation basée sur les différences de taille (ou de volume hydrodynamique) des molécules. Elle permet la séparation des composés à travers un gel poreux en fonction de leur masse moléculaire, taille et forme spatiale. Dans cette méthode, la phase stationnaire est constituée d'un matériel inerte, des billes poreuses possédant une certaine distribution de taille des pores (seuil d'exclusion). La phase mobile est constituée d'un éluant qui permet d'entraîner les molécules. Ne pouvant s'introduire dans les pores des billes, le chemin préférentiel des grosses molécules est extérieur aux billes, leur durée d'élution

est donc la plus courte. Les petites molécules migrent plus lentement (temps d'élution plus long) car elles empruntent des chemins au travers des pores des billes.

Les principales applications de SEC sont reliées à la purification, l'analyse de la pureté, l'estimation de la masse molaire de polymères. La détermination de la masse molaire est réalisée en utilisant des courbes de calibration. Des standards secondaires peuvent être utilisés, ces derniers sont des polymères de masse connue avec des conformations similaires à celles des polymères étudiés. Les pullulanes sont une famille de polysaccharides extracellulaires produits par le champignon *Aureobasidium pullulans* et solubles dans l'eau. La disponibilité commerciale des pullulanes (large gamme de molécules à la masse moléculaire définie) permet de les utiliser comme gamme de calibration dans la phase aqueuse.

Plusieurs études ont montré que la conformation macromoléculaire du pullulane dans une solution aqueuse est similaire à celle de l'AH (Sousa *et al.*, 2009).

Rangaswamy *et al.* (2008) ont déterminé la masse moléculaire de l'AH en utilisant cette technique. La phase mobile mise en jeu est une solution de  $\text{NaNO}_3$  1M, à un débit de 1 mL/min. La détection se fait par un détecteur à indice de réfraction. La colonne (Shodex OH Pak SB 804-805HQ) a été calibrée avec des standards de pullulanes de différentes masses moléculaires (distribution de taille).

### **3.2. Caractérisation de la distribution de taille moléculaire de l'AH par technique électrophorétique**

Une méthode couramment employée selon Stahl (2000) est la mise en œuvre de techniques électrophorétiques. Les standards employés dans ces techniques sont des AH de différentes masses moléculaires extraits de crêtes de coq. Les gels d'électrophorèse sont obtenus à partir de 0,7 à 0,9 % d'agarose. Le tampon utilisé est un tampon phosphate-EDTA (Volume de 2 L, contenant : 57,5 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 13,1 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 3,7 g de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ). Les échantillons sont mélangés à du bleu de bromophénol et du glycérol. Avec un ampérage de 20 mA et un voltage de 30 V, la durée de migration des échantillons à analyser dans le gel est d'environ 20 h. La masse moléculaire de l'AH est déterminée à l'aide d'une courbe de calibration établie à l'aide des masses moléculaires des marqueurs standards et des distances de migration.

### 3.3. Détermination de la masse moléculaire globale de l'AH par mesure de la viscosité

La relation de Mark-Houwink permet, à partir de la viscosité intrinsèque d'obtenir, la masse moléculaire d'un polymère. Cette relation semi-empirique est la suivante :

$$\eta = KM^\alpha$$

-  $\eta$  est la viscosité intrinsèque et s'exprime en  $(g/L)^{-1}$

-  $K$  et  $\alpha$  sont les constantes de Mark-Houwink. Il existe des valeurs spécifiques de ces constantes pour chacune des combinaisons, solvant – polymère

-  $M$  est la masse moléculaire (en Da)

-  $\alpha$  est une valeur comprise entre 0,5 et 0,9

Hong *et al.* (2004) ont utilisé cette relation pour déterminer la masse moléculaire de l'AH. Cette relation est fonction de la température ainsi que de la force ionique du milieu. Il est donc préférable de déterminer les paramètres de la relation de Mark-Houwink pour des conditions expérimentales spécifiques. Ils ont ainsi estimé la masse moléculaire de l'AH à 25 °C en établissant la relation  $\eta=3,6 \times 10^{-4} M^{0,78}$ .

## 4. Séparation de l'acide hyaluronique

Dans le milieu de culture, l'AH se retrouve sous deux formes : libre et capsulaire, encore liée aux bactéries. L'extraction de l'AH des capsules bactériennes se fait généralement par voie chimique, en utilisant un détergent, souvent du sodium dodécylique sulfate (SDS) (Akdamar *et al.* (2009)).

Par exemple, Chong et Nielsen (2003) ont extrait l'AH des capsules en lysant les cellules pendant 10 minutes avec un volume de SDS 0,1 % (p/v) pour un volume de milieu de culture. Cette extraction est suivie d'une filtration de l'échantillon à travers une membrane de 0,45 µm. Ces opérations permettent par la suite de quantifier l'AH total.

Hong *et al.* (2004) ont éliminé les cellules et les composés insolubles dans le milieu de culture par centrifugation et le polymère est précipité avec de l'alcool puis récupéré par centrifugation.

Han *et al.* (2004) ont séparé l'AH des microorganismes en ajoutant du SDS et de la formaline au milieu de culture. Ensuite, le milieu de culture est centrifugé ou filtré.

Rangaswamy et Jain (2008) ont dilué le milieu de culture après fermentation de *Streptococcus equi* sp. *zooepidemicus* ATCC 39920 avec un volume équivalent d'eau apyrogène puis l'ont centrifugé à 17686 g pendant 20 mn.

Sousa *et al.* (2009) a mis au point un protocole d'extraction de l'AH. Le milieu de culture est centrifugé à 3200 tr/min pendant 20 min afin d'éliminer les cellules et les débris cellulaires. Après avoir éliminé les cellules, un volume et demi d'éthanol est ajouté à un volume de surnageant et la solution est gardée à 4 °C pendant 1 h pour provoquer la précipitation de l'AH. Le surnageant est éliminé et le précipité est re-dissous dans du NaNO<sub>3</sub> 0,1 M et analysé pour établir la distribution de la masse molaire, et la concentration de l'acide hyaluronique.

Jagannath et Ramachandran (2010) séparent l'AH des microorganismes en additionnant 0,1 % SDS (un volume de SDS pour deux volumes de culture) au milieu de culture. Ce mélange est incubé pendant 20 mn puis centrifugé à 10 000 tr/min pendant 10 min.

## 5. Purification de l'acide hyaluronique

La purification de l'AH passe par l'élimination de différents métabolites et des protéines produits par les microorganismes lors de la fermentation.

### 5.1. Les techniques classiques de purification

Hong *et al.* (2004) ont éliminé les contaminants de faible masse moléculaire par précipitation avec de l'ammonium quaternaire. L'AH est purifié en utilisant une étape de chromatographie d'échange d'anions (colonne DEAE) et une étape de filtration sur gel Sephadex. La quantité d'AH est mesurée par la méthode au carbazole et la quantité de protéine est déterminée par réaction avec du bleu de Coomassie. La récupération du polysaccharide est de 60 % avec moins de 0,1 % de protéines contaminantes associées.

Lors de la purification de l'AH, la contamination protéique a été observée par Sousa *et al.* (2009) par analyses en chromatographie (présence de pics de co-élution à 11 et 13 min en UV). L'augmentation du nombre des étapes de purification diminue la concentration des protéines contaminantes des échantillons d'AH.

## 5.2. Exemples d'amélioration des techniques de purification

Afin de s'affranchir des fastidieuses étapes de lavages par solvants, Rangaswamy et Jain (2008) ont mis au point une technique de purification qui combine l'adsorption sur gel de silice, le traitement au charbon actif suivi d'une diafiltration (Tableau 13). Le traitement au gel de silice et au charbon actif a permis de retirer 96 % des impuretés protéiques. L'ultrafiltration conduit à une concentration protéique de 0,06 %. Ce procédé semble être efficace car il conduit à une faible dilution par les solvants et à une meilleure qualité de l'AH de haute masse moléculaire. Une étape de filtration 0,22 µm permet la stérilisation du produit avec un rendement de 65 %.

**Tableau 13 : Récapitulatif des étapes de purification mises en place par Rangaswamy et Jain (2008)**

Treatment	Volume (ml)	HA yield (mg/ml)	Protein (mg/ml)	Total HA (mg)	Total protein (mg)	% Protein w.r.t. HA
IPA <sup>a</sup>	100	3.4	0.56	340	56	16.5
Silica gel <sup>b</sup>	90	3.2	0.15	288	13.5	4.7
Carbon <sup>c</sup>	90	3.1	0.02	279	1.8	0.6
Diafiltration <sup>d</sup> (5X)	128	1.7	0.001	217.6	0.13	0.06
0.22 µm Filtration <sup>e</sup>	128	1.7	0.001	217.6	0.13	0.06

Rangaswamy et Jain (2008) citent dans leur publication un brevet de Carlino et Magnette, publié en 2002, portant sur une méthode originale de purification de l'AH.

Après 20 h de fermentation de *Streptococcus equi*, le milieu de culture est récupéré dans un récipient d'une contenance de 50 L. Le milieu est maintenu sous agitation continue, le pH est ajusté à 2,5 avec du HCl 6 N (la viscosité du milieu augmente). Le milieu est filtré à travers un jeu de cartouches de filtres de 0,2 µm.

La vanne de filtrat est maintenue fermée afin de faire recirculer le milieu pendant plusieurs minutes. Elle est ensuite ouverte et de l'eau distillée apyrogène est ajoutée en continu. La pression de sortie du rétentat est maintenue entre 1 et 3 bars préférentiellement à 2 bars. La diafiltration est arrêtée quand l'absorbance du filtrat à une longueur d'onde de 280 nm est de 0,012.

Le pH de la solution diafiltrée est ajusté à 4 avec de la soude 5N et le milieu est centrifugé à 9000 tr/min, à 15 °C. Le pH du surnageant est ensuite réajusté à 7 et la solution est filtrée avec un filtre de 0,2 µm puis stérilisée.

Le rendement obtenu avec ce procédé est de 85 à 87 % avec une pureté en AH de 96,5 % et une viscosité intrinsèque de 2100 mL/g correspondant à une masse moléculaire de  $1,7 \cdot 10^6$  Da.

Han *et al.* (2004) ont développé une méthode de purification de l'AH en plusieurs étapes. Cette méthode met en jeu l'ajout d'une résine d'adsorption et un traitement au charbon actif. Les résines d'adsorption sont des benzo di-vinyl styrène. Une résine d'adsorption est ajoutée au milieu de culture à raison de 0,1 à 10 % p/p et le pH est ajusté à 8,5. Après avoir ajouté la résine, le mélange est agité pour adsorber les endotoxines. Le mélange est ensuite filtré pour éliminer la résine d'adsorption. La méthode de filtration mise en jeu n'est pas décrite.

Un traitement au charbon actif est réalisé après chaque étape. Une solution de NaCl (concentration de 0,5 à 3 M) est ajoutée et la préparation est ensuite filtrée. Selon les inventeurs, le traitement au charbon actif permet de réduire le nombre d'étapes de précipitation avec des solvants organiques et, ainsi, de préparer un AH de grande pureté par un procédé simple et économique. Le charbon actif adsorberait les protéines et/ou les acides nucléiques. L'AH obtenu dans ce cas a une pureté de 99 %.

Gözke et Posten (2010) ont combiné en une seule technique la filtration membranaire et l'électrophorèse : l'électrofiltration. Le champ électrique appliqué est parallèle au flux de filtration. Les biopolymères avec une haute viscosité comme l'AH subissent les forces électrophorétiques et hydrodynamiques. Les premières permettent de réduire la durée du processus.

## 6. Conclusions

La 1ère étape en aval de la production d'AH consiste à séparer ce polymère des microorganismes qui le sécrètent. Cette opération est le plus souvent réalisée en mettant en contact le milieu de culture contenant les cellules avec un détergent comme le SDS. Une séparation par centrifugation est nécessaire pour séparer les bactéries de l'AH (qui se trouve donc dans le surnageant).

L'AH peut alors être quantifié, la méthode de référence est la méthode au carbazole mise au point par Bitter et Muir (1962). Néanmoins, cette technique est non sélective, elle nécessite une purification préalable et utilise des produits corrosifs et toxiques. Pour palier à ces inconvénients, de nouvelles méthodes comme celle de Song *et al.* (2009), plus simples à mettre en œuvre, ont été développées.

La purification, seconde étape avale, est primordiale dans les procédés de production d'AH, notamment lorsque ce dernier est destiné à une utilisation pharmaceutique ou cosmétique. Elle représente la majorité des coûts d'obtention de cette molécule d'intérêt. Les métabolites issus de la culture des microorganismes, comme les protéines contaminantes ou endotoxines, doivent être éliminés. Cette opération est responsable de la diminution du rendement de la productivité en AH. Il est nécessaire de trouver un compromis entre l'élimination maximale des impuretés et la limitation des pertes en AH durant la purification. La répétition d'étapes de précipitations, gourmandes en solvant (le plus souvent l'éthanol), diminue la concentration en AH. Des techniques de purification mettant en jeu des résines aromatiques et des charbons actifs ont été brevetées et semblent limiter cette réduction du rendement en AH tout en garantissant une pureté d'AH maximale.

La détermination de la masse moléculaire peut se faire par différentes méthodes mais la technique la plus couramment employée est la chromatographie d'exclusion de taille couplée à un détecteur à indice de réfraction. La masse moléculaire de l'AH produit conditionnera ses applications futures. Il est donc nécessaire de doser qualitativement ce polymère. Un AH de faible masse moléculaire sera plutôt utilisé dans le domaine de l'ophtalmologie, alors qu'un AH de haute masse moléculaire sera employé en cosmétique.

# Partie Aspects pharmaceutiques

## 1. Introduction

L'AH joue un rôle physiologique important dans de nombreux organismes et dans les tissus humains. Ce composé naturel a l'avantage d'être dégradé en glucides simples. De plus, son pouvoir hygroscopique et sa nature viscoélastique rendent son utilisation très intéressante dans les applications pharmaceutiques et biomédicales (Frank *et al.*, 1999 ; Girish et Kempuraju, 2007).

## 2. Formation d'hydrogels

Les hydrogels sont des réseaux de polymères, tridimensionnels et hydrophiles, capables de retenir une grande quantité d'eau ou de liquides biologiques (Van Tomme *et al.*, 2008). Ils ressemblent à la MEC native des tissus. Depuis leur première application, dans les années 60, en tant que constituant des lentilles de contact souples, leur utilisation a augmenté et ils sont, aujourd'hui, employés dans les domaines pharmaceutique et biomédical (Nair *et al.*, 2011). Ces hydrogels ont plusieurs avantages :

- ils sont biocompatibles et biodégradables
- ils supportent l'encapsulation de cellules ou de facteurs de croissance,
- ils permettent la libération contrôlée de composés,
- ils facilitent la croissance cellulaire durant la régénération tissulaire,
- ils peuvent être utilisés pour la réparation d'imperfections avec intervention chirurgicale minime.

Des modifications des chaînes de polymère peuvent être réalisées par diverses méthodes de couplage physiques ou chimiques. Depuis une dizaine d'années, la recherche a évolué vers la formulation de produits injectables formant un gel macroscopique au niveau du site d'injection (Van Tomme *et al.*, 2008). Les avantages de cette approche sont l'amélioration du confort pour le patient et la réduction des coûts. La gélification *in situ* peut être obtenue par polymérisation par les rayonnements UV (introduisant des liaisons covalentes non réversibles) ou par auto-assemblage (interactions réversibles ou réactions chimiques non réversibles).

Nair *et al.* (2011) ont proposé un hydrogel comprenant de l'AH oxydé et du chitosane. La formation de ce polymère est indépendante de la température et du taux de glycérol phosphate ajouté (servant à la neutralisation du chitosane). L'hydrogel formé a l'avantage d'être plus stable qu'un gel de chitosane traditionnel, cela s'expliquerait par la formation de liaison entre le groupement amine du chitosane et du groupement aldéhyde de l'AH oxydé. Sa gélification *in situ* prend moins de deux minutes. Des cellules peuvent être encapsulées dans ce gel, le taux de rétention des cellules viables

est de 95 %. Cet hydrogel peut donc être utilisé comme système injectable pour l'ingénierie tissulaire ainsi que dans la délivrance de médicaments ou de gènes. Les auteurs soulignent que les structures complexes de chitosane et d'AH présentent un matériau de choix pour les applications d'ingénierie tissulaire (peau et cartilage).

### **3. Applications**

La première application thérapeutique de l'acide hyaluronique remonte à 1968, il a été utilisé à l'état purifié pour traité un grand brûlé. Depuis, il a trouvé des applications dans pratiquement tous les champs de la médecine.

La masse moléculaire de l'AH va conditionner ses applications. Les domaines où il peut être utilisé sont nombreux et vastes :

- La chirurgie ophtalmique (transplantation de cornée, cataracte, glaucome)
- Les pathologies pulmonaires,
- La prise en charge de pathologies articulaires rhumatologiques
- La prévention des brides post-chirurgicales en chirurgie abdominale
- Le traitement du reflux vésico-urétral de l'enfant
- Le traitement des pathologies des cordes vocales
- La chirurgie esthétique (mammaire ou dermique (comblement de rides))
- La régénération de la peau (aide à la cicatrisation)
- Les cancers (marqueur tumoral pour le cancer de la prostate et du sein)
- Les produits cosmétiques (crèmes hydratantes (Liu, Sun *et al.*, 2008))

### 3.1. Chirurgie

#### 3.1.1. Arthrose, cartilage et articulations

L'acide hyaluronique est un composant intrinsèque du cartilage articulaire. Il est essentiel pour le développement des articulations au stade embryonnaire et dans la fonction adulte ultérieure.

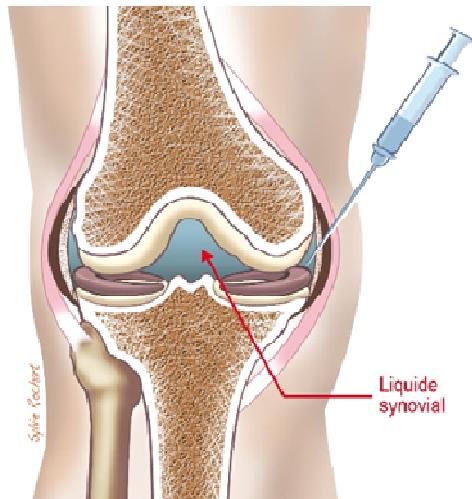


Figure 27 : Injection d'acide hyaluronique dans l'articulation du genou, d'après Fruminet (2010)

Dans les articulations arthrosiques, il a été observé que la masse moléculaire et la concentration de l'AH étaient diminuées sous l'action de cytokines pro-inflammatoires et de radicaux libres (Girish et Kemparaju, 2007 ; Kim *et al.*, 2011).

Les injections intra-articulaires d'acide hyaluronique (Figure 27) ont montré un bénéfice dans le traitement de l'arthrose de la personne âgée.

Des études ont démontré que l'injection d'AH stoppe la dégénérescence du cartilage et la libération de protéoglycans de la MEC. L'AH nouvellement injecté protège la surface du cartilage articulaire, normalise les propriétés du liquide synovial et réduit la perception de la douleur. L'effet analgésique obtenu après administration est comparable ou supérieur à celui des corticostéroïdes ou des anti-inflammatoires non stéroïdiens (Kirwan, 2001).

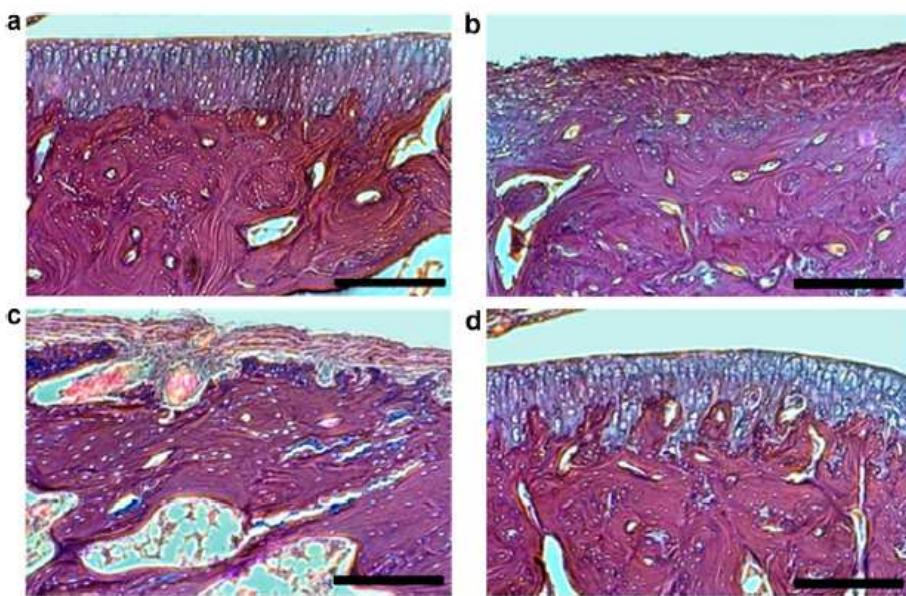
Kim *et al.* (2011) ont développé des hydrogels contenant de l'AH modifié par couplage à de la tyramine (Tyr). L'hydrogel AH-Tyr a été préparé par réaction avec du peroxyde d'hydrogène et une peroxydase (HRP : Horseradish Peroxidase). Le gel renfermait un anti-inflammatoire : la dexaméthasone, molécule de référence dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde.

L'injection des hydrogels AH-Tyr renfermant la dexaméthasone (DMT) s'est faite dans les articulations d'animaux modèles (CIA : Collagen-Induced Arthritis) et a conduit au traitement de l'arthrite rhumatoïde chez le rat (Figures 28 et 29).



**Figure 28 : Photographies de pattes de rats normaux et de rats CIA (n=5) avant et après traitement, d'après Kim et al. (2011).**

(a) contrôle, (b) rats CIA traités par PBS (Phosphate buffered saline) (contrôle négatif), (c) rats traités par AH-Tyr et HRP (Horseradish Peroxidase), (d) rats traités par des hydrogels d'AH-Tyr et DMT



**Figure 29 : Analyse histologique des tissus articulaires à 4 semaines, d'après Kim et al. (2011).**

(a) contrôle, (b) rats CIA traités par PBS (Phosphate buffered saline) (contrôle négatif), (c) rats traités par AH-Tyr et HRP (Horseradish Peroxidase), (d) rats traités par des hydrogels d'AH-Tyr et DMT

Tritz-Schiavi *et al.* (2010) ont mis au point une structure stratifiée contenant un hydrogel d'alginate et d'AH mimant l'environnement du cartilage articulaire. Ces auteurs ont remarqué une répartition homogène des cellules souches mésenchymateuses dans l'hydrogel et une répartition péricellulaire de l'actine. Après trois jours de culture, environ 52 % des cellules sont restés viables. A la fin de la culture, la proportion de cellules vivantes et l'activité métabolique ont augmenté, ce qui indique que l'hydrogel mis au point représente un environnement favorable pour la construction de néocartilage.

Elisseeff *et al.* (1999) ont été les premiers à étudier l'utilisation de la photopolymérisation pour l'encapsulation de chondrocytes dans des réseaux hydrogels d'AH pour la régénération du cartilage. Les cellules ont été directement encapsulées dans des hydrogels contenant des MeAH de masse moléculaire (50 à 1100 kDa) et de concentration variables (2 à 20 % m/m) pour évaluer l'influence des propriétés du gel sur la formation de néocartilage. Ces auteurs ont remarqué qu'après 12 semaines d'implantation sous-cutanée, la production de néocartilage variait selon la formulation du gel. Les hydrogels contenant une concentration de 2 % m/m en AH de 50 kDa ont montré les propriétés les plus proches du cartilage natif. La réticulation des gels d'AH influence aussi la diffusion des cellules à travers les hydrogels et la production tissulaire générale par les cellules souches myéloïdes dérivées du mésenchyme (MSC). Il a été démontré que le type de chondrocyte (auriculaire

ou articulaire) influençait les propriétés du tissu cartilagineux néoformé. Les chondrocytes auriculaires forment les meilleurs tissus, probablement grâce à leur capacité supérieure de remodelage des hydrogels. L'expression améliorée de certains gènes a été observée dans les construits articulaires soumis à des forces de compression mimant l'environnement du tissu natif. D'après Burdick et Prestwich (2011), des chondrocytes ont aussi été photoencapsulés dans des hydrogels d'AH et étudiés dans des modèles de cartilage *in vivo*. Les construits semblent être bien intégrés avec les tissus natifs et montrent une meilleure synthèse de la matrice après implantation.

### **3.1.2. Œil**

L'œil occupe une place particulière dans l'histoire et l'évolution des produits à base d'AH. De par ces propriétés viscoélastiques, ce gel aide aux processus de cicatrisation et de régénération après interventions chirurgicales. L'AH permet une ré-épithérialisation de la conjonctive ainsi qu'une réduction de la pression intraoculaire (Price *et al.*, 2007).

L'AH est couramment utilisé en chirurgie ophtalmique en complément de l'implantation de dispositif artificiel intraoculaire (Goa et Benfield, 1994). Il est aussi employé pour prévenir la dessication de la cornée durant certaines opérations. L'acide hyaluronique peut être utilisé de façon topique pour le traitement du syndrome de sécheresse oculaire ou l'administration d'antibiotiques dans l'œil ; le gel prévenant le lessivage du médicament par les larmes et prolongeant sa libération (Rah, 2011).

Cette molécule est un composant important des humeurs aqueuse et vitrée. Son injection intravitréale est largement utilisée pour palier à la perforation traumatique du globe ou en traitement après une trabéculectomie ou une phacoémulsification (Price *et al.*, 2007).

Dans le cas de la chirurgie de la cataracte, les gels d'AH sont utilisés pour maintenir l'espace opératoire (profondeur de la chambre antérieure) et pour protéger l'épithélium de la cornée et les autres tissus des dommages physiques. La cicatrisation de la cornée serait due à la capacité de l'AH de promouvoir la croissance des cellules de l'épithélium cornéen.

## 3.2. Chirurgie esthétique

### 3.2.1. *Implants mammaires*

L'acide hyaluronique a été employé dans les prothèses mammaires mais cela reste anecdotique du fait du coût prohibitif qu'engendrerait la production de grosses quantités d'AH pour cette application médicale (Fruminet, 2010).

### 3.2.2. *Injection dermique*

La principale utilisation de l'acide hyaluronique en chirurgie esthétique de rajeunissement est le comblement des rides (Figure 30) pour lequel sa popularité a augmenté depuis 2004. La palette des formulations disponibles sur le marché s'est enrichie au vu de la demande toujours grandissante.

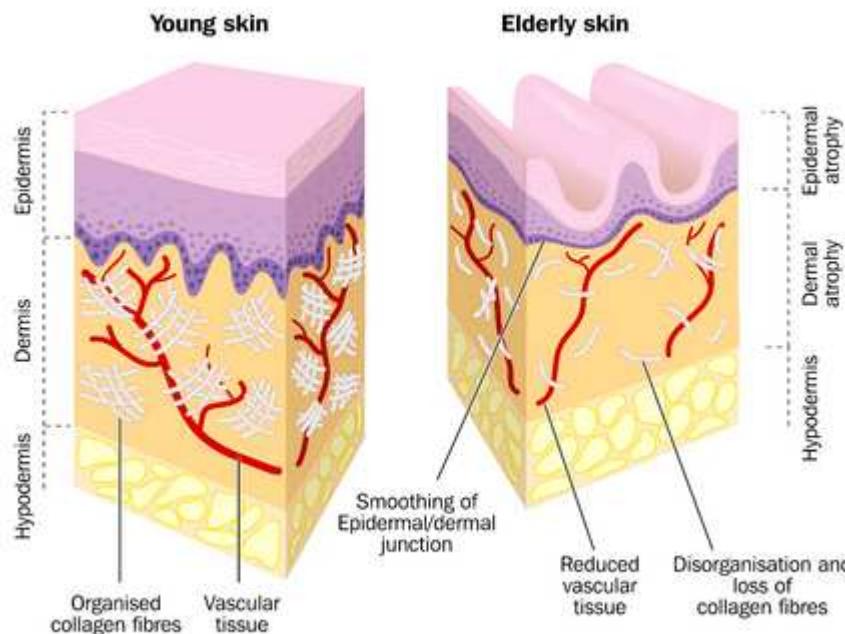


Figure 30 : Comparaison de la constitution d'une peau jeune et d'une peau âgée (dreamstime.com)

Les gels d'AH injectables ont démontré une excellente efficacité pour les rides les plus fines en comparaison avec la toxine botulique et le collagène. Le traitement combiné avec la toxine botulique est plus efficace que celui par AH seul mais la raison n'a pas été encore clairement élucidée.

L'AH, présenté sous forme de gel transparent, est injecté dans la peau pour combler les rides et sillons profonds mais également pour remodeler certains volumes du visage. L'AH est résorbable et a donc un effet limité dans le temps. Biodégradable, l'AH reste actif de 8 à 12 mois. Deux séances

annuelles d'entretien peuvent alors être nécessaires pour conserver l'effet des injections d'AH à plus long terme.

La ou les injections, à base de gel, se pratiquent en quelques minutes dans le tissu cutané ou dans le derme. Les aiguilles utilisées sont très fines, ce qui rend le geste médical pratiquement indolore. Il ne nécessite aucune anesthésie générale, tout au plus, pour certaines parties du visage (notamment autour de la bouche où la zone est un peu plus fragile) l'application d'une pommade anesthésiante à la lidocaïne. Le résultat est immédiat, seules quelques rougeurs subsistent, mais elles s'estompent rapidement. Certaines spécialités renferment de la lidocaïne qui est ainsi directement injectée avec l'AH.

Le coût de ces interventions n'est pas négligeable, il varie de 200 à 500 euros et est calculé en consultation en fonction de la zone à traiter, de la nature des diverses prestations proposées et du type d'AH utilisé. Les injections d'AH à visée esthétique ne sont pas prises en charge par la Sécurité Sociale.

### **3.3. Autres applications en ingénierie tissulaire**

L'ingénierie tissulaire est un champ de recherche dont le but est la régénération des tissus et des organes. Les cellules, les matrices supports et les facteurs de croissance sont les trois principaux composants nécessaires à l'élaboration d'un tissu artificiel. Le développement de polymères biodégradables permet de créer des matrices temporaires et joue un rôle important dans le succès des transplantations cellulaires Lin *et al.* (2009).

#### ***3.3.1. Délivrance de cellules : exemple du transfert de kératinocytes pour la cicatrisation de plaies***

Laserskin, d'après Price *et al.* (2007), est un feutrage d'acide hyaluronique hautement estérifié (et donc faiblement soluble) qui permet le transfert de kératinocytes d'une culture cellulaire vers la blessure ainsi que la prolifération de ces cellules. Ce système permet par exemple la cicatrisation de l'ulcère diabétique. Certaines études ont comparé l'association de ce feutrage avec des kératinocytes seuls à des systèmes contenant des fibroblastes. Ces derniers, en co-culture, ont démontré de meilleur taux de cicatrisation.

### **3.3.2. Régénération dermique**

Il existe un certain nombre de méthodes disponibles pour la reconstruction du derme. Une reconstruction formelle d'un néo-derme peut être entreprise par greffe de derme allogénique. Deux matériaux sont couramment utilisés : le collagène et les supports dermiques à base d'acide hyaluronique (Price *et al.*, 2007).

L'utilisation de l'acide hyaluronique n'est pas seulement limitée à la recherche cutanée. Comme vu précédemment, des études sont aussi menées, par exemple, sur la production de chondrocytes.

D'autres aires incluant la culture d'adipocytes, de lignée cellulaire de foie ou encore de glomérule ont été évaluées. Il apparaît évident que le système de culture cellulaire sur AH a beaucoup de potentiel et pourrait être la base de la culture tridimensionnelle d'organes (Price *et al.* (2007).

### **3.3.3. Réparation cardiaque**

Dans leur revue bibliographique, Burdick et Prestwich (2011) présentent aussi une étude sur l'utilité des hydrogels d'AH dans la réparation cardiaque. Après un infarctus du myocarde, l'augmentation des molécules pro-inflammatoires combinée au pompage de fluide au travers du cœur conduit à une augmentation de la taille du ventricule gauche et à un rétrécissement de la paroi cardiaque. Ce processus peut avoir des effets néfastes sur la fonction du cœur et conduire à un arrêt cardiaque. Une approche pour réduire les différents stress subis par l'endocarde est l'injection d'un biomatériau acellulaire. Les hydrogels d'AH qui ont une gélification uniforme peuvent être utilisés dans cette approche.

### **3.3.4. Ingénierie valvulaire**

Les approches d'ingénierie tissulaire sont particulièrement intéressantes en chirurgie cardiaque car elles fournissent des substituts biologiques aux valves endommagées lors de valvulopathies. D'après Burdick et Prestwich (2011), les hydrogels d'AH photoréticulés ont été étudiés pour cette application car l'Ah est naturellement présent dans les valves cardiaques. Les cellules valvulaires interstitielles (VIC) sont reconnues pour être difficiles à cultiver dans les milieux classiquement utilisés mais elles adhèrent et prolifèrent très bien sur des hydrogels à base d'AH. Une fois encapsulées, les VIC restent viables et produisent d'importantes molécules de la matrice.

### **3.4. Microsystèmes**

Au-delà de l'ingénierie tissulaire et de la culture cellulaire, les hydrogels d'AH photopolymérisés peuvent aussi être utilisés dans le développement de microsystèmes. Le micromodelage des hydrogels est potentiellement utile dans les études de biologie fondamentale, le diagnostic et le criblage à haut débit. Le principal avantage est le contrôle de la photopolymérisation des macromères de Méthyl-AH pour former des micropuits ou microgels pour l'encapsulation ou la culture de cellules. Les hydrogels d'AH peuvent aussi être utilisés dans des microbioréacteurs pour permettre une culture tridimensionnelle de cellules souches avec une perfusion contrôlée du milieu de culture (Burdick et Prestwich, 2011 ; Seidlits *et al.*, 2011).

### **3.5. Cosmétologie**

L'humidité naturelle de la peau est attribuée à son contenu en AH. Cette propriété avantageuse du biopolymère a permis son ajout dans les préparations cosmétiques. Les révolutions dans le domaine des biotechnologies et de la génétique ont permis de rendre économiquement viables les procédés de fermentation bactérienne d'AH et ainsi favoriser son utilisation en cosmétique.

Pour beaucoup de spécialités, la concentration en AH est comprise entre 0,025 % et 0,05 %. Cela semble suffisant pour donner aux préparations une texture douce et visqueuse. De telles solutions appliquées sur la peau forment un film qui apporte une hydratation prolongée (Stern et Maibach, 2008).

### **3.6. Indicateur de maladies**

L'AH est présent sous différentes formes dans notre organisme : libre dans la circulation sanguine ou le système lymphatique, fixé à la MEC. Normalement la concentration en AH circulant est faible mais elle augmente dans les cas de lésions tissulaires. Une rapide augmentation de cette concentration peut aussi être une réponse à un stress comme une hémorragie, une septicémie ou une intervention chirurgicale. Une augmentation de la concentration en AH dans le sérum est aussi un des plus précoce indicateurs de cirrhose du foie, de fibrose de ce même organe ou encore d'arthrose du genou. L'AH peut donc être utilisé comme biomarqueur clinique pour détecter rapidement des changements survenus suite à une blessure ou à une maladie (George and Stern, 2004).

### 3.7. Systèmes de délivrance de médicaments et d'ADN

Grâce à sa présence naturelle dans le corps humain et aux nombreuses possibilités de modifications chimiques (réticulation chimique, greffage de médicaments), des capsules issues de ce polymère laissent envisager des applications intéressantes pour le transport de principes actifs (Szarpak, 2009).

En effet depuis quelques années, l'AH est utilisé de façon significative dans le développement de systèmes de délivrance dermique et transdermique de médicaments. Les effets bénéfiques de l'AH sur la délivrance dermique du diclofénac ont été étudiés aussi bien *in vitro* que *in vivo* et au niveau clinique (Brown *et al.*, 2002). Des études *in vitro* ont reporté que l'AH améliore énormément la partition du diclofénac dans la peau humaine et sa rétention dans l'épiderme. L'AH produit les mêmes effets avec la cyclosporine ou l'ibuprofène. La biodisponibilité augmentée des médicaments grâce à l'AH est fonction de la masse moléculaire du biopolymère ; les AH de haute masse moléculaire permettent une augmentation de la biodisponibilité alors que les AH de faible masse moléculaire n'ont aucun effet (Morimoto *et al.*, 1991).

La nature non immunogénique de l'AH a été utilisée dans le cas de système de délivrance de principe actif par voie pulmonaire ou parentérale pour obtenir une libération constante ou pour prolonger la rétention de molécules comme les agents anticancéreux. La conjugaison d'AH de faible masse moléculaire avec des composés cytotoxiques comme le paclitaxel ou la doxorubicine a été étudiée (Luo *et al.*, 2000). Il a été mis en évidence que les conjugués formés sont internalisés par les cellules cancéreuses par endocytose médiaée par des récepteurs. Par exemple, *in vitro*, le taxol lié chimiquement à de l'AH cible sélectivement les lignées cellulaires cancéreuses de colon, d'ovaire ou de sein (Luo *et al.*, 2000).

Surini *et al.* (2003) ont, quand à eux, développé un implant à base d'AH et de chitosane qui permet la libération programmée d'insuline.

La photopolymérisation fournit une technique simple d'encapsulation des molécules pour ces applications. Burdick et Prestwich (2011) signalent que la délivrance de protéines par des dérivés de l'AH, seuls ou combinés avec du polyéthylène glycol, a été étudié. Ces systèmes composites peuvent être utilisés pour une large gamme d'applications comme la médecine régénérative. Des macromères d'AH modifiés ont été combinés avec d'autres molécules comme systèmes d'encapsulation et de libération pour la délivrance d'ADN. Les approches de thérapies géniques sont de plus en plus utilisées en médecine régénérative pour altérer l'expression de gènes cibles et ainsi diriger la réparation tissulaire. L'activité de l'ADN libéré est dépendante des conditions d'encapsulation et de formulation du matériau. L'utilisation d'hydrogels d'AH permet de s'affranchir des vecteurs viraux.

### **3.8. Recouvrement de matériaux**

Le recouvrement des surfaces des biomatériaux par de l'AH a été décrit dans la revue bibliographique de Morra (2005). Cette revue décrit les différentes méthodes de recouvrement comme les liaisons covalentes, le couplage ionique ou l'adsorption. L'AH peut par exemple être lié de façon covalente à la surface de stents métalliques en utilisant des carbodiimides.

La formation de films multi-couches permet d'améliorer l'adhésion cellulaire et la résistance de l'AH réticulé. De tels matériaux sont très prometteurs pour le recouvrement des implants prothétiques (Schanté *et al.*, 2011).

## **4. Les différentes spécialités**

La grande majorité des produits de comblement des rides sont destinés à être dégradés puis éliminés par l'organisme. Mais certains d'entre eux sont en partie ou non éliminés et ainsi persistent en totalité ou en partie définitivement dans le tissu.

Il n'existe pas à ce jour de nomenclature européenne permettant aux professionnels qui utilisent ces produits d'identifier leurs durées d'effets et les risques associés à leur utilisation. L'Afssaps (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé) propose donc au vu des données de la littérature une classification de ces dispositifs dans le but d'améliorer l'information des professionnels et du public. Les produits injectables de comblement des rides ont, selon la nature du matériau qui les compose, une durée d'effet et un processus d'élimination qui les caractérisent.

Ces produits peuvent ainsi être classés en trois catégories principalement selon leur durée de présence dans l'organisme : les produits résorbables, lentement résorbables, non résorbables. On entend par produits « résorbables » et « lentement résorbables » des produits éliminés dans le temps naturellement par l'organisme par opposition aux « non résorbables » qui persistent définitivement dans la peau.

### **Produits résorbables**

Ils sont dérivés pour la majorité d'AH d'origine animale ou issus de la biofermentation qui peuvent subir des modifications chimiques qui leur procurent une durée de présence dans l'organisme de 3 à 6 mois.

### **Produits lentement résorbables**

Leur durée d'effet est située entre 6 mois et 2 ans. Certaines substances sont déjà utilisées dans des applications médicales (hydroxyapatite, alginate...) sans pour autant garantir une innocuité totale de la présence du produit dans la peau.

### **Produits non résorbables**

Ils sont présents définitivement dans le corps. Ils peuvent être fabriqués par exemple à partir de polymères acryliques ou méthacryliques ou gel de polyacrylamide et associés ou non à un matériau résorbable (acide hyaluronique, collagène...). Si dans certains cas une extraction du produit est possible, elle ne sera que partielle.

Ascher *et al.* (2004) ou encore Romagnoli et Belmontesi (2008) (Figures 31 et 32) ont présenté une liste des différentes spécialités à base d'AH présentes sur le marché. De façon générale, ces derniers peuvent être classés comme suit :

Les acides hyaluroniques réticulés :

- D'origine animale
- D'origine non animale, issus de la fermentation bactérienne
- Les produits volumateurs

Les acides hyaluroniques non réticulés :

- D'origine animale
- D'origine non animale, issus de la fermentation bactérienne

Les acides hyaluroniques vecteurs

Depuis octobre 2010, l'Afssaps a mis en place une liste des produits injectables de comblement des rides déclarés (Annexe 2).



Figure 31 : Spécificité tissulaire des composés à base d'AH non animal stabilisé Restylane®, d'après Romagnoli et Belmontesi (2008)

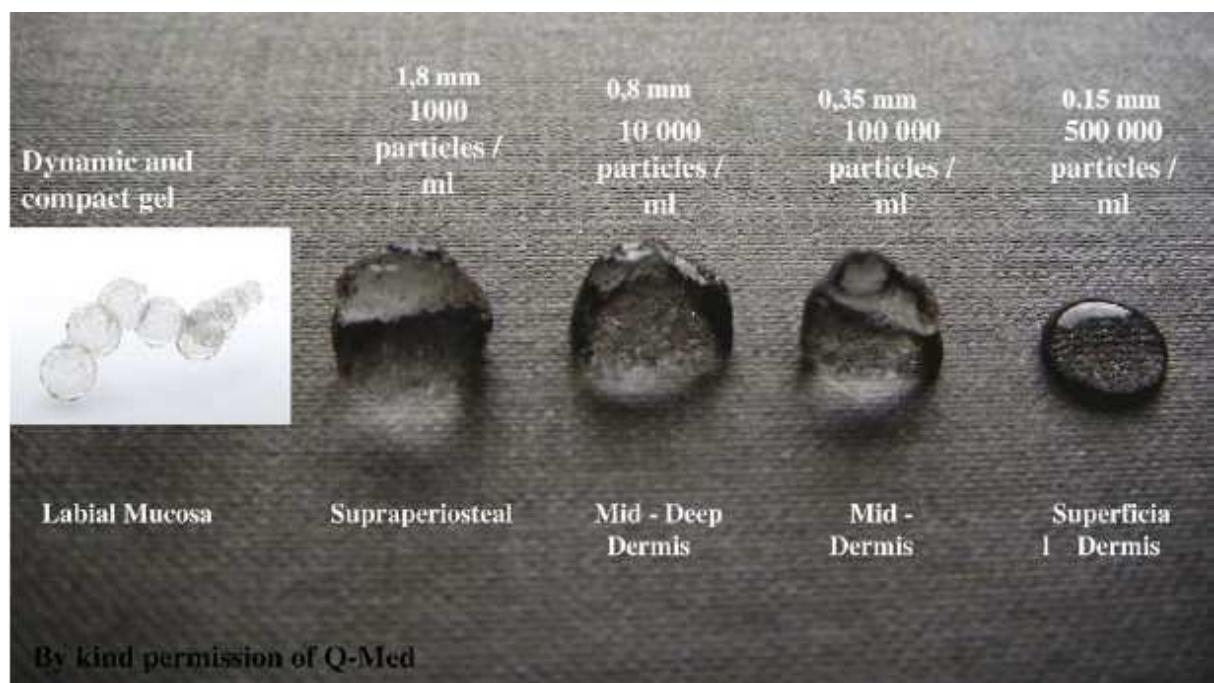


Figure 32 : Spécialités à base d'AH stabilisé non animal de Q-Med, d'après Romagnoli et Belmontesi (2008)

## 5. Effets secondaires

Les effets secondaires développés dans ce chapitre sont ceux rencontrés après injection d'AH dans le cadre de la chirurgie esthétique (Ascher *et al.* (2004), Requena *et al.* (2011), Romagnoli et Belmontesi (2008)).

Historiquement, le produit le plus populaire pour le comblement des rides est le collagène mais l'utilisation de ce dernier a rencontré quelques problèmes. L'allergie est probablement la plus importante complication mais la structure ubiquitaire de l'AH permet de contourner cet effet indésirable. Bien que l'acide hyaluronique soit très bien toléré, il est possible d'observer un érythème transitoire ou un léger gonflement. D'autres réactions, comme une réaction inflammatoire, ont été documentées, elles vont de la simple hypersensibilité à l'angio-oedème avec des titres positifs en immunoglobines G et E anti-acide hyaluronique (Price *et al.*, 2007).

### 5.1. Les réactions immédiates

Pendant l'injection ou immédiatement après peuvent apparaître :

- un érythème qui semble plus fréquent avec les AH qu'avec le collagène,
- un saignement léger au niveau de certains points d'injection, surtout en péribuccal ou au niveau des commissures labiales,
- un oedème,
- des ecchymoses punctiformes,
- une douleur, un prurit, une sensibilité de la peau au point de piqûre, ces réactions immédiates disparaissent généralement en 72 heures.

Elles seraient dues à une mauvaise préparation de la peau. Ces effets secondaires immédiats sont assez fréquents, en particulier l'érythème qui est observé de manière presque constante et rarement rapporté de manière systématique, mais retrouvé lors de l'interrogatoire ; son caractère très transitoire et bénin explique que pour certains, il est considéré comme quasi normal.

#### Comment les éviter ?

Leur traitement repose sur l'emploi de crèmes à la vitamine K1 immédiatement après l'injection, l'application immédiate de crème dermocorticoïde ou d'un pack froid. Le respect des contre

indications (aspirine et anticoagulants arrêtés au moins quatre jours avant) et surtout une bonne technique permettrait de les éviter (Ascher *et al.*, 2004).

Lors d'une injection d'AH au niveau des lèvres, un œdème inflammatoire et sensible peut apparaître en moins de 12 heures, et peut persister deux à sept jours. Sa disparition est facilitée par l'emploi de dermocorticoïdes. Il ne s'agit pas d'une réaction d'hypersensibilité retardée et la restitution *ad integrum* est habituelle.

Des papules ou de fines lignes blanches le long de la ride, une nodosité palpable ou visible, traduisent une faute technique : le produit a été injecté trop superficiellement, ou a été mal choisi (emploi d'un produit trop concentré ou trop réticulé pour cette correction superficielle).

**Comment les éviter ?**

Un massage immédiat et vigoureux, répété pendant plusieurs jours, permet d'étaler le produit, cependant certaines papules peuvent persister plusieurs mois.

## **5.2. Les réactions semi-retardées**

Elles surviennent dans les jours qui suivent l'injection et correspondent le plus souvent à :

- des abcès aux sites d'injections liés à une mauvaise désinfection préalable.
- des hématomes en nappe apparaissent dans les heures qui suivent l'injection, plutôt localisés en péri-buccal, ou multiples lors de pratique de mésothérapie notamment au niveau jugal.

**Comment les éviter ?**

Une compression immédiate, l'application de froid les limitent. Ces hématomes peuvent durer plus de huit jours.

- des paresthésies, des risques d'allergie à l'anesthésique local sont très rares.

### 5.3. Les complications retardées

Elles peuvent apparaître un ou plusieurs jours après l'injection. Ces réactions sont localisées aux sites d'injections, et de différents types. Elles ont été décrites avec les deux types de produits résorbables que sont le collagène bovin et l'AH. Il s'agit :

- d'œdème parfois intense et induré, de granulomes non spécifiques érythémato-violacés,
- de folliculites indurées,
- de pseudokystes et nodules.

Ces réactions sont considérées comme aussi fréquentes avec les collagènes qu'avec les AH. Elles apparaissent une à quatre semaines après les injections (mais de cas plus tardifs ont été décrits avec le collagène). Elles peuvent apparaître lors de la première injection mais aussi après n'importe quelle injection ultérieure.

#### Comment y remédier ?

Leur traitement doit être instauré le plus rapidement possible. Dès l'apparition d'un œdème, un dermocorticoïde associé à une corticothérapie orale seront prescrits pour 15 jours. La restitution *ad integrum* est habituelle, mais elle peut demander quelques mois. Certains praticiens ont proposé l'incision des ces lésions ou leur ponction pour accélérer leur guérison, mais le risque de cicatrice est alors plus important (Ascher *et al.*, 2004).

Ces réactions locales retardées sont classées en deux types : immunologiques et non immunologiques.

Les réactions immunologiques de type hypersensibilité retardée, sont médiées par les lymphocytes T, spécifiques de l'antigène présent dans la préparation. Cette réponse immune spécifique serait due à la présence de différentes protéines (résidu aviaire, bactérie, impureté). Lors de l'injection intradermique une réaction de type hypersensibilité se produit avec prise en charge de l'antigène par les cellules de Langerhans ou les macrophages, présentation de l'antigène aux cellules immunocompétentes et induction chez des patients prédisposés de la production de lymphocytes T spécifiques de l'antigène. C'est la réaction d'hypersensibilité retardée classique.

Les réactions locales non immunologiques, à type de granulomes (Figure 33) à corps étranger mettent en jeu des cytokines inflammatoires produites par les cellules phagocytaires lors de l'injection du produit. Ces réactions non spécifiques provoquent un infiltrat autour de l'implant. D'autres réactions inflammatoires non spécifiques ont été décrites avec l'acide hyaluronique et seraient secondaires à la présence de résidus de réticulation ou de stabilisation voire des contaminants des implants.

Les produits injectables résorbables ont des effets secondaires peu gênants et surtout non durables, qui en font des produits très sûrs. Des effets secondaires plus graves ont été rapportés en cas d'injections de produits résorbables sur le site d'une injection préalable de produit non résorbable. Il s'agit de granulomes, dont le traitement est souvent partiel et difficile, il faut donc proscrire toute injection de produit lentement résorbable sur un site préalablement traité avec un produit, ou non résorbable. En effet, les granulomes ainsi déclenchés, sont, non seulement durables et particulièrement difficiles à traiter, mais leur responsabilité sera rattachée à la dernière injection. Cette dernière faisant office de « révélateur », c'est elle qui sera mise en cause (Ascher *et al.*, 2004).

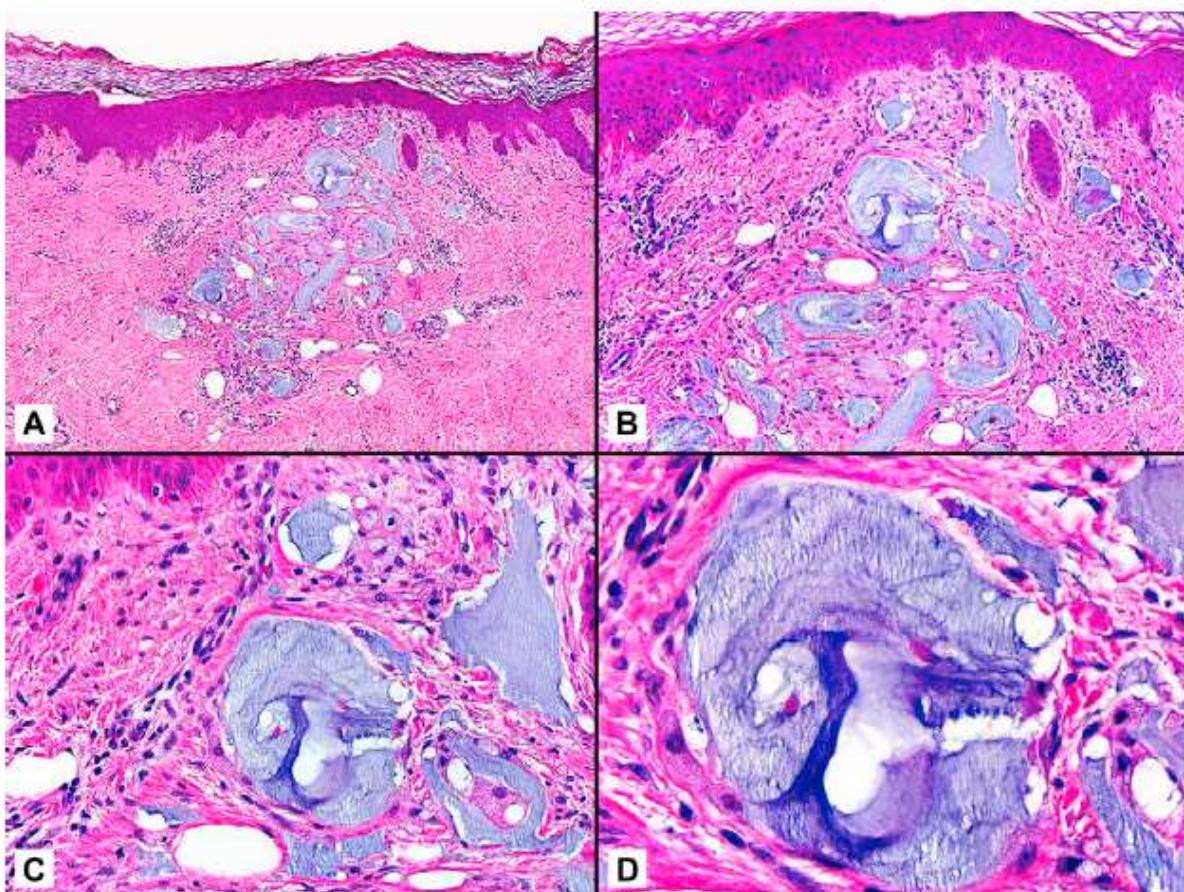


Figure 33 : Coupes histopathologiques de réaction de granulomatose par l'AH, coloration hématoxyline et éosine, d'après Requena *et al.* (2011).

A : Vue du derme (x20), B : Zoom montrant les dépôts basophiles de taille et de forme variable (injection d'AH)(x40), C : Histiocytes et cellules géantes polynucléées (x200), D : AH injecté (x400)

## 6. Législation des produits injectables à base d'AH

### 6.1. Mise sur le marché

Alors que les médicaments sont soumis à l'obtention d'une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché), les dispositifs médicaux sont soumis à l'obtention d'un marquage CE (Communauté Européenne). La procédure d'obtention du marquage est allégée.

En tant que dispositifs médicaux, les produits de comblement des rides doivent satisfaire aux exigences essentielles de la directive européenne 93/42/CEE modifiée par la 2007/47/CE, transposée en droit français par la loi du 18 janvier 1994 relative à la santé publique et à la protection sociale (Ascher *et al.*, 2004).

Ainsi, leurs fabricants doivent soumettre leurs produits à une évaluation de leur sécurité et performances par un organisme dit « notifié » c'est à dire habilité à délivrer un certificat CE, nécessaire au fabricant pour établir sa déclaration de conformité. Celle-ci lui permet d'apposer le marquage CE sur son produit. Ce type d'organisme est contrôlé par une autorité compétente nationale (en France l'Afssaps) au sein de l'UE (Union Européenne).

La démonstration de la conformité aux exigences essentielles doit comporter des données précliniques (tests *in vitro* et sur animal). Une évaluation clinique des performances et de la sécurité du dispositif doit également être réalisée.

Les données précliniques réalisées avant les essais sur l'homme permettent d'obtenir des éléments prédictifs des risques associés à l'utilisation des dispositifs médicaux mais sans garantir pour autant de sécurité absolue.

Des guides internationaux telles que des normes permettent notamment de lister les tests précliniques à réaliser par le fabricant pour garantir la sécurité et les performances du dispositif médical qu'il fabrique, telle que la norme ISO 10993 relative à la biocompatibilité des dispositifs médicaux.

La directive 2007/47/CE applicable au 21 mars 2010 renforce les exigences en matière d'évaluation clinique et insiste sur le recueil de données complémentaires après la mise sur le marché du produit.

Les données cliniques relative aux produits injectables de comblement des rides réalisées chez l'homme ne sont pas suffisantes pour garantir la sécurité d'utilisation du produit notamment à cause

d'effectifs insuffisants et de durée d'apparition tardive de certains effets secondaires graves tels que le granulome (quelques mois à plusieurs années). En effet, les deux paramètres limitants de ces types d'essai clinique sont l'effectif réduit des candidats recrutés et la durée limitée de l'essai.

Les essais cliniques réalisés sur les produits résorbables ont généralement une durée de 3 à 6 mois, un effectif de 150 personnes et les conséquences des ré-injections ne sont pas évaluées. En ce qui concerne les produits permanents, les effectifs sont en général identiques et la durée d'étude est très variable d'un produit à un autre mais sans dépasser en général trois ans, durée très inférieure à celle constatée lors de l'apparition de certains granulomes (5-10 ans).

Depuis 2011, l'Afssaps prépare un référentiel pour l'encadrement d'un essai clinique et le suivi post-mise sur le marché portant sur les produits injectables de comblement des rides afin notamment de mesurer l'incidence des effets indésirables.

## 6.2. Surveillance du marché

Les produits injectables de comblement de rides font partie des dispositifs médicaux présentant un potentiel élevé de risques pour la santé humaine (dispositifs de classe IIb/III). Ces classes de dispositifs font l'objet d'une communication de mise sur le marché sur le territoire français adressée à l'Afssaps par le fabricant, ou son mandataire, ou son fabricant.

**Tableau 14 : Classification des dispositifs médicaux**

<b>Classe</b>	<b>Caractérisation</b>
Classe de risque I	<b>Faible</b> degré de risque
Classe de risque IIa	Degré <b>moyen</b> de risque
Classe de risque IIb	Potentiel <b>élevé</b> de risque
Classe de risque III	Potentiel <b>très sérieux</b> de risque

Le fabricant est responsable de la mise sur le marché de son produit. Cependant, il est de la responsabilité des autorités sanitaires de l'UE de surveiller le marché des dispositifs médicaux.

De manière générale à tous les dispositifs médicaux, l'agence peut procéder à :

- des contrôles du marché sur dossiers des produits et se concentre notamment sur les nouveaux produits,
- l'inspection des fabricants,

- à des contrôles en laboratoire sur des prélèvements ou directement sur les produits du marché.

Dans le cas où l'agence constate qu'un dispositif peut compromettre la santé et/ou la sécurité des patients, utilisateurs ou le cas échéant d'autres personnes, elle peut prendre toutes les mesures utiles provisoires pour retirer ces dispositifs du marché, interdire ou restreindre leur mise sur le marché.

Un produit de comblement des rides conforme à la réglementation en vigueur portant le marquage CE relatif aux dispositifs médicaux comporte au moins :

- Sur l'emballage et la notice d'utilisations le pictogramme  associé à quatre chiffres qui définissent l'organisme ayant délivré le marquage CE du produit,
- Une notice d'utilisation.

### **6.3. Traçabilité et matériovigilance**

De par leur caractéristique invasive et le grand nomadisme des candidats dans le domaine de l'esthétisme, les produits injectables de comblement des rides doivent être tracés lors de chaque injection, comme le sont les dispositifs médicaux (décret n°2006-1497 et arrêté du 26 janvier 2007).

Le patient recevant une injection doit être informé des caractéristiques du produit injecté (nom commercial, fabricant, numéro de lot) ainsi que des circonstances de l'injection (médecin, lieu, indication et site d'injection).

La matériovigilance a pour objectif d'éviter la reproduction d'incidents et risques d'incidents graves mettant en cause des dispositifs médicaux. Il est important que les praticiens, qui ont l'obligation réglementaire de le faire, signalent ces incidents graves à l'Afssaps pour qu'elle puisse prendre les mesures préventives ou correctives appropriées. Les patients eux mêmes peuvent procéder à ce type de signalement auprès de l'agence mais le font le plus souvent par l'intermédiaire de leur médecin.

Ces signalements font l'objet d'une évaluation interne associant des experts externes et peuvent aboutir à objectiver la responsabilité directe du dispositif médical. L'Afssaps a alors pour mission d'alerter et d'assurer des mesures correctives : recommandations et retrait temporaire du marché si un danger grave a été établi et qu'il relie l'incident au dispositif médical.

## Conclusions générales

De par son caractère ubiquitaire, son hygroscopicité et ses propriétés viscoélastiques, l'AH est devenu un constituant majeur de nombreuses spécialités dans des domaines d'applications variés. Les premières sources en ce biopolymère étaient les tissus animaux. Pour pallier aux inconvénients de ces voies d'extraction, des procédés microbiens ont été développés. Ces derniers ont un rendement de production plus important, la taille de l'AH est plus supérieure et la qualité du polymère produit est meilleure.

La production d'AH par voie microbienne se fait en plusieurs étapes. La première étape consiste à choisir la souche adéquate permettant la production d'AH de haute masse moléculaire. Les souches sauvages pourront subir une mutagénèse afin d'obtenir des souches mutantes dites « super-encapsulées ». Les bactéries du genre *Streptococcus* et plus particulièrement l'espèce *Streptococcus zooepidemicus* sont étudiées et employées.

La seconde étape du procédé consiste à optimiser la composition du milieu de culture et les paramètres du procédé en adéquation avec la souche utilisée. Les bactéries du genre *Streptococcus* sont des bactéries lactiques très exigeantes en nutriments. Le milieu doit contenir des éléments de base (C, O, N, H, P et S), des vitamines, des minéraux, des acides aminés,... Plusieurs études (Im *et al.*, 2009 ; Armstrong et Johns, 2009 ; Kim *et al.*, 2006 ; Kim *et al.*, 1996) ont montré que l'optimisation des constituants et la modification des sources carbonées, azotées, l'addition d'acides aminés, de vitamines et de minéraux peuvent améliorer significativement la production et la masse moléculaire de l'AH. Les paramètres du procédé tels que le pH, la température, la vitesse d'agitation et d'aération sont tout aussi importants. Le pH optimal semble se situer autour de 7. Concernant la température, de nombreux auteurs préconisent de mettre en œuvre une température sub-optimale (par rapport à la croissance), autour de 32 °C. La production d'AH de haute masse moléculaire serait favorisée lorsque la production de biomasse serait limitée. Plusieurs auteurs s'accordent sur le fait qu'il existe une réelle compétition entre la croissance et la production d'AH. La vitesse d'agitation doit permettre une homogénéisation du mélange sans risquer la cassure des chaînes des polymères. La production d'AH étant faible en milieu anaérobie, l'apport d'oxygène et la vitesse d'aération permettent de l'améliorer. Actuellement, la production d'AH à petite ou moyenne échelle peut être facilement optimisée. Il apparaît nécessaire d'étudier des paramètres extrapolables pour envisager l'industrialisation à grande échelle d'un procédé microbiologique.

L'AH produit se retrouve sous deux formes dans le milieu de culture : sous forme libre et sous forme liée (AH capsulaire). La troisième étape consiste en la séparation et la purification du polymère. La séparation se fait par ajout d'un tensio-actif (souvent le SDS) dans le milieu de culture. Cette étape est suivie d'une centrifugation permettant de récupérer l'AH dans le surnageant. L'AH peut ensuite être quantifié. La méthode de Bitter et Muir (1962) ou dosage au carbazole est la méthode de référence. La purification va permettre d'éliminer les protéines contaminantes ainsi que les métabolites produits par les microorganismes. Le dosage qualitatif (ou détermination de la masse moléculaire) est souvent réalisée par chromatographie d'exclusion stérique (perméation de gel) couplée à un détecteur à indice de réfraction, mais aussi par corrélation avec la mesure de la viscosité.

La production d'AH de haute masse moléculaire est un enjeu notamment dans le domaine de la médecine cosmétique. Les hydrogels d'AH peuvent aussi être utilisés comme système injectable pour l'ingénierie tissulaire ainsi que dans la délivrance de médicaments ou de gènes. De part la potentielle complexation de molécules d'intérêt à ce polymère, les possibilités d'applications sont innombrables.

Aujourd'hui, de nombreux produits à base d'AH sont présents sur le marché. Quel que soit la spécialité, la connaissance approfondie de la pharmacologie et des résultats cliniques indiscutables sont nécessaires avant toute première utilisation. Il est souhaitable d'éviter surtout sur un même lieu d'injection, les mélanges, résorbables et non résorbables, mais il est possible d'utiliser deux résorbables de gammes différentes. Une enquête minutieuse des antécédents et des traitements antérieurs est primordiale.

La tolérance et le caractère résorbable de l'AH, en font un produit à effets secondaires limités. Son action de stimulation dermique (néocollagénèse et prolifération fibroblastique), pourrait jouer un rôle préventif dans le vieillissement cutané.

Dorénavant l'AH occupe une place de choix dans la recherche de l'implant idéal, immunologiquement inerte, lentement biodégradable, pour le comblement des rides et de nombreuses autres applications. Sa production par voie microbienne semble être la seule qui puisse fournir un produit de qualité, à « moindre » coût... tout du moins jusqu'à la germination d'une nouvelle révolution biotechnologique.



$$\frac{t_i - \frac{B}{t_i^2}}{t_0 - \frac{B}{t_0^2}}$$

#### Calcul des concentrations

Calculez la concentration  $c_1$  (exprimée en kg/m<sup>3</sup>) d'hyaluronate de sodium dans la solution à examiner (a) à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{m_{0p} \times x \times (100 - h) \times m_{1p} \times \rho_{25}}{100 \times 100 \times (m_{0p} + m_{0s}) \times (m_{1p} + m_{1s})}$$

$x$  = teneur pour cent en hyaluronate de sodium déterminée dans le dosage,

$h$  = perte à la dessiccation, en pour cent,

$\rho_{25}$  = 1005 kg/m<sup>3</sup> (masse volumique de la solution à examiner à 25 °C).

Calculez la concentration  $c_2$  (exprimée en kg/m<sup>3</sup>) d'hyaluronate de sodium dans la solution à examiner (b) à l'aide de l'expression suivante :

$$c_1 \times \frac{m_{2p}}{m_{2s} + m_{2p}}$$

Calculez la concentration  $c_3$  (exprimée en kg/m<sup>3</sup>) d'hyaluronate de sodium dans la solution à examiner (c) à l'aide de l'expression suivante :

$$c_1 \times \frac{m_{3p}}{m_{3s} + m_{3p}}$$

#### Calcul de la viscosité intrinsèque

Calculez la viscosité intrinsèque  $[\eta]$  à partir de la droite de régression établie par la méthode des moindres carrés suivant l'équation de Martin :

$$\log \left( \frac{\eta_r - 1}{c} \right) = \log [\eta] + k [\eta] c$$

L'antilogarithme décimal de l'ordonnée à l'origine est la viscosité intrinsèque, exprimée en m<sup>3</sup>/kg.

**Glycosaminoglycanes sulfatés** : au maximum 1 pour cent, si l'hyaluronate de sodium est obtenu par extraction à partir de crête de coq.

*Pour des raisons de sécurité, la manipulation de l'acide perchlorique à température élevée exige des précautions appropriées.*

**Solution à examiner.** Dans un tube à essai de 150 mm de longueur et d'un diamètre intérieur de 16 mm, introduisez une quantité d'hyaluronate de sodium équivalant à 50,0 mg de substance desséchée et dissolvez dans 1,0 mL d'*acide perchlorique R*.

**Solution témoin.** Dissolvez 0,149 g de *sulfate de sodium anhydre R* dans de l'*eau R* et complétez à 100,0 mL avec le même solvant. Prélevez 10,0 mL de cette solution et complétez à 100,0 mL avec de l'*eau R*. Transférez 1,0 mL de cette solution dans un tube à essai de 150 mm de longueur et d'un diamètre intérieur de 16 mm et évaporez dans un bloc chauffant à 90-95 °C, puis dissolvez le résidu dans 1,0 mL d'*acide perchlorique R*.

Bouchez tous les tubes avec de la laine de verre. Placez-les dans un bloc chauffant ou un bain d'huile de silicone maintenu à 180 °C et chauffez jusqu'à obtention de solutions incolores limpides (environ 12 h). Sortez les tubes et refroidissez-les à température ambiante. Ajoutez dans chaque tube 3,0 mL d'une solution de *chlorure de baryum R* à 33,3 g/L, bouchez et agitez énergiquement. Laissez reposer pendant 30 min, puis agitez à nouveau chaque tube et mesurez l'absorbance (2.2.25) à 660 nm, par comparaison à de l'*eau R*.

L'absorbance de la solution à examiner n'est pas supérieure à l'absorbance de la solution témoin.

**Acides nucléiques.** L'absorbance (2.2.25) de la solution S à 260 nm est au maximum de 0,5.

**Protéines** : au maximum 0,3 pour cent ; au maximum 0,1 pour cent si l'hyaluronate de sodium est destiné à la fabrication de préparations parentérales.

**Solution à examiner (a).** Dissolvez de l'hyaluronate de sodium dans de l'*eau R* de façon à obtenir une solution contenant une quantité d'hyaluronate de sodium équivalant à environ 10 mg de substance desséchée par millilitre.

**Solution à examiner (b).** Préparez un mélange à volumes égaux de solution à examiner (a) et d'*eau R*.

**Solutions de référence.** Préparez une solution mère d'*albumine bovine R* à 0,5 mg/mL dans de l'*eau R*. A partir de cette solution, préparez 5 dilutions en série contenant de 5 µg/mL à 50 µg/mL d'*albumine bovine R*.

Dans des tubes à essai contenant 2,5 mL d'*eau R* (blanc), ajoutez 2,5 mL de *solution cupri-tartrique R* récemment préparée, puis 2,5 mL de solution à examiner (a), de solution à examiner (b) ou d'une des solutions de référence, en homogénéisant après chaque addition. Après environ 10 min, ajoutez dans chaque tube 0,50 mL d'un mélange à volumes égaux de *réactif phosphomolybdotungstique R* et d'*eau R* préparé extemporanément, en homogénéisant après chaque addition. Après 30 min, mesurez l'absorbance (2.2.25) de chaque solution à 750 nm par comparaison au blanc. A partir de la courbe d'étalonnage obtenue avec les 5 solutions de référence, calculez la teneur en protéines des solutions à examiner.

**Chlorures (2.4.4)** : au maximum 0,5 pour cent.

Dissolvez 67 mg d'hyaluronate de sodium dans 100 mL d'*eau R*.

**Fer** : au maximum 80 ppm.

Spectrométrie d'absorption atomique (2.2.23, Procédé II).

**Solution à examiner.** Dissolvez une quantité d'hyaluronate de sodium équivalant à 0,25 g de substance desséchée dans 1 mL d'*acide nitrique R*, en chauffant au bain-marie. Refroidissez et complétez à 10,0 mL avec de l'*eau R*.

**Solutions de référence.** Préparez 2 solutions de référence de la même manière que la solution à examiner, mais en ajoutant respectivement 1,0 mL et 2,0 mL de *solution à 10 ppm de fer (Fe) R* après dissolution de l'hyaluronate de sodium.

**Source** : lampe à cathode creuse au fer en utilisant une largeur de fente spectrale de 0,2 nm.

**Longueur d'onde** : 248,3 nm.

**Dispositif d'atomisation** : flamme air-acétylène.

**Métaux lourds (2.4.8)** : au maximum 20 ppm ; au maximum 10 ppm si l'hyaluronate de sodium est destiné à la fabrication de préparations parentérales.

1,0 g d'hyaluronate de sodium satisfait à l'essai F. Préparez la solution témoin avec 2,0 mL de *solution à 10 ppm de plomb (Pb) R*.

**Perte à la dessiccation (2.2.32)** : au maximum 20,0 pour cent, déterminé à l'étuve à 100-110 °C sur du *pentoxyde de diposphore R* pendant 6 h sur 0,500 g d'hyaluronate de sodium.

**Contamination microbienne**

DGAT : critère d'acceptation 10<sup>2</sup> UFC/g (2.6.12). Effectuez l'essai sur 1 g d'hyaluronate de sodium.

**Endotoxines bactériennes (2.6.14)** : moins de 0,5 UI/mg, si l'hyaluronate de sodium est destiné à la fabrication de préparations parentérales sans autre procédé approprié d'élimination des endotoxines bactériennes ; moins de 0,05 UI/mg, si l'hyaluronate de sodium est destiné à la préparation de formes pharmaceutiques administrées par voie intra-oculaire ou intra-articulaire sans autre procédé approprié d'élimination des endotoxines bactériennes.

#### DOSAGE

Déterminez la teneur en acide glucuronique après réaction avec le carbazol comme décrit ci-après.

**Réactif A.** Dissolvez 0,95 g de tétraborate de disodium R dans 100,0 mL d'*acide sulfurique R*.

**Réactif B.** Dissolvez 0,125 g de carbazol R dans 100,0 mL d'*éthanol anhydre R*.

*Solution à examiner.* Préparez cette solution en triple.

Dissolvez 0,170 g d'hyaluronate de sodium dans de l'*eau R* et complétez à 100,0 g avec le même solvant. Prélevez 10,0 g de cette solution et complétez à 200,0 g avec de l'*eau R*.

*Solution mère de référence.* Dissolvez dans de l'*eau R* 0,100 g d'*acide D-glucuronique R*, préalablement desséché à masse constante sous vide sur du *pentoxyde de diphosphore R* (2.2.32), et complétez à 100,0 g avec le même solvant.

*Solutions de référence.* Préparez 5 dilutions de la solution mère de référence, de teneur en *acide D-glucuronique R* allant de 6,5 µg/g à 65 µg/g.

Placez dans de l'eau glacée 25 tubes à essai numérotés de 1 à 25. Introduisez dans des tubes séparés, à raison de 3 tubes par solution, 1,0 mL des 5 solutions de référence (tubes 1 à 15) et 1,0 mL des 3 solutions à examiner (tubes 16 à 24) ; dans le tube 25, placez 1,0 mL d'*eau R* (blanc). Ajoutez dans chaque tube 5,0 mL de réactif A récemment préparé et préalablement refroidi dans de l'eau glacée. Fermez hermétiquement les tubes avec des capuchons de plastique, agitez, et placez au bain-marie pendant exactement 15 min. Refroidissez dans de l'eau glacée, puis ajoutez dans chaque tube 0,20 mL de réactif B. Refermez les tubes, agitez et placez à nouveau au bain-marie pendant exactement 15 min. Refroidissez à température ambiante et mesurez l'absorbance (2.2.25) des solutions à 530 nm, par comparaison au blanc.

A partir de la courbe d'étalonnage obtenue avec la moyenne des valeurs de l'absorbance lues pour chacune des solutions de référence, calculez la moyenne des teneurs en acide D-glucuronique des solutions à examiner.

Calculez la teneur pour cent en hyaluronate de sodium à l'aide de l'expression suivante :

$$\frac{c_g}{c_s} \times Z \times \frac{100}{100 - h} \times \frac{401,3}{194,1}$$

$c_g$  = moyenne des concentrations d'acide D-glucuronique dans les solutions à examiner, en milligrammes par gramme,

$c_s$  = moyenne des concentrations de substance à examiner dans les solutions à examiner, en milligrammes par gramme,

$Z$  = teneur pour cent (déterminée) en  $C_6H_{10}O_7$  de l'*acide D-glucuronique R*,

$h$  = perte à la dessiccation, en pour cent,

401,3 = masse moléculaire relative d'une unité disaccharidique,

194,1 = masse moléculaire relative de l'acide glucuronique.

#### CONSERVATION

En récipient étanche, à l'abri de la lumière et de l'humidité. Si la substance est stérile, elle est conservée en récipient stérile, étanche, à fermeture inviolable.

#### ÉTIQUETAGE

L'étiquette indique :

- la viscosité intrinsèque,
- l'origine de la substance,
- l'utilisation prévue de la substance,
- dans les cas appropriés, que la substance est appropriée à l'administration parentérale à l'exclusion de la voie intra-articulaire,
- dans les cas appropriés, que la substance est appropriée à l'administration parentérale y compris la voie intra-articulaire,
- dans les cas appropriés, que la substance est appropriée à l'administration par voie intra-oculaire.

**Annexe 2 : Liste des produits injectables de comblement des rides déclarés en France, d'après l'Afssaps (2010)**

LISTE DES PRODUITS INJECTABLES DE COMBLEMENT DES RIDES DECLARÉS EN FRANCE (octobre 2010). Les produits suivants sont indiqués dans le comblement des rides du visage.				
*R: résorbable (3-6 mois), LR: lentement résorbable (6-24 mois), NR: non résorbable (définitif)				
Dénomination commerciale	Fabricant	Composition	*R-LR-NR	Date de déclaration à l'Afssaps
AchHyal®	TEDEC-MEIJI FARMA SA	acide hyaluronique	R	13/06/2005
Acide hyaluronique HYALURONICA-1®	Vital Esthétique	acide hyaluronique	R	19/10/2009
Acide hyaluronique HYALURONICA-2®	Vital Esthétique	acide hyaluronique	R	19/10/2009
DERMYAL 18®	Hyal Intertrade	acide hyaluronique	R	09/06/2009
DERMYAL 24R®	Hyal Intertrade	acide hyaluronique	R	09/06/2009
DERMYAL 32HR®	Hyal Intertrade	acide hyaluronique	R	09/06/2009
ESTHELIS SOFT	ANTEIS SA	acide hyaluronique		12/05/2010
ESTHELIS BASIC	ANTEIS SA	acide hyaluronique		12/05/2010
FORTELIS EXTRA®	ANTEIS SA	acide hyaluronique	R	28/02/2009
GLYTONE Professional 2® Rides superficielles	Pierre Fabre Dermo-Cosmetique	acide hyaluronique	R	15/05/2008
HYALUDERM 2%®	LCA Pharmaceutical	acide hyaluronique	R	03/08/2009
HYALUDERM 2,5%®	LCA Pharmaceutical	acide hyaluronique	R	03/08/2009
IDUNE® 2,0%	GENEVRIER	acide hyaluronique	R	28/06/2010
IDUNE® 1,6%	GENEVRIER	acide hyaluronique	R	29/06/2010
IDUNE® 0,8%	GENEVRIER	acide hyaluronique	R	16/04/2010
ISOGEL®class I, II, III	Laboratoires FILORGA	acide hyaluronique	R	10/10/2006
JOLIDERMIS 24®	ANTEIS SA	acide hyaluronique	R	28/02/2009
JOLESS DEFINE	HYALTECH Limited	acide hyaluronique	R	15/09/2010
JOLESS BALANCE	HYALTECH Limited	acide hyaluronique	R	14/05/2010
JOLESS SOFT	HYALTECH Limited	acide hyaluronique	R	15/09/2010
JOLIDERMIS 24+®	ANTEIS SA	acide hyaluronique	R	12/05/2010
JOLIDERMIS 18®	ANTEIS SA	acide hyaluronique	R	12/05/2010
LISSANT-YAL 1.6 %®	Laboratoires PHARMY 2	acide hyaluronique	R	14/09/2009
LISSANT-YAL 2.2 %®	Laboratoires PHARMY 2	acide hyaluronique	R	14/09/2009
M-HA18®	FILORGA	acide hyaluronique	R	02/04/2010
Perfectha Derm® - PD	OBVIELINE	acide hyaluronique	R	05/10/2007
Perfectha Derm® Deep - PDD	OBVIELINE	acide hyaluronique	R	05/10/2007
Perfectha Derm® Fine Lines PDFL	OBVIELINE	acide hyaluronique	R	05/10/2007
PREVELLE®	GENZYME Biosurgery	acide hyaluronique	R	13/02/2008
PRINCESS® Filler	CROMA GmbH	acide hyaluronique	R	02/12/2008
PRINCESS® RICH	CROMA GmbH	acide hyaluronique	R	02/06/2009
PURAGEN®	Mentor Biopolymers Ltd	acide hyaluronique	R	13/02/2008
RENOFILL Deeply Correction®	Laboratoires RENOPHASE	acide hyaluronique	R	28/05/2009
RENOFILL Perfectly Volume®	Laboratoires RENOPHASE	acide hyaluronique	R	28/05/2009
RENOFILL Softy Correction®	Laboratoires RENOPHASE	acide hyaluronique	R	28/05/2009
REVANESSE®	Prolenium Medical Technologies Inc	acide hyaluronique	R	09/09/2009
REVANESSE® Lips®	Prolenium Medical Technologies Inc	acide hyaluronique	R	09/09/2009
REVANESSE® Pure	Prolenium Medical Technologies Inc	acide hyaluronique	R	09/09/2009
REVANESSE® Ultra	Prolenium Medical Technologies Inc	acide hyaluronique	R	09/09/2009
R-FINE®	HYALTECH Limited	acide hyaluronique	R	29/09/2006

LISTE DES PRODUITS INJECTABLES DE COMBLEMENT DES RIDES DECLARÉS EN FRANCE (octobre 2010). Les produits suivants sont indiqués dans le comblement des rides du visage.				
Solution viscoélastique intradermique PRINCESS VOLUME®	CROMA GmbH	acide hyaluronique	R	16/10/2009
STYLAGE HydroMax®	Laboratoires VIVACY	acide hyaluronique	R	29/05/2009
STYLAGE S 0,4ml®	Laboratoires VIVACY	acide hyaluronique	R	03/10/2008
STYLAGE XL®	Laboratoires VIVACY	acide hyaluronique	R	11/04/2008
STYLAGE® L	Laboratoires VIVACY	acide hyaluronique	R	11/04/2008
STYLAGE® Hydro	Laboratoires VIVACY	acide hyaluronique	R	11/04/2008
STYLAGE® M	Laboratoires VIVACY	acide hyaluronique	R	11/04/2008
Stylage® M Lidocaïne	Laboratoires VIVACY	acide hyaluronique	R	25/01/2010
STYLAGE® S	Laboratoires VIVACY	acide hyaluronique	R	11/04/2008
Stylage® S Lidocaïne	Laboratoires VIVACY	acide hyaluronique	R	25/01/2010
Stylage® Special Lips	Laboratoires VIVACY	acide hyaluronique	R	16/10/2008
Stylage® Spécial Lips Lidocaïne	Laboratoires VIVACY	acide hyaluronique	R	25/01/2010
Succeev one	Hyal Intertrade	acide hyaluronique	R	08/04/2010
Succeev two	Hyal Intertrade	acide hyaluronique	R	08/04/2010
Succeev three	Hyal Intertrade	acide hyaluronique	R	08/04/2010
SURGIDERM 18®	Allergan	acide hyaluronique	R	03/07/2008
SURGILIFT Plus®	Allergan	acide hyaluronique	R	03/07/2008
TEOSYAL 27G Deep Lines Single®	TEOXANE SA	acide hyaluronique	R	29/03/2007
TEOSYAL 27G Deep Lines®	TEOXANE SA	acide hyaluronique	R	18/05/2006
TEOSYAL 30G Global Action (2x1ml)®	TEOXANE SA	acide hyaluronique	R	18/05/2006
TEOSYAL 30G Global Action Single (1ml)®	TEOXANE SA	acide hyaluronique	R	29/03/2007
TEOSYAL 30G Touch Up®	TEOXANE SA	acide hyaluronique	R	18/05/2006
TEOSYAL First Lines®	TEOXANE SA	acide hyaluronique	R	18/05/2006
TEOSYAL Kiss Single®	TEOXANE SA	acide hyaluronique	R	29/03/2007
TEOSYAL Kiss®	TEOXANE SA	acide hyaluronique	R	18/05/2006
TEOSYAL Ultra Deep Single®	TEOXANE SA	acide hyaluronique	R	29/03/2007
TEOSYAL Ultra Deep®	TEOXANE SA	acide hyaluronique	R	18/05/2006
VARIODERM MESOLIFT	ADODERM GMBH	acide hyaluronique	R	19/05/2010
VISAGEL®	SURGICAL Concepts GmbH	acide hyaluronique	R	23/03/2006
X-HA3®	Laboratoires FILORGA	acide hyaluronique	R	23/03/2009
X-HA volume®	Laboratoires FILORGA	acide hyaluronique	R	23/03/2009
CONJONCTYL®	SEDIFA Laboratoires	Monomethyltrisilanol orthohydroxy benzoate de sodium	LR	24/05/2004
GLYTONE Professional 3® Rides moyennes   profondes	Pierre Fabre Dermo-Cosmétique	acide hyaluronique	LR	15/05/2008
GLYTONE Professional 4® Volumes et dépressions profondes	Pierre Fabre Dermo-Cosmétique	acide hyaluronique	LR	25/08/2009
JUVEDERM ULTRA 3®	Allergan	acide hyaluronique	LR	26/12/2007
JUVEDERM ULTRA 4®	Allergan	acide hyaluronique	LR	26/12/2007
JUVEDERM ULTRA LIP®	Allergan	acide hyaluronique	LR	26/12/2007

LISTE DES PRODUITS INJECTABLES DE COMBLEMENT DES RIDES DECLARÉS EN FRANCE (octobre 2010). Les produits suivants sont indiqués dans le comblement des rides du visage.				
JUVEDERM® ULTRA SMILE®	Allergan	acide hyaluronique	LR	07/04/2008
JUVEDERM® VOLUMA	Allergan	acide hyaluronique	LR	07/04/2008
NEW-FILL®	DERMIK LABORATORIES (a business of SANOFI- AVENTIS US LLC)	acide polylactique	LR	28/02/2005
RADIESSE®	MERZ Aesthetics Inc	hydroxyapatite de Calcium	LR	07/10/2010
Restylane Lidocaïne®	Q-MED AB	acide hyaluronique	LR	27/09/2009
Restylane Perlane Lidocaïne®	Q-MED AB	acide hyaluronique	LR	27/09/2009
Restylane Perlane®	Q-MED AB	acide hyaluronique	LR	27/09/2005
Restylane SubQ®	Q-MED AB	acide hyaluronique	LR	27/09/2005
Restylane Touch®	Q-MED AB	acide hyaluronique	LR	27/09/2005
Restylane Vital "Pen Injector" (Stylo d'injection)®	Q-MED AB	acide hyaluronique	LR	03/12/2009
Restylane Vital Light®	Q-MED AB	acide hyaluronique	LR	25/05/2009
Restylane Vital Light- Injector®	Q-MED AB	acide hyaluronique	LR	25/05/2009
Restylane Vital White®	Q-MED AB	acide hyaluronique	LR	27/08/2008
Restylane Vital White- Injector®	Q-MED AB	acide hyaluronique	LR	18/12/2008
Restylane Vital®	Q-MED AB	acide hyaluronique	LR	27/09/2005
Restylane®	Q-MED AB	acide hyaluronique	LR	27/09/2005
SCULPTRA®	DERMIK LABORATORIES (a business of SANOFI- AVENTIS US LLC)	acide polylactique	LR	06/12/2004
SURGIDERM 24XP®	Allergan	acide hyaluronique	LR	03/07/2008
SURGIDERM 30®	Allergan	acide hyaluronique	LR	03/07/2008
SURGIDERM 30XP®	Allergan	acide hyaluronique	LR	03/07/2008
SURGILIPS®	Allergan	acide hyaluronique	LR	03/07/2008
VARIODERM	ADODERM GmbH	acide hyaluronique	LR	19/05/2010
VARIODERM plus	ADODERM GmbH	acide hyaluronique	LR	19/05/2010
VARIODERM lips & medium	ADODERM GmbH	acide hyaluronique	LR	19/05/2010
VARIODERM Fine Line	ADODERM GmbH	acide hyaluronique	LR	19/05/2010
X-HA volume®	FILORGA	acide hyaluronique	LR	02/04/2010
REDEXIS®	Prolenium Medical Technologies Inc	Microbille de dextran+ Acide hyaluronique	NR	09/09/2009
AQUAMID®	Ferrosan A/S	polyacrylamide	NR	13/06/2005
Les produits suivants ne sont plus sur le marché français				
Dénomination commerciale	Fabricant	Composition	*R-LR-NR	Année d'arrêt de commercialisation
NOVABEL®	MERZ Pharmaceuticals GmbH	alginat	LR	2010
OUTLINE Fine/OUTLINE Original/OUTLINE Ultra	PROCYTECH	polyacrylamide modifié	LR	2008
EVOLUTION	PROCYTECH	Polymères acryliques (polyacrylamide)	NR	2008
NOVASOFT	ADODERM GmbH	acide hyaluronique + Particules Polymères (poly(méthacrylate d'hydroxyéthyle-co-méthacrylate d'éthyle) (PHEMA-co-EMA)	NR	2008
DERMALIVE/DERMADEEP	DERMATECH	acide hyaluronique + Particules Polymères (poly(méthacrylate d'hydroxyéthyle-co-méthacrylate d'éthyle) (PHEMA-co-EMA)	NR	2007

## Bibliographie

Akdamar H.A., Sarıözlü N.Y., Özcan A.A., Ersöz A., Denizli A., Say R. (2009). Separation and purification of hyaluronic acid by glucuronic acid imprinted microbeads. *Materials Science and Engineering C* 29, 1404-1408

Armstrong D.C., Johns M.R. (1997). Culture conditions affect the molecular weight properties of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2759-2764

Asari A., Miyauchi S. (2000). Medical Application of hyaluronan. *Glycoforum - Hyaluronan Today*

Ascher B., Cerceau M., Baspeyras M., Rossi B. (2004). Soft tissue filling with hyaluronic acid. *Annales de chirurgie plastique esthétique* 49, 465-485

Barbucci R., Lamponi S., Borzacchiello A., Ambrosio L., Fini M., Torricelli P., Giardino R. (2002). Hyaluronic acid hydrogel in the treatment of osteoarthritis. *Biomaterials* 23, 4503-4513

Bastow E.R., Byers S., Golub S.B., Clarkin C.E., Pitsillides A.A. , Fosang A.J. (2008). Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone Cell. Mol. Life Sci. 65, 395-413

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2009). Second Edition, volume 3, The Firmicutes

Blank L.M., Hugenholtz P., Nielsen L.K. (2008). Evolution of the hyaluronic acid synthesis (has) operon in *Streptococcus zooepidemicus* and other pathogenic *Streptococci*. *Journal of Molecular Evolution* 67, 13-22

Boas N.F. (1949). Isolation of hyaluronic acid from the cock's comb

Brown S.H., Pummill P.E. (2008). Recombinant production of hyaluronic acid. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 9, 239-241

Burdick J.A., Prestwich G.D. (2011). Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications. *Adv. Mater.*, 23, 41-56

Carlino S., Magnette F. (2002). Process for purifying high molecular weight hyaluronic acid. BREVET AMÉRICAIN n° US 6 489 467 B1

Chaabane A. (2010). Production d'acide hyaluronique. Rapport bibliographique sur l'acide hyaluronique

Chen W.Y. et Abatangelo G. (1999). Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair Regen.* 7, 79-89

Chen W.Y., Marcellin E., Hung J., Nielsen L.K. (2009). Hyaluronan molecular weight is controlled by UDP-N-acetylglucosamine concentration in *Streptococcus zooepidemicus*. *Journal of Biological Chemistry* 284, 18007-18014

Chien L.J., Lee C.K. (2007). Enhanced hyaluronic acid production in *Bacillus subtilis* by coexpressing bacterial hemoglobin. *Biotechnology Progress* 23, 1017-1022

Chien L.J., Lee C.K. (2007). Hyaluronic acid production by recombinant *Lactococcus lactis*. *Appl Microbiol Biotechnol* 77, 339-346

Chong B.F., Nielsen L.K. (2003). Aerobic cultivation of *Streptococcus zooepidemicus* and the role of NADH oxidase. *Biochemical Engineering Journal*, 16, 153-162

Cornelis P., Wei Q., Andrews S.C., Vinckx T. (2011). Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics* 3, 540-549

Croce M.A., Dyne K., Boraldi F. (2001). Hyaluronan affects protein and collagen synthesis by in vitro human skin fibroblasts. *Tissue Cell*

Csoka A.B., Frost G.I., Stern R. (2001). The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol.* 20, 499–508

Darke A., Finer E.G., Moorhouse R., Rees D.A. (1975). Studies of hyaluronate solutions by nuclear magnetic relaxation measurements. Detection of covalently-defined, stiff segments within the flexible chains. *J. Mol. Biol.* 99, 477-486

Don M.M., Shoparwe N.F. (2009). Kinetics of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* considering the effect of glucose. *Biochemical Engineering Journal*

Frank C., Shrive N., Hiraoka H., Nakamura N., Kaneda Y., Hart D. (1999). Optimisation of the Biology of Soft Tissue Repair. *Journal of Science and Medicine in Sport* 2, 190-210

Duan X.J., Yang L., Zhang X., Tan W.S. (2008). Effect of oxygen and shear stress on molecular weight of hyaluronic acid produced by *streptococcus zooepidemicus*. *Journal of microbiology biotechnology* 18, 718-724

Elisseeff J., Anseth K., Sims D., McIntosh W. , Randolph M. , Langer R. (1999). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 96 , 3104

Fong-Chong B., Blank L.M., McLaughlin R., Nielsen L.K. (2004). Microbial hyaluronic acid production. *Applied microbiology and biotechnology* 66, 341-351

Fong-Chong B., Nielsen L.K. (2003). Amplifying the cellular reduction potential of *Streptococcus zooepidemicus*. *Journal of Biotechnology* 100, 33-41

Fruminet J. (2010). Rapport de stage

George J., Stern R. (2004). Serum hyaluronan and hyaluronidase: Very early markers of toxic liver injury. *Clinica Chimica Acta* 348, 189-197

Girish K.S., Kemparaju K. (2007). The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: A biological overview. *Life Sciences* 80, 1921-1943

Goa K.L., Benfield P. (1994). Hyaluronic acid. Review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing. *Drugs* 47, 536-66

Gözke G., Posten C. (2010). Electrofiltration of biopolymers. *Food Engineering Reviews* 2, 131-146

Han H.Y., Jang S.H., Kim E.C., Park J.K., Han Y.J., Lee C., Park H.S., Kim Y.C., Park H.J. (2004). Microorganismes produisant de l'acide hyaluronique et procédé de purification de l'acide hyaluronique. BREVET INTERNATIONAL n° WO 2004/016771

Hardingham T.E. et Fosang A.J. (1992). Proteoglycans : many lbrms and many functions. *FASEB. J.* 6, 861-870

Hasegawa S., Nagatsuru M., Shibutani M., Yamamoto S., Hasebe S. (1999). Productivity of concentrated hyaluronic acid using a Maxblend© fermentor. *Journal of bioscience and bioengineering* 88, 68-71

Hong S.S., Chen J., Zhang J.G., Tao Y.C., Liu L.Y. (2004). Purification and structure identification of hyaluronic acid. *Chinese chemical letters* 15, 811-812

Huang W-C., Chen S-J., Chen T-L. (2008). Production of hyaluronic acid by repeated batch fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 40, 460-464

Hynes W.L., Dixon A.R., Walton S.L., Aridgides L.J. (2000). The extracellular hyaluronidase gene (hyIA) of *Streptococcus pyogenes*. *FEMS Microbiology Letters* 184, 109-112

Im J-H., Song J-M., Kang J-H., Kang D-J. (2009). Optimization of medium components for high-molecular-weight hyaluronic acid production by *Streptococcus* sp. ID9102 via a statistical approach. *J Ind Microbiol Biotechnol* 36, 1337-1344

Itano N., Sawai T., Yoshida M., Lenas P., Yamada Y., Imagawa M., Shinomura T., Hamaguchi M., Yoshida Y., Ohnuki Y., Miyauchi S., Spicer A. P., McDonald J. A. and Kimata K. (1999). Three isoforms of mammalian hyaluronan synthases have distinct enzymatic properties. *J. Biol. Chem.* 274, 25085-25092

Jaggannath S., Ramachandran K.B. (2009). Influence of competing metabolic processes on the molecular weight of hyaluronic acid synthesized by *Streptococcus zooepidemicus*. *Biochemical Engineering Journal* 48, 148-158

Jedrzejas M.J. (2000). Structural and functional comparison of polysaccharide-degrading enzymes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 35, 221-251

Jedrzejas M.J., Stern R. (2005). Structures of vertebrate hyaluronidases and their unique enzymatic mechanism of hydrolysis. *Proteins (Structure Function and Bioinformatics)* 61, 227-238

Kang D.Y., Kim W-S., Heo I.S., Park Y.H., Lee S. (2010). Extraction of hyaluronic acid (HA) from rooster comb and characterization using flow field-flow fractionation (FFFF) coupled with multiangle light scattering (MALS). *J. Sep. Sci.* 33, 3530-3536

Karousou E., Kamiryo M., Skandalis S.S., Ruusala A., Asteriou T., Passi A., Yamashita H., Hellman U., Hedin C.H., Hedin P. The activity of Hyaluronan Synthase 2 is regulated by Dimerization and Ubiquitination. *Journal of Biological Chemistry* 285, 23647-23654

Ke C., Qiao D., Gan D., Sun Y., Ye H., Zeng X. (2008). Antioxydant activity in vitro and in vivo of the capsule polysaccharides from *Streptococcus equi* ssp *zooepidemicus*. *Carbohydrate Polymers* 75, 677-682

Kim J.H., Yoo S.J., Oh D.K., Kneon Y.G., Park D.W., Lee C.H., Gil G.H. (1996). Selection of a *Streptococcus equi* mutant and optimization of culture conditions for the production of high molecular weight hyaluronic acid. *Enzyme and Microbial Technology* 19, 440-445

Kim S.J., Park S.Y., Kim C.W. (2006). A novel approach to the production of hyaluronic acid by *Streptococcus zooepidemicus*. *Journal of Microbiology Biotechnology*, 16, 1849-1855

Kim K.S., Park S.J., Yang J.A., Jeon J.H., Bhang S.H., Kim B.S., Hahn S.K. (2011). Injectable hyaluronic acid-tyramine hydrogels for the treatment of rheumatoid arthritis. *Acta Biomaterialia* 7, 666-674

Kirwan J. (2001). Is there a place for intra-articular hyaluronate in osteoarthritis of the knee? *Knee* 8, 93-101

Laroui H. (2007). Nanosphères polymères à couverture de hyaluronate pour la délivrance ciblée de molécules actives dans le traitement des affections du cartilage. Thèse de docteur d'université.

Laurent T.C., Balazs E.A. (1970). Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix, Structure of hyaluronic acid

Liu L., Du G., Chen J., Wang M., Sun J. (2009). Comparative study on the influence of dissolved oxygen control approaches on the microbial hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus*.

Liu L., Du G., Chen J., Zhu Y., Wang M., Sun J. (2008). Microbial production of low molecular weight hyaluronic acid by adding hydrogen peroxide and ascorbate in batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*. *Bioresource Technology* 100, 362-367

Liu L., Sun J., Zhang D., Du G., Chen J., Xu W. (2008). Culture conditions optimization of hyaluronic acid production by *Streptococcus zooepidemicus* based on radial basis function neural network and quantum-behaved particle swarm optimization algorithm. *Enzyme and Microbial Technology* 44, 24-32

Liu L., Du G., Chen J., Wang M., Sun J. (2008). Influence of hyaluronidase addition on the production of hyaluronic acid by batch culture of *Streptococcus zooepidemicus*. *Food Chemistry* 110, 923-926

Luo Y., Ziebell M.R., Prestwich G.D. (2000). A hyaluronic acid - Taxol antitumor bioconjugate targeted to cancer cells. *Biomacromolecules* 1, 208-218

Magdalou J., Netter P., Fournel-Gigleux S., Ouzzine M. (2008). Agrecan and articular cartilage : Assessment of glycosyltransferases for the restoration of cartilage matrix in osteoarthritis. *Journal de la Société de Biologie* 202, 281-288

Matsubara C., Kajiwara M., Akasaka H., Haze S. (1991). Carbon-13 nuclear magnetic resonance studies on the biosynthesis of hyaluronic acid. *Chem Pharm Bull* 39, 2446-2448

Menzel E., Farr C. (1998). *Cancer Letters* 131, 3-11

Meyer K., Palmer J.W. (1934). The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem* 107, 629-34  
Miyazaki T., Yomota C., Okada S. (1998). Change in molecular weight of hyaluronic acid during measurement with a cone-plate rotational viscometer. *Journal of Applied Polymer Science* 67, 2199-2206

Morimoto K., Yamaguchi H., Iwakura Y., Morisaka K., Ohashi Y., Nakai Y. (1991). Effects of viscous hyaluronate-sodium solutions on the nasal absorption of vasopressin and an analogue. *Pharmaceutical Research* 8, 471-474

Morra M. (2005). Engineering of biomaterials surfaces by hyaluronan. *Biomacromolecules* 6, 1205-1223

Nair S., Remya N.S., Remya S., Nair P.D. (2011). A biodegradable in situ injectable hydrogel based on chitosane and oxidized hyaluronic acid for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers* 85, 838-844

Noble P.W. (2002). Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biology* 21, 25-29

Nykopp T.K., Rilla K., Tammi M.I., Tammi R.H., Sironen R., Hämäläinen K., Kosma V-M., Heinonen S., Anttila M. (2010). Hyaluronan synthases (HAS1-3) and hyaluronidases (HYAL1-2) in the accumulation of hyaluronan in endometrioid endometrial carcinoma. <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/512>

Ogrodowski C.S., Hokka C.O., Santana M.H.A. (2005). The Effects of the Addition of Lysozyme and Aeration on the Formation and the Rheological Properties of the Product. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121-124

Olutoye O.O., Barone E.J., Yager D.R., Uchida T., Cohen I.K., Diegelmann, R.R. (1997). Hyaluronic acid inhibits platelet function: implications in scarless healing. *J. Pediatr. Surg.* 32, 1037-1040

Prestwich G.D., Marecak D.M., Marecek J.F., Vercruyse K.P., Ziebell M.R. (1997). Controlled chemical modification of hyaluronic acid : synthesis, applications, and biodegradation of hydrazide derivatives. *Journal of Controlled Release* 53, 93-103

Price R.D., Berry M.G., Navsaria H.A. (2007). Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence. *Journal of plastic, reconstructive and aesthetic surgery* 60, 1110-1119

Rah M.J. (2011). A review of hyaluronan and its ophthalmic applications. *Optometry* 82, 38-43

Rangaswamy V., Jain D. (2008). An efficient process for production and purification of hyaluronic acid from *Streptococcus equi ssp zooepidemicus*. *Biotechnol Lett* 30, 493-496

Rangaswamy V., Santosh V., Dharmendra J., Nataraj V., Velankar H., Kapat A. (2008). Efficient process for purification of high molecular weight hyaluronic acid. *Brevet international n° WO 2008/035372 A2*

Requena L., Requena C., Christensen L., Zimmermann U.S., Kutzner H., Cerroni L. (2011). Adverse reactions to injectable soft tissue fillers. *J Am Acad Dermatol* , 1-34

Rinaudo M. (2007). Corrosion Engineering. *Science and Technology*

Romagnoli M., Belmontesi M. (2008). Hyaluronic acid-based fillers: theory and practice. *Clinics in Dermatology* 26, 123-159

Schanté C.E., Zuber G., Herlin C., Vandamme T.F. (2011). Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers* 85, 469-489

Schiller J., Fuchs B., Arnhold J., Arnold K. (2003). Contribution of reactive oxygen species to cartilage degradation in rheumatic diseases : Molecular pathways, diagnosis and potential therapeutic strategies. *Curr. Med. Chem.* 10, 2123-2145

Seidlits S.K., Drinnan C.T., Petersen R.R., Shear J.B., Suggs L.J., Schmidt C.E. (2011). Fibronectin-hyaluronic acid composite hydrogels for three-dimensional endothelial cell culture. *Acta Biomaterialia* 7, 2401-2409

Shiedline A., Bigelow R., Christopher W., Arbari S., Yang L., Maier R.V., Wainwright N., Childs A., Miller R.J. (2004). Evaluation of hyaluronan from different sources : *Streptococcus zooepidemicus*, rooster comb, bovine vitreous, and human umbilical cord. *Biomacromolecules* 5, 2122-2127

Sousa A.S., Guimaraes A.P., Gonçalves C.V., Silva I.J., Cavalcante C.L., Azevedo D.C.S. (2009). Purification and characterization of microbial hyaluronic acid by solvent precipitation and size-exclusion chromatography. *Separation science technology* 44, 906-923

Stahl S. (2003). Method and means for the production of hyaluronic acid. *Brevet américain n° US 6 537 795 B1*

Stern R., Maibach H.I. (2008). Hyaluronan in skin : aspects of aging and its pharmacologic modulation. Clinics in Dermatology 26, 106-122

Surini S., Akiyama H., Morishita M., Nagai T., Takayama, K. (2003). Release phenomena of insulin from an implantable device composed of a polyion complex of chitosan and sodium hyaluronate. Journal of Controlled Release 90, 291-301

Szarpak A. (2009). Layer-by-Layer capsules of hyaluronic acid as potential drug carriers: synthesis, characterization and manipulating the properties. Thèse de docteur d'université.

Tokita Y., Okamoto A. (1995). Polymer Degradation and Stability 48, 269-273

Tritz-Schiavi J., Charif N., Henrionnet C., De Isla N., Bensoussan D., Magdalou J., Benkirane-Jessel N., Huselstein C. (2010). Original approach for cartilage tissue engineering with mesenchymal stem cells. Bio-Medical Materials and Engineering 20, 167-174

Van Tomme S.R., Storm G., Hennink W.E. (2008). In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. International Journal of Pharmaceutics 355, 1-18

Weigel J.A., Weigel P.H. (2003). Characterization of the recombinant rat 175-kDa hyaluronan receptor for endocytosis (HARE). J. Biol. Chem. 278, 42802-42811

Weigel P., De Angelis P. (2005). Organisms for large scale hyaluronan production. Industrial Bioprocessing 27

Wessels M.R., Moses A.E., Goldberg J.B., Dicesare T.J. (1991). Hyaluronic acid capsule is a virulence factor for mucoid group A *Streptococci*. Proc. Natl. Sci. 88, 8317-8321

West D.C., Hampson I.N., Arnold F., *et al.* (1991). Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. Science 228, 1324-6

Winter W.T., Smith P.J.C., Arrott S. (1975). Hyaluronic acid: structure of a fully extended 3-fold helical sodium salt and comparison with the less extended 4 fold helical forms. J.Mol.Biol. 99, 219-235

Yu H., Li Q., Zhou X., Kolosov V.P., Perelman J.M. (2011). Role of hyaluronan and CD44 in reactive oxygen species-induced mucus hypersecretion. Mol Cell Biochem 352, 65-75

Yu H., Stephanopoulos G. (2008). Metabolic engineering of *Escherichia coli* for biosynthesis of hyaluronic acid. Metabolic Engineering 10, 24-32

Zhang X., Duan X.J., Tan W.S. (2010). Mechanism for the effect of agitation on the molecular weight of hyaluronic acid produced by *Streptococcus zooepidemicus*. Food Chemistry 119, 1643-1646

## DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 25/10/2011

<p><b>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</b></p> <p>présenté par Mathieu POINSOT</p> <p><u>Sujet</u> : L'acide hyaluronique : production microbiologique et applications</p> <p>Jury :</p> <p>Président : Pierre LEROY, Pr Directeur : Emmanuel RONDAGS, MCF</p> <p>Juges : Jacques MAGDALOU, DR Joël COULON, MCF</p>	<p>Vu,</p> <p>Nancy, le 22/07/2011</p> <p>Le Président du Jury      Le Directeur de Thèse</p> <p><b>M. P. LEROY      M. E. RONDAGS</b></p>  
<p>Vu et approuvé,</p> <p>Nancy, le <u>26.09.11</u></p> <p>Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,</p> <p></p>	<p>Vu,</p> <p>Nancy, le <u>30.9.2011</u></p> <p>Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,</p> <p><i>Pour le Président et par Délégation, La Vice-Présidente du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire, Francine PAULUS</i></p> <p><i>Jean-Pierre FINANCE</i></p> <p><i>C CAPDEVILLE-ATKINSON</i></p>

N° d'enregistrement : 3781.

N° d'identification :

**TITRE / TITLE :**

**L'acide hyaluronique : Production microbiologique et applications**  
**Hyaluronic acid : Microbial production and applications**

**Thèse soutenue le 25 octobre 2011**  
**Par Mathieu POINSOT**

**RESUME / ABSTRACT :**

L'acide hyaluronique est un polymère naturel retrouvé dans de nombreuses espèces animales et microbiennes et doté de propriétés physico-chimiques remarquables.

Depuis près de trente ans, il connaît un succès grandissant dans les domaines thérapeutiques et cosmétiques. Pour pouvoir répondre à la demande toujours plus importante en ce biopolymère, les voies d'obtention ont évolué avec les connaissances scientifiques. L'extraction à partir de tissus animaux a cédé sa place à la production par voie microbienne. Les souches utilisées pour l'obtention de cette molécule d'intérêt sont des bactéries du genre *Streptococcus* possédant une capsule, et tout particulièrement l'espèce *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*.

L'optimisation du milieu de culture et des conditions de réalisation en fonction de la souche mise en œuvre et du mode choisi permet d'obtenir la concentration en acide hyaluronique de haute masse moléculaire la plus importante possible.

Afin de s'assurer du contrôle de la qualité du produit, l'acide hyaluronique doit satisfaire aux normes de la Pharmacopée Européenne. Ces multiples contrôles ainsi que la tolérance et le caractère résorbable de l'acide hyaluronique, en font un produit à effets secondaires limités qui occupe une place de choix dans la recherche de l'implant idéal.

Hyaluronic acid is a natural polymer, found in many animal and microbial species, which has remarkable physical and chemical properties.

For nearly thirty years, it is becoming increasingly popular in the therapeutic and cosmetics areas. To meet the ever increasing demand in this biopolymer, obtaining pathways have evolved with scientific knowledges. The extraction from animal tissue has been replaced with microbial production. The strains used to obtain this molecule are bacteria of the genus *Streptococcus* with a capsule, especially the species *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*.

Optimization of culture medium and culture conditions, functions of strain and selected mode, allows to obtain the most important concentration of high molecular weight hyaluronic acid.

In order to ensure quality control of the product, hyaluronic acid must meet the standards of the European Pharmacopoeia. These multiple controls as well as tolerance and absorbable property of hyaluronic acid make it a product with limited side effects that occupies a prominent place in the search for the ideal filler.

**MOTS CLES :** ACIDE HYALURONIQUE, PROCEDES DE PRODUCTION, PRODUCTION MICROBIOLOGIQUE, *STREPTOCOCCUS*, GENIE MICROBIOLOGIQUE, EXTRACTION, PURIFICATION, COSMETIQUE, DISPOSITIFS MEDICAUX, ASSOCIATIONS

<b>Directeur de thèse</b>	<b>Intitulé du laboratoire</b>	<b>Nature</b>
EMMANUEL RONDAGS	LRGP	<b>Expérimentale</b> <input type="checkbox"/> <b>Bibliographique</b> <input checked="" type="checkbox"/> <b>Thème</b> <input type="checkbox"/>

**Thèmes**

**3 – Médicament**

