

Titre: Effet du chitosane sur des hydrogels macroporeux d'alginate pour la capture de cellules cancéreuses du glioblastome multiforme
Title: capture de cellules cancéreuses du glioblastome multiforme

Auteur: Caroline Safi
Author:

Date: 2022

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Safi, C. (2022). Effet du chitosane sur des hydrogels macroporeux d'alginate pour la capture de cellules cancéreuses du glioblastome multiforme [Master's thesis, Polytechnique Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/10335/>
Citation:

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

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/10335/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Nick Virgilio, Benoit Paquette, & Marc-Antoine Lauzon
Advisors:

Programme: Génie chimique
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Effet du chitosane sur des hydrogels macroporeux d'alginate pour la capture de cellules
cancéreuses du glioblastome multiforme**

CAROLINE SAFI

Département de génie chimique

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

Génie chimique

Mai 2022

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

Effet du chitosane sur des hydrogels macroporeux d'alginate pour la capture de cellules cancéreuses du glioblastome multiforme

présenté par **Caroline SAFI**

en vue de l'obtention du diplôme de *Maîtrise ès sciences appliquées*

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

Basil FAVIS, président

Nick VIRGILIO, membre et directeur de recherche

Benoit PAQUETTE, membre et codirecteur de recherche

Marc-Antoine LAUZON, membre et codirecteur de recherche

Marc LAVERTU, membre

DÉDICACE

À ma mère qui m'a montré à me tenir droit,

Et mon père à imaginer;

À ma sœur qui m'a fait voir que parfois le cœur se cache,

Et mon frère que l'on cache parfois le cœur.

Et à mon berger.

All that is gold does not glitter,
Not all those who *wander* are lost.

– J.R.R. Tolkien

J'aimerais également rendre un hommage particulier

À Raphaëlle Gauthier

Dont la lumière du souvenir m'a, à quelques reprises,

Rappelé l'humanité derrière les fioles et le travail.

REMERCIEMENTS

Je ne peux débiter ces remerciements autrement qu'en exprimant toute ma gratitude à mon directeur de maîtrise, Pr Nick Virgilio. Ton soutien et ta compréhension ont permis à ma personne et à ce projet de faire leur excursion à mon propre rythme. J'ai grandi en assurance et, au fil de tes conseils, mûri dans mes propres valeurs. Alors que tes encouragements, et ta critique d'esprit, m'ont amenée avec fierté au port, il me faut tout de même admettre qu'il me peine de planter l'ancre.

J'aimerais continuer en remerciant les stagiaires de notre laboratoire qui ont été essentiels à ce projet : Lisa Delattre, Melek Abdelkhalek, Simon Bergeron-Fortier et Vaiana Moreau. Quelle expérience enrichissante, et d'autant plus agréable, que d'avoir pu vous côtoyer durant plus de deux années. J'aimerais également remercier Baptiste Bergmann pour son appui technique et inventif, aux côtés de ceux de Lisa, qui m'a permis de concrétiser des idées qui autrement seraient restées sans vie.

Je tiens à poursuivre en remerciant l'ensemble des collaborateurs avec lesquels j'ai eu le privilège d'écrire mon article scientifique. I would like to thank Angela Giraldo for her constant support through this joint endeavour; I doubt my experience would've been as cheerful, knowledgeable, and enriching without you. J'aimerais remercier mon co-superviseur, Pr Benoît Paquette, avec qui les quelques conversations réfléchies à voix haute sur le coin d'une porte m'ont montré le plaisir de la recherche et la créativité qu'elle permet. J'aimerais également remercier mon second co-superviseur, Pr Marc-Antoine Lauzon, et Pr Nathalie Fauchoux de m'avoir accueillie dans ce projet et dans les univers de leurs expertises.

Je suis également très reconnaissante d'avoir pu m'accoster près des paillasses de Benoit Liberelle et de Changheng Wang, des personnes dont la rigueur scientifique et la discipline m'ont grandement inspirée à travers ce projet. Your support and guidance was detrimental to this project, and I know that my working alongside both of you has made me evolve not only on a scientific and professional level, but also in my own humanity through your generosity of time and counsel. J'aimerais également remercier Romane Oliverio qui m'a plusieurs fois dépêtrée dans mes

questionnements, et également Médéric Dégardin pour son support collégial. Votre accueil et présence ont allégé le temps passé entre les murs des laboratoires. J'aimerais aussi remercier Pr Gregory DeCrescenzo et Pr Marc Lavertu pour m'avoir donné accès à leurs installations.

Je ne peux poursuivre sans mentionner l'expérience académique dont j'ai pu profiter lorsque j'ai intégré les classes d'oncologie du Dr Louis Gaboury de la faculté de médecine de l'Université de Montréal. Votre manière de démocratiser votre science, ainsi que la chaleur de vos cours, ont légitimisé et dynamisé mon parcours. Je vous en remercie.

Mon expérience de maîtrise aurait été complètement différente sans les membres du bureau d'étudiants des cycles gradués et des laboratoires avec qui j'ai passé plusieurs pauses café, et plusieurs discussions murmurées au bout de nos chaises de travail, à partager et écouter vos conseils d'études et de vie. Merci donc aux chaleureux, bienveillants et inoubliables Arthur Lassus, Teodora Gancheva, Clémence Abriat, Olivier Gazil, Helia Sojoudiasli, Isabelle Courteau, Cristina Torres, Mélanie Girard, Parniyan Talebpour et, bien sûr, ces chers Matthieu Gauthier et Wendell Raphaël. Je tiens aussi à remercier les membres du personnel du département de génie chimique, en particulier Gino Robin et Martine Lamarche qui étaient toujours présents et rassurants; Marie-Claude Dupuis, Alexandre Bréard, Brigitte Langevin et Mylène Charron pour leur gaieté, disponibilité et bienveillance; ainsi que Claire Cerclé, Sébastien Chénard, Maxime Beaudoin et Anic Desforges pour avoir rendu possible ce qui m'était, seule, très difficile. Je tiens aussi à remercier Michelle Ste-Marie et Sandra Murray Desrosiers qui, d'une certaine façon, m'ont vu grandir durant les sept dernières années; et Yann Jeudy dont les paroles sages hantent parfois mes plus mauvaises décisions (notamment, que j'aurais dû commencer à écrire ce mémoire avant).

Comment ne pas mentionner les professeurs qui m'ont le plus marqué durant mon parcours au baccalauréat, à commencer par Pr Basil Favis et Pr Michel Perrier qui m'ont toujours inspirée par leur humanité, leur patience et la générosité de leur temps, ainsi que par leur grande sagesse et connaissance. J'aimerais aussi bien sûr remercier Patrice Farand qui m'a donné ma chance à de nombreuses reprises et qui m'a fait confiance. Je tire de nombreuses leçons de discipline et d'éthique de travail de vous. J'aimerais aussi remercier Pr Jason Tavares pour ces mêmes raisons, et également pour avoir pris le temps de me conseiller et d'infuser de l'ambition à la fin d'un cycle

qui m'amenait beaucoup de doutes. I would also like to thank Pr James Kwan for his humanity and the amazing experience he gave us in his class and lab. Your courses have risen in me a great interest for the biomedical field and have motivated me in choosing this project.

Je voudrais également mentionner deux professeurs de mon cégep qui ont eu un véritable impact chez moi à une autre époque. Alors que j'ai eu l'occasion de toucher à l'enseignement moi-même depuis, je dois vous remercier pour votre manière exceptionnelle de communiquer votre passion et votre curiosité pour la science et le monde à vos étudiants. Merci donc à M. Dany Rondeau et M. Alain Lachapelle pour cette période brève mais marquante.

Similairement, je me dois de remercier certaines personnes qui font partie de mon histoire, nommément Anne Lavoie, Stéphane Lauzon, Suzanne Huberdeau, Lilianne Lacroix, Sr Jacinthe Caron, Sr Rosa Medina, Jennifer Dufour, Inam et Amal Boumheri et de très nombreux autres.

Je remercie également mes amis qui m'ont suivi, malgré mes écueils, depuis maintenant de nombreuses années. D'abord, Florence Ravary-Berger, complice en maîtrise et en plusieurs autres choses, dont les accomplissements et la bonté de son caractère ne cessent d'être pour moi une inspiration. J'aimerais également remercier la constellation de personnes qui, peut-être sans le savoir, sont en partie responsables de la personne que je suis aujourd'hui. Là où l'on sombre en noirceur, les amis rappellent de rallumer la lumière (pour paraphraser un grand personnage). Je remercie donc en particulier Eva Tardif-Sanchez et Stéphanie Lora-Burgos.

Dans ma vie personnelle, j'aimerais remercier Guy Poirier et Sonia Concetta qui ont probablement été mes plus grands motivateurs et qui ont toujours eu foi que la fin serait une bonne histoire; à Ammo Georges, Tante Thé, Mélanie, ma sœur et mon frère ainsi qu'à mes parents. Je tiens aussi à exprimer ma gratitude au tracé de la vie que je suis de la même famille que Christophe, Christian, Kim et Stewie.

Un certain Curtis James Jackson (50 Cent) a un jour dit que lorsqu'une personne décide d'être elle-même, elle offre une chose au monde que nul autre ne peut. Alors, dans les mots de Calvin Broadus Jr (Snoop Dogg), j'aimerais finir avec ceci: I want to thank me.

RÉSUMÉ

Le glioblastome multiforme (GBM) est un type de cancer du cerveau associé à un taux de survie très faible. En effet, une récurrence de la pathologie dans un rayon de 2 cm autour de l'ablation chirurgicale est extrêmement fréquente. La morphologie invasive et éparse de ce type de tumeur est un limitant aux résections totales. Les traitements complémentaires à la chirurgie sont, quant à eux, soumis à de nombreuses contraintes propres au système nerveux central (SNC) – lui qui comprend le cerveau et la moelle épinière. En effet, la radiosensibilité et la chimiosensibilité des cellules saines par rapport aux cellules malades, ainsi que la barrière hématoencéphalique, sont des contraintes biochimiques et physiques à la radiothérapie et à la chimiothérapie. L'hétérogénéité tumorale, c'est-à-dire la grande diversité de signatures génétiques des cellules cancéreuses dans la lésion, ainsi que le microenvironnement tumoral, qui asservit les agents immunitaires à son avantage, viennent réduire le champ d'impact de l'immunothérapie. D'autre part, les conditions physiologiques particulières amenées par le système nerveux central, notamment les concentrations ioniques et le pH du liquide cérébro-spinal, amènent de grands défis de conception pour les implants thérapeutiques intégrés au cerveau. De surcroît, le module de compression faible de la matière cérébrale oblige l'utilisation de matériaux mous pour de tels implants; et l'adhésion cellulaire à la surface de la matrice amène un défi de formulation chimique supplémentaire.

Les travaux d'Autier (2019) du Centre Hospitalier Universitaire d'Angers et de l'Université d'Angers en France, et subséquemment ceux de Gascon (2020) et de Solano (2021) de l'Université de Sherbrooke, ont proposé, par différentes approches, le développement d'un piège à cellules cancéreuses. Ce-dernier doit être placé dans la cavité chirurgicale, pour ensuite libérer un chimioattractant capable d'attirer les cellules tumorales jusqu'au piège. Là, les cellules seraient emprisonnées, puis irradiées par radiothérapie stéréotaxique – une technique de radiothérapie ciblée.

Le présent projet de maîtrise a pour objectif de poursuivre le développement de la trappe à cellules cancéreuses initiée par Solano. Celle-ci repose sur l'utilisation d'un hydrogel macroporeux fait à base d'alginate et réticulé avec des ions calciums, tel que développé par Esquirol (2013). Cette matrice microstructurée est préparée à l'aide d'un moule obtenu par le mélange de polymères continus de polystyrène (PS) et de poly-L-lactone (PLA). Les moules PLA poreux sont obtenus en retirant sélectivement la phase PS à l'aide de cyclohexane (50% de porosité, 300 µm de taille de

pore). Suite à l'injection d'une solution d'alginate dans une chambre sous-vide, les moules poreux remplis sont ensuite trempés dans une solution d'ions de calcium permettant la réticulation de l'alginate. Les moules PLA sont finalement extraits à l'aide de chloroforme pour obtenir des hydrogels d'alginate macroporeux.

Les gels d'alginate perdent cependant leur tenue mécanique lorsque plongés dans du PBS (ou un autre milieu salin), dû à une substitution ionique et un effet de chélation. Dans le but de régler ce problème, le présent travail postule que les hydrogels d'alginate peuvent être stabilisés en le réticulant en partie avec un polysaccharide de charge opposée. Le chitosane a été sélectionné pour cette tâche, notamment pour ses propriétés bioactives et le fait qu'il soit largement utilisé dans le domaine des biomatériaux. Or, étant donné les polarités opposées de l'alginate et du chitosane, la complexation électrostatique est presque instantanée lorsque les deux polysaccharides sont mélangés dans leur phase soluble. Ceci produit des précipités au lieu d'un hydrogel homogène. Il s'avère nécessaire de contrôler le processus d'interaction entre le chitosane et l'alginate.

Afin de faire interagir avec uniformité dans tout le volume l'alginate et le chitosane, une suspension de chitosane a été fabriquée en le solubilisant (pH=3-3,5) puis le précipitant (pH=9 à 12) par ultrasonication. Celle-ci fut ensuite ajoutée à une solution d'alginate (pH=8-8,5), et le mélange fut ensuite injecté dans les moules. Ces-derniers furent finalement plongés dans une solution de chlorure de calcium à 0,125% m/v pour permettre la réticulation de l'alginate. Une fois l'extraction du PLA réalisée, les gels furent conservés dans une solution de chlorure de calcium de 4% m/v contenant de l'azote de sodium pour éviter la prolifération biologique.

De cette manière, des hydrogels macroporeux composés de 1% d'alginate et différents teneurs en chitosane (0%, 0,02% et 0,2% m/v) ont été synthétisés. Un test de stabilité chimique a montré une certaine conservation du réseau réticulé pour les gels plongés dans une solution de PBS 1X qui contenaient une teneur suffisante en chitosane (0,2%). D'autre part, des tests en compression mécanique n'ont montré aucun impact statistiquement significatif de l'ajout du chitosane sur le module en compression. Alors que le module visé pour s'approcher des tissus cérébraux est d'environ 1 kPa, le module moyen fut du même ordre de grandeur, quoique plus élevé – soit aux environs de 4 à 9 kPa. Il est à noter que les valeurs ciblées par la littérature varient, et que des sources proposent même une gamme entre 0,1 et 16 kPa. Quant à l'impact du chitosane sur l'adhésion cellulaire, ainsi que du peptide d'adhésion RGD qui a été greffé à l'alginate pour certains

échantillons, ces expériences ont été menées par Solano à l'aide de cellules de glioblastome multiforme de rongeurs de la lignée F98. Les résultats de culture cellulaire ont montré que le meilleur compromis entre une bonne adhésion cellulaire (accumulation et rétention) et une faible prolifération correspondait à la formulation qui contenait 0,2% de chitosane mais aucun peptide RGD. En effet, le peptide RGD, à la teneur testée, lorsque combiné au chitosane a mené à une prolifération cellulaire plus forte que les matrices avec seulement du chitosane. Pour une application de capture de cellules malignes, la croissance cellulaire est un facteur qu'il faut limiter.

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM) is a type of brain cancer associated with a very low survival rate. Indeed, a recurrence of the pathology within a radius of 2 cm around the surgical site is extremely frequent. The invasive and sparse morphology of this type of tumor is a limitation to total resections. As for treatments complementary to surgery, they are subject to numerous constraints specific to the central nervous system (CNS) – which comprises of the brain and the spinal cord. Indeed, radiosensitivity and chemosensitivity of healthy cells compared to diseased cells, as well as the blood-brain barrier, are biochemical and physical obstacles to radiotherapy and chemotherapy. Tumor heterogeneity, i.e. the great diversity of genetic signatures of cancer cells in the lesion, as well as the tumor microenvironment, which enslaves immune agents to its advantage, reduce the field of impact of immunotherapy. On the other hand, the physiological conditions brought about by the central nervous system, in particular the ionic concentrations and the pH of the cerebrospinal fluid, bring great design challenges for therapeutic implants integrated into the brain. Furthermore, the low compressive modulus of brain matter requires the use of soft materials for such implants; and cell adhesion to the matrix surface brings an additional chemical formulation challenge.

The works of Autier (2019) from the *Centre Hospitalier Universitaire d'Angers* and the University of Angers in France, and subsequently those of Gascon (2020) and Solano (2021) from the University of Sherbrooke, have proposed, through different approaches, the development of a cancer cell trap. This trap would be placed in the surgical cavity and be able to release a chemoattractant capable of attracting tumor cells towards it. There, the cells would be trapped and then irradiated with stereotactic radiation therapy – a targeted radiation therapy technique.

This master's project aims to continue the development of the cancer cell trap initiated by Solano. It is based on the use of a macroporous hydrogel made from alginate and crosslinked with calcium ions, as developed by Esquirol (2013). This microstructured matrix is prepared using a mold obtained by mixing co-continuous polymers of polystyrene (PS) and poly-L-lactone (PLA). Porous PLA molds are obtained by selectively removing the PS phase using cyclohexane (50% porosity, 300 μm pore size). Following the injection of an alginate solution into a vacuum chamber, the filled

porous molds are then plunged in a solution of calcium ions to allow for alginate to crosslink. PLA molds are finally extracted using chloroform to yield macroporous alginate hydrogels.

These alginate gels, however, lose their mechanical strength when immersed in PBS (or another saline medium), due to ionic substitution and a chelation effect. To address this problem, the present work postulates that alginate hydrogels can be stabilized by crosslinking it in part with a polysaccharide of opposite charge. Chitosan was selected for this task, especially for its bioactive properties and the fact that it is widely used in the field of biomaterials. However, given the opposite polarities of alginate and chitosan, electrostatic complexation is almost instantaneous when the two polysaccharides are mixed in their soluble phase. This produces precipitates instead of a homogeneous hydrogel. It is necessary to control the process of interaction between chitosan and alginate.

In order to make the alginate and chitosan interact uniformly throughout the volume, a suspension of chitosan was made by solubilizing (pH=3-3.5) then precipitating it (pH=9 to 12) by ultrasonication. The suspension was then added to an alginate solution (pH=8-8.5), and the mixture was injected into the molds. These were finally immersed in a 0.125% m/v calcium chloride solution to allow the alginate to crosslink. After PLA extraction, the gels were stored in a 4% w/v calcium chloride solution containing sodium azide to prevent biological proliferation.

In this way, macroporous hydrogels composed of 1% alginate and different chitosan contents (0%, 0.02% and 0.2% m/v) were synthesized. A chemical stability test showed a certain conservation of the crosslinked network for the gels immersed in a solution of PBS 1X which contained a sufficient content of chitosan (0.2%). On the other hand, mechanical compression tests showed no statistically significant impact of the addition of chitosan to the modulus in compression. While the target modulus to resemble brain tissue is around 1 kPa, the average modulus was of the same order of magnitude, although higher – around 4 to 9 kPa. It should be noted that the values targeted by the literature vary, and that sources even propose a range between 0.1 and 16 kPa. As for the impact of chitosan on cell adhesion, as well as the RGD adhesion peptide which was grafted onto alginate for certain samples, these experiments were carried out by Solano using glioblastoma multiforme murine cells from the F98 line. The cell culture results showed that the best compromise between

good cell adhesion (accumulation and retention) and low proliferation corresponded to the formulation which contained 0.2% chitosan but no RGD peptide. Indeed, the RGD peptide, at the content tested, when combined to chitosan led to stronger cell proliferation than the matrices with only chitosan. For a malignant cell capture application, cell growth is a factor that must be limited.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE.....	iii
REMERCIEMENTS	v
RÉSUMÉ.....	viii
ABSTRACT	xi
TABLE DES MATIÈRES	xiv
LISTE DES TABLEAUX.....	xvi
LISTE DES FIGURES.....	xvii
LISTE DES ÉQUATIONS.....	xxiii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xxiv
LISTE DES ANNEXES.....	xxv
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 2 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE	5
2.1 Hypothèse de recherche	5
2.2 Objectif principal.....	5
2.3 Objectifs spécifiques	5
CHAPITRE 3 REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	6
3.1 Notions essentielles en oncologie du cerveau	6
3.1.1 Concepts moléculaires et cellulaires des cancers.....	6
3.1.2 Aspects cliniques.....	7
3.2 Glioblastome multiforme	8
3.3 Contraintes de l'environnement cérébral dans le développement d'un implant	10
3.2 Développement de matrices poreuses	21
3.2.1 Principales techniques de fabrication de matériaux tridimensionnels poreux	21

3.2.2	Dissolution sélective à partir de mélanges de polymères immiscibles co-continus	24
3.3	Hydrogels à base de biopolymères hydrosolubles	34
3.3.1	Notions introductives	34
3.3.2	Alginate et chitosane	40
3.3.3	Matériaux faits d'alginate et de chitosane.....	42
CHAPITRE 4	DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT INDIQUANT LA COHÉRENCE DES ARTICLES PAR RAPPORT AUX OBJECTIFS DE LA RECHERCHE	45
CHAPITRE 5	ARTICLE 1: EFFECT OF CHITOSAN ON ALGINATE-BASED MACROPOROUS HYDROGELS FOR THE CAPTURE OF GLIOBLASTOMA CANCER CELLS.....	46
CHAPITRE 6	ASPECTS MÉTHODOLOGIQUES ET RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES.....	80
6.1	Situation initiale	80
6.2	Étudier les différentes formes du chitosane	80
6.3	Étudier différentes approches d'acidification	86
6.4	Résultats complémentaires à ceux de l'article scientifique.....	90
CHAPITRE 7	DISCUSSION GÉNÉRALE	94
CHAPITRE 8	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	101
	RÉFÉRENCES.....	106
	ANNEXES	116

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3.1: Composition du plasma et du liquide cérébro-spinal (LCS) (chez le chien ou le rat). Reproduit partiellement de Brown (2004) ³⁹ . Copyright (2004) Elsevier.	18
Tableau 3.2: Principales techniques de fabrication de matrices poreuses	21
Tableau 3.3: Méthodes de caractérisation de la morphologie co-continue.....	31
Tableau 3.4: Classes de biopolymères et caractéristiques	34
Tableau 3.5: Charge, origine et structure moléculaire d'une sélection de polysaccharides connus	35
Tableau 3.6: Stress mécaniques ressentis par les tissus cérébraux selon différents scénarios. Tiré de Aurand et al. (2012). ⁹³ Copyright (2012) MDPI.	39
Tableau 3.7: Caractéristiques essentielles de l'alginate et du chitosane	41
Tableau 3.8: Structures formées entre l'alginate et le chitosane selon différentes techniques de mélange et de préparation	43
Tableau 5.1 SA and CHI properties.	51
Tableaux 8.1 Recommandations futures pour la continuation du projet gliotrappe (GLTRP) et pour l'avancée générale de la science et la caractérisation des matériaux hydrogels formés à partir d'alginate et de chitosane (SC.MTX)	102
Tableau A.0.1 : Grades, caractéristiques et taux de survie (données entre 1973 et 2004) des astrocytomes. Tableau reproduit à partir de ¹⁴² et ²² . Copyright (2010) Springer Nature.	118
Tableau A.0.2 : Essais et valeurs obtenues pour les propriétés mécaniques des tissus cérébraux. Tiré de Aurand et al. (2012) ⁹³ . Copyright (2012) MDPI.	121

LISTE DES FIGURES

- Figure 1.1:** Processus thérapeutique proposé pour le glioblastome multiforme à l'aide de la Gliotrappe. Icônes tirés de Flaticon (s.d.), GettyImages (s.d.). Micrographie tirée avec la permission de Esquirol (2014)⁷. Copyright (2014) American Chemical Society.2
- Figure 1.2:** Représentation simplifiée de la gélification des chaînes polymériques d'alginate à l'aide d'ions calcium – les chaînes adoptent une configuration de type « egg-box ». Inspiré de Niculescu et Grumezescu (2022)¹¹.3
- Figure 1.3:** Interaction supposée des chaînes d'alginate et de chitosane pour former un réseau tridimensionnel d'hydrogel, bâti en partie à l'aide d'ions calcium. Le peptide RGD est greffé sur les chaînes d'alginate pour certaines formulations afin de promouvoir l'adhésion cellulaire.4
- Figure 3.1:** Capacités distinctives des cancers qui leur confèrent une plus grande ténacité et agressivité que les cellules normales. Adapté et traduit de Hanahan et al. (2011)¹². Copyright (2011) Elsevier.7
- Figure 3.2 :** Statistiques des tumeurs (malignes et bénignes) du système nerveux central. Les cancers comptent pour 29,7% de ces tumeurs, et parmi eux, 48,6% sont des glioblastomes. Tiré de Miller et al. (2021)¹⁸. Copyright (2021) American Cancer Society.9
- Figure 3.3 :** Marges chirurgicales positives et négatives. Tiré de Tringale et al. (2018)²⁵. Copyright (2018) Wiley.11
- Figure 3.4:** Nomenclature des volumes en radiothérapie. Image reproduite de Verhoeven et al. (2019)²⁶. Copyright (2019) Springer Nature.12
- Figure 3.5:** Représentation d'une chimiothérapie régionale par voie intraventriculaire. Tiré de la Société canadienne du cancer (s.d.)³³.15
- Figure 3.6:** Représentation de la chimiothérapie locale où des nanogels sont (A) injectés sur le site de la tumeur ou (B) injectés par voie intraveineuse. Tiré de Basso et al. (2018)³⁴. Copyright (2018) MDPI.16
- Figure 3.7:** Représentation du microenvironnement tumoral et des types de cellules présentes dans le cœur de la tumeur et dans les tissus environnants. Tiré de Darmanis et al. (2017)³⁷. Copyright (2017) Elsevier.17

Figure 3.8: Capacité de désordre spontané (entropie) pour a) un mélange de monomères, et b) un mélange de polymères. Figure inspirée de Lee et al. (2017) ⁶⁴ . Copyright (2017) Taylor & Francis.	25
Figure 3.9: Processus de fabrication d'hydrogels poreux à partir d'un mélange co-continu de polymères immiscibles (ici de polystyrène et de poly (L-lactide), où 1) la phase de polystyrène est dissoute à l'aide de cyclohexane; 2) la solution précurseure d'hydrogel est injectée sous-vide dans le moule; et 3) la phase de poly(L-lactide) est dissoute à l'aide de chloroforme. Tiré et traduit de Esquirol (2014) ⁷ . Copyright (2014) American Chemical Society.	26
Figure 3.10: Évolution du diamètre de la phase mineure en fonction de sa concentration pour un mélange de polypropylène (PP) et de polycarbonate (PC). Les courbes inférieures montrent le diamètre moyen en nombre (dn) et les courbes supérieures le diamètre moyen en volume (dv). Adapté de Favis et Chalifoux (1988) ⁷⁰ et inspiré de Ravati et Favis (2010) ⁷¹ . Copyright (1988) Elsevier; Copyright (2010) Elsevier.....	27
Figure 3.11 Morphologie a) dispersée et b) co-continue d'un mélange de polymères immiscibles. Tiré de Ravati et Favis (2010) ⁷¹ . Copyright (2010) Elsevier.	28
Figure 3.12 : Représentation du processus d'extrusion. Traduit et adapté de Encyclopædia Britannica (1997) ⁷⁴	28
Figure 3.13: Processus de grossissement (coarsening) des phases lors d'un recuit. Tiré de Yuan et Favis (2005) ⁷⁶ . Copyright (2004) Wiley.	30
Figure 3.14: Micrographies SEM d'un mélange PS/PE ayant subi un recuit à 170°C de (a) 0 min, (b) 10 min, (c) 15 min et (d) 25 min. Tiré de Galloway et al. (2005) ⁷⁵ . Copyright (2005) Elsevier.	31
Figure 3.15: Processus de fabrication de matrices poreuses à deux tailles de pores à partir d'un mélange ternaire de polymères immiscibles. Tiré de Wang (2014) ⁶⁹ . Copyright (2014) Elsevier.	33
Figure 3.16: Réseau gélifié d'un hydrogel. Les flèches blanches représentent les forces de réticulation; les flèches bleues les forces hydrophiles. Figure inspirée de Gancheva (2018) ⁶⁶	37
Figure 3.17: Voies de dégradation du réseau réticulé d'un hydrogel. Tiré de Cai et al. (2012) ⁹¹ . Copyright (2012) Wiley.	38

- Figure 3.18:** Alginate fonctionnalisé au peptide GGGGRGDS à l'aide d'EDC et de Sulfo-NHS. Tiré de Mohan et al. (2022)⁹⁴. Copyright (2022) Elsevier.40
- Figure 3.19:** Chitosane fonctionnalisé au peptide RGD à l'aide de NHS. Tiré de Mohan et al. (2022)⁹⁴. Copyright (2022) Elsevier.....40
- Figure 3.20:** Structure moléculaire du chitosane et de l'alginate, et représentation de la configuration egg-box model pour l'alginate. Tiré de Niculescu et Grumezescu (2022)¹¹. Copyright (2022) MDPI.41
- Figure 5.1.** 45 min annealed PLA macroporous cylinder mold: a.1) perspective view, a.2) side view, a.3) top view. Complementary SA-CHI hydrogel (B condition, 1% SA + 0.02% CHI): b.1) perspective view, b.2) side view, b.3) top view. The scale bar is 3 mm.62
- Figure 5.2.** MicroCT images showing : a) 45 min annealed macroporous PLA mold, and (b) SA-CHI hydrogel (B condition, 1% SA + 0.02% CHI). The pores are in black, and the solid phase (PLA or hydrogel) is in pale gray. Note that the water inside the macroporous hydrogel pores was absorbed with paper to enhance contrast between the gel phase and the pores.63
- Figure 5.3.** Compression modulus (kPa) of macroporous hydrogels for a strain ε ranging from 0.9% to 1.36% for all four formulations: (A) SA 1%, CHI 0% (pristine SA), (B) SA 1% + CHI 0.02%, (C) SA 1% + CHI 0.2%, and (D) SA-RGD 1% + CHI 0.2%. All compositions are in % w/v. Each value represents the average of 3 samples.64
- Figure 5.4.** Structural stability tests on Days 4, 7 and 15, for gel formulations (A) 1% SA (no CHI), (B) SA 1% + CHI 0.02%, (C) SA 1% + CHI 0.2%, and (D) SA-RGD 1% + CHI 0.2%, in i) CaCl₂ 4% (control medium), ii) CaCl₂ 4% + antibiotics, iii) DMEM + antibiotics, and iv) PBS + antibiotics. All formulations are % w/v. The experiment was conducted with duplicates. The scale bar is 0.5 cm. Some images had their background partly removed to better emphasize the gel shape. Note that all of the gels on Day 0 looked like the one displayed in Figure 1b.67
- Figure 5.5.** a) Percentage of cell adhesion over time in 1% SA + 0.2% CHI gels, without or with grafted RGD. Each point is the mean of two different replicate experiments, each performed in triplicate; b) Proliferation of F98 cells in SA gels alone, and with 0.02% and 0.2% CHI. The last formulation was grafted or not with RGD; c) Accumulation and retention of F98 cells in SA-CHI hydrogels, without or with grafted RGD. Macroporous hydrogels were incubated with 10⁵ F98 cells

for 48 h at 37 °C. Data represent the mean (\pm SD) of two independent experiments, each performed in triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$70

Figure 5.6. Distribution of F98 cells within SA and CHI gels, grafted or not with the RGD peptide (CGGRGDS). The gels were incubated with 5×10^5 F98 cells for 48 h. a) Schematic representation of the experiment, showing the seeding point for F98 cells, the volume excluded from the imaging field, and the five levels (L) of imaging (L1 to L5). b) F98 spheroids distribution per level in macroporous hydrogels. The number of F98 cellular spheroids and their position within the gel. c) The mean surface of F98 spheroids (μm^2) per level in the gels. Data represent the mean \pm S.D. of three independent experiments, each performed in triplicate. ns > 0.1 , * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$72

Figure 5.7. Illustration of the F98 spheroids at the third level (L3, see Figure 6a) in macroporous hydrogel formulations: a) 1% SA, b) 1% SA + 0.2% CHI, and c) 1% SA-RGD + 0.2% CHI. Images obtained with an epifluorescence microscope. The gels were fixed with 3% w/v (PFA) and stained with Rhodamine-phalloidin 2105247 and Hoechst 33342 (nuclei, blue channel). The scale bar is 1 mm.73

Figure 6.1: Gels d'alginate, CaCO_3 et GDL, a) sans chitosane et b) avec chitosane.80

Figure 6.2: Diagramme de phases présentant la solubilité du chitosane (0,2 g/100 g acide acétique à 1%) en fonction du pH.81

Figure 6.3: Mélanges alginate (0,75%) et chitosane (0,1%) selon le pH de la solution de base de chitosane. (Les pH indiqués sont ceux de la solution de chitosane utilisée initialement.).....82

Figure 6.4: Mélanges d'alginate (0,75%) et de chitosane (0,1%) à bas pH. (Les pH indiqués sont ceux de la solution de chitosane utilisée initialement).83

Figure 6.5: Mélanges alginate (0,3%) et chitosane (0,1%) en modifiant le pH de la solution de base de chitosane. (Les pH indiqués sont ceux de la solution de chitosane utilisée, pas ceux des mélanges finaux.)84

Figure 6.6: Courbe de titrage Chitosane/NaOH et variation de l'énergie de sonication injectée. 25 ml de chitosane 0,8% m/v dans 1% m/m d'acide acétique se sont faits titrés à l'aide de NaOH 1M.85

Figure 6.7: Gélification d'un mélange alginate - suspension de chitosane à l'aide de GDL86

Figure 6.8: Montage pour la technique d'acidification par vapeurs acides	87
Figure 6.9: Acidification par voie acide de mélanges alginate-chitosane préparés de diverses manières.	88
Figure 6.10: Réticulation par vapeurs acides d'une suspension de chitosane mélangée à de l'alginate a) sans GDL et b) avec GDL.	89
Figure 6.11: Processus de fabrication de gels macroporeux d'alginate et de chitosane partiellement réticulé dans une solution calcium et acidifié dans une solution de HCl.....	90
Figure 6.12 Évolution de a) la position et de b) la charge appliquée, en fonction du temps, sur un hydrogel macroporeux d'alginate, et de c) la contrainte en fonction du pourcentage de déformation en compression.....	91
Figure 6.13: Défauts de fabrication des moules macroporeux ayant subis un recuit de 45 minutes	92
Figure 7.1: Hydrogels macroporeux d'alginate 1% à différentes teneurs en chitosane (0%, 0,02% et 0,2%) et fonctionnalisés, ou non, à l'aide du peptide RGD, trempés durant 15 jours dans différentes solutions.	94
Figure 7.2: Image MicroCT d'un moule de 60 minutes, tel que présenté par Solano ⁵⁶ . Copyright (2021) Elsevier.	97
Figure A.1: Étapes de formation de métastases à partir d'une tumeur primaire. Tiré de Mitchell et al. (2016) ¹⁴	116
Figure A.2: Représentation des différentes voies de migration des cellules du glioblastome multiforme durant leur invasion. Tiré de Seker-Polat et al. (2022) ¹⁴¹ . Copyright (2022) MDPI.	117
Figure A.3: Énergie libre de mélange de Gibbs en fonction de la concentration d'un composant d'un mélange binaire de polymères ayant le même poids moléculaire M. Tiré de Paul et Newman (1978) ¹⁴³	119
Figure A.4: Fabrication de gels pleins d'alginate et de calcium en a) déposant un volume de CaCl ₂ directement sur la surface du gel et b) vaporisant une solution de CaCl ₂ sur une membrane à la surface du volume d'alginate.	122

Figure A.5 : Représentation du montage « bassins versants » 2.0, permettant de gélifier une solution d'alginate de manière uniforme tout en faisant recirculer le fluide de réticulation. Concept original, design développé avec des collaborateurs.124

Figure A.6: Immersion de gels d'alginate gelés dans une solution de CaCl_2 à différentes concentrations.....125

LISTE DES ÉQUATIONS

Équation 3.1: Énergie libre de mélange de Gibbs	24
Equation 2: Calculation of specific interfacial area.....	56
Equation 3: Calculation of the mold and gel domain size	56
Equation 4: Calculation of the applied strain	56
Equation 5: Calculation of the recorded stress	56
Équation A.6: Théorie des solutions de Flory-Huggins. Tiré de Paul et Newman (1978) ¹⁴³	120
Équation A.7: Simplification de la loi de Flory-Huggins. Tiré de Paul et Newman (1978) ¹⁴³ .	120

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

CHI	Chitosane
GBM	Glioblastome multiforme
LCS	Liquide cérébro-spinal
LCR	Liquide céphalo-rachidien
PLA	Poly (L-lactide)
PS	Polystyrène
RGD-SA	Alginate de sodium modifié avec le peptide RGD
SA	Alginate de sodium
SNC	Système nerveux central
STD-CHI	Chitosane standardisé
STD-SA	Alginate de sodium standardisé

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1. Mécanisme de formation des métastases.....	116
Annexe 2. Morphologie infiltrante du glioblastome multiforme.....	117
Annexe 3. Classification des astrocytomes selon leur grade	118
Annexe 4. Conditions thermodynamiques nécessaires pour obtenir un mélange de polymères miscibles.....	119
Annexe 5. Essais et valeurs obtenues pour les propriétés mécaniques des tissus cérébraux.....	121
Annexe 6. Méthodes de fabrication de gels pleins	122

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

Le glioblastome multiforme (GBM) est un cancer de stade IV (phase terminale) qui se forme à partir de cellules gliales du système nerveux central (SNC)¹. Les tumeurs apparaissent au cerveau, et plus rarement au niveau de la moelle épinière². La capacité de la tumeur à générer des colonies en périphérie de la tumeur principale (désignée comme de l'invasion) est l'enjeu le plus critique pour la survie du patient. En effet, les traitements utilisés, soit généralement une chirurgie suivie d'une radiothérapie et/ou chimiothérapie, sont limités par la sensibilité de la zone à traiter. Ainsi, au terme des traitements, la totalité des cellules cancéreuses n'est pas éradiquée ce qui cause la récurrence de la maladie.

Le taux de survie après 5 ans pour l'adulte atteint d'un GBM se situe entre 1 et 14%, déclinant sévèrement avec l'âge. La survie médiane est de 12 à 14 mois, ce qui en fait un cancer particulièrement mortel¹. Avec une incidence de 3,19 sur 100 000 personnes aux États-Unis³, le GBM « est la tumeur cérébrale maligne la plus fréquente chez l'adulte »⁴.

Ce projet de recherche, dans lequel s'inscrivent les travaux de ce mémoire, vise à développer un piège à cellules cancéreuses, ou *Gliotrappe*, implanté chez l'humain à la suite du retrait chirurgical d'une tumeur de GBM (**Figure 1.1**). Cet implant, semblable à la structure d'une éponge, est caractérisé par une morphologie poreuse qui permettrait aux cellules de pénétrer dans le piège pour y adhérer. Ces cellules seraient parvenues jusqu'à la matrice grâce à un chimio-attractant que cette dernière aurait libéré. Celui-ci attirera vers l'implant les cellules cancéreuses résiduelles situées en périphérie de l'ablation. Au moment de la publication de cet ouvrage, le processus de migration cellulaire à l'étude par notre groupe repose sur la libération contrôlée de CXCL12 à partir de nanoparticules qui seront dispersées dans la matrice. Le CXCL12 est une protéine interagissant entre autres avec des récepteurs sur-exprimés de la membrane des cellules de GBM. Bien que le CXCL12 stimule également la mobilisation de cellules immunitaires (lymphocytes, etc.), on pose l'hypothèse qu'il permettra l'attraction des cellules d'intérêt avec un bon taux de sélectivité^{5,6}. Suite à la concentration dans l'implant des cellules résiduelles de GBM initialement logées dans un rayon de quelques millimètres à quelques centimètres, un traitement intensifié de radiothérapie stéréotaxique est envisagé.

L'hypothèse de recherche est que cette nouvelle voie thérapeutique permettra d'augmenter l'agressivité du traitement sans compromettre les tissus sains environnants, permettant ainsi d'améliorer le pronostic du patient.

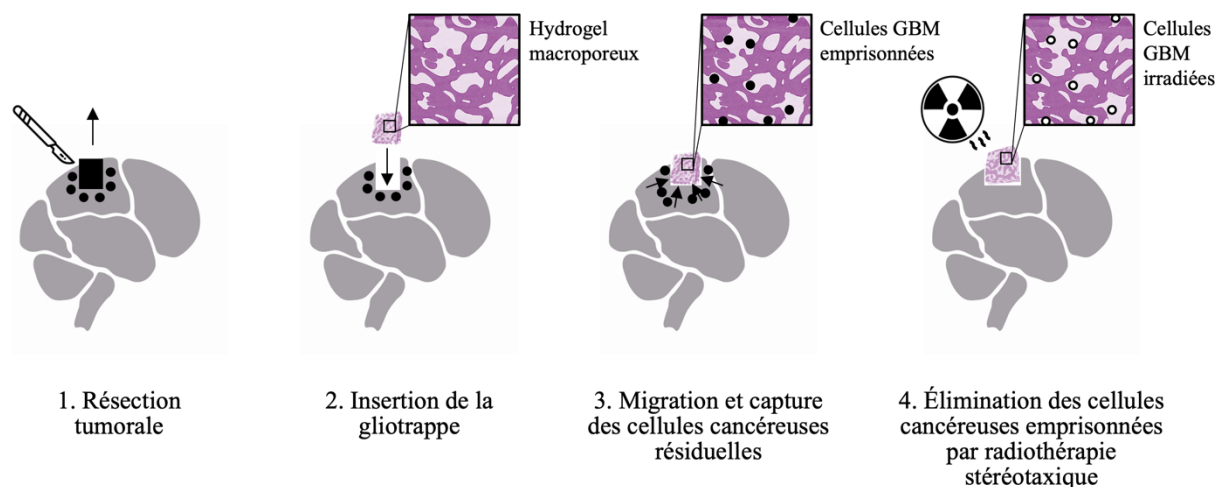


Figure 1.1: Processus thérapeutique proposé pour le glioblastome multiforme à l'aide de la Gliotrapp. Icônes tirés de Flaticon (s.d.), GettyImages (s.d.). Micrographie tirée avec la permission de Esquirol (2014)⁷. Copyright (2014) American Chemical Society.

Le présent mémoire de maîtrise présente les travaux associés au développement de la matrice de l'implant. Originellement, un hydrogel d'alginate, gélifié à l'aide d'ions de calcium (**Figure 1.2**), a été choisi pour préparer les matrices poreuses, en raison de la facilité de la mise en œuvre et de la possibilité de l'utiliser pour une application médicale. Le groupe du Professeur Nick Virgilio de Polytechnique Montréal a développé un processus de fabrication de gels macroporeux en injectant la solution gélifiante désirée dans des moules de poly (L-lactide) (PLA)⁸. Ces moules sont préparés par l'extrusion d'un mélange de polymères à base de PLA et de polystyrène (PS), suivie de la dissolution sélective de la phase PS. Des tests cellulaires présentant la migration et l'effet de la radiation sur des gels macroporeux d'alginate (modifié à l'aide des peptides RGD) ont récemment été publiés dans le cadre du projet *Gliotrapp*⁶. L'intérêt pour des hydrogels d'alginate suite à ces résultats a été confirmé, en plus du faible coût du produit, de son abondance et de son utilisation très bien documentée pour des applications médicales similaires. D'autres tests préliminaires non-publiés ont cependant montré que la stabilité chimique des matrices alginate-calcium est limitée lorsqu'elles sont plongées dans du PBS. Ce soluté a été choisi comme première approximation afin

de simuler le pH et l'environnement salin du milieu physiologique. Les matrices se dégradent progressivement par substitution ionique et par effet de chélation^{9,10}. Ceci mène à la destruction du réseau tridimensionnel du gel, et à l'affaiblissement, voire l'anéantissement, de la matrice – un problème potentiellement significatif pour les essais *in vivo* futurs.

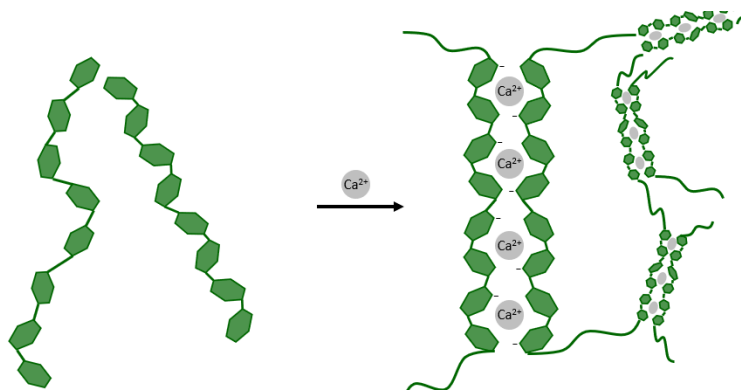


Figure 1.2: Représentation simplifiée de la gélification des chaînes polymériques d'alginate à l'aide d'ions calcium – les chaînes adoptent une configuration de type « egg-box ». Inspiré de Niculescu et Grumezescu (2022) ¹¹.

Pour contrer ce phénomène, il a été proposé de remplacer partiellement les ions calcium par des biopolyélectrolytes, c.-à-d. des biopolymères chargés, ce qui réduirait l'effet de substitution ionique en milieu physiologique. Le chitosane, un polymère cationique (chargé positivement) déjà utilisé pour des applications médicales et présentant de bonnes propriétés d'adhésion cellulaire, a été sélectionné afin de le substituer aux ions calcium, pour former avec l'alginate un hydrogel mécaniquement plus stable. Le chitosane, de charge opposée à l'alginate (qui est un polymère anionique), pourrait donc jouer en partie le rôle des ions calcium pour la formation du réseau tridimensionnel d'hydrogel (**Figure 1.3**). La littérature étaye déjà l'interaction alginate-chitosane lors de la fabrication de microbilles de polymère, mais la fabrication de gels homogènes entre ces deux chaînes uniquement ne semble pas être documentée. Le présent projet de recherche aura pour objectif de développer une méthodologie pour la fabrication de gels macroporeux d'alginate et de chitosane répondant aux contraintes biochimiques et mécaniques relatives aux applications de la Gliotrappe. D'autre part, une étude cellulaire réalisée à l'Université de Sherbrooke par Solano, à l'aide de la lignée F98 de GBM, a eu pour but de valider l'impact du chitosane sur l'accumulation, la rétention, la prolifération et la distribution cellulaires, ainsi que celui du peptide RGD, greffé sur l'alginate de certaines matrices.

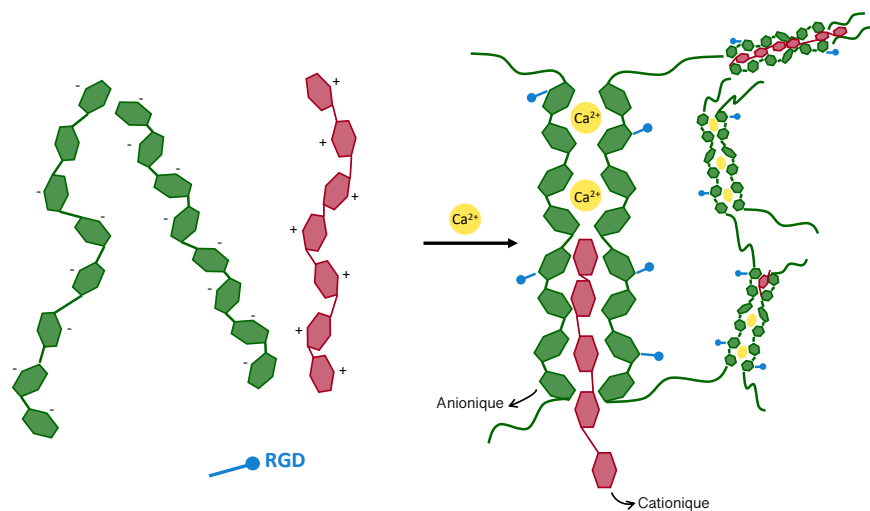


Figure 1.3: Interaction supposée des chaînes d'alginate et de chitosane pour former un réseau tridimensionnel d'hydrogel, bâti en partie à l'aide d'ions calcium. Le peptide RGD est greffé sur les chaînes d'alginate pour certaines formulations afin de promouvoir l'adhésion cellulaire.

CHAPITRE 2 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

2.1 Hypothèse de recherche

Les chaînes polymériques d'alginate et de chitosane, lorsque mises en solution dans des conditions adéquates, peuvent former un hydrogel (réseau tridimensionnel) grâce à des interactions électrostatiques, de sorte à former un gel qui favorise l'adhésion cellulaire et minimise la dégradation de la matrice par substitution ionique en milieu physiologique.

2.2 Objectif principal

Développer des hydrogels macroporeux composés d'un mélange de deux polysaccharides naturels, l'alginate et le chitosane, qui possèdent les propriétés mécaniques et biochimiques nécessaires à leur implantation dans le cerveau humain pour une application de capture et d'élimination de cellules cancéreuses de glioblastome multiforme.

2.3 Objectifs spécifiques

1. Adapter la technique de fabrication des gels poreux par dissolution sélective d'un moule à base de mélanges binaires co-continus de polymères non-miscibles, pour des solutions binaires de polysaccharides alginate/chitosane.
2. Ajuster la rigidité de la matrice hydrogel à une valeur comparable à celle des tissus cérébraux (~ 1 kPa).
3. Déterminer si l'ajout de chitosane dans la matrice hydrogel favorise la colonisation et l'adhésion des cellules de glioblastome dans la matrice.
4. Obtenir un gel poreux qui est chimiquement stable lorsque plongé dans un milieu salin semblable aux conditions et au pH physiologiques.

CHAPITRE 3 REVUE DE LA LITTÉRATURE

Le développement d'un implant microstructuré pour le traitement d'un cancer cérébral implique une approche multidisciplinaire. Ce chapitre présente les concepts-phares à l'intersection des sciences de l'oncologie du cerveau, des mélanges de polymères, et des biopolymères et hydrogels.

3.1 Notions essentielles en oncologie du cerveau

3.1.1 Concepts moléculaires et cellulaires des cancers

Génétique des cancers

Les cancers prennent leur origine à partir d'une cellule saine du corps qui, suite à l'expression d'une mutation génétique, commence à se comporter de manière irrégulière et dommageable. Ces mutations génétiques peuvent être de source héréditaire ou développées à l'état embryonnaire, induites par un carcinogène (irradiation, agents chimiques, virus oncogènes, etc.), ou encore apparaître de manière fortuite dans la vie de l'individu.

Le corps est capable de rectifier ces anomalies à l'aide de différents mécanismes de réparation de l'ADN ainsi que d'apoptose, là où les cellules déficientes sont tuées. Néanmoins, certaines mutations permettent d'éviter ce type de réparation. Le défaut est alors conservé dans la cellule-mère, et transmis à ses cellules-filles. Naît alors un type de lésion appelée *tumeur* qui, si maligne, est classée comme étant un cancer.

Ressources des cancers qui expliquent leur ténacité et agressivité

Les mutations génétiques que portent les cellules cancéreuses leur confèrent certains propriétés, résumées à la **Figure 3.1**. Ces caractéristiques leur permettent de créer un microenvironnement qui promeut leur survie en augmentant les signaux de croissance et en évitant les suppresseurs tumoraux; en bénéficiant d'une quasi-immortalité notamment par le retard de leur mort (apoptose); en envahissant leurs environs immédiats par vascularisation (angiogénèse), qui permet d'acheminer oxygène et nutriments, et par la formation de métastases; et en esquivant les stratégies immunitaires du corps en plus de les tourner à leur avantage.

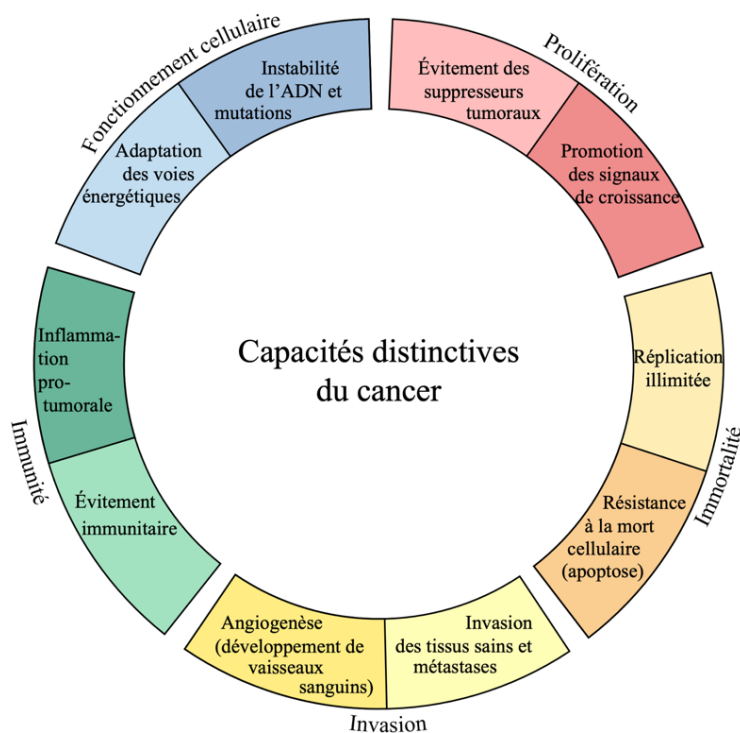


Figure 3.1: Capacités distinctives des cancers qui leur confèrent une plus grande ténacité et agressivité que les cellules normales. Adapté et traduit de Hanahan et al. (2011) ¹². Copyright (2011) Elsevier.

3.1.2 Aspects cliniques

Diagnostic : détermination de la nature de la tumeur

Les tumeurs, ou *néoplasies*, sont des proliférations cellulaires anormales. Ces excroissances peuvent être bénignes et ne présenter que peu de risque pour le patient; d'autres sont malignes, et alors qualifiées de cancéreuses. La détermination de la nature de la tumeur se fait en étudiant la lésion grâce à de l'imagerie médicale (tomodensitométrie (CT-scan), imagerie par résonance magnétique (MRI))¹³ et/ou en réalisant une étude histologique des tissus à partir d'une biopsie. Quatre indicateurs révèlent de manière particulièrement probante la présence d'une tumeur maligne ¹⁴:

1. Croissance cellulaire à un rythme dérégulé : une prolifération hors de contrôle mène à la formation d'amas désorganisés de cellules, souvent sous-oxygénés (dits hypoxiques) et parfois nécrotiques.
2. Perte de différenciation des tissus (ou anaplasie) : les cellules adoptent une morphologie atypique par rapport aux cellules saines qui peut leur faire perdre leurs fonctionnalités.

3. Formation de colonies sur des sites éloignés : les cellules peuvent créer des métastases. L'**Annexe 1** présente une schématisation de ce processus.
4. Envahissement des tissus sains environnants : les cellules croissent de manière infiltrante. La région tumorale n'est pas circonscrite ni bien délimitée. L'**Annexe 2** présente les voies d'invasion du glioblastome multiforme.

Pronostic : Détermination de l'étendue et du stade de la maladie

La majorité des cancers sont classifiés par **stades** (I à IV) selon leur gravité dans un cadre de référence appelé **T-N-M** : (**T**aille et profondeur de la tumeur – **N**ombre de nœuds lymphatiques affectés – présence et nombre de **M**étastases) ^{15,16}. Cette classification macroscopique s'avère cependant inadaptée pour les cancers du système nerveux central (SNC), comprenant le cerveau et la moelle épinière, vu l'absence de ganglions lymphatiques dans ce système, et le fait que les patients décèdent souvent avant même qu'une maladie métastatique ne puisse se développer. D'autre part, la sensibilité de la région affectée s'avère largement plus critique au pronostic que sa taille. On utilise donc un système de **grades** (I à IV) basé notamment sur l'histologie des tissus ¹⁷. L'**Annexe 3** présente la classification par grade des astrocytomes, dont fait partie le glioblastome multiforme.

3.2 Glioblastome multiforme

Nature, incidence et pronostic

Dans le cerveau humain, deux groupes principaux de cellules composent les tissus : les neurones et les cellules gliales. Les premières, bien connues pour leur rôle dans la transmission de l'influx nerveux, sont supportées par les secondes, qui se déclinent en plusieurs types. Parmi eux, on compte les astrocytes, les cellules les plus populeuses du système nerveux central. Les astrocytes regroupent de nombreuses sous-familles qui accomplissent des mandats essentiels, tels que le maintien de l'environnement fonctionnel des neurones; des actions de contrôle autour de la barrière hématoencéphalique et de l'afflux sanguin; et une contribution à la régulation d'ions libres (p.ex. potassium).

Le glioblastome multiforme (GBM) est un astrocytome, c'est-à-dire une tumeur maligne qui affecte les astrocytes. Alors que le tiers de toutes les tumeurs diagnostiquées au cerveau sont des cancers, la moitié de ce nombre sont des GBM, tel que présenté à la **Figure 3.2** ¹⁸. Il s'agit donc

d'un cancer extrêmement répandu dans sa catégorie, pour lequel la survie médiane est environ d'une année. Selon la Société canadienne du cancer, et pour des données entre 1973 et 2004, la survie relative après 5 ans varie entre 14% et 1% chez l'adulte, déclinant sévèrement avec l'âge. Le GBM est classé au plus haut niveau d'agressivité des tumeurs cérébrales (grade IV).

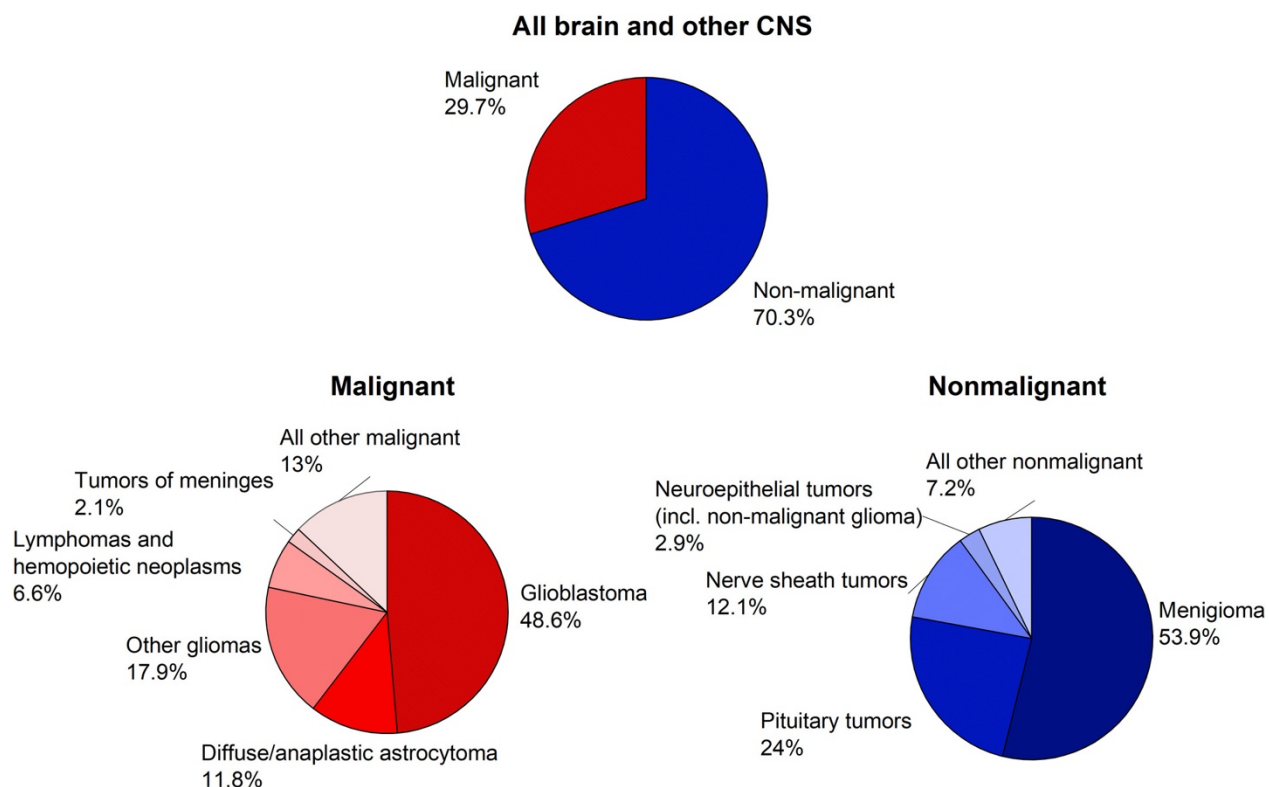


Figure 3.2 : Statistiques des tumeurs (malignes et bénignes) du système nerveux central. Les cancers comptent pour 29,7% de ces tumeurs, et parmi eux, 48,6% sont des glioblastomes. Tiré de Miller et al. (2021) ¹⁸. Copyright (2021) American Cancer Society.

Symptômes

Parmi les symptômes du GBM, on compte un phénomène d'hernie, où la masse tumorale prend de l'expansion hors de la zone normalement occupée par le cerveau¹⁹. La barrière hématoencéphalique peut également être perforée, et une accumulation de fluide crée un œdème²⁰. Ces deux phénomènes peuvent causer chez le patient une pression intracrânienne et une perte des capacités neurologiques²¹. Bien évidemment, les symptômes sont très variables selon l'emplacement de la tumeur, et peuvent passer de maux de tête, convulsions et vomissements à des changements de personnalité¹³.

Malignité et récurrence

Le pronostic peu enviable du glioblastome multiforme s'explique en partie par sa grande malignité. En effet, le GBM, comme la plupart des cancers, est capable de copier des cellules extrêmement rapidement. D'autre part, la morphologie infiltrante de ce type de tumeur (d'où lui vient son nom, multiforme ²²) se traduit par l'apparition de parcelles tumorales en périphérie de la colonie principale. Cette configuration rend très difficile le retrait de l'ensemble des cellules cancéreuses, et un retour de la maladie se produit généralement dans un rayon de 2 cm en périphérie de l'ablation chirurgicale dans deux tiers des cas, alors que chez le reste des patients elle survient dans un autre lobe, hémisphère ou région du cerveau²³. La récurrence presque inévitable du GBM chez le patient s'explique également par l'hétérogénéité de la signature génétique des cellules qui composent la même tumeur. Ceci implique que les traitements (tels que chimiothérapie, radiothérapie et immunothérapie) ont des résultats variables sur chacune des unités cancéreuses ²⁴.

3.3 Contraintes de l'environnement cérébral dans le développement d'un implant

Les traitements du GBM sont contraints aux conditions spécifiques dans lesquelles opère le système nerveux central. Des défis physiques et biochimiques doivent être surmontés afin qu'ils atteignent une certaine efficacité. Les lignes suivantes dressent la liste de quelques-uns de ces éléments.

i. Sensibilité des tissus sains environnants

Le cerveau est l'épicentre du corps, à la fois émetteur et récepteur d'informations, de commandes et de sensations. La destruction de cellules malades à des fins thérapeutiques dans cette région est irrémédiablement une opération délicate.

Dans le cas du glioblastome, le premier traitement privilégié est la chirurgie. La résection tumorale permet d'une part de retirer la plus grande partie de la néoplasie et de réduire la pression intracrânienne, et du même coup de permettre au clinicien d'effectuer une biopsie afin de déterminer le type et le stade du cancer ²¹.

La **Figure 3.3** présente le concept de marges chirurgicales. Une marge positive indique que le contour des tissus retirés contient des cellules cancéreuses, alors qu'une marge négative implique que tout le cancer est contenu hors du périmètre de résection ²⁵.

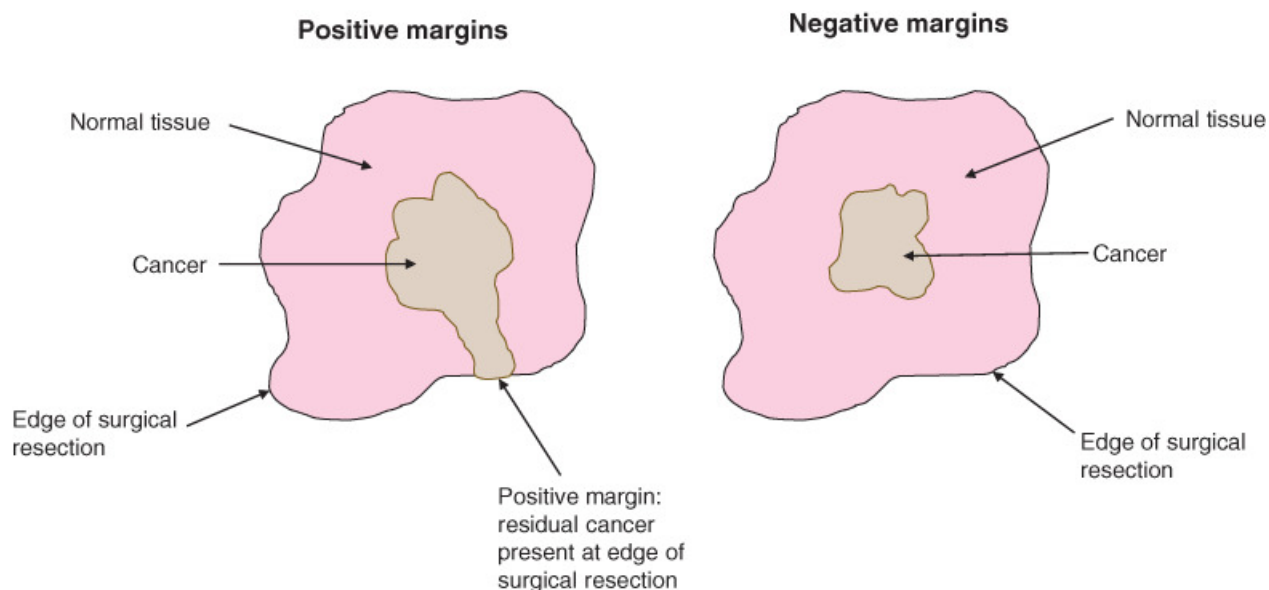


Figure 3.3 : Marges chirurgicales positives et négatives. Tiré de Tringale et al. (2018) ²⁵.
Copyright (2018) Wiley.

Dans un cas de cancer situé dans une zone aussi sensible et étant aussi agressif que le GBM, le compromis entre la résection maximale possible et la qualité de vie, voire la survie du patient, est à évaluer. Non seulement faut-il éviter de détériorer les capacités neurologiques du patient en retirant trop de tissus sains; mais aussi faut-il composer avec la morphologie étendue et parsemée du GBM.

Au-delà de cette notion de marges chirurgicales, même pour une résection totale, le cancer fait éventuellement récurrence. Cela relève du fait que des cellules cancéreuses sont également localisées en périphérie de la tumeur principale, et ne peuvent être complètement enlevées par la voie chirurgicale. Le traitement complémentaire le plus fréquent est alors la radiothérapie, qui débute lorsque la plaie est guérie¹³. Cependant, c'est désormais la radiosensibilité des cellules saines, c'est-à-dire leur vulnérabilité face à la radiation, qui met à son tour un frein à l'intensité de la thérapie. En effet, comme pour la chirurgie qui cherche à retirer une zone plus large que celle de la tumeur stricte, la

Figure 3.4 propose un principe similaire pour la radiothérapie.

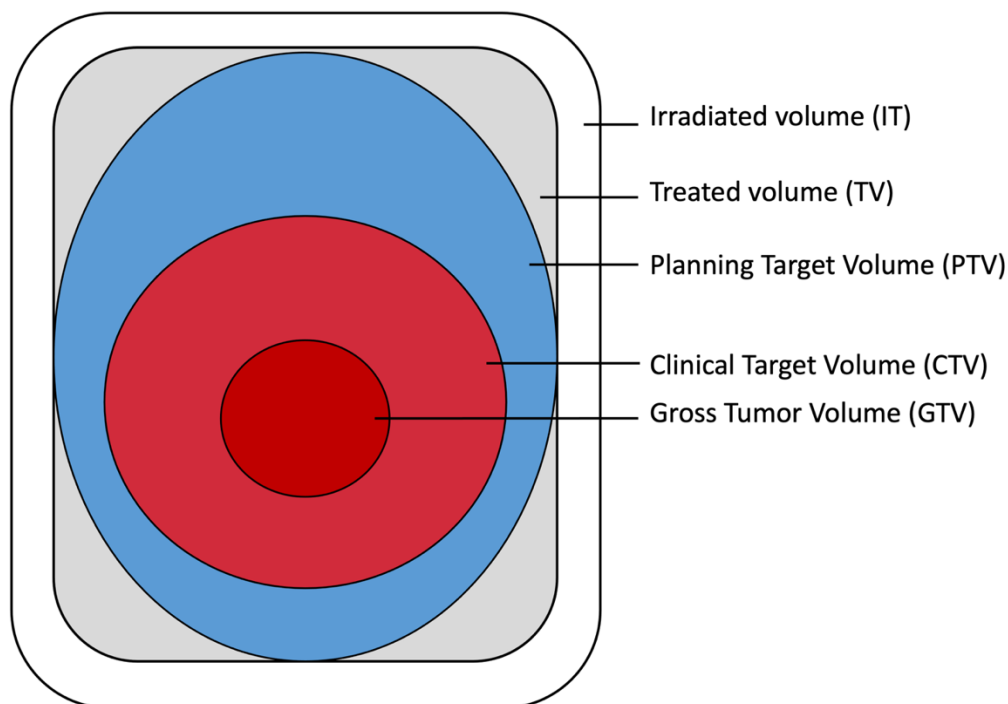


Figure 3.4: Nomenclature des volumes en radiothérapie. Image reproduite de Verhoeven et al. (2019)²⁶. Copyright (2019) Springer Nature.

Ainsi, le volume irradié théorique (sur la

Figure 3.4, identifié IT) est plus grand que le volume de la tumeur (sur la

Figure 3.4, identifié GTV), ce qui implique irrémédiablement l'atteinte des tissus sains.

L'équilibre entre la mortalité des cellules saines (que l'on cherche à limiter) et celle des cellules malades (que l'on cherche à maximiser) est atteint en partie grâce au concept de doses fractionnées. En effet, en utilisant le principe voulant que les cellules cancéreuses ont davantage de difficulté à réparer des mutations de l'ADN, et en appliquant des doses répétées mais espacées dans le temps, chacune sous le seuil de létalité (*sub-lethal dose*) mais pouvant tout de même causer des dommages, on encourage la réparation et la survie des cellules saines tout en promouvant l'accumulation de défauts dans les cancéreuses, menant éventuellement à leur mort. Ce processus mise sur les 5 **R**s de la radiothérapie : la **R**éparation, **R**éarrangement, **R**epopulation et **R**éoxygénation des cellules saines davantage que les cellules malades, dans une logique où la **R**adiosensibilité des unes par rapport aux autres avantage les premières²⁷.

Une étude réalisée par D'Alessandris a cependant montré que la radiosensibilité des neurones et de leurs cellules-souches saines est supérieure à plusieurs lignées de GBM, cellules malades. Ceci implique que l'irradiation doit être utilisée avec modération afin de ne pas détruire des cellules qui, tel qu'expliqué par les auteurs, sont parmi les rares cellules du cerveau qui ont un potentiel de se régénérer²⁸.

ii. Chimiosensibilité et barrière hématoencéphalique

La même étude par D'Alessandris propose une conclusion similaire au niveau des neurones et de leurs précurseurs face à l'utilisation de l'agent chimiothérapeutique témozolomide (TMZ) par rapport aux cellules ciblées de glioblastome multiforme²⁸. La chimiosensibilité des cellules saines est donc également un enjeu à considérer dans le choix et la posologie d'un traitement thérapeutique, complémentaire à la chirurgie ou non.

La chimiothérapie avec du TMZ s'avère tout de même un choix fréquent, car il est l'un des rares agents capables de traverser la barrière hématoencéphalique. On l'utilise en mode adjuvant, c'est-à-dire en même temps que la radiothérapie afin de rendre cette dernière plus efficace¹³. Administré oralement, il intègre le sang à un taux de biodisponibilité (proportion dans la circulation sanguine par rapport à la proportion ingérée) de près de 100%²⁹. Ensuite, par sa très petite taille et son caractère lipophile, il arrive à traverser la couche de cellules endothéliales qui tapissent les vaisseaux sanguins^{29,30} qui mènent au SNC à un taux d'environ 30% par rapport à la quantité dans le plasma²⁹.

De nombreux autres agents chimiothérapeutiques, tout comme 98% des médicaments, n'ont pas cette capacité³¹. Il en va de même pour une grande partie des virus et bactéries^{31,32}. En effet, il s'agit du rôle de la barrière hématoencéphalique de protéger le cerveau et la moelle épinière de la majorité des affections biologiques et chimiques qui leur seraient dommageables.

Il existe différentes manières d'administrer une chimiothérapie pour les cancers du cerveau³³:

- a. Voie systémique : introduction par la voie sanguine (ingestion ou administration intraveineuse) d'un agent chimiothérapeutique³³. Le TMZ en est un exemple²⁹.

- b. Voie régionale :
- i. Intraventriculaire : l'agent chimiothérapeutique est directement administré dans le liquide cérébro-spinal, par un cathéter, entre les ventricules du cerveau³³. **La Figure 3.5** présente cette option.
 - ii. Intrathécale : l'agent chimiothérapeutique est administré directement dans le liquide cérébro-spinal, par ponction lombaire, dans la colonne vertébrale³³.
- c. Voie locale :
- i. Livraison contrôlée : insertion d'implants chargés d'agents chimiothérapeutiques délivrés in situ³³.
 - Gaufrettes placées sur le site de la tumeur après la chirurgie ³⁴. La carmustine, commercialisée dans les implants Gliadel ®, en est un exemple¹⁷.
 - Nanogels injectés sur le site de la tumeur. La **Figure 3.6 (A)** en fait la représentation ³⁴.
 - Nanogels injectés par voie intraveineuse. Ceux-ci peuvent être conçus suffisamment petits pour traverser la barrière hématoencéphalique. La **Figure 3.6 (B)** en fait la représentation ³⁴.

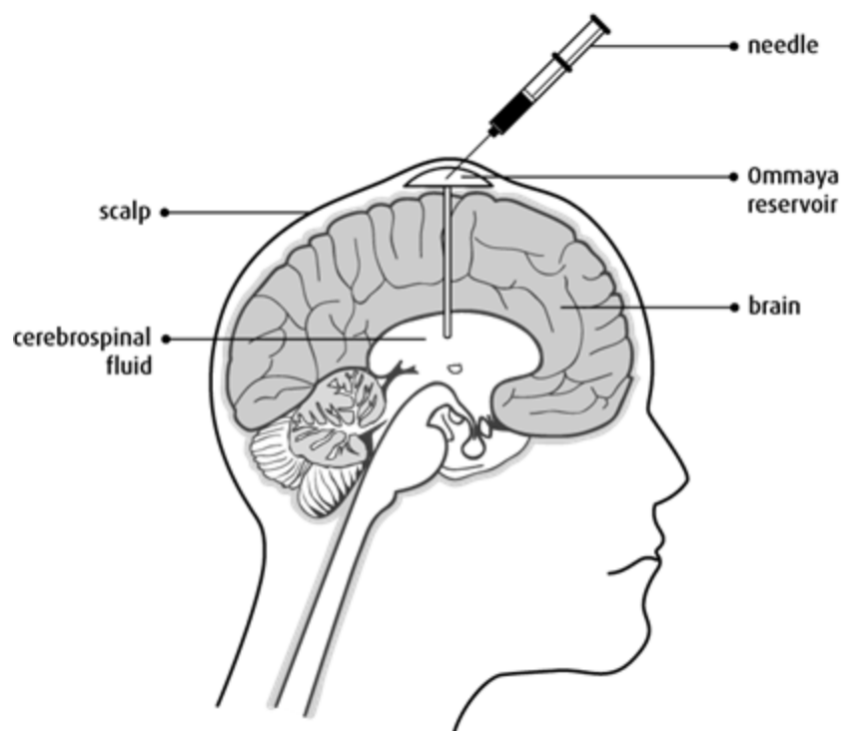


Figure 3.5: Représentation d'une chimiothérapie régionale par voie intraventriculaire. Tiré de la Société canadienne du cancer (s.d.)³³.

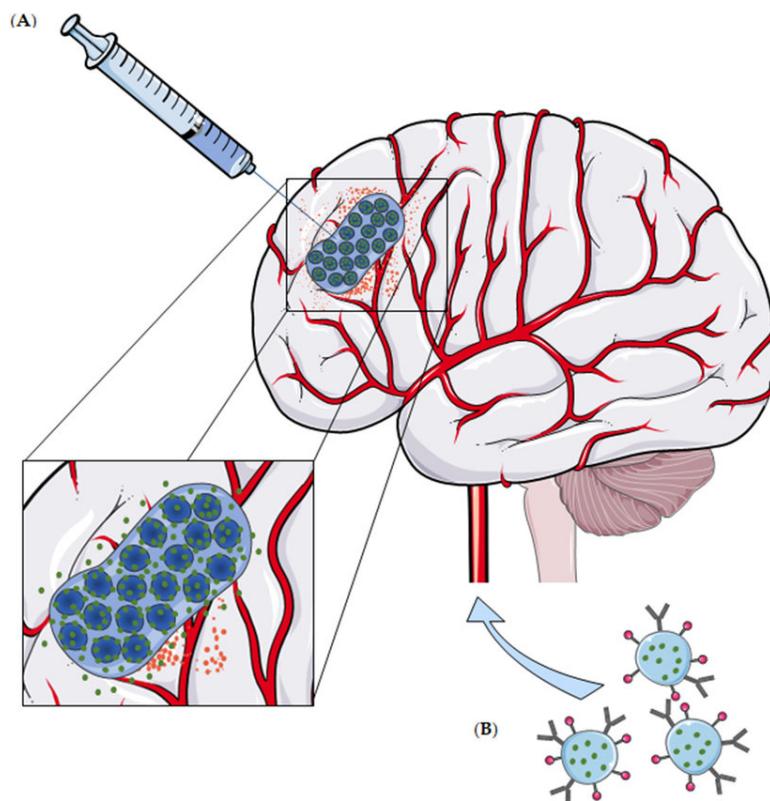


Figure 3.6: Représentation de la chimiothérapie locale où des nanogels sont (A) injectés sur le site de la tumeur ou (B) injectés par voie intraveineuse. Tiré de Basso et al. (2018)³⁴. Copyright (2018) MDPI.

iii. *Microenvironnement tumoral et immunité*

Une tumeur est un enchevêtrement complexe de cellules cancéreuses qui peuvent avoir une signature génétique hétérogène et se trouver à différents grades. On appelle ce concept l'hétérogénéité tumorale²⁴. D'autre part, les tissus qui entourent le cœur de la tumeur comptent des cellules immunitaires qui, contrairement à ce qui serait attendu d'elles, peuvent nuire au patient en promouvant par exemple la croissance du cancer (facteurs de croissance et d'angiogenèse leur étant destinées sont captées par la tumeur)³⁵. L'immunothérapie est un type de traitement qui vise à enseigner à certaines cellules immunitaires à reconnaître les tumeurs cancéreuses. Pour ce type de thérapie, l'hétérogénéité tumorale est un défi de taille, car son efficacité sur une telle variabilité est difficilement prédictible^{35,36}. La **Figure 3.7** offre une représentation de la composition (mélange de cellules cancéreuses et immunitaires) d'une tumeur (section de gauche) et des tissus environnants (section de droite). La morphologie infiltrante est clairement illustrée.

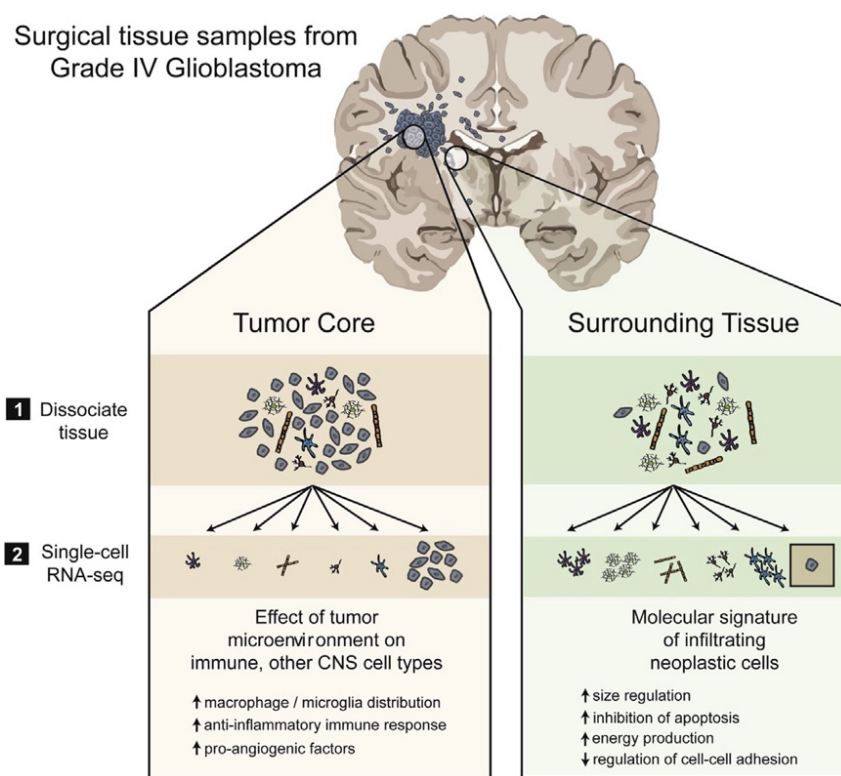


Figure 3.7: Représentation du microenvironnement tumoral et des types de cellules présentes dans le cœur de la tumeur et dans les tissus environnants. Tiré de Darmanis et al. (2017)³⁷.
Copyright (2017) Elsevier.

iv. Liquide cébrospinal (LCS) (ou céphalo-rachidien (LCR))

Le LCS remplit entre autres le rôle de transporter les composés salins, les hormones et les macronutriments (glucose, acides aminés, etc.) entre les différentes cellules du système nerveux central. De nombreux composés se retrouvent dans le LCS, tels que des vitamines, certaines cellules immunitaires (t.q. microgliales) et des ions inorganiques comme le manganèse³⁸. Le **Tableau 3.1** présente quelques concentrations essentielles du LCS par rapport au plasma sanguin.

Tableau 3.1: Composition du plasma et du liquide cérébro-spinal (LCS) (chez le chien ou le rat). Reproduit partiellement de Brown (2004) ³⁹. Copyright (2004) Elsevier.

Composé	Plasma	LCS
Na ⁺ (mM)	155	151
K ⁺ (mM)	4,6	3,0
Mg ²⁺ (mM)	0,7	1,0
Ca ²⁺ (mM)	2,9	1,4
Cl ⁻ (mM)	121	133
HCO ₃ ⁻ (mM)	26,2	25,8
Glucose (mM)	6,3	4,2
Acide aminé (mM)	2,3	0,8
Protéine (mg/100g)	6500	25
pH	7,4	7,4

Parmi ces éléments, les cations de sodium, de potassium et de magnésium amènent le risque de nuire à l'intégrité d'implants faits à partir d'hydrogels réticulés par voie électrostatique, comme des gels d'alginate et de calcium ³⁹. En effet, une substitution ionique s'observe entre les ions calcium bivalents et les espèces monovalentes (ou bivalentes mais incapables de former un réseau tridimensionnel fort, comme le magnésium). Cet échange d'ions se traduit par la dégradation précoce du gel *in vivo* ⁹. Similairement, le contenu en certaines formes de PO₄³⁻ présente un fort effet de chélation avec les ions calcium, et agit aussi comme agent déstabilisant des gels d'alginate-calcium⁹.

L'effet du contenu du fluide céphalo-rachidien doit être pris en compte lors de la conception d'un matériau destiné à être implanté chez le vivant. Il est légitime cependant de questionner la fluctuation des concentrations de ce même liquide lorsque le système est soumis à un état de stress, tel que d'anesthésie, de chirurgie, de réponse inflammatoire ou de pathologie comme le cancer. Il a d'ailleurs été démontré que lorsque la barrière hématoencéphalique est percée, par le résultat de diverses conditions médicales, les concentrations des fluides sanguins et cérébraux sont perturbées, et le mélange de contenu se produit. Dans le cas spécifique du PO₄³⁻, sa concentration étant inférieure dans le LCS en comparaison au sérum sanguin, elle se voit augmenter suite à ce type de perturbation. Similairement, alors que la teneur en phosphate des cellules est aussi supérieure à celle du LCS, la nécrose des cellules, un type de mort cellulaire qui, contrairement à l'apoptose, déverse le contenu de la cellule dans son environnement ⁴⁰, et vient à son tour augmenter la teneur

du LCS en ce composé ⁴¹. Or, les tumeurs de GBM sont caractérisées par des régions hémorragiques et d'autres nécrotiques ^{22,42} – l'augmentation en phosphate dans ces conditions est donc à considérer. D'autre part, Heipertz et ses collaborateurs ont établi une corrélation entre les tumeurs du CNS (sans mentionner lesquelles) et l'augmentation de la concentration en phosphate dans le liquide cérébro-spinal ⁴¹.

v. *Surface des cellules*

La biochimie de surface est un concept essentiel en génie tissulaire et biomédical. L'interaction de l'hôte avec le corps étranger en est une capitale. Alors que la toxicité, l'immunogénicité (soit la capacité d'induire une réponse immunitaire), la biocompatibilité et la biodégradation sont des éléments critiques dans le développement d'un substrat artificiel, la capacité des cellules à y adhérer est un enjeu d'aussi grande importance. Si l'intérêt de l'implant est d'interagir avec les cellules, il est nécessaire que le matériau de la matrice suscite leur adhésion. Différentes approches peuvent être employées afin de parvenir à cet objectif, notamment en exploitant la polarité de certains récepteurs présents sur la membrane cellulaire.

Les glycosaminoglycanes (GAGs) et protéoglycanes (PGs) sont respectivement des polysaccharides, et des protéines sur lesquelles sont greffées des polysaccharides (en l'occurrence des GAGs) ^{43,44}. Il existe 5 types de glycosaminoglycanes (hyaluronane, chondroïtine, dermatane, héparine/héparane, keratan⁴⁴) et elles sont composées d'un motif formé d'un saccharide aminé et d'un acide uronique⁴⁴. Elles sont présentes dans la matrice extracellulaire des membranes, incluant dans les cellules gliales et neuronales du cerveau au niveau des GAGs ⁴³. Ce sont des molécules polaires chargées négativement ^{43,45-47}. Le chitosane, un polysaccharide chargé positivement, peut former avec ces composés des complexes par voie électrostatique, et pourrait promouvoir l'adhésion cellulaire sur une matrice dans un milieu *in vivo* ⁴⁸. Une chaîne de chitosane fonctionnalisée d'un peptide peut également interagir avec d'autres récepteurs cellulaires, comme des intégrines, tel que démontré par Mochizuki avec un peptide de laminine ⁴⁹. D'autres polysaccharides, comme l'alginate (anionique) fonctionnalisé avec le peptide d'adhésion CGGRGDS, a su favoriser l'accumulation et la rétention de cellules de glioblastome multiforme sur-exprimant les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ ^{6,50,51}.

Outre ces intégrines, le récepteur CXCR4 est également exprimé sur les cellules cancéreuses, incluant celles du GBM. Gascon et ses collaborateurs ont démontré que des nanoparticules contenant du CXCL12, une molécule qui normalement promeut la migration des cellules cancéreuses lors de l'invasion des tissus sains, pouvaient relâcher ce chimioattractant afin d'orienter le déplacement des cellules tumorales dans une direction désirée en les faisant remonter le gradient de concentration de cette molécule⁵.

vi. Module des tissus cérébraux

Alors que la section précédente traitait de l'importance de la biochimie de surface d'un implant, celle-ci décrit l'importance de ses propriétés mécaniques, en particulier de son module de compression. En génie tissulaire, la rigidité du substrat est un élément essentiel lors de la croissance des cellules et durant leur phase de différenciation, c'est-à-dire lorsqu'elles se spécialisent. Pour les précurseurs neurales, qui évoluent éventuellement en neurones ou en cellules gliales, il en va de même, tel que rapporté par Murphy et ses collaborateurs⁵². Ainsi, dans un cas où une matrice serait implantée afin de faire la capture de cellules cancéreuses, comme proposé par Autier⁵³ et par Solano⁶, ce paramètre est essentiel dans la fabrication dudit support. Pour la matière grise et blanche de l'humain, Murphy rapporte que le module de compression se situe respectivement autour de 2,28 et 2,37 kPa⁵². D'autres études rapportent des valeurs pour les tissus cérébraux entre 0,1 et 16 kPa⁵².

Utilisation de biomatériaux dans la recherche sur le GBM

À ce jour, aucun traitement du GBM n'a réussi à améliorer significativement le taux de survie des patients. Les traitements les plus communs continuent d'être explorés (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie et immunothérapie), alors que d'autres, comme ceux qui utilisent des biomatériaux, prennent leur essor. Alors que les biomatériaux peuvent être retrouvés sous différentes formes, telles que dans le cas d'implants chargés en chimiothérapie (nanogels, gaufrettes), les matrices tridimensionnelles se sont établies comme des supports essentiels. De la modélisation de l'environnement cérébral pour la recherche scientifique afin de mieux comprendre le GBM⁵⁴, à la culture de tissus cérébraux,⁵⁵ en passant par la capture de cellules cancéreuses⁵⁶, ces échafaudages, bien établis pour de nombreuses autres applications biomédicales, suscitent un intérêt particulier par rapport aux substrats 2D. La section suivante abordera leur fabrication.

3.2 Développement de matrices poreuses

En génie tissulaire, il est admis que pour qu'un groupe de cellules puisse proliférer et se différencier (c'est-à-dire se spécialiser et adopter une morphologie et une fonction distinctives), un support 3D est idéal, contrairement à un substrat 2D, pour imiter l'environnement vivant⁵⁷. Ce biomimétisme tridimensionnel est crucial aux cellules pour qu'elles perçoivent les signaux (p. ex. de croissance, de communication intercellulaire) de manière similaire à lorsqu'elles se trouvent dans le corps⁵⁷. Ainsi, de nombreuses techniques de fabrication d'échafaudages destinés à la croissance artificielle de tissus ont été développées avec les années, chacune portant des avantages et des limites.

Dans le cas du glioblastome multiforme, l'utilisation de matrices poreuses est proposée en particulier afin d'imiter *in vitro* l'environnement cérébral et mieux étudier la pathologie et de potentiels traitements. Cha et Kim proposent une revue des principales techniques de fabrication et principaux polymères synthétiques et naturels utilisés pour la recherche sur le GBM⁵⁸.

3.2.1 Principales techniques de fabrication de matériaux tridimensionnels poreux

Le **Tableau 3.2** présente un descriptif abrégé des méthodes de fabrication de matrices poreuses les plus communes.

Tableau 3.2: Principales techniques de fabrication de matrices poreuses

Technique	Avantages	Inconvénients
A. Mélanges binaires et séparation de phases		
<p>i. Évaporation de solvant et lixiviation de particules</p> <p>Un polymère est dissout à l'aide d'un solvant, puis mélangé à des particules. Suite à l'évaporation du solvant, une pièce solide de polymère est obtenue. Les particules sont ensuite lixiviées par le lavage de la</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Grande porosité possible (50-90%) • Taille de pore contrôlée par le choix des particules • Peu coûteux • Montage simple 	<ul style="list-style-type: none"> • Solvants toxiques • Les particules au centre du volume peuvent être hors d'atteinte. Pour fabriquer une matrice 3D, il faut donc superposer plusieurs fines membranes poreuses. • Répartition des pores et interconnectivité difficilement contrôlables

pièce et un matériau poreux est obtenu ^{59,60} .		<ul style="list-style-type: none"> • Temps d'évaporation des solvants long
<p>ii. Lyophilisation</p> <p>Un polymère dissout dans un solvant est gelé puis lyophilisé. L'espace laissé par les cristaux de solvant forme la structure poreuse ^{59,60}.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Contrôle de la taille des pores possible en ajustant la température de lyophilisation (p.ex. -10°C à -70°C) • Porosité interconnectée • Évite un procédé à température élevée 	<ul style="list-style-type: none"> • Temps d'évaporation très long • Solvants très souvent toxiques
<p>iii. Séparation de phases induite par la variation de température</p> <p>Un polymère dissout dans un solvant et placé à température élevée est refroidi afin de créer une séparation de phases, l'une riche et l'autre pauvre en polymère. Le solvant est ensuite retiré par lyophilisation ^{59,60}.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Porosité uniforme 	<ul style="list-style-type: none"> • Taille des pores obtenus très petite et pas compatible avec toutes les applications • Solvants toxiques • Procédé à température élevée
<p>iv. Moussage par voie gazeuse</p> <p>Un polymère fondu est moussé par dépressurisation, par un gaz inerte. Le refroidissement de la pièce résulte en un matériau poreux ^{59,60}.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Grande porosité possible (>90%) • Pas d'utilisation de solvants • Temps de fabrication rapide 	<ul style="list-style-type: none"> • Taille de pores et interconnectivité difficilement contrôlables • Procédé à température et pression élevées
<p>v. Dissolution sélective de mélanges de polymères co-continus</p> <p>Deux polymères immiscibles sont extrudés pour former un</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Grand contrôle de la taille de pores, de la porosité et de l'interconnectivité à l'aide d'étapes de recuits et de compatibilisants 	<ul style="list-style-type: none"> • Temps de préparation et d'usinage longs • Solvants toxiques

<p>mélange co-continu qui est ensuite dissout sélectivement pour donner une phase poreuse ⁸.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Technique facilement mise à l'échelle et reproductible • Possibilité de créer plus d'un réseau interconnecté de tailles différentes (mélanges ternaires) 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitation dans la taille et la forme de la matrice selon le processus d'extrusion
<p>B. Mise en forme structurée</p>		
<p>vi. Électrofilage</p> <p>Une différence de potentiel permet de projeter une fibre polymérique sur un réceptacle et de créer un réseau enchevêtré. De l'électrofilage avec ou sans solvant est possible ^{59,60}.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Grande porosité et aire de surface possibles • Taille des pores peut être contrôlée par la taille de la fibre • Rapidité de fabrication 	<ul style="list-style-type: none"> • Montage spécifique nécessaire à la fabrication • Solvants toxiques pour l'électrofilage avec solvant • Structure moins fine pour l'électrofilage sans solvant qui utilise le polymère sous sa forme fondue • Limitations techniques quant à la capacité de créer un réseau complexe et à porosité bien distribuée
<p>vii. Impression 3D assistée par ordinateur (techniques variées)</p> <p>À partir d'un dessin conçu par ordinateur, une matrice poreuse sur mesure peut être fabriquée. Plusieurs techniques de ce type de prototypage rapide existent (frittage sélectif par laser, stéréolithographie, impression 3D, autres) ^{59,60}.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Prédicibilité du matériau obtenu puisqu'il peut être hautement paramétré lors de la conception • Hautement interconnecté si désiré, et taille de pores contrôlée 	<ul style="list-style-type: none"> • Montage spécifique nécessaire à la fabrication • Fabrication à l'unité • Limitations relatives à la technologie de prototypage rapide choisie

<p>viii. Impression de matière biologique (<i>Bioprinting</i>)</p> <p>À travers des méthodes variées (impression à jet d'encre, microextrusion, impression assistée par laser, autres), une impression d'un matériel biologique se fait avec une grande précision. Ce matériel peut contenir des cellules ⁵⁹.</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Aucun solvant • Fabrication en une seule étape de matériaux faits de polymères naturels contenant déjà des cellules si désirées 	<ul style="list-style-type: none"> • Limitation de l'ajustement des paramètres de fabrication si des cellules sont présentes • Limitations respectives à la technologie choisie
---	--	---

3.2.2 Dissolution sélective à partir de mélanges de polymères immiscibles continus

Depuis leur début, les polymères synthétiques ont suscité un intérêt commercial pour leurs propriétés mécaniques versatiles, leur faible densité et leur faible coût. Au fil des évolutions technologiques rapides du dernier siècle, le besoin de développer des matériaux plus performants a mené les industriels à mélanger des polymères en espérant obtenir de meilleures propriétés ⁶¹.

Les mélanges de polymères se classent en fonction d'une notion élémentaire: leur miscibilité. Par définition, la miscibilité définit la capacité d'au moins deux éléments de natures distinctes à former un mélange homogène à l'échelle moléculaire ⁶².

La miscibilité entre polymères est permise lorsque les conditions thermodynamiques des éléments composant le mélange lui sont favorables. L'équation de l'énergie libre de Gibbs (ΔG_m) régit ces conditions :

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m$$

Équation 3.1: Énergie libre de mélange de Gibbs

Pour qu'un mélange binaire soit spontanément miscible, il faut en premier lieu que l'énergie de Gibbs de mélange soit négative ($\Delta G_m < 0$) ⁶³. Ceci est d'une part possible lorsque le terme d'entropie du mélange est maximal; plus il est élevé, plus le désordre permet de disperser les molécules les unes par rapport aux autres, et plus est favorisée une solution homogène. Or, les

polymères sont des macromolécules dont la taille de chaîne est généralement très élevée. Ainsi, les mélanges de polymères tendent à avoir une contribution d'entropie de mélange plus faible, puisque leur conformation encombrante réduit la capacité de mélange. Cette notion est représentée à la **Figure 3.8**. Conséquemment, les mélanges de polymères sont de fait très souvent immiscibles ⁶². Le terme d'enthalpie, ainsi que des notions thermodynamiques complémentaires, sont présentées en **Annexe 4**.

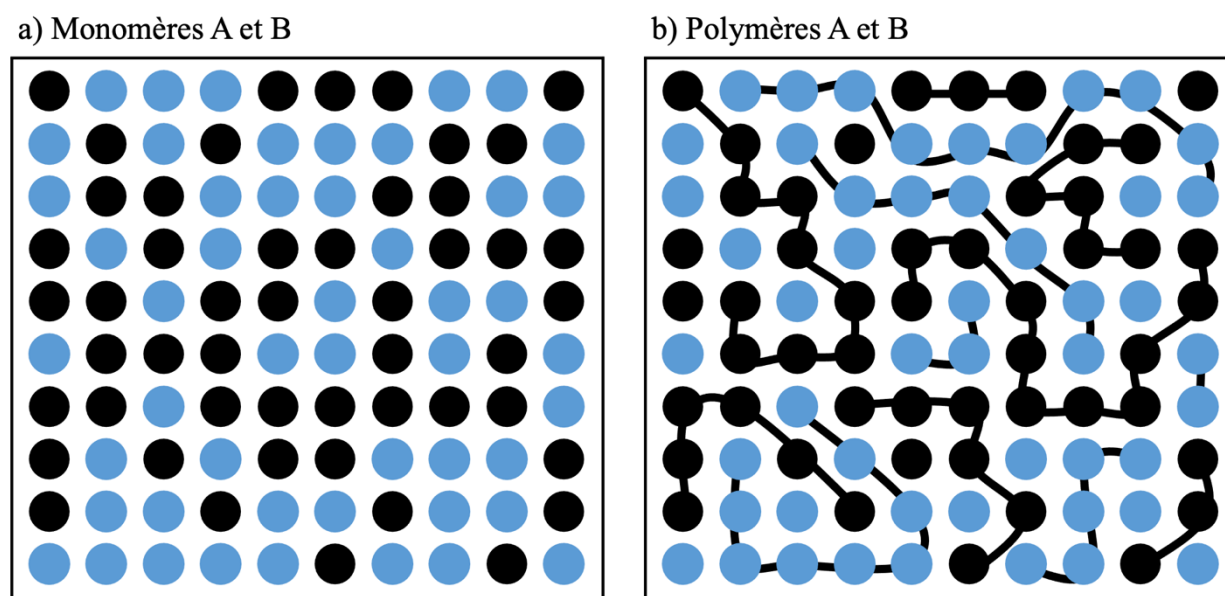


Figure 3.8: Capacité de désordre spontané (entropie) pour a) un mélange de monomères, et b) un mélange de polymères. Figure inspirée de Lee et al. (2017)⁶⁴. Copyright (2017) Taylor & Francis.

Favis, Macosko et leurs collaborateurs ont étudié les mélanges de polymères immiscibles depuis plus de 30 ans. Leurs travaux ont permis de développer des systèmes binaires hautement interconnectés, dits co-continus, qui peuvent être mis en forme de sorte à obtenir des moules poreux utiles à l'industrie biomédicale ⁶ ou chimique de haute performance ^{65,66}. La **Figure 3.9** présente ce processus. Parmi les mélanges de polymères immiscibles qu'ils ont étudiés, on note :

- Polypropylène et Polycarbonate (PP/PC)
- Poly(méthyl méthacrylate) et Polycarbonate (PMMA/PC)
- Polystyrène et Poly(L-lactide) (PS/PLA)
- Poly(ϵ -caprolactone) et Poly(L-lactide) (PCL/PLA)

- Poly(ϵ -caprolactone) et Poly(éthylène) oxyde (PCL/PEO)
- Et plusieurs autres.

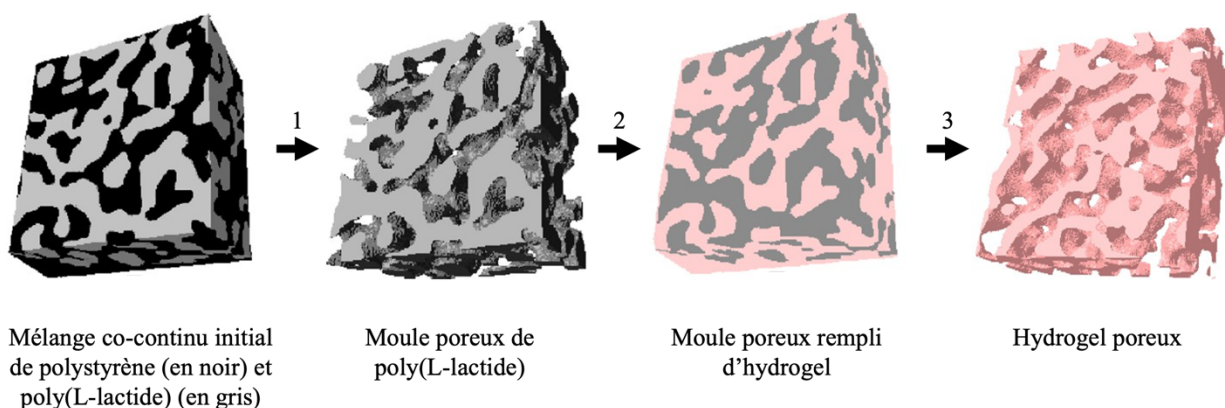


Figure 3.9: Processus de fabrication d'hydrogels poreux à partir d'un mélange co-continu de polymères immiscibles (ici de polystyrène et de poly (L-lactide), où 1) la phase de polystyrène est dissoute à l'aide de cyclohexane; 2) la solution précurseur d'hydrogel est injectée sous-vide dans le moule; et 3) la phase de poly(L-lactide) est dissoute à l'aide de chloroforme. Tiré et traduit de Esquirol (2014) ⁷. Copyright (2014) American Chemical Society.

La force de cette méthode de fabrication de matrices poreuses réside dans sa capacité de contrôler avec une grande précision la structure obtenue (distribution de la taille de pores, volume poreux, niveau d'interconnectivité). De plus, le processus de fabrication peut être adapté aux contraintes amenées par le vivant, telles que le besoin d'une faible toxicité des matériaux (polymères, solvants), d'une bioactivité de la surface (injection d'hydrogels ⁶, ajout de couches actives par la technique *layer-by-layer* ^{67,68}) et d'une structure tridimensionnelle encore plus complexe grâce à des mélanges ternaires ⁶⁹. Les sections suivantes présentent les concepts régissant les différentes morphologies des mélanges de polymères immiscibles; les techniques de fabrication et de caractérisation; et les applications pertinentes.

La phase mineure

Un mélange binaire immiscible peut montrer une microstructure de type phase dispersée dans une matrice. Plus la quantité de phase dispersée augmente, plus se produit de la coalescence entre les

gouttelettes de la phase dispersée, et plus leur diamètre augmente ⁷⁰. À titre d'exemple, l'effet de la concentration en polycarbonate (PC) dans une matrice de polypropylène (PP) sur le diamètre de la phase mineure est représenté à la **Figure 3.10**.

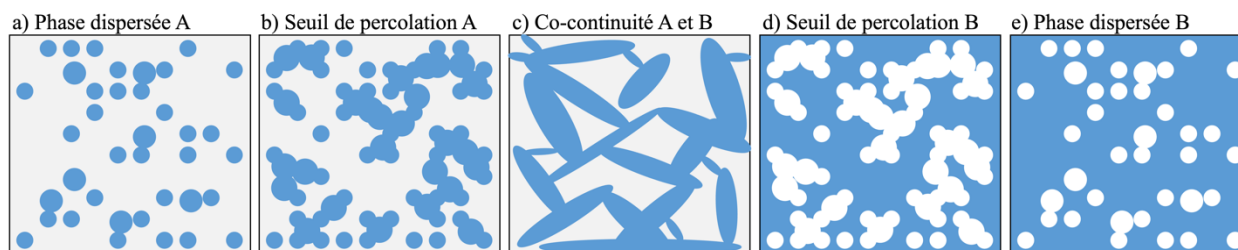
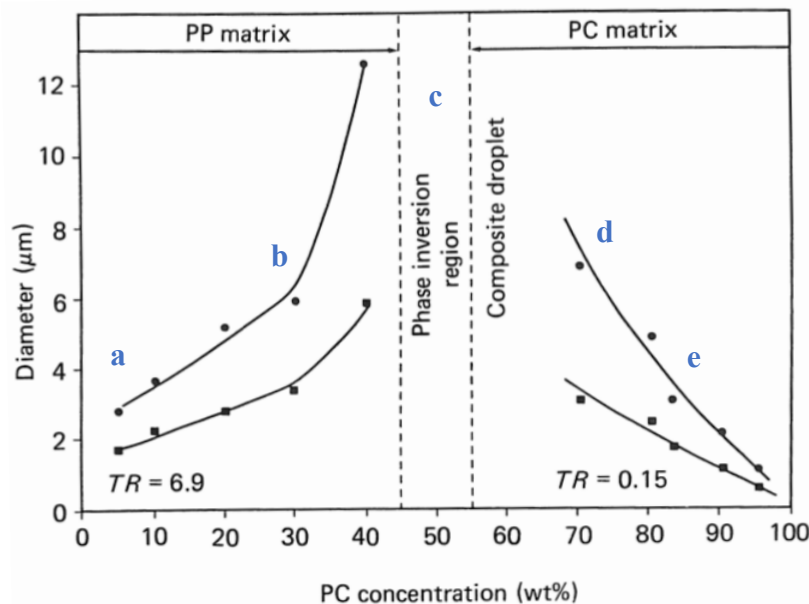


Figure 3.10: Évolution du diamètre de la phase mineure en fonction de sa concentration pour un mélange de polypropylène (PP) et de polycarbonate (PC). Les courbes inférieures montrent le diamètre moyen en nombre (d_n) et les courbes supérieures le diamètre moyen en volume (d_v). Adapté de Favis et Chalifoux (1988) ⁷⁰ et inspiré de Ravati et Favis (2010) ⁷¹. Copyright (1988) Elsevier; Copyright (2010) Elsevier.

À une concentration donnée, le diamètre de la phase mineure commence à augmenter dramatiquement à chaque nouvel incrément de polymère. Il s'agit du seuil de percolation. Au-delà de ce point, la phase mineure adopte une morphologie présentant « différents niveaux de continuité » ⁷². La **Figure 3.11** montre un mélange immiscible adoptant une morphologie (a) dispersée et (b) co-continue.

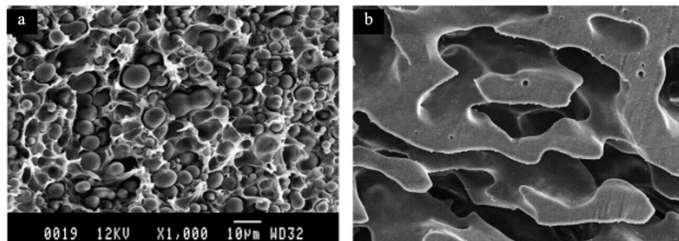


Figure 3.11 Morphologie a) dispersée et b) co-continue d'un mélange de polymères immiscibles. Tiré de Ravati et Favis (2010) ⁷¹. Copyright (2010) Elsevier.

Contrôle de la morphologie des mélanges de polymères immiscibles co-continus

Le processus de fabrication de mélanges immiscibles co-continus de polymères peut se faire à l'aide d'un mélangeur interne⁷³ ou d'une extrudeuse⁵⁶. La **Figure 3.12** illustre les points essentiels du processus qui peuvent avoir une influence sur l'interconnectivité des phases.

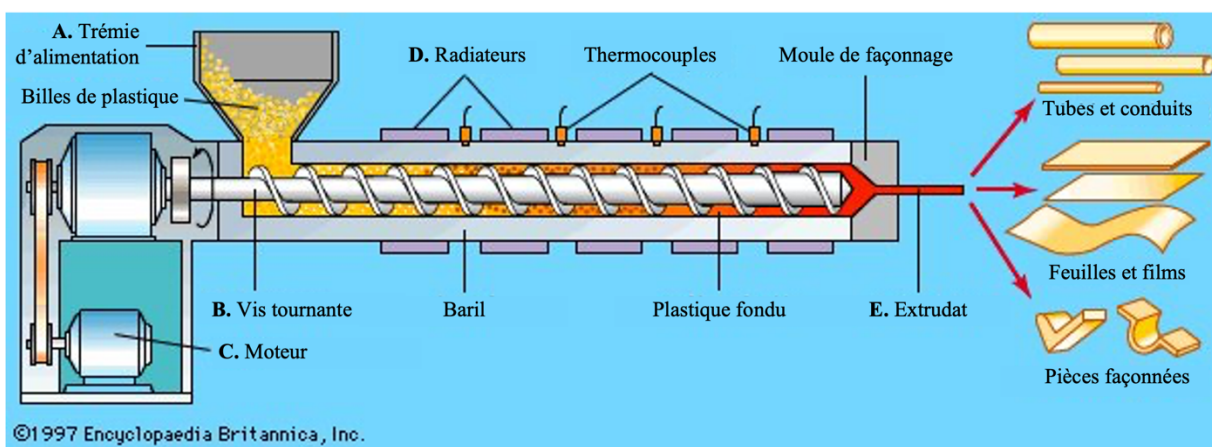


Figure 3.12 : Représentation du processus d'extrusion. Traduit et adapté de Encyclopædia Britannica (1997) ⁷⁴.

En effet, la morphologie des mélanges de polymères immiscibles peut être influencée par de nombreuses variables dans le processus de fabrication. Les lignes suivantes présentent les différents points du procédé et les paramètres qui peuvent être variés:

A. **Trémie d'alimentation** : les billes de plastiques sont ajoutées à l'extrudeuse.

- Nature des polymères immiscibles (ratios de viscosité et élasticité) et de leur interface ⁷³
- Ratio de chacun des polymères ⁷³
- Ajout d'un compatibilisant afin de diminuer la taille de pores du réseau

B/C. **Vis tournante et Moteur** : les billes de plastiques sont mélangées.

- Cisaillement subi par les polymères peut orienter le réseau co-continu

D. **Radiateurs** : les polymères sont chauffés afin de l'amener à sa phase fondue.

E. **Extrudat** : le mélange de polymère sort de l'extrudeuse et est plongé dans un fluide froid afin d'en figer la morphologie⁷³.

- Recuit afin d'augmenter la taille de pores du réseau

Contrôle de la taille de pores du réseau co-continu

Tel que mentionné à la section précédente, deux opérations peuvent être réalisées afin de contrôler la taille de pores d'un réseau co-continu : l'ajout d'un compatibilisant, et le recuit.

i. Compatibilisation :

L'ajout d'un copolymère permet de réduire la tension interfaciale entre un polymère A et un polymère B. Un copolymère est généralement une courte chaîne dont un segment contient un monomère ayant une polarité compatible avec le polymère A, et un autre avec le polymère B. Il vient se loger à l'interstice des polymères durant le mélange et, selon la quantité ajoutée, permet de réduire l'immiscibilité entre les deux phases. Cela peut d'une part permettre d'obtenir une morphologie plus fine; et d'autre part, cela peut stabiliser la morphologie du mélange (et donc ses caractéristiques) lorsque la pièce est soumise à nouveau à la chaleur, par exemple dans le cadre d'un recuit⁷⁵.

ii. Recuit :

Le recuit a l'objectif contraire de la compatibilisation, c'est-à-dire qu'il a pour but de faire évoluer la morphologie d'une pièce après la fin de son extrusion. La **Figure 3.13** présente ce phénomène. En réappliquant de la chaleur de manière uniforme, (a) les polymères se dilatent en leur volume. Dans une région donnée, (b) les embranchements plus minces d'un polymère A subissent alors la pression de l'autre phase. Par effet capillaire, (c) le polymère A est repoussé vers les volumes les plus proches, et (d) le

petit embranchement disparaît. Par ce processus, on observe un phénomène de grossissement de chacune des phases, ou *coarsening*. Le temps, la température et l'uniformité de la chaleur de la pièce lors du recuit sont les paramètres d'influence pour ce processus de modification de la taille des phases.

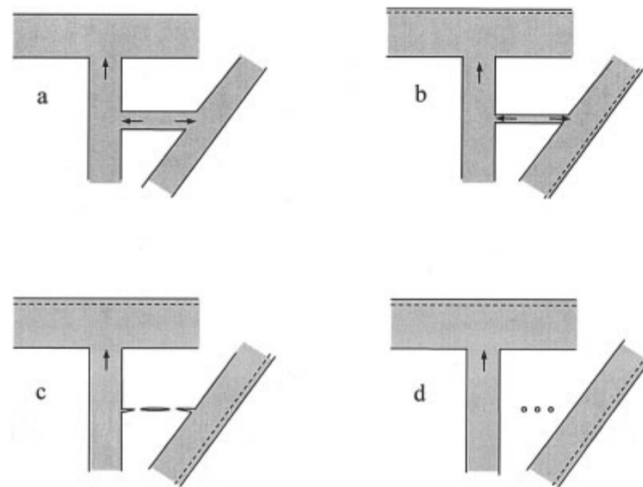


Figure 3.13: Processus de grossissement (*coarsening*) des phases lors d'un recuit. Tiré de Yuan et Favis (2005) ⁷⁶. Copyright (2004) Wiley.

La **Figure 3.14** présente l'effet de recuit sur un mélange de PS/PE 50/50 tel que publié par Galloway et ses collaborateurs. L'échelle sur ces images est de $100 \mu\text{m}$.

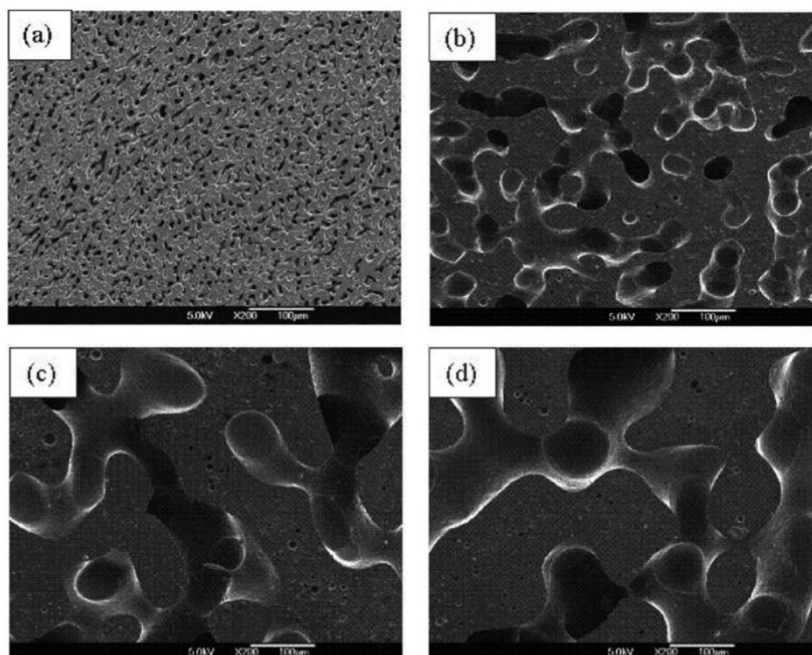


Figure 3.14: Micrographies SEM d'un mélange PS/PE ayant subi un recuit à 170°C de (a) 0 min, (b) 10 min, (c) 15 min et (d) 25 min. Tiré de Galloway et al. (2005)⁷⁵. Copyright (2005) Elsevier.

Méthodes de caractérisation de la morphologie

Le **Tableau 3.3** présente les principales méthodes analytiques utilisées afin de caractériser la co-continuité et la taille de pores des matrices poreuses. Celles-ci ne se limitent pas aux matrices poreuses obtenues par la technique de dissolution sélective.

Tableau 3.3: Méthodes de caractérisation de la morphologie co-continue

Caractérisation de la co-continuité	
Microscopie électronique à balayage (SEM) ⁷⁷ et microtomographie (Micro-CT) ⁵⁶	Les techniques d'imagerie permettent d'observer la morphologie à l'échelle du micron. La microscopie électronique à balayage permet d'observer une tranche d'échantillon, alors que la microtomographie permet de prendre des photographies à différentes épaisseurs du volume. Par analyse computationnelle de ces images, il est ensuite possible d'estimer la taille de pores, la porosité et la surface spécifique.

Gravimétrie ⁷²	<p>La gravimétrie consiste à mesurer la masse d'un moule avant et après la dissolution de l'une des phases. En utilisant le ratio suivant, il est alors possible de déterminer le pourcentage de continuité du réseau :</p> $\%_{\text{continuité}} = \frac{(m_{\text{copolymère ou Polymère}})_{\text{initial}} - (m_{\text{copolymère ou Polymère}})_{\text{final}}}{(m_{\text{copolymère ou Polymère}})_{\text{initial}}} \times 100\%$
Analyse BET (Brunauer, Emmett et Teller) ⁷²	<p>L'analyse BET est une technique qui consiste à injecter de l'azote dans le moule poreux, et d'évaluer la quantité adsorbée par la surface. En posant des hypothèses, notamment que les pores sont de forme cylindrique, la surface spécifique et la taille de pores peuvent être estimés :</p> $S = \frac{v_m \cdot N \cdot a}{v_M}$ <p>Où N : nombre d'Avogadro a : aire requise pour une molécule d'azote adsorbée v_m : volume d'azote gazeux requis pour former une monocouche d'azote adsorbé v_M : volume molaire du gaz</p>
Porosimétrie par intrusion de mercure (MIP) ⁷³	<p>Cette technique permet d'estimer la porosité (d_n, d_v et la distribution de la taille de pores). Elle consiste à injecter du mercure sous pression et utiliser l'équation de Washburn ⁷³ :</p> $Pr = -2\sigma_m \cos \theta$ <p>Où P : pression appliquée; r : le rayon du pore; σ_m : tension de surface du mercure; θ: angle de contact entre le polymère et le mercure.</p>

Applications avancées et intérêt biomédical

La technique de fabrication de moules poreux par l'utilisation de mélanges co-continus de polymères immiscibles s'applique au domaine biomédical. Par exemple, Sarazin (2004) a montré la capacité d'une telle matrice de se charger et de relâcher une solution aqueuse pour la délivrance de médicaments⁷⁸. Les travaux d'Esquirol (2013) ont montré qu'il était possible de fabriquer un hydrogel macroporeux en injectant une solution précurseur dans le moule et en dissolvant la phase polymère. Solano (2021) a repris ce principe afin de produire une matrice à porosité hautement

contrôlée et interconnectée dans le cadre du développement d'une gliotrappe destinée à la capture *in vivo* de cellules cancéreuses de glioblastome multiforme.

La technique de fabrication de moules poreux par la voie de polymères immiscibles est intéressante, car elle permet de produire des matrices ayant des propriétés très complexes. Par exemple, il est possible de concevoir une matrice ayant deux réseaux interconnectés de tailles de pores différentes, tel que présenté à la **Figure 3.15**. Cela est possible à partir d'un mélange ternaire, en extrudant un polymère A à un mélange de polymères B/C. Deux dissolutions sélectives consécutives permettent alors d'obtenir la matrice poreuse. Ceci est une voie intéressante en génie tissulaire lorsque l'on désire créer une canalisation spécifique à l'acheminement de nutriments ⁶⁹. Similairement, un second réseau pourrait contenir un hydrogel gorgé d'un médicament ⁶⁹ ou d'un chimioattractant.

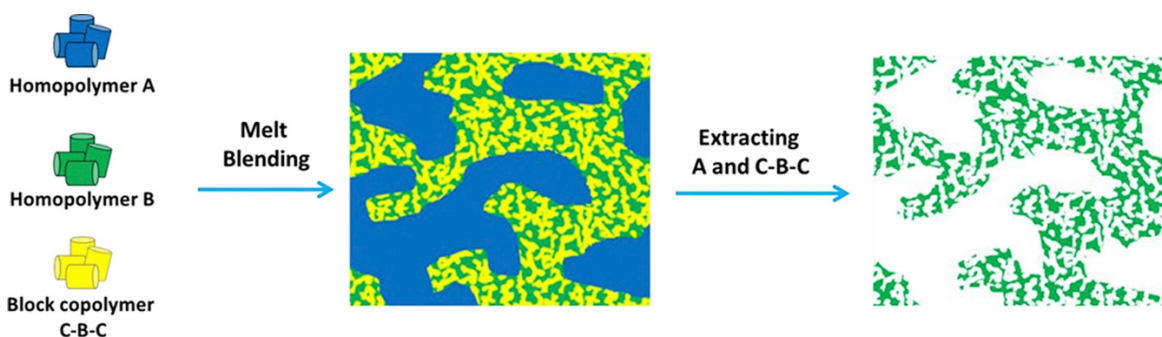


Figure 3.15: Processus de fabrication de matrices poreuses à deux tailles de pores à partir d'un mélange ternaire de polymères immiscibles. Tiré de Wang (2014) ⁶⁹. Copyright (2014) Elsevier.

D'autre part, une matrice poreuse faite à partir d'un polymère synthétique peut voir sa surface bonifiée en termes d'adhésion cellulaire. En utilisant la technique LbL (*layer-by-layer*), il a été démontré par Ghavidel et ses collaborateurs qu'une fine couche de chitosane pouvait être déposée sur une matrice de poly(ϵ -caprolactone) (PCL) préparée par dissolution sélective d'un mélange immiscible initial de PCL et de poly(éthylène) oxyde (PEO) ⁶⁷. Copyright (2014) Elsevier.

3.3 Hydrogels à base de biopolymères hydrosolubles

3.3.1 Notions introductives

Les polymères sont des macromolécules (poids moléculaire entre 10^4 et 10^7)⁷⁹ dont la chaîne se compose d'un ou de plusieurs motifs, appelés monomères, qui se répètent de manière ordonnée ou aléatoire. Les polymères peuvent être synthétisés ou extraits de la nature (biopolymères)⁸⁰.

Les biopolymères peuvent avoir des origines diverses, passant des végétaux, des bactéries aux cellules humaines. Ils se classent en trois catégories⁸⁰, présentées au **Tableau 3.4**.

Tableau 3.4: Classes de biopolymères et caractéristiques

Biopolymère	Monomère	Exemples
Protéine	Acide aminé ⁸⁰	Collagène, gélatine, kératine ⁸¹
Polysaccharide	Saccharide (sucres) ⁸⁰	Cellulose, pectine, glycogène ^{80,82}
Polynucléotide	Nucléotide (composé d'un groupement phosphate, d'un sucre (ribose ou désoxyribose ⁸³) et d'une base azotée) ⁸⁰	ADN, ARN ⁸⁰

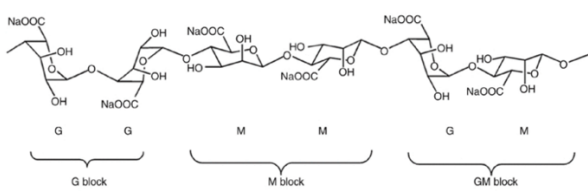
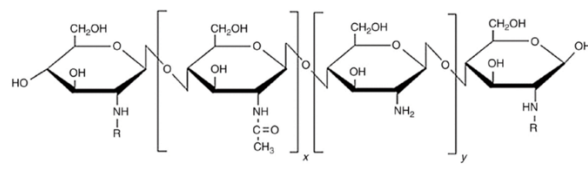
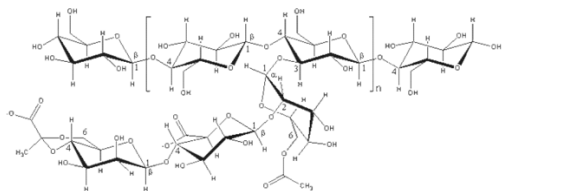
Polysaccharides

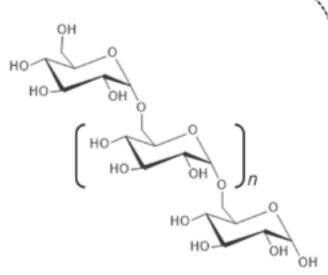
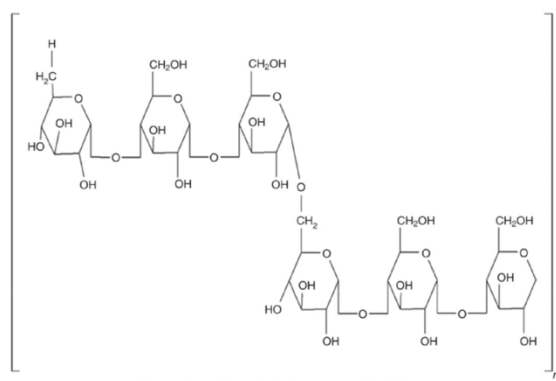
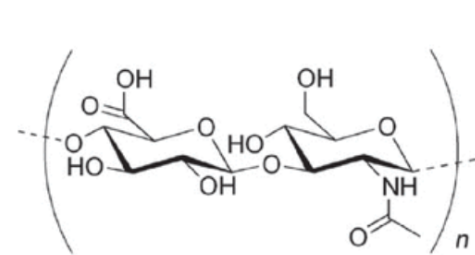
Les polysaccharides sont largement utilisés en génie alimentaire ainsi que dans le domaine des matériaux. Des membranes, fibres et hydrogels peuvent être fabriqués avec eux, en combinaison parfois avec des protéines. Les monomères des polysaccharides sont liés par des liaisons covalentes glycosidiques : à chaque fois que deux monomères se lient entre eux, une molécule d'eau est formée⁸⁰.

Les polysaccharides peuvent posséder des groupements chimiques divers (hydroxyl, carboxyl, aminé⁸²), former une chaîne d'un ou de plusieurs motifs, et même porter une charge. Les chaînes polymériques qui sont chargées sont nommées polyélectrolytes⁸⁴. Le **Tableau 3.5** liste quelques polysaccharides connus; certains sont anioniques (charge négative), cationiques (charge positive)

et d'autres neutres. À titre d'exemple, l'alginate et le chitosane sont des polyélectrolytes; l'un est chargé négativement, et l'autre positivement, respectivement.

Tableau 3.5: Charge, origine et structure moléculaire d'une sélection de polysaccharides connus

Polysaccharide	Charge	Origine	Structure moléculaire
Alginate	Anionique ⁸⁰	Algues et bactéries ⁸⁵	 <p>Tiré de Grumezescu (2017)⁸². Copyright (2013) Elsevier.</p>
Chitosane	Cationique ⁸⁰	Crustacés ⁸⁶	 <p> $R = \text{—C(=O)—CH}_3$ and $x > 50\%$ → Chitin $R = \text{—H}$ and $y > 50\%$ → Chitosan </p> <p>Tiré de Grumezescu (2017)⁸². Copyright (2015) Elsevier.</p>
Gomme de xanthane	Anionique ⁸⁷	Microbes ⁸²	 <p>Tiré de Lo et al. (2007)⁸⁷. Copyright (2007) Elsevier.</p>

Dextran	Neutre ⁸⁰	Microbes ⁸²	 <p>Tiré de Díaz-Montes (2007) ⁸⁸.</p>
Pullulane	Neutre ⁸⁰	Microbes ⁸²	 <p>Tiré de Grumezescu et al. (2018) ⁸⁹.</p>
Acide hyaluronique	Anionique ⁸²	Animal ⁸²	 <p>Tiré de Gupta (2016) ⁹⁰.</p>

Hydrogels

Les hydrogels sont des réseaux tridimensionnels hydrophiles formés par des polymères synthétiques ou naturels (polysaccharides ou protéines)⁹¹. L'équilibre entre les forces des groupements hydrophiles (forces d'hydratation, osmotiques et capillaires⁹²) et celles de rigidité du matériau (liée à la réticulation)⁹¹ leur permet d'absorber une très grande quantité d'eau (de 20% à plus de 95% de leur poids⁹¹) tout en maintenant leur structure. La **Figure 3.16** propose une

représentation des forces en présence, ainsi que les différentes échelles de l'espace du réseau de polymères. Celui-ci peut être associé à un enchevêtrement de l'ordre nanoscopique (1 – 100 nm, IUPAC), microscopique (0.1 – 100 μm , IUPAC) ou macroscopique (> 0.1 cm, IUPAC)⁶⁶.

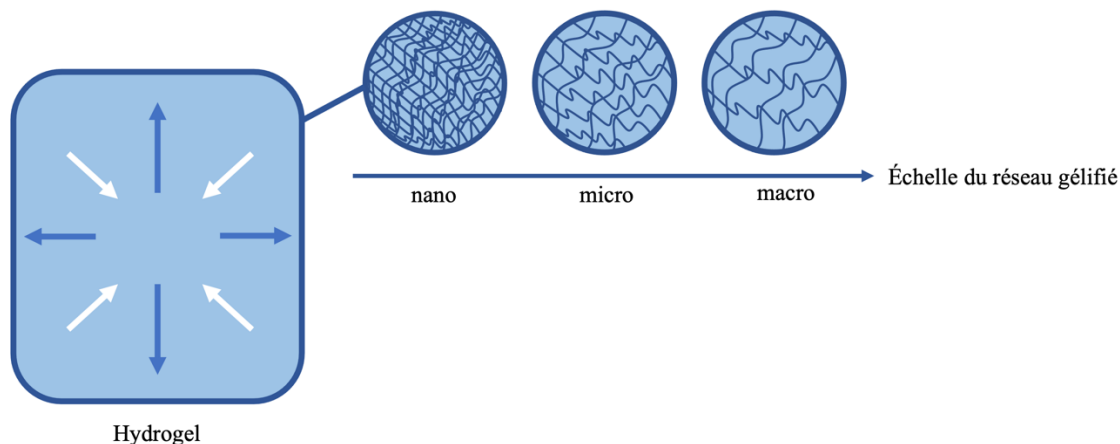


Figure 3.16: Réseau gélifié d'un hydrogel. Les flèches blanches représentent les forces de réticulation; les flèches bleues les forces hydrophiles. Figure inspirée de Gancheva (2018)⁶⁶.

La réticulation des hydrogels peut se faire par voie chimique (liaisons covalentes) ou physique (liaisons ioniques, ponts hydrogène, interactions électrostatiques de van der Waals, interactions hydrophobes, cristallisation⁸⁰)⁹¹. Les hydrogels réticulés physiquement sont des matériaux dont la structure et les propriétés peuvent évoluer dans le temps, en fonction des stimuli environnementaux qu'ils subissent. Ainsi, ils peuvent réagir aux conditions suivantes:

- Humidité : se gonfler d'eau (*swelling*) ou s'assécher
- Température
- pH
- Champ magnétique
- Lumière
- Sels et agents chimiques

Les hydrogels chimiques peuvent aussi répondre à certains de ces stimuli et se dégrader. **La Figure 3.17** montre les différentes voies de dégradation possible d'un réseau tridimensionnel d'hydrogel (physique ou chimique). Dans un environnement vivant, ces derniers peuvent voir (a) leurs chaînes polymériques, (b) leurs agents de réticulation et (c) leurs groupements fonctionnels clivés par voie

enzymatique ou par hydrolyse⁹¹. Dépendamment des résidus produits ou absorbés, la dégradation chimique des hydrogels peut être perturbante, toxique ou au contraire avoir peu d'impact sur le vivant.

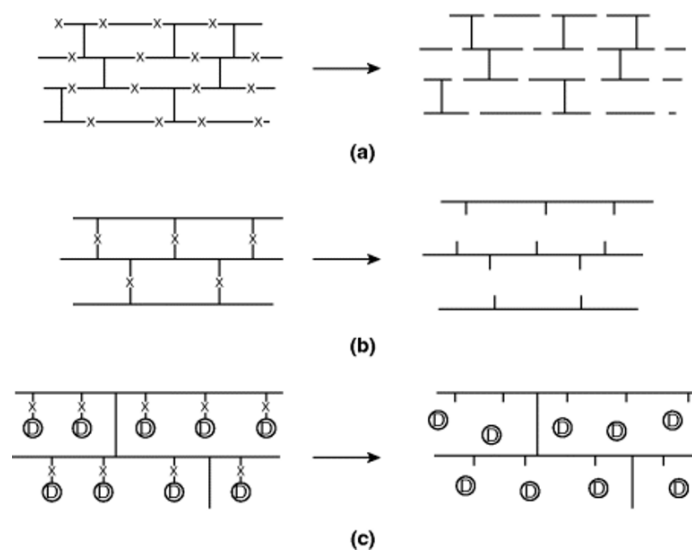


Figure 3.17: Voies de dégradation du réseau réticulé d'un hydrogel. Tiré de Cai et al. (2012)⁹¹. Copyright (2012) Wiley.

D'autre part, de nombreuses caractéristiques intrinsèques au matériau synthétisé (propriétés mécaniques, bioactivité (compatibilité, adhésion, dégradation), conductivité électrique, effets de surface, autres) sont possibles en fonction des paramètres de fabrication :

- Types de biopolymères (polysaccharides, protéines, ou une combinaison des deux)
- Types de groupements fonctionnels, ratio des motifs sur les chaînes et chiralité
- Concentration
- Ajout de copolymères
- Renfort par particules et nanoparticules
- Fonctionnalisation (p.ex. peptides d'adhésion)
- Méthodes de fabrication et voies de réticulation
- Et d'autres.

Cette grande diversité de propriétés et de formulation rend l'utilisation des hydrogels très appropriée dans le domaine biomédical pour l'imitation de tissus mous. Les tissus cérébraux en font partie, et les hydrogels sont d'ailleurs largement utilisés dans la recherche sur le glioblastome multiforme. En effet, on les utilise par exemple pour la livraison ciblée de chimiothérapie locale, comme dans le cas des gaufrettes Gliadel®. Celles-ci libèrent de la carmustine au fur et à mesure que se dégrade l'hydrogel de poly[anhydride-co-bis(p-carboxyphénoxy)propane]/acide sébacique⁹¹. Cha et Kim proposent quant à eux une revue de nombreuses études utilisant des hydrogels afin d'imiter l'environnement cérébral pour l'étude de la pathologie du GBM. Parmi les polymères identifiés qui reproduisent le plus fidèlement la matrice extracellulaire des tissus cérébraux, on liste notamment, et pour des raisons diverses, le chitosane, le matrigel, la gélatine et l'acide hyaluronique. L'alginate et le polyacrylamide sont aussi identifiés comme de bons imitateurs de la rigidité des tissus cérébraux⁵⁸. En ce sens, de nombreux tests de propriétés mécaniques (modules d'élasticité, de relaxation, de cisaillement) peuvent être réalisés afin de les comparer à ceux des tissus cérébraux, tels que des tests en compression, en traction, en indentation, en élastographie à résonance magnétique, et en microscopie de force atomique, pour n'en nommer que quelques-uns. L'**Annexe 5** présente un résumé fait par Aurand au niveau de ces techniques et des gammes de valeurs obtenues. Le **Tableau 3.6** propose également une synthèse des stress que subissent les tissus cérébraux et qui justifient ces essais mécaniques.

Tableau 3.6: Stress mécaniques ressentis par les tissus cérébraux selon différents scénarios. Tiré de Aurand et al. (2012).⁹³ Copyright (2012) MDPI.

Material Characteristic	Loading Description	Possible Implications	Load Scenario
Creep/Relaxation Behavior	Constant Pressure	Permanent deformation Change in elastic modulus Permanent deformation	Static pressure on brain tissue from surrounding tissue, fluid, and bone
Fatigue Stress Behavior	Cyclic pressure	Changes in material properties Hardening/crystallization Fracture/Failure Permanent deformation	Normal intracranial pressure fluctuations Glial cell migration through microenvironments (<i>i.e.</i> , white matter tracts/ spinal cord)
Fatigue Strain Behavior	Cyclic deformation	Changes in material properties Hardening/crystallization Fracture/Failure	Normal intracranial pressure fluctuations Motion in spinal cord within the vertebrae
Stress/Strain Recovery	Tension or Compression	Permanent deformation	Flexion or extension in spinal cord within vertebrae Intracranial hyper/hypotension Normal intracranial pressure fluctuations

Des hydrogels peuvent également être implantés dans le système nerveux central dans le but de régénérer les zones où des tissus malades ont été retirés. La fonctionnalisation des polymères est souvent utilisée afin d'améliorer les propriétés biochimiques des hydrogels utilisés pour ce type d'application *in vivo*. L'acide aminé Arg-Gly-Asp (RGD), ainsi que l'héparine et la gélatine qui imitent les protéoglycanes des matrices extracellulaires, sont des exemples de molécules utilisées à cette fin⁹³. La **Figure 3.18** et la **Figure 3.19** montrent les structures chimiques de l'alginate et du chitosane fonctionnalisés par un type de peptide RGD et selon une certaine chimie.

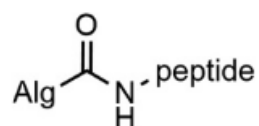


Figure 3.18: Alginate fonctionnalisé au peptide GGGGRGDS à l'aide d'EDC et de Sulfo-NHS. Tiré de Mohan et al. (2022)⁹⁴. Copyright (2022) Elsevier.

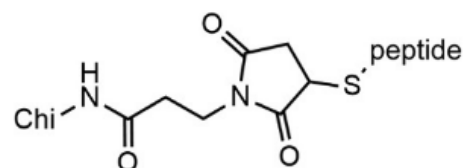


Figure 3.19: Chitosane fonctionnalisé au peptide RGD à l'aide de NHS. Tiré de Mohan et al. (2022)⁹⁴. Copyright (2022) Elsevier.

3.3.2 Alginate et chitosane

L'alginate et le chitosane sont des polysaccharides naturels. Ce sont également des polyélectrolytes; l'alginate étant anionique et le chitosane cationique. La littérature rapporte différents matériaux (hydrogels et autres) obtenus en les combinant ensemble. La section suivante présentera certaines de ces méthodologies et des structures obtenues. Quant à la section présente, elle résumera les caractéristiques essentielles de chacune de ces macromolécules afin de mieux comprendre leur capacité de réticulation et leur champ d'application.

La **Figure 3.20** présente les structures moléculaires du chitosane et de l'alginate, ainsi que l'*egg-box model*, soit la configuration adoptée par l'alginate lorsque réticulée par voie ionique.

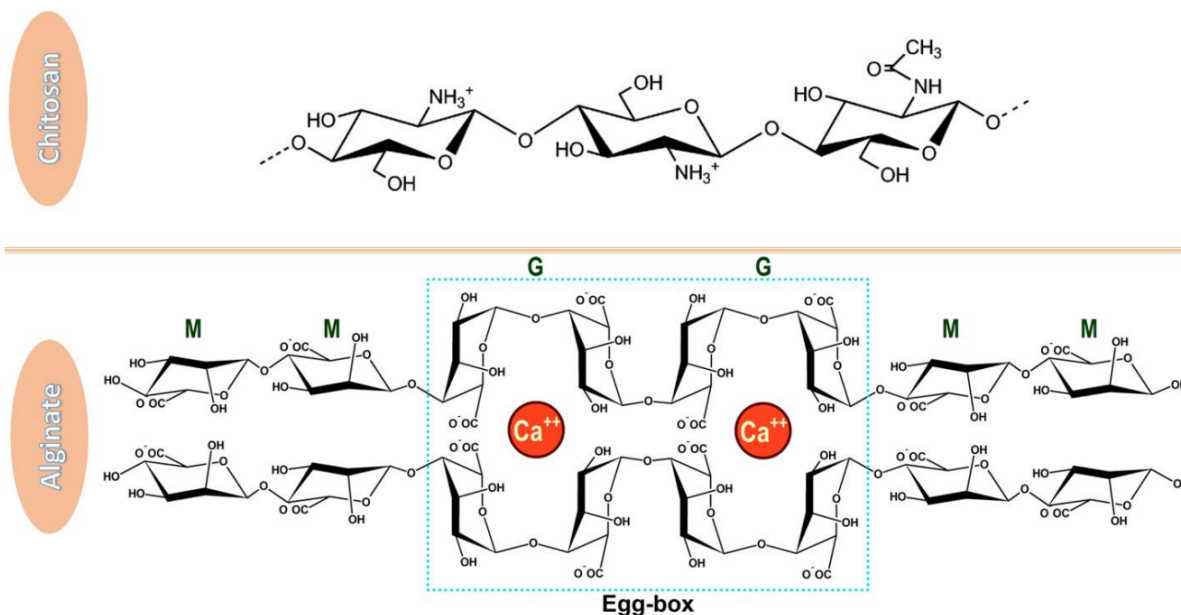


Figure 3.20: Structure moléculaire du chitosane et de l'alginate, et représentation de la configuration *egg-box model* pour l'alginate. Tiré de Niculescu et Grumezescu (2022)¹¹. Copyright (2022) MDPI.

Le **Tableau 3.7** présente un comparatif entre l'alginate et le chitosane sur la base de certaines caractéristiques.

Tableau 3.7: Caractéristiques essentielles de l'alginate et du chitosane

Caractéristique	Alginate	Chitosane
Monomères	Copolymères ¹⁰ : <ul style="list-style-type: none"> • β-D acide Mannuronique (M) • α-1 acide Guluronique (G) résidues Ce sont des épimères en C-5.	Copolymère ⁸⁶ : <ul style="list-style-type: none"> • β (1-4) N-acetyl-D-glucosamine • D-glucosamine
Grade	La molécule d'alginate vient sous différentes formes. Le poids moléculaire (polysaccharide, oligosaccharide) et le ratio des	Similairement, la molécule de chitosane vient aussi avec un poids moléculaire variable (polysaccharide, oligosaccharide),

	blocs M/G et leur motif (MM, GG, MG) ont un grand impact sur les propriétés du matériau (biologiques, mécaniques) ¹⁰ .	ainsi que différents degrés de déacétylation (DDA) (proportion de D-glucosamine). Il s'agit d'ailleurs de ce qui le distingue de la chitine; le chitosane a un DDA de plus de 50% ⁹⁵ .
Bioactivité	<ul style="list-style-type: none"> • Non-toxique¹⁰ • Biodégradable¹⁰ • Biocompatible¹⁰ • Bioadhésion¹⁰ • Immunogénéicité variable¹⁰ 	<ul style="list-style-type: none"> • Non-toxique⁹⁶ • Biodégradable⁹⁶ • Biocompatible⁹⁶ • Anti-microbien⁹⁶
pka	<p>pka_{group.M} = 3,38⁹⁷</p> <p>pka_{group.G} = 3,65⁹⁷</p>	pka _{D-glucosamine} = 6,5 selon le degré de déacétylation ^{98,99}
Solubilité dans l'eau sur la gamme de pH	Insoluble sous un pH de 3 ¹⁰	Entre 2 et 6 ⁹⁵ dépendamment des propriétés de la chaîne
Voies de réticulation principale	<ul style="list-style-type: none"> • Covalente (p.ex. chimie des carbodiimides¹⁰⁰) • Ionique (Mg²⁺ < < Mn²⁺ < Zn²⁺ < Ni²⁺ < Co²⁺ < Ca²⁺ < Sr²⁺ < Ba²⁺ < Cd²⁺ < Cu²⁺ < Pb²⁺)¹⁰¹ • Électrostatique (p. ex. chitosane¹⁰²) • Diminution du pH sous le pka¹⁰³ • Autres 	<ul style="list-style-type: none"> • Covalente (p. ex. génipine¹⁰⁴) • Ionique (p.ex. sodium tripolyphosphate (STPP)¹⁰⁵) • Électrostatique (p.ex. alginate¹⁰², chondroïtine¹⁰⁶) • Autres

3.3.3 Matériaux faits d'alginate et de chitosane

Lorsque l'alginate et le chitosane sont en solution, les charges opposées entre les groupes carboxyles et amines respectivement forment ensemble un complexe. La littérature propose

différentes méthodes afin de les faire interagir ensemble. Le **Tableau 3.8** en présente quelques-unes.

Tableau 3.8: Structures formées entre l'alginate et le chitosane selon différentes techniques de mélange et de préparation

Structure formée	Description de la technique
Hydrogel inhomogène	Une solution de chitosane solubilisé dans un milieu acide est mélangée à une solution solubilisée d'alginate. Un hydrogel inhomogène est formé.
Hydrogel obtenu par acidification du mélange	Une solution de chitosane (sous forme d'oligosaccharide et non pas de polysaccharide) à pH = 8 est mélangé vigoureusement durant 10 minutes à une solution d'alginate. Une solution de d-Glucono δ -lactone (GDL) préparée quelques instants avant est rapidement ajoutée, et le mélange est coulé ¹⁰⁷ .
Hydrogel réticulé par voie ionique (ion cationique) et électrostatique (polysaccharide anionique)	<p>Une solution de chitosane solubilisé dans un milieu acide est mélangée à une solution solubilisée d'alginate à l'aide d'un mélangeur durant 5 minutes. Le mélange est coulé, congelé, lyophilisé puis réticulé à l'aide d'une solution de CaCl₂. Les hydrogels formés ont été utilisés dans le cadre d'une étude par Kievit et al. (2010) sur le développement d'un milieu imitant le microenvironnement tumoral des gliomes¹⁰².</p> <p>Similairement, Hyland et al. (2011) rapporte l'utilisation d'une méthode similaire en ajoutant un polysaccharide anionique supplémentaire avant la lyophilisation : la chondroïtine, un glycosaminoglycane¹⁰⁶. Hyland rapporte que son utilisation au moment du trempage a amélioré les propriétés mécaniques du matériau obtenu.</p>

<p>Hydrogel réticulé par voie covalente à l'aide d'un agent réticulant</p>	<p>Baysal et al. (2013) rapporte une méthodologie afin de réticuler de manière covalente l'alginate et le chitosane ensemble à l'aide de N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Une solution d'alginate est ajoutée goutte par goutte à une solution acidifiée de chitosane tout en mélangeant en continu. Le DCC fut ajouté, et la pièce déjà réticulée fut ensuite lyophilisée¹⁰⁸.</p> <p>Une étude par Li et al. (2021) propose la génération d'un réseau triple, où le chitosane et l'alginate interagissent de manière électrostatique; l'alginate et les ions calciums par voie ionique; et la génipine et le chitosane par voie covalente¹⁰⁴.</p>
<p>Membrane/Capsule</p>	<p>Des gels couverts d'une membrane permettent d'encapsuler des agents biologiques actifs⁸⁰.</p> <p>Bagre et al. (2013) présente une méthodologie Membrane/Capsule SA/CHI. Des nanoparticules de chitosane (p.ex. réticulées ioniquement à l'aide de sodium tripolyphosphate (STPP)) sont plongées dans une solution d'alginate puis une autre de chlorure de CaCl₂ pour réticuler l'alginate¹⁰⁵.</p>

CHAPITRE 4 DÉMARCHE DE L'ENSEMBLE DU TRAVAIL DE RECHERCHE ET ORGANISATION GÉNÉRALE DU DOCUMENT INDIQUANT LA COHÉRENCE DES ARTICLES PAR RAPPORT AUX OBJECTIFS DE LA RECHERCHE

Ce projet de maîtrise s'articule autour de son objectif principal : celui de fabriquer des hydrogels macroporeux d'alginate et de chitosane pouvant répondre aux contraintes d'un implant destiné à un nouveau traitement de capture et d'irradiation de cellules cancéreuses de glioblastome multiforme dans le cerveau humain. La méthodologie retenue et les principaux résultats sont colligés au **Chapitre 5**. Le **Chapitre 6** présente les techniques de fabrication de la solution précurseur d'alginate et de chitosane ayant mené à la procédure finale, ainsi que les voies de réticulation alternatives explorées. Le **Chapitre 7** renvoie à une discussion générale des travaux par rapport à la littérature et aux limites de la connaissance scientifique actuelle, alors que le **Chapitre 8** résume les recommandations et conclusions essentielles pour la suite du développement de la *Gliotrappe* formulée avec de l'alginate et du chitosane, ainsi que pour l'avancée générale de la science des matériaux hydrogels fabriqués à partir de ces deux polysaccharides.

Le **Chapitre 5** présente les travaux soumis au périodique *ACS Applied Materials & Interfaces*. Des hydrogels microstructurés d'alginate, contenant différents teneurs en chitosane, sont soumis à des essais de compression mécanique, de stabilité dimensionnelle en milieu salin, et d'adhésion, de prolifération et de distribution cellulaire à partir de la lignée murine de glioblastome multiforme F98. Pour les essais biologiques en particulier, de l'alginate fonctionnalisé avec le peptide d'adhésion RGD a été utilisé dans la fabrication des gels. Il est établi qu'aux concentrations de chitosane utilisées, aucun effet statistiquement significatif n'a été observé sur la tenue mécanique en compression, alors qu'elle est qualitativement observable lors de la chélation et de la substitution ionique subie par le calcium de l'hydrogel lorsqu'en solution avec du PBS. D'autre part, la meilleure condition étudiée pour minimiser la prolifération cellulaire tout en promouvant l'adhésion est celle sans peptide RGD et avec la plus haute teneur en chitosane.

CHAPITRE 5 ARTICLE 1: EFFECT OF CHITOSAN ON ALGINATE-BASED MACROPOROUS HYDROGELS FOR THE CAPTURE OF GLIOBLASTOMA CANCER CELLS

Submitted article to journal *ACS Applied Materials & Interfaces* on March 1st 2022.

Caroline Safi,^a Angela Giraldo Solano,^b Benoit Liberelle,^c Hélène Therriault,^b Lisa Delattre.^a Melek Abdelkhalek,^a Changsheng Wang,^a Simon Bergeron-Fortier,^a Vaiana Moreau,^a Gregory De Crescenzo,^c Nathalie Faucheux,^d Marc-Antoine Lauzon,^d Benoit Paquette^{b} and Nick Virgilio^{a*}*

^a Research Center for High Performance Polymer and Composite Systems (CREPEC), Department of Chemical Engineering, Polytechnique Montréal, Montréal, Québec, H3C 3A7, Canada.

^b Center for Research in Radiotherapy, Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada.

^c Department of Chemical Engineering, Polytechnique Montréal, Montréal, Québec H3C 3A7, Canada.

^d Department of Chemical and Biotechnological Engineering, Faculty of Engineering, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1K 0A5, Canada.

KEYWORDS: Alginate-based macroporous hydrogel matrix; chitosan; RGD adhesion peptide; cancer cell trap; glioblastoma; brain cancer

ABSTRACT

Glioblastoma multiform (GBM) is a type of brain cancer associated with a very low survival rate, since a large number of cancer cells remain infiltrated in the brain despite the treatments currently available. This work presents a macroporous hydrogel trap, destined to be implanted in the surgical cavity following tumor resection, and designed to attract and retain cancer cells, in order to eliminate them afterwards with a lethal dose of stereotactic radiotherapy. The biocompatible hydrogel formulation comprises sodium alginate (SA) and chitosan (CHI) bearing complementary electrostatic charges and stabilizing the gels in saline and cell culture media, as compared to pristine SA gels. The highly controlled and interconnected porosity, characterized by X-ray microCT, yields mechanical properties comparable to brain tissues, and allows F98 glioblastoma cells to penetrate the gels within the entire volume, as confirmed by fluorescence microscopy. The addition of a grafted –RGD peptide on SA, combined with CHI, significantly enhances the adhesion and retention of F98 cells within the gels. Overall, the best compromise between a low proliferation and a high level of accumulation and retention of F98 cells was obtained with the hydrogel formulated with 1% SA and 0.2% CHI, without the –RGD adhesion peptide.

INTRODUCTION

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and malignant type of astrocytic tumor.¹⁰⁹ Astrocytes are the prevalent cell type in the central nervous system (CNS), and are responsible for supporting neuronal activity and maintaining the brain's organization.^{110,111} GBM alone accounts for half of all CNS malignant tumors,¹⁸ with a median survival of 12-14 months for the adult population, and a 5-year survival rate that ranges from 1% to 14% and declines severely with age.¹¹²

GBM cells can infiltrate the brain over a distance of up to 2 cm.¹¹³ The efficiency of current treatments is limited by the blood-brain barrier, which restricts the accumulation in cancer cells of chemotherapeutic drugs injected intravenously. In addition, healthy brain tissues are frequently more sensitive than GBM cells to radiotherapy.²⁸ As a result, GBM is currently treated by a combination of surgery and radiotherapy, with the use of Temozolomide (TMZ),¹⁰⁹ an adjuvant chemotherapy drug that increases the vulnerability of GBM cells to radiation. Another approach is the use of a drug delivery device placed on site after the surgery, such as the Gliadel® wafers loaded with carmustine, another chemotherapy drug.¹¹³ No treatment, however, has been able so far to significantly reduce the recurrence of the disease.^{23,109}

One solution to tackle this problem is to promote the migration of the GBM cells infiltrated in the brain towards a chosen location, and use targeted stereotaxic radiotherapy to eradicate them. In fact, the accumulation of GBM cells in a trap located in the surgical cavity would lead to their removal from the surrounding healthy brain tissue. This would in turn greatly limit the dose of radiation deposited to healthy brain tissues. This concept, known as a cancer cell trap, has been assessed by Autier et al.,⁵³ who have shown that GBM F98 cells can accumulate on a biomaterial membrane composed of bacterial cellulose.

Alginate is also widely used as a biomaterial and can be processed into various forms and shapes (beads, membranes, fibers, etc.). It has many medical applications (e.g. tissue engineering, enzyme immobilization, drug delivery vehicles),^{114–119} and is also specifically used for GBM research (modeling of the brain's environment,⁵⁴ culture substrates to produce GBM cell lines,⁵⁵ therapeutic cell encapsulation and delivery¹²⁰). It is an abundant and low-cost anionic polysaccharide,¹²¹ that is approved for medical use and is biodegradable, usually biocompatible and non-toxic.¹⁰ It can be used in combination with other polysaccharides like hyaluronic acid and chitosan (CHI),^{114,115,122–124} and it also shows low immunogenicity for certain grades (lower ratios of mannuronic (M)/guluronic (G) groups)¹⁰ and purification methods.¹²⁵ Recently, Giraldo et al. have developed a structured, 3D macroporous sodium alginate (SA) hydrogel as a cancer cell trap (average pore diameter of 300 μm , fully interconnected pores).⁵⁶ This porous gel trap was fabricated by using porous poly(L-lactide) (PLA) molds prepared from melt-processed co-continuous polymer blends of polystyrene (PS) and PLA, with quiescent annealing allowing precise microstructure control, and the selective dissolution of the PS phase yielding the porous PLA molds – resulting in the possibility of tuning the average pore size over a range of 1 to 1000 μm , with fully interconnected pores.^{7,76,78,126,127} The resulting molds are filled with an aqueous solution of SA, which is gelified by plunging the filled molds in a Ca^{2+} solution. The porous SA hydrogels are obtained by selectively dissolving the PLA phase with chloroform.⁷ These hydrogel scaffolds were able to accumulate and retain GBM F98 rat cancer cells, especially when SA was functionalized with a cell adhesion peptide, CGGRGDS (RGD), which interacts with the $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ and $\alpha\text{v}\beta\text{5}$ integrins expressed by GBM cells.^{50,51} It also suffered minimal degradation following irradiation.⁵⁶ However, RGD-functionalized alginate-based hydrogels are not stable enough in physiological media and allow significant proliferation of GBM cells.⁵⁶

Indeed, despite its favorable features for biological applications, alginate gels crosslinked with Ca^{2+} ions suffer from structural degradation when plunged into media containing monovalent ionic species, such as sodium, and weak divalent cations like magnesium, when ion exchange occurs.^{9,10,101} Furthermore, calcium can be chelated by phosphate (PO_4^{3-}),^{9,10} which causes a loss of Ca^{2+} and destabilizes the gel network. This degrades the integrity of the tridimensional network, and limits the use of Ca^{2+} -SA hydrogels in physiological conditions,⁹ like in the cerebrospinal fluid where these charged species are present.^{39,128} In fact, physiological fluids could trigger the gel's disintegration before the completion of its purpose.

To increase the stability of macroporous hydrogels, we hypothesized that the addition of an oppositely charged polyelectrolyte, i.e. CHI, can form stable complexes with SA and stabilize the 3D network, as demonstrated recently for the xanthan gum/gelatin B complementary pair system¹²⁹. CHI also promotes cell adhesion since its cationic nature can create complexes with the glycosaminoglycans and proteoglycans present on the cell membrane. Adhesion peptides can also be grafted onto CHI to further improve the targeting of specific integrins present at the cellular surface.^{48,49} CHI in its charged state cannot however be mixed directly with SA, as the complementary and opposite charges quickly create insoluble complexes that precipitate in solution.¹³⁰

This work aims at stabilizing the structure and mechanical properties of SA macroporous hydrogels, by adding a CHI particulate suspension to the SA solution, at various CHI contents, prior to gelation. The effect of CHI content on the compression modulus of SA-CHI porous gels, and on gel stability in different aqueous media, were assessed. Finally, the effect of CHI was evaluated on the accumulation, retention, distribution and proliferation of F98 GBM murine cells in porous gels, functionalized or not with RGD adhesion peptides.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Poly(lactic acid) Ingeo™ 4032D (PLA, melt flow index = 7 g/10 min @ 210 °C/2.16 kg, ρ (200 °C) = 1.11 g/cm³) was purchased from NatureWorks, and Polystyrene MC3650 (PS, melt flow index = 13.0 g/10 min @ 200 °C/5 kg, ρ (200 °C) = 0.97 g/cm³) was obtained from Americas Styrenics. The properties of SA and CHI are given in **Table 5.1**.

Table 5.1 SA and CHI properties.

Polymer	Supplier	Grade	Properties
SA Sodium Alginate	Kimica (Pain, Chile)	IL-6G	M/G ratio: 0.5 ¹ Viscosity: 30 - 60 mPa·s (1%) ¹ Molecular weight (Mn): 67,000 ± 8000 g/mol ² Polydispersity (PDI) = 2.1 ²
CHI Chitosan	BioLog Heppe GmbH (Landsberg Germany)	85/60/A1	Degree of deacetylation (DDA): 85% ¹ Viscosity: 60 mPas (1% in 1% acetic acid) ¹ Molecular weight (Mn): 50 – 100 kDa ¹

¹Data obtained from the supplier. ²Measured by gel permeation chromatography (GPC).

Cyclohexane, chloroform, dimethyl sulfoxide (DMSO), NaOH, acetic acid and hydrochloric acid (HCl) were all ACS-grade chemical reagents. Calcium chloride (CaCl₂), sodium bicarbonate, N-hydroxysuccinimide (NHS, 98% purity) and ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC, 99+% purity), and sodium azide S2002 (\geq 99.5%) were purchased from Sigma-Aldrich. N- ϵ -maleimidocaproic acid hydrazide (EMCH) was supplied by ThermoFisher Scientific, and the cysteine-terminated peptide CGGRGDS (RGD) by Ezbiolab (98%, N-terminal acetyl, C-terminal amide, New Jersey, USA). All aqueous solutions were prepared with MilliQ water (18.2 M Ω ·cm; total organic compounds (TOC) \leq 5 ppb). Glassware was carefully cleansed

by overnight immersion in a bath of KOH-saturated isopropyl alcohol followed by intensive rinsing with Milli-Q water, and tools were cleaned with MilliQ water and ethanol 70% v/v before use.

Preparation of PLA macroporous molds

Following the procedures detailed in previous publications,^{7,56} blends of PS and PLA were melt-processed with an AG 34 mm Leistritz co-rotating twin-screw extruder at 190 °C at a 50/50 wt% ratio with two feeders. The resulting immiscible co-continuous blend was extruded into rods and quenched to freeze-in the morphology. The rods were then annealed using a hot press at 190 °C for 45 min to allow microstructure coarsening.⁷⁶ After quenching, the annealed rods were then cut into cylinders (diameter = 1 cm, height = 0.6 cm). The PS phase was next selectively extracted with cyclohexane using a soxhlet apparatus. The resulting porous PLA molds were finally dried overnight in a vacuum oven at 40 °C.

Preparation and modification of SA and CHI

Filtration of SA and CHI solutions

SA powder was dissolved at 1% w/v in warm water, filtered with PROGENE® Vacuum Filtration Units (0.22 µm, polyethersulfone (PES) membrane, Ultident Scientific, Saint-Laurent, Québec, Canada), then freeze-dried. CHI flakes were dissolved at 0.6% w/v in a pH 4 HCl solution using a 500-Watt Ultrasonic Homogenizer (CP505, Cole-Parmer) with a 12.7 mm diameter probe during 5 min at 60% amplitude. The solutions were then stored at 4 °C overnight. The CHI solution was filtered likewise and brought to a neutral pH using NaOH 1 M before freeze-drying. The resulting products, filtered SA and CHI, were stored at 4 °C until used.

RGD-peptide grafting on filtered SA

Filtered SA was dissolved at 1% w/v in MilliQ water. Aqueous aliquots of 0.1 M NHS and 0.4 M EDC, both stored at -80 °C until used, were thawed, and quickly added to 40 mL of SA solution, respectively at a volume of 3.5 μ L and 1 μ L. After leaving the solution on an orbital plate shaker for 20 min at room temperature (RT), a 10 mM aliquot of EMCH dissolved in DMSO, stored at -80 °C, was thawed, and 17.5 μ L was added to the solution. After an additional 60 min at RT on the orbital shaker, 56.9 μ L of a thawed 2 mg/mL RGD solution was added, that is 3.5×10^{-7} mol of cysteine-terminated peptide per 400 mg of SA. The resulting solution was maintained under agitation for 20 h, then filtered five times using Amicon Ultra-15 with 10 kDa membrane centrifugal filter units (Merck Millipore, Tullagreen, Ireland) to withdraw any free peptide and reagents. The resulting RGD-grafted SA (SA-RGD) was freeze-dried and stored at 4 °C.

Preparation of SA-CHI macroporous hydrogels

Chitosan suspension preparation

CHI suspensions were prepared by first dissolving filtered CHI either at 0.04% w/v, or 0.4% w/v in MilliQ water, using HCl 1 M to bring the solutions to pH 4, while using an ultrasonic homogenizer with the same parameters as stated previously (for the filtration of CHI). The ultrasonic homogenizer probe was placed 1 cm under the liquid line and in the first quarter from the side of a 100 mL beaker,¹³¹ which was placed in an ice bath. Then, 0.05 mL of NaOH 1 M per minute was added dropwise near the probe during ultrasonication, for a total of 5 min, for the 0.04% w/v solution, and 19 min for the 0.4% w/v solution. Increasing the pH during ultrasonication resulted in CHI phase separation and formation of a suspension. The resulting pH for both solutions ranged between 9 and 11 throughout the different trials. The suspensions were then stored at 4 °C until use, which occurred on the same day or up to two days later.

SA-CHI solution preparation

Four different gelling formulations were prepared: (A) 1% w/v SA (pristine filtered SA solution), (B) 1% w/v SA + 0.02% w/v CHI, (C) 1% w/v SA + 0.2% w/v CHI, and (D) 1% w/v SA-RGD + 0.2% w/v CHI. The pristine 1% w/v SA solution was prepared by directly solubilizing the required quantity of SA in hot water, while the other three solutions containing CHI were prepared by mixing equal volumes of a 2% w/v SA (or SA-RGD) solution, with the 0.04% or 0.4% w/v CHI suspensions. Prior to mixing, each CHI suspension was vortexed to ensure homogeneity. For all gelling solutions thus prepared, air bubbles were removed by using a sonication bath for 5 s. The four gelling formulation solutions were left at room temperature and injected into molds in the following hours.

Injection of SA-CHI solutions and gelation in porous PLA molds

Macroporous hydrogels were prepared based on the four precursor gelling solutions described previously. Porous PLA molds were individually deposited in 15 mL falcon tubes, and 3 mL of the precursor gelling solutions were poured in the tubes to fully cover the molds. Then, the lid-less tubes were deposited in a custom-built injection system applying pressure-vacuum cycles. Three to four cycles of vacuum and high pressure under N₂ were applied, until most of the trapped air bubbles were expelled from the molds and the pores filled with the SA-CHI solutions. The molds were retrieved and gently dried on all sides to remove excess solution. The molds were then deposited for 30 s in a 0.22 μm filtered 4% w/v CaCl₂ solution to start gelation, and then in a 0.125% w/v CaCl₂ solution overnight to slowly complete the gelation process.

PLA molds dissolution

The PLA molds filled with the gels were taken out of the CaCl₂ solution, put into vials containing 10 mL of chloroform, and deposited on a shaker plate set at 60 RPM. Every two to three days, the chloroform was changed, for a total of four solvent exchanges, or until the white PLA phase was completely dissolved - leaving transparent macroporous SA-CHI hydrogels. The gels were stored at 4 °C in a 0.22 μm filtered 4% CaCl₂ solution until characterization and use. Gels destined for cellular assays were stored likewise, with the addition of 6 droplets of a 5% w/v sodium azide solution per 500 mL of 4% CaCl₂, to prevent bacterial proliferation. Before the cell culture assays, the gels were rinsed and sterilized in aqueous ethanol 70% v/v during 10 min on a shaker plate. In summary, four different gel formulations were tested: 1% w/v SA (pristine sodium alginate), 1% w/v SA with 0.02% w/v CHI, 1% w/v SA with 0.2% w/v CHI, and 1% w/v SA-RGD with 0.2% w/v CHI.

Characterization of PLA molds and SA-CHI hydrogels

Microtomography

MicroCT images of 45 min annealed macroporous PLA molds, and 1% w/v SA macroporous hydrogels (with the pores emptied of water using Kimwipe papers), were obtained with a Zeiss Xradia 520 Versa instrument. Images of three polymer mold samples, and one porous gel, were obtained at 40 kV and 75 μA. The images were analyzed following a procedure described previously,⁵⁶ with the software ImageJ. After contrast adjustment, the images were binarized to clearly distinguish the two phases (PLA and air; hydrogel and air, respectively). For the molds, the PLA phase was considered as the region of interest (ROI), since it subsequently corresponds to the pores in the SA-CHI gels, once the PLA is extracted. For the gels, the pores were selected as the

ROI. In both cases, the perimeter (P) of the ROI and the area (A) of the whole micrograph, were calculated, and the specific interfacial area S was evaluated with Erreur! Source du renvoi introuvable.:⁷

$$S = \frac{P}{A}$$

Equation 2: Calculation of specific interfacial area

The PLA characteristic domain size d_{PLA} , and the gel average pore diameter d_{pores_gel} , were then obtained with Erreur! Source du renvoi introuvable.:⁷

$$d_{PLA \text{ OR } pores_gel} = \frac{4\varphi_{ROI}}{S}$$

Equation 3: Calculation of the mold and gel domain size

where φ_{ROI} is the area fraction of the ROI. A statistical one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's multiple comparison tests was performed on 9 images per samples using the GraphPad Prism software.

Compression

The

After having found contact with the gel (piston speed = 25 $\mu\text{m/s}$, stop criteria: 0.25 g), the probe applied a first pre-compression (piston speed = 25 $\mu\text{m/s}$) corresponding to a displacement of 50 μm (strain $\varepsilon \cong 0.9\%$) in order to ensure complete contact with the gel surface. A second compression of 25 μm (piston speed = 20 $\mu\text{m/s}$) was next applied to evaluate the compression modulus. The instrument recorded the displacement (ΔH , in μm) and the applied load (G , in kg) at an acquisition rate of 0.1 s^{-1} . The applied strain ε (%) and recorded stress σ (Pa) as a function of time were calculated with $\varepsilon \text{ \%} = \frac{\Delta H}{H_0}$

Erreur! Source du renvoi introuvable.:

$$\varepsilon (\%) = \frac{\Delta H}{H_0}$$

Equation 4: Calculation of the applied strain

$$\sigma (kPa) = \frac{Force}{Surface\ area} = \frac{G \cdot g}{\frac{\pi D_0^2}{4}}$$

with g being the standard gravity.

Equation 5: Calculation of the recorded stress

The compression stress σ was plotted as a function of ε , and the data were fitted with a linear regression to obtain the compression modulus. Three macroporous gels were tested per formulation, and the average modulus and standard deviation were calculated. In all cases, ε_{\max} was always inferior to 1.5% and the recorded stress varied linearly with ε .

Dimensional and structural stability tests in saline and cell culture media

The dimensional stability and gel stiffness of all four macroporous gel formulations were assessed in four different saline and cell culture media. First, a solution of Penicillin G at 6.1% w/v, and Streptomycin at 10% w/v, (Pen-Strep solution) was prepared with MilliQ water, then filtered at 0.22 μm and stored at -20 $^{\circ}\text{C}$ until use. An Amphotericin B solution (AmphB) at 1.25% w/v was prepared in the same way. All antibiotics were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich, Ca).

Next, solutions of (1) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline 1X, without calcium chloride and magnesium chloride (PBS 1X); (2) Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 0.1% w/v bovine serum albumin (BSA); and a (3) 4% w/v CaCl_2 solution, were also prepared with MilliQ water, then filtered at 0.22 μm . Finally, 100 μL per 500 mL of the solutions of Pen-Strep and AmphB were added to all three solutions (4% CaCl_2 , PBS 1X and DMEM). In summary,

the stability of the macroporous gels was assessed in four different media: (1) 4% w/v CaCl₂ (as a reference, without antibiotics), and (2) 4% w/v CaCl₂, (3) PBS 1X, and (4) DMEM, these last three supplemented with the antibiotics solutions of Pen-Strep and AmphB.

Then, eight macroporous hydrogels of each formulation (for a total of 32 gels) were first sterilized in aqueous ethanol 70% v/v during 10 min on a shaker plate. Next, they were washed three times with MilliQ water during 20 min, and then left overnight in a 4% w/v CaCl₂ solution. The next day (Day 0), the gels were transferred in well-plates, and they were covered with 2 mL of one of the four liquid media – i.e. 2 macroporous gels per formulation (4 formulations), per liquid media (4 media), for a total of 32 assays. Note that the gels covered with the three media supplemented with antibiotics were also initially rinsed twice with the corresponding media. Each media was changed on Day 1 (the day after starting the experiment), and then every three days (Days 4, 7, 10 and 13). The experiment culminated after 15 days. The dimensional stability and stiffness of the gels were assessed qualitatively with pictures and manipulation by hand and were given a score on a scale from 1 (no change) to 5 (complete gel collapse and liquefaction), since measurement with the Mach-1 mechanical Tester was rendered difficult or impossible in certain cases due to gel deformation.

Cell culture

The murine GBM cell line F98 was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA), and maintained in DMEM medium supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), 44 mM of sodium bicarbonate, 2 mM of L-glutamine and a mix of penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL). They were incubated at 37 °C in a humidified environment with 5% CO₂. The mCherry fluorescent marker was introduced into the F98 cells using the pCDH-CMV-mCherry-T2A-Puro lentiviral vector (Addgene Catalog#72264, Watertown, MA), as

previously reported.⁵⁶ Fluorescence measurements with the F98 cells expressing the mCherry marker were done in DMEM media without phenol red.

Effect of RGD peptide grafting on cell adhesion

The adhesion of F98 cells in the macroporous hydrogels was determined for only one formulation (1% SA + 0.2% CHI), to study the relevance of grafting the RGD peptide to promote cell adhesion. The macroporous hydrogels (grafted or not with the –RGD peptide) were placed in a 96-well plate, and F98 cells (10^5 in 100 μ L of DMEM) expressing the red fluorescent protein mCherry were deposited on the top surface, followed by incubation for 5 h at 37 °C and 5% CO₂, to let the cells diffuse into the gels. The gels were further incubated for 24 to 72 h, and then gently washed with PBS to remove cells that might remain on the exterior surface. The hydrogels were then transferred to a new 96-well plate in order to quantify the number of adhered cells by fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 530$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 590$ nm) with a microplate reader (HT Synergy) calibrated with a standard curve.

Cell proliferation in macroporous hydrogel matrices

The F98 mCherry cells (10^5 in 100 μ L DMEM) were added on top of the macroporous hydrogels trimmed into 5 mm diameter \times 3 mm high cylinders, and then incubated in a 96-well plate at 37 °C. After 5 h of incubation, the macroporous gels were gently washed with PBS 1X, to remove the F98 cells that did not enter. The gels were returned to the incubator for 24, 48 and 72 h. After each time point, the number of F98 cells was determined with a fluorescence microplate reader, as previously described.

Accumulation and retention of F98 cells in the hydrogel matrices

The accumulation and retention of F98 cells in the macroporous hydrogels were determined as previously reported.⁵⁶ Briefly, the F98 cells (10^5 in 100 μ L of DMEM) expressing the red fluorescent protein mCherry were added on top of the hydrogels, which were next placed in a 96-well plate at 37 °C and 5% CO₂. The cells were then left to diffuse into the gels for 5 h, and they were then washed gently with PBS to remove the cells remaining on the surface. After 24 h of incubation at 37 °C allowing the cells to adhere to the gels, the number of accumulated cells was measured with a fluorescence microplate reader. To determine how many cells were retained, the gels were placed in a migration chamber connected to a 20 mL syringe to carry out a stringent wash. The F98 cells not firmly adhered to the gels were removed with 300 μ L DMEM suctioned through the gel with the syringe.⁵⁶ The quantity of F98 cells retained in the gels was then determined by fluorescence, as previously described.

Distribution of F98 cells through the hydrogels

F98 cell distribution within the gels was assessed by epifluorescence microscopy (EVOS™ FL Auto Imaging System, Life Technologies) combined with image analysis tools. Briefly, the F98 cells (5×10^5) were seeded on the top of the gels as mentioned in the previous sections, and incubated for 48 h at 37 °C and 5% CO₂. The cells were then fixed with 3% w/v paraformaldehyde (PFA) and stained with Rhodamine-phalloidin 2105247 (actin cytoskeleton, red channel) (1:100) and Hoechst 33342 (nuclei, blue channel) (purchased from ThermoFisher Canada), at a final concentration of 5 μ g/mL in 0.1% w/v BSA in DMEM red phenol-free. The distribution of the F98 cells from the top to the bottom of the gels was determined by scanning 5 different levels with both channels at the same time (blue, red) and at 10 \times magnification, using the epifluorescence microscope. The number and size of the clusters of F98 cells in each level were analyzed by image processing using a procedure previously described.⁵⁶ In short, spheroids count, and weight

averaging, were determined from binarized images obtained with an in-house program and method. This approach allowed to account for noise and out of focus cell clusters, due to the interconnectivity of the pores, where a large spheroid can be found in more than one level.

Statistical analysis

Cell assays results are all expressed as the mean \pm standard deviation, for 2 to 3 experiments performed in triplicate. All statistical analyses were performed using a *t*-test and two ways analysis of variance (ANOVA), as well as multiple comparison tests using Tukey as statistical hypothesis testing. A value of $p < 0.05$ was considered as statistically significant; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$. The Benjamini, Krieger and Yekutieli method was used as false discovery rate control (FDR) with a Q value of 0.05.⁵⁶

RESULTS

PLA molds and hydrogels dimensions and microstructure

Figure 5.1 presents comparative images in multiple views of a typical 45 min annealed PLA mold (Figure 1a) and SA-CHI hydrogel (B condition, 1% SA + 0.02% CHI) (Figure 1b). The molds were machined at 1 cm in diameter and 0.6 cm in height. For all four formulations, the resulting gels were slightly smaller in dimensions, with an average diameter of about 0.9 cm, and 0.55 cm in height.

The microstructures of a PLA mold (**Figure 5.2 a**) and resulting porous SA-CHI hydrogel (B condition, 1% SA + 0.02% CHI) (**Figure 5.2 b**) were analyzed by microCT. The average PLA volume fraction (ϕ_{PLA}) and PLA average domain diameter (d_{PLA}), as measured by image analysis, are $59\% \pm 3\%$ and $740 \mu\text{m} \pm 30 \mu\text{m}$ for the PLA molds (9 images analyzed per sample, for 3 independent samples), whereas for the gels the pore volume fraction $\phi_{\text{gel}} = 33\% \pm 6\%$, and the

average pore diameter $d_{pores_gel} = 610 \mu\text{m} \pm 70 \mu\text{m}$ (9 images analyzed per sample, for 1 independent sample). Despite the slight reduction in microscopic and macroscopic dimensions for the gel, the morphology is well preserved, as well as the full pore interconnectivity (see **Supporting video files**). The lower porosity for the gel, compared to the PLA molds, could be due to gel shrinkage when removing water from the pores, prior to inserting the gel in the microCT instrument. Note that the lighter grey areas in the hydrogel image (**Figure 5.2 b**) could be residual water at the pore surface that could not be removed with the absorbing paper.

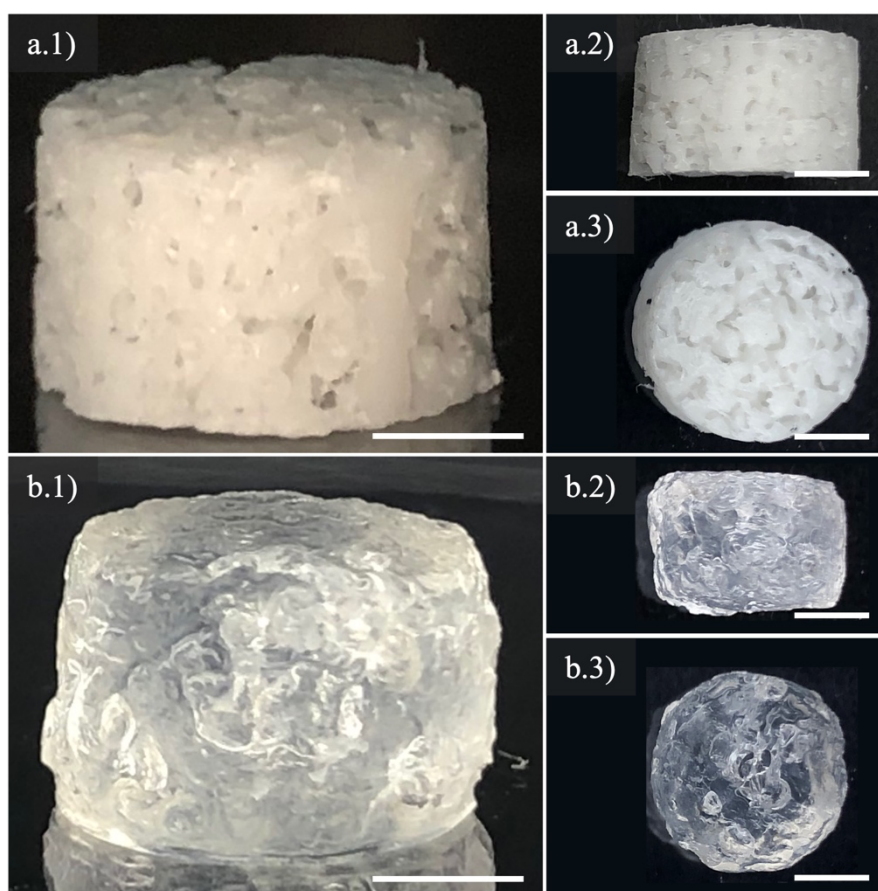


Figure 5.1. 45 min annealed PLA macroporous cylinder mold: a.1) perspective view, a.2) side view, a.3) top view. Complementary SA-CHI hydrogel (B condition, 1% SA + 0.02% CHI): b.1) perspective view, b.2) side view, b.3) top view. The scale bar is 3 mm.

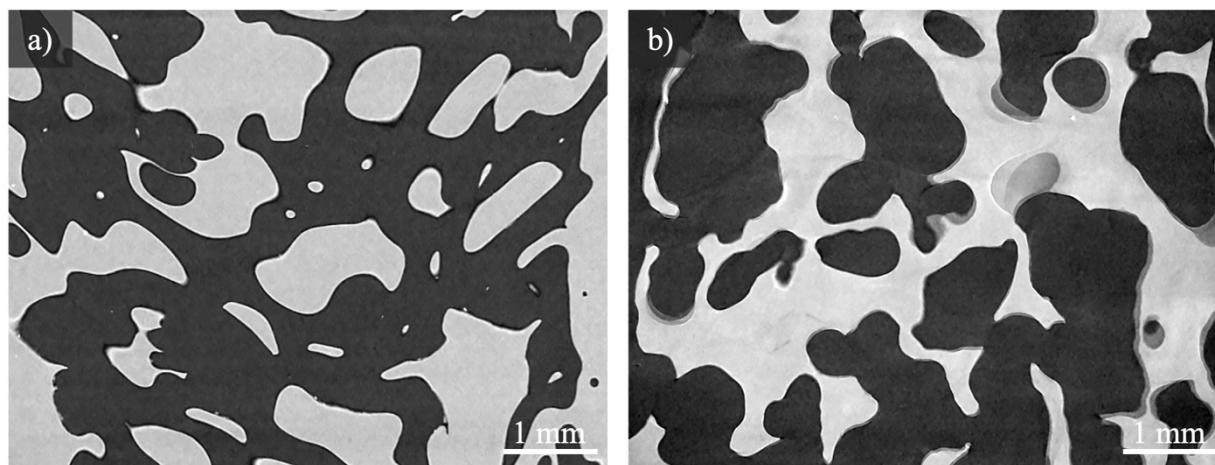


Figure 5.2. MicroCT images showing : a) 45 min annealed macroporous PLA mold, and (b) SA-CHI hydrogel (B condition, 1% SA + 0.02% CHI). The pores are in black, and the solid phase (PLA or hydrogel) is in pale gray. Note that the water inside the macroporous hydrogel pores was absorbed with paper to enhance contrast between the gel phase and the pores.

Compression modulus and stability in culture media

The compression modulus for the four macroporous hydrogel formulations were measured by applying a strain ϵ ranging from 0.9% to 1.36% (**Figure 5.3**) – σ increased nearly linearly with ϵ over this range. For all four formulations, the mean value of the compression modulus varies in a range comprised between 4.5 to 6.2 kPa, confirming that CHI added at 0.02% or 0.2% had no significant impact on the modulus, as for the RGD peptide ($P = 0.80$ evaluated from one-way ANOVA statistical test). Considering the distribution of the results (error bars), the modulus is of the same order of magnitude compared to the values of 1.4 to 1.9 kPa reported for brain tissues (measured by indentation).^{52,132}

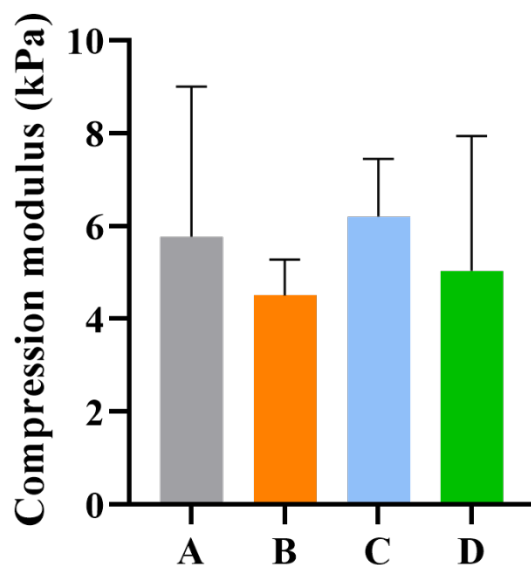


Figure 5.3. Compression modulus (kPa) of macroporous hydrogels for a strain ϵ ranging from 0.9% to 1.36% for all four formulations: (A) SA 1%, CHI 0% (pristine SA), (B) SA 1% + CHI 0.02%, (C) SA 1% + CHI 0.2%, and (D) SA-RGD 1% + CHI 0.2%. All compositions are in % w/v. Each value represents the average of 3 samples.

The stability of all hydrogel formulations was evaluated in four different media, including a 4% w/v CaCl_2 solution as control. The results displayed in **Figure 5.4** illustrate how gel integrity has evolved over a period of 15 days. Shape integrity and gel stiffness, compared to the initial state, were evaluated on a scale from 0 (original gel stiffness and porosity) to five (complete gel liquefaction) by visual inspection and manual manipulation.

The dimensions and original stiffness of all gel formulations did not show any noticeable change after 15 days in the 4% CaCl_2 control medium (**Figure 5.4 i**). The addition of antibiotics, which are usually found in cell culture medium, did not alone significantly alter their dimensions and stiffness as only slight softening was observed (**Figure 5.4 ii**).

In the DMEM culture medium (with antibiotics) (**Figure 5.4 iii**), a more acute gel deformation was observed, as well as a loss of structural integrity, especially at the bottom of the samples where the porosity appears to be altered or partially lost.

Lastly, in the physiological buffer PBS with antibiotics, gels without CHI or with only 0.02% CHI completely lost their integrity and liquefied at Day 4 (**Figure 5.4 iv**). However, gels with a higher content in CHI (0.2% w/v) only partially lost their integrity after Day 15, while porosity loss was observed. Overall, CHI stabilized, at least partially, the integrity of the gels in the various media.

Weight variation over time could not be determined because the absorbent paper used to remove the excess water, prior to weight measurement, remained adhered and broke the gels, and also caused some irreversible gel deswelling (also explaining the change in size sometimes observed at the beginning of the experiment, see example at Day 7 in CaCl₂ 4% + antibiotics, Figure 4). It was also not possible to accurately monitor the evolution of the compression modulus with time since the gels underwent significant softening and deformation. Consequently, a semi-quantitative analysis was used instead. Since the 1% SA + 0.02% CHI formulation did not show any improved structural integrity, it was discarded for the cell culture assays next.

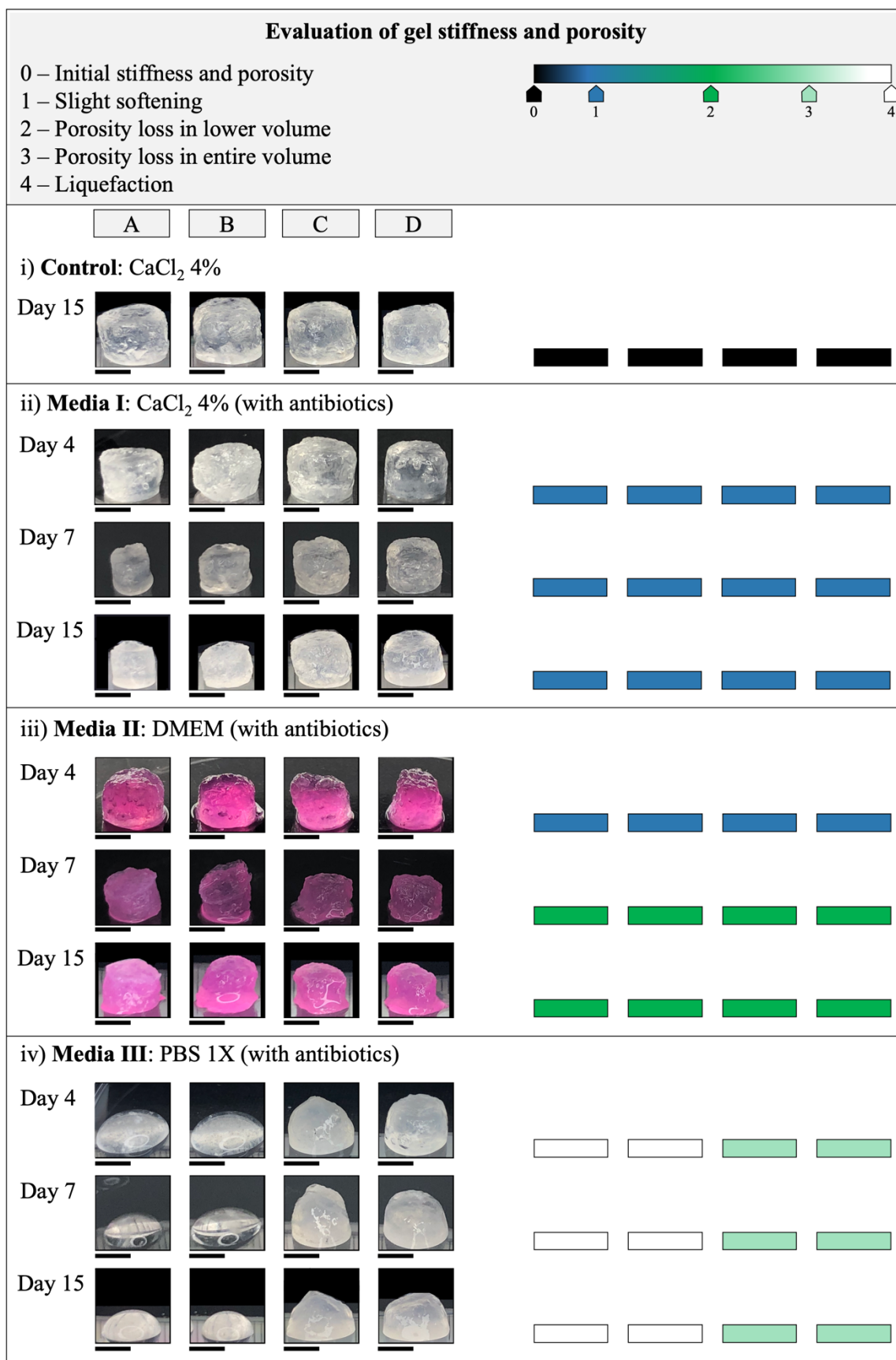


Figure 5.4. Structural stability tests on Days 4, 7 and 15, for gel formulations (A) 1% SA (no CHI), (B) SA 1% + CHI 0.02%, (C) SA 1% + CHI 0.2%, and (D) SA-RGD 1% + CHI 0.2%, in i) CaCl₂ 4% (control medium), ii) CaCl₂ 4% + antibiotics, iii) DMEM + antibiotics, and iv) PBS + antibiotics. All formulations are % w/v. The experiment was conducted with duplicates. The scale bar is 0.5 cm. Some images had their background partly removed to better emphasize the gel shape. Note that all of the gels on Day 0 looked like the one displayed in Figure 1b.

Effect of the RGD peptide on F98 cell adhesion

The relevance of grafting the RGD peptide for the retention of F98 cells in the 1% SA + 0.2% CHI hydrogel formulation was determined. In order to allow cancer cells to adhere either to the grafted RGD peptides, or directly onto the non-functionalized surface of SA and CHI, the F98 cells were incubated for 24 to 72 h, and the percentage of adhered cells in the hydrogels was measured (**Figure 5.5 a**). Grafting the RGD peptide increases the adhesion of cancer cells by 18% and 35% after 24 h ($p < 0.05$) and 48 h ($p < 0.05$) of incubation time, respectively. The advantage of grafting the RGD peptide was significant after the first 24 h of incubation and then slightly diminished. The adhesion of F98 cells reached over 90% after 72 h of incubation. These results suggest that the RGD peptide promotes a strong and faster adhesion, as compared to F98 cells in the 1% SA + 0.2% CHI hydrogels, but it is not required to efficiently retain these cells. Moreover, the increase in cell adhesion observed with the hydrogels grafted with the RGD peptide at 72 h correlated with a stimulation of proliferation rate as observed next in **Figure 5.5 b**. This suggests that F98 cells must first firmly adhere to RGD-grafted hydrogels before proliferating significantly.

F98 cell proliferation in the macroporous hydrogels

The proliferation of F98 cells was assessed over a period of 72 h (**Figure 5.5 b**). After 24 h and 48 h, no significant difference between the four hydrogel formulations was observed. A significant

increase was measured only for the hydrogel grafted with the RGD adhesion peptide after 72 h of incubation time. The number of F98 cells was then approximately 3.5 times higher in the RGD-grafted hydrogel, compared to the other formulations ($p < 0.01$).

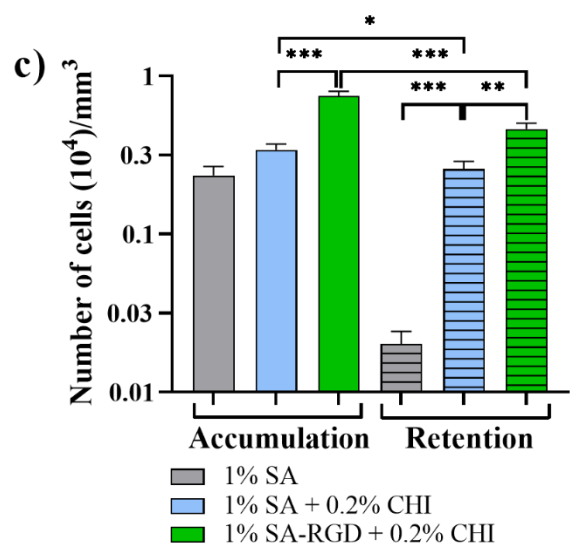
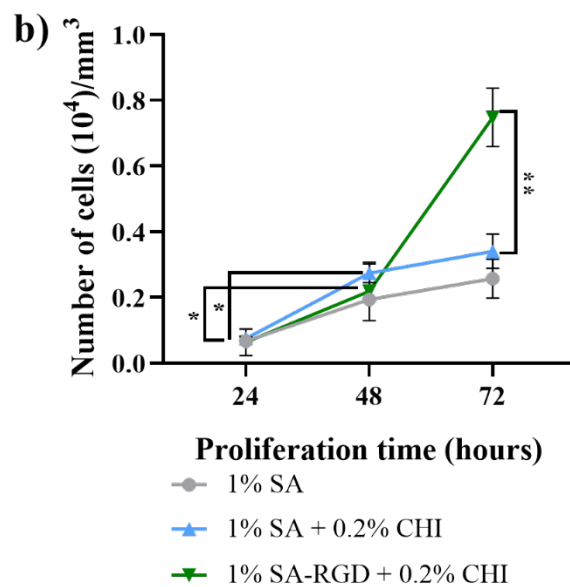
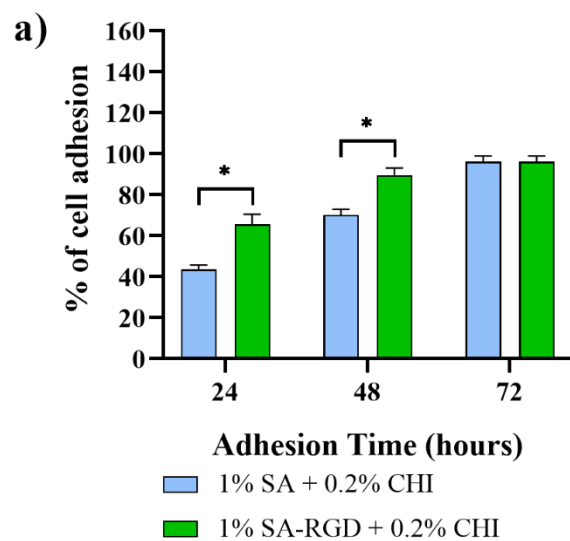


Figure 5.5. a) Percentage of cell adhesion over time in 1% SA + 0.2% CHI gels, without or with grafted RGD. Each point is the mean of two different replicate experiments, each performed in triplicate; b) Proliferation of F98 cells in SA gels alone, and with 0.02% and 0.2% CHI. The last formulation was grafted or not with RGD; c) Accumulation and retention of F98 cells in SA-CHI hydrogels, without or with grafted RGD. Macroporous hydrogels were incubated with 10^5 F98 cells for 48 h at 37 °C. Data represent the mean (\pm SD) of two independent experiments, each performed in triplicate. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Accumulation and retention of F98 cells depending on the hydrogel formulation

The accumulation and retention of F98 cells after 48 h of incubation were determined for the hydrogel formulations containing 1% SA, 1% SA + 0.2% CHI, and 1% SA-RGD + 0.2% CHI (**Figure 5.5 c**). The addition of 0.2% CHI to 1% SA hydrogels increased the accumulation of F98 cells by 35%, but the greatest gain was obtained by grafting in addition the RGD adhesion peptide, leading to more than 2 times more cells accumulated.

A stringent wash was then applied to determine the number of cells retained in the hydrogels (**Figure 5.5 c**). Less than 5% of F98 cells remained adhered to the 1% SA gels. A significant improvement was obtained by adding CHI, since an 80% retention was measured for the 1% SA - 0.2% CHI formulation ($p < 0.001$). Finally, grafting the RGD peptide resulted in a lower retention (65%) for the 1% SA-RGD + 0.2% CHI formulation ($p < 0.01$). Nevertheless, the final number of F98 cells was still 2 times higher when the RDG peptide was grafted ($p < 0.01$).

Distribution of F98 cells within the gels

F98 cells were seeded on top of the hydrogels to let them diffuse into the materials. After 48 h, their distribution was determined by epifluorescence microscopy at 5 different levels (0.45 mm separating each level) (**Figure 5.6 a**) and starting at 0.25 mm from the top of the gel. Three hydrogel formulations were assessed: 1% SA, 1% SA + 0.2% CHI, and 1% SA-RGD + 0.2% CHI. Since

F98 cells tend to aggregate together to form spheroids, their distribution was reported as the number of spheroids per level (**Figure 5.6 b**), and their mean surface per level (**Figure 5.6 c**), at each level. Illustrations of the spheroids observed at Level 3, for all three hydrogel formulations, are reported in **Figure 5.7**, confirming that the cells were able to diffuse inside the gels.

F98 spheroids were found only in the first three levels for the 1% SA hydrogel, while they were distributed fairly evenly throughout hydrogels formulated with 1% SA + 0.2% CHI and 1% SA-RGD + 0.2% CHI (Figure 6b). These results further support the capacity of chitosan and RGD peptide to retain the F98 cells. The mean surface of the spheroids was generally larger in the 1% SA-RGD + 0.2% CHI gels, which could be caused by the ability of the RGD peptide to stimulate the proliferation of F98 cells (Figure 6c).

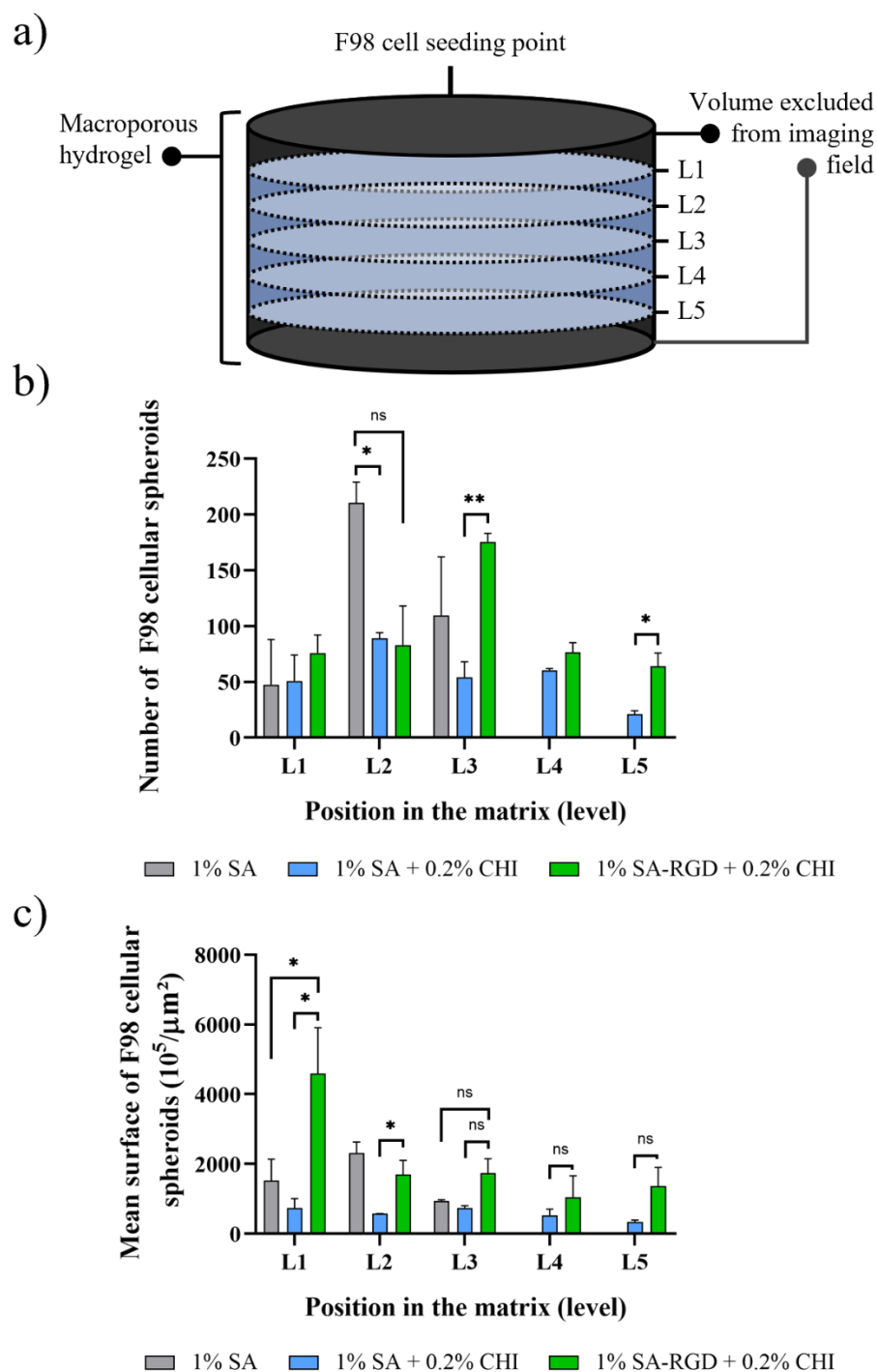


Figure 5.6. Distribution of F98 cells within SA and CHI gels, grafted or not with the RGD peptide (CGGRGDS). The gels were incubated with 5×10^5 F98 cells for 48 h. a) Schematic representation of the experiment, showing the seeding point for F98 cells, the volume excluded from the imaging field, and the five levels (L) of imaging (L1 to L5). b) F98 spheroids distribution per level in macroporous hydrogels. The number of F98 cellular spheroids and their

position within the gel. c) The mean surface of F98 spheroids (μm^2) per level in the gels. Data represent the mean \pm S.D. of three independent experiments, each performed in triplicate. ns > 0.1, *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001.

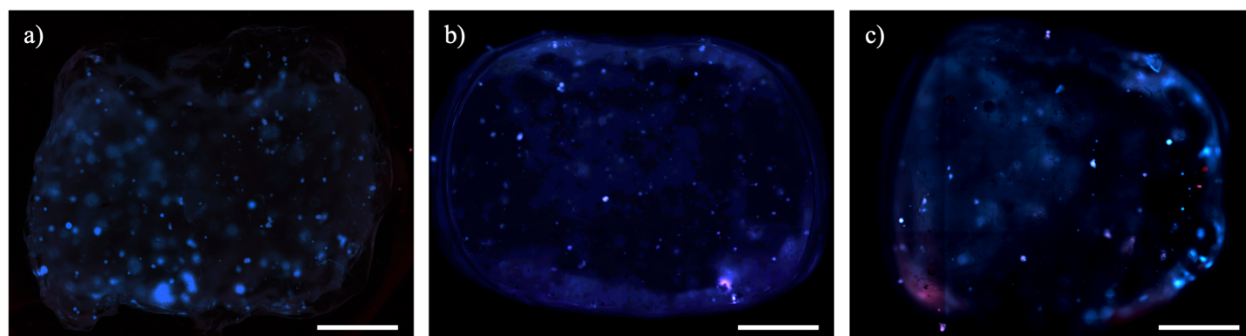


Figure 5.7. Illustration of the F98 spheroids at the third level (L3, see Figure 6a) in macroporous hydrogel formulations: a) 1% SA, b) 1% SA + 0.2% CHI, and c) 1% SA-RGD + 0.2% CHI. Images obtained with an epifluorescence microscope. The gels were fixed with 3% w/v (PFA) and stained with Rhodamine-phalloidin 2105247 and Hoechst 33342 (nuclei, blue channel). The scale bar is 1 mm.

DISCUSSION

The main objective of this work was to evaluate both the capacity of CHI in stabilizing SA-based macroporous hydrogels in saline and physiological media, and to promote the GBM cell adhesion and retention properties once inside the gel trap, while limiting their proliferation.

Figures 3 and 4 show that a small addition of CHI (0.02 or 0.2% w/v) to 1% SA gels does not significantly impact the value of the compression modulus (the RGD peptide has also no significant impact), but a minimum CHI concentration is required in order to improve gel stability in saline and cell culture media – herein measured at 0.2%. The stability is enhanced by the electrostatic interactions between SA and CHI bearing complementary charges in solution.^{129,133} While the effect remains moderate at this point, improving the control over the gelation process either by increasing the content in CHI,¹³⁴ by chemically modifying SA and/or CHI,¹³⁵ or via vapor phase gelation,^{129,133} for example, could further improve gel strength and stability.

Figure 3 also shows that the compression modulus is comprised in a range of 4 to 6 kPa, which is slightly higher compared to the reported values of 1.4 to 1.9 kPa corresponding to soft cerebral tissues (measured by indentation).^{52,132} Adjusting the porosity and SA concentration should allow the required fine tuning to match these values, while the CHI concentration could be independently adjusted to stabilize the gels – this is an interesting outcome simplifying the design process since adding a low amount of CHI does not significantly alter the compression modulus value. CHI stabilizes the gels in the media, promotes cell adhesion, and reduces cancer cell proliferation (compared to –RGD grafted gels).

To assess the gels capacity in accumulating and retaining F98 cells, 48 h between the initial cell addition moment onto the gels, and the measuring time, was deemed optimal. It allowed sufficient time for the cells to enter and fully occupy the available porous volume (Figures 6 and 7), and to adhere to the gel surface (Figure 5a), without significant cell proliferation (Figure 5b), for all gel formulations. The presence of CHI significantly improved the capacity of the gels to accumulate and retain F98 cells (Figure 5c) as compared to pristine SA gels, a trend that was further enhanced by adding the –RGD adhesion peptide. However, RGD-grafted gels also led to significant F98 cell proliferation (Figure 5b), which is an undesirable feature if the objective is to ultimately eliminate these cells by radiotherapy. CHI is also known to inhibit cancer cell proliferation and to promote the initiation of apoptosis.^{136–138} However, these beneficial effects on preventing cell proliferation was not observed with the hydrogel containing 0.2% CHI when compared to those without CHI. This suggests that a higher concentration of CHI would be required. Finally, CHI and –RGD both resulted in a more homogeneous distribution of F98 cells within the gels, as Figure 6 illustrates. The higher cell retention in CHI and –RGD functionalized gels also resulted into a higher number of larger spheroids, compared to pristine SA gels.

Overall, the formulation comprised of 1% SA with 0.2% CHI, without the –RGD cell adhesion peptide, offered the best compromise between increasing cell accumulation and retention in the macroporous gels, and decreasing the undesired cancer cell proliferation. Finally, in this work, the macroporous hydrogels average pore size was kept constant at about 600 μm , for a porosity of 33%. Future works will need to assess the impacts of both pore size and porosity on the mechanical properties, and cell accumulation and retention properties.

CONCLUSION

This work demonstrates that chitosan (CHI) improves the stability of sodium alginate (SA) macroporous hydrogels in saline and cell culture media. These macroporous hydrogels are designed to attract and retain glioblastoma brain cancer cells, in order to eliminate them afterwards with a lethal dose of stereotactic radiotherapy. The gel formulation, combined with the intricate and fully interconnected porosity, yield mechanical properties comparable to brain tissues, and allow F98 glioblastoma cells to penetrate the gels within their entire volumes, as confirmed by fluorescence microscopy. While the addition of a grafted –RGD peptide on SA, combined with CHI, significantly enhances the adhesion and retention of F98 cells within the gels, it also promotes their undesirable proliferation. As a result, the best compromise between a low proliferation and a high level of accumulation and retention of F98 cells was obtained with the hydrogel formulated with 1% SA and 0.2% CHI, without the –RGD adhesion peptide.

AUTHORS INFORMATION

Corresponding Authors

* Nick Virgilio. Email: nick.virgilio@polymtl.ca

* Benoit Paquette. Email: benoit.paquette@usherbrooke.ca

Author Contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

Funding Sources

The authors acknowledge the *Fonds de Recherche du Québec – Nature et Technologie* for financial support via the *Projet de Recherche en Équipe* program, as well as the New Frontiers in Research - Exploration program. This work was also supported by the TransMedTech Institute (NanoBio Technology Platform) and its main funding partner, the Canada First Research Excellence Fund. N. Virgilio acknowledges the financial support of Polytechnique Montréal via the UPIR program.

ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to thank Pr Marc Lavertu (Polytechnique Montreal, Chemical Engineering Department) for the access to the confocal microscope. The authors also thank Dr. Marie-Hélène Bernier for her expertise and support with the MicroCT experiments (Polytechnique Montreal).

ABBREVIATIONS

A, area; AmphB, Amphotericin B solution; BBB, Blood-Brain Barrier; BBDT, Block-Based Decision Table Algorithm; BSA, bovine serum albumin; BSBC, blood-spinal cord barrier; CHI, chitosan; CSN, central nervous system; EDC, Ethyl-N'-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride; DMSO, Dimethyl sulfoxide; EMCH, N- ϵ -maleimidocaproic acidhydrazide; FBS, foetal bovine serum; GBM, glioblastoma multiform; NHS, N-Hydroxysuccinimide; P, perimeter; PBS 1X, Phosphate Buffered Saline 1X solution; Pen-Strep, Penicillin G and Streptomycin solution; PLA, poly (L-lactide); PS, polystyrene; CGGRGDS, cysteine-terminated RGD peptide; RBIT, Rhodamine B isothiocyanate; RT, room temperature; SA, sodium alginate; SA-RGD,

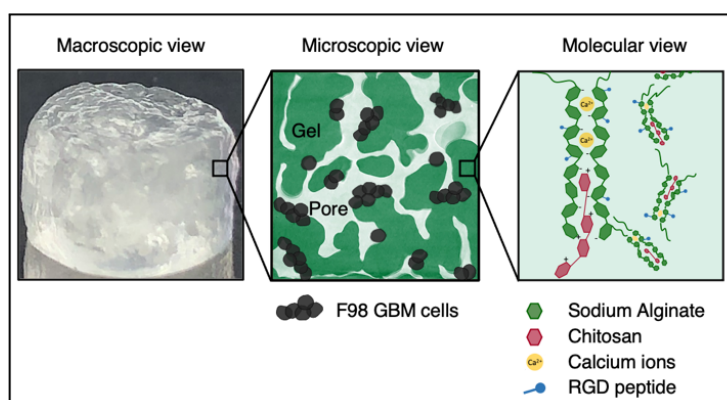
CGGRGDS-grafted sodium alginate; SD, standard deviation; STD-SA, sodium alginate; TMZ, Temozolomide.

SUPPORTING INFORMATION: 1) Parameters of compression assays; 2) Video files showing the interconnected porosity in porous PLA mold (1_Porous PLA.mp4) and porous gel (2_Porous gel.mp4).

for Table of Contents use only

Effect of Chitosan on Alginate-based Macroporous Hydrogels for the Capture of Glioblastoma Cancer Cells

Caroline Safi,^a Angela Giraldo Solano,^b Benoit Liberelle,^c H el ene Therriault,^b Lisa Delattre,^a Melek Abdelkhalek,^a Changsheng Wang,^a Simon Bergeron-Fortier,^a Vaiana Moreau,^a Gregory De Crescenzo,^c Nathalie Fauchoux,^d Marc-Antoine Lauzon,^d Benoit Paquette^{b} and Nick Virgilio^{a*}*



Supporting Information

Table S1. Mechanical test parameters

Step	Parameters
Find contact	Move at 25 $\mu\text{m/s}$ until a load of 0.25 g is recorded.
Pre-compression	Compression of 50 μm at 25 $\mu\text{m/s}$.
Main compression	Additional compression of 25 μm at 20 $\mu\text{m/s}$.

CHAPITRE 6 ASPECTS MÉTHODOLOGIQUES ET RÉSULTATS COMPLÉMENTAIRES

Le présent chapitre porte sur les travaux qui ont précédé la formulation finale des hydrogels macroporeux d'alginate et de chitosane présentée au **Chapitre 5**. L'objectif de cette section est de contextualiser et de partager les constats faits sur le système étudié.

6.1 Situation initiale

Les gels d'alginate étaient initialement préparés par deux voies de réticulation distinctes.

- Lorsque des hydrogels macroporeux étaient produits, une solution de CaCl_2 était utilisée pour former un réseau tridimensionnel par gélification externe.
- Lorsque des gels pleins étaient produits, du CaCO_3 , une forme non-soluble de calcium à pH neutre, et une quantité de δ -gluconolactone (GDL), un agent acidifiant, étaient ajoutés au mélange. Ce type de gélification est qualifiée « d'interne ».

6.2 Étudier les différentes formes du chitosane

Afin de faire interagir le chitosane et l'alginate pour former un gel, il faut disperser l'un dans l'autre. Cette section présente les différentes formes de chitosane utilisées.

i. Flocons

Le chitosane, reçu sous forme de flocons, fut d'abord mélangé à l'alginate dans cet état. L'interaction entre les deux polysaccharides fut cependant peu significative; une certaine dissolution du chitosane semblait cependant s'opérer lorsque du GDL était utilisé.

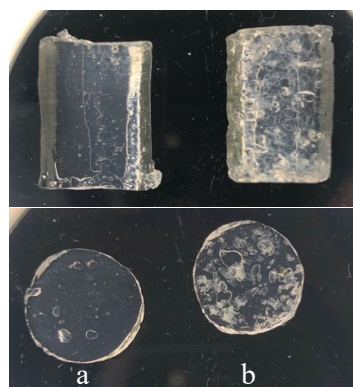


Figure 6.1: Gels d'alginate, CaCO_3 et GDL, a) sans chitosane et b) avec chitosane.

ii. Solution de chitosane

Le chitosane fut ensuite solubilisé dans de l'acide acétique, un acide faible, en le mélangeant au barreau magnétique durant plusieurs jours. Une fois le chitosane complètement solubilisé, des résidus persistaient; ceci a éventuellement été réglé vers la fin du projet en utilisant de l'alginate du chitosane initialement filtrés et lyophilisés, avant d'être utilisés.

Avec la solution obtenue, une titration a été réalisée afin d'observer l'évolution de la solubilité du chitosane en fonction du pH. La Figure 6.2 présente ce diagramme de phase. On observe de manière qualitative que, pour le grade de chitosane utilisé, le polysaccharide est soluble à un pH inférieur à 7. On constate en effet que la solution passe d'une apparence transparente (signe de solubilité) à une couleur blanche (signe d'insolubilité).

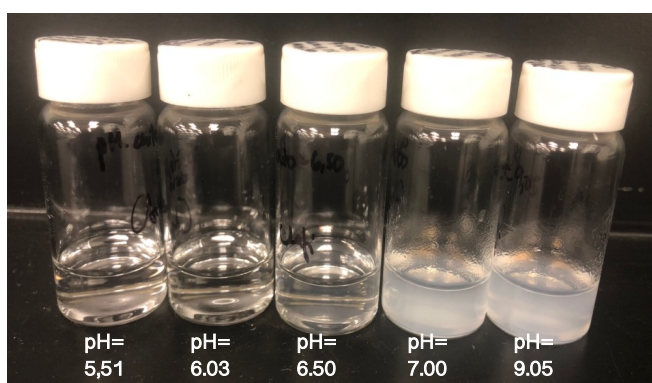


Figure 6.2: Diagramme de phases présentant la solubilité du chitosane (0,2 g/100 g acide acétique à 1%) en fonction du pH.

Chacune de ces solutions fut ensuite mélangée avec un barreau magnétique à l'alginate. **La Figure 6.3** suivante présente les résultats obtenus. Les bouteilles sont inversées pour montrer la texture et la tenue du complexe formé.

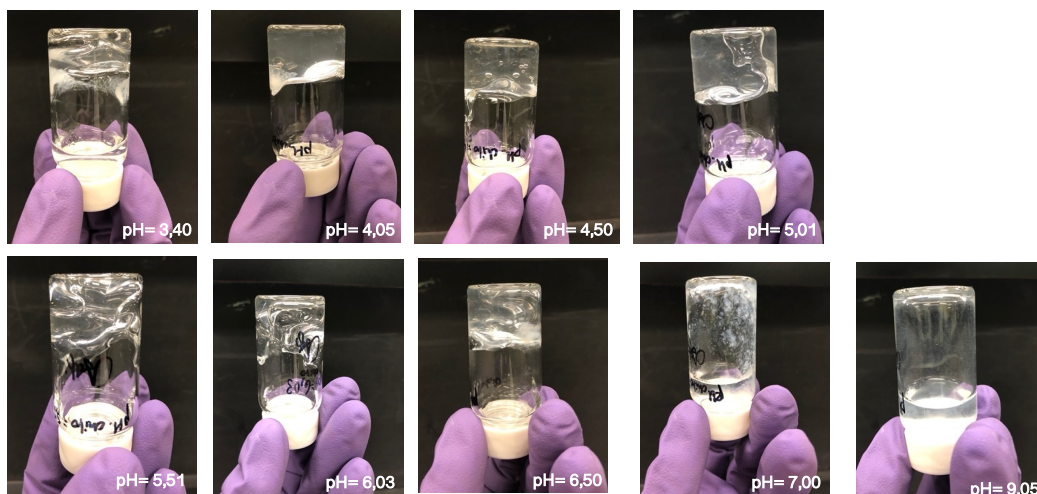


Figure 6.3: Mélanges alginate (0,75%) et chitosane (0,1%) selon le pH de la solution de base de chitosane. (Les pH indiqués sont ceux de la solution de chitosane utilisée initialement.)

De cette figure, on observe que plus le pH du chitosane augmente, moins une structure gélifiée est en mesure de se former. En fait, le chitosane perd graduellement en solubilité et a de moins de moins de charges positives disponibles pour interagir avec l'alginate.

En contrepartie, on constate qu'un certain gel se crée pour les échantillons dont le pH du chitosane est inférieur à 7. Ce « gel » formé est en réalité inhomogène, car il présente des zones plus complexées (précipitations blanchâtres) par rapport à d'autres. La **Figure 6.4** montre d'autres plans des échantillons, à pH 3,40 et 4,05.

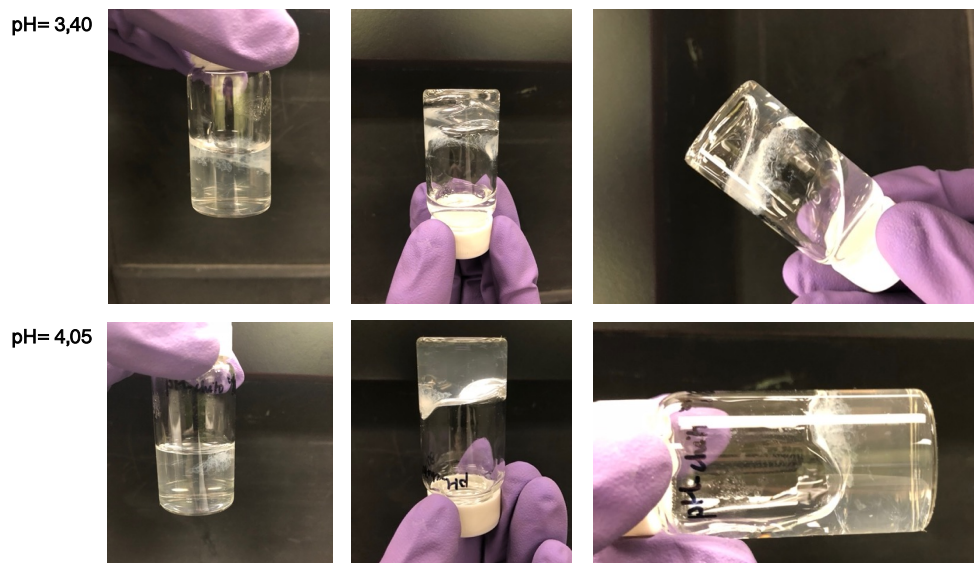


Figure 6.4: Mélanges d'alginate (0,75%) et de chitosane (0,1%) à bas pH. (Les pH indiqués sont ceux de la solution de chitosane utilisée initialement).

La **Figure 6.5**, réalisée à partir d'une expérience similaire, montre plus clairement les précipités blancs au centre des gels formés à pH inférieurs à 7. Par exemple, pour le pH = 5,43, bien que lorsque l'on penche la bouteille on voit une distorsion à la surface du liquide qui montre une structure gélifiée, on peut clairement voir qu'en son centre se trouvent des filaments blancs. Ces objets blancs seraient des précipités alginate-chitosane.

Pour cette même figure, lorsqu'on prend un pH = 7, la bouteille inclinée montre un résultat différent. On ne retrouve aucun signe de gel, ce qui s'explique par le fait que le chitosane n'est plus soluble et n'interagit pas avec l'alginate. Dans ce cas, les résidus blanchâtres au fond de la fiole sont des précipités de chitosane insolubles uniquement.

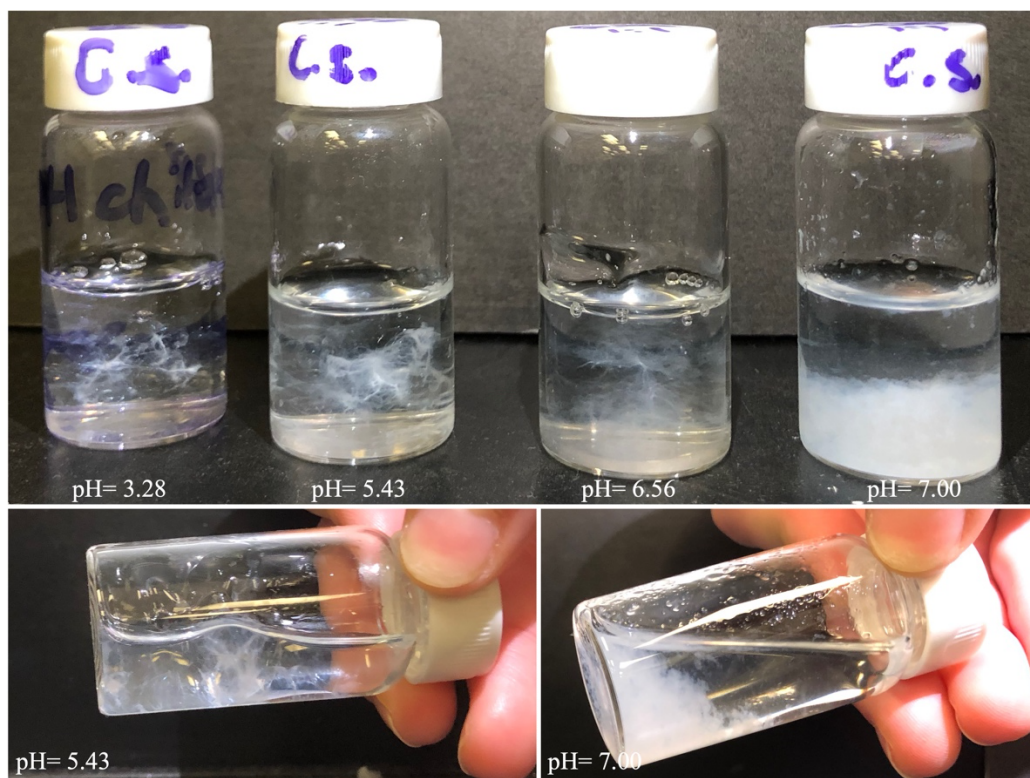


Figure 6.5: Mélanges alginate (0,3%) et chitosane (0,1%) en modifiant le pH de la solution de base de chitosane. (Les pH indiqués sont ceux de la solution de chitosane utilisée, pas ceux des mélanges finaux.)

Ainsi, le mélange d'alginate et de chitosane, tous deux sous leur forme solubilisée, ne permet pas de former un gel homogène. La section suivante propose une autre approche, en utilisant plutôt une suspension de chitosane.

iii. Suspension de chitosane

Afin de disperser le chitosane dans l'alginate de manière à obtenir une interaction plus homogène dans le volume, il a été proposé de former une suspension de chitosane et de graduellement la re-solubiliser dans l'alginate. Les différentes voies d'acidification sont présentées à la section suivante.

La technique de préparation des suspensions de chitosane a été décrite au **Chapitre 5**, dans la section de la méthodologie. Pour préparer une suspension de chitosane, il faut partir d'une solution, puis graduellement faire augmenter le pH tout en utilisant une sonde d'ultrasonication.

Afin de mieux comprendre l'évolution du pH des solutions de chitosane en fonction de l'ajout de NaOH, une titration a été réalisée et est présentée à la **Figure 6.6**. À noter que celle-ci a été réalisée avec une solution de chitosane solubilisé dans de l'acide acétique, et non pas dans une solution de HCl comme dans le **Chapitre 5**.

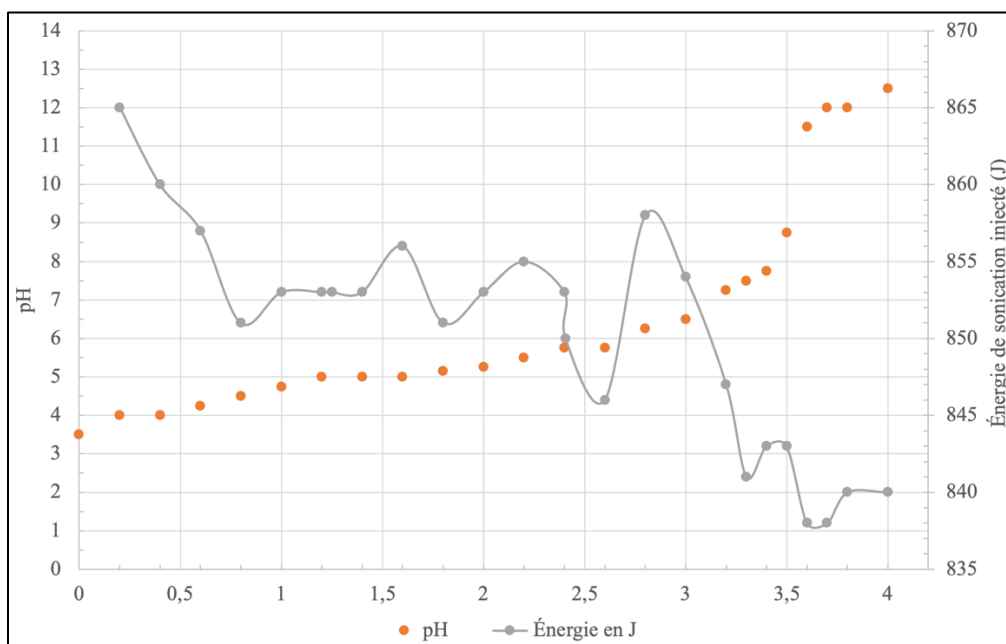


Figure 6.6: Courbe de titrage Chitosane/NaOH et variation de l'énergie de sonication injectée. 25 ml de chitosane 0,8%*m/v* dans 1%*m/m* d'acide acétique se sont faits titrés à l'aide de NaOH 1M.

Les suspensions de chitosane préparées contenaient des particules relativement grossières. En réalité, après quelques minutes (pour les suspensions à 0,4% *m/v*) et après quelques heures (pour les suspensions à 0,04% *m/v*), une décantation s'opérait. Le zeta potentiel de la suspension ni la taille de particules n'ont été déterminés. Différents paramètres pourraient être ajustés dans le futur afin de diminuer la taille des particules :

- Concentration de la base (NaOH 1M était utilisé). Le fait de réduire la concentration et d'administrer goutte à goutte la base permettrait potentiellement de créer des précipités plus fins.
- Choix et concentration de l'acide (HCl 1M était utilisé). D'autres conditions n'ont pas été testées systématiquement.
- Température de fabrication à optimiser. Un bain de glace était utilisé mais il ne permettait pas de contrôler la température tout au long de l'expérience.

6.3 Étudier différentes approches d'acidification

Des mélanges alginate – suspensions de chitosane ont également été préparées. Trois méthodes principales d'acidification ont été testées : i) acidification interne à l'aide de GDL, ii) acidification externe par vapeurs acides, et iii) acidification externe avec bain acide.

i. Acidification interne à l'aide de GDL

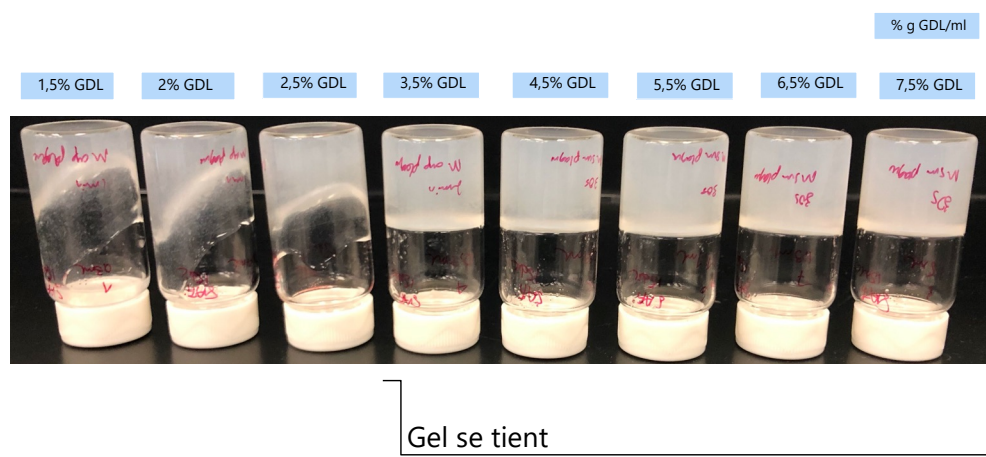


Figure 6.7: Gélification d'un mélange alginate - suspension de chitosane à l'aide de GDL

La **Figure 6.7** montre que la formation de gels est possible lorsqu'une certaine concentration minimale en GDL est ajoutée dans le mélange. Par contre, contrairement aux gels d'alginate – CaCO_3 qui réticulent en quelques secondes grâce au GDL, ce n'est pas le cas des gels alginate – chitosane, puisque la gélification n'est pas induite par du Ca^{2+} en solution. Ainsi, cette méthode s'avère moins bien adaptée à la méthode de fabrication de gels macroporeux présentée dans l'article scientifique, car une cinétique de réticulation trop lente pourrait causer le moule poreux à s'évider de la solution injectée avant que le gel ne se forme. Une solution pourrait être d'injecter le moule et de le tremper dans un surplus de solution pour éviter qu'il ne se vide.

Cette voie d'acidification a été peu explorée. Ainsi, le temps de réticulation ainsi que la qualité des gels formés (homogénéité, tenue mécanique, structure fragmentée ou intègre) n'ont pas encore été évalués.

ii. Acidification externe par vapeurs acides

Cette technique, inspirée de l'article de Wang et al.¹²⁹, consiste à placer la solution gélifiante dans une enceinte fermée dans laquelle s'évapore un acide. Dans ce cas précis, bien que le chitosane ait été dissout dans du HCl avant d'être remis en suspension, c'est de l'acide acétique glacial qui fut utilisé. La **Figure 6.8** offre une représentation du montage.

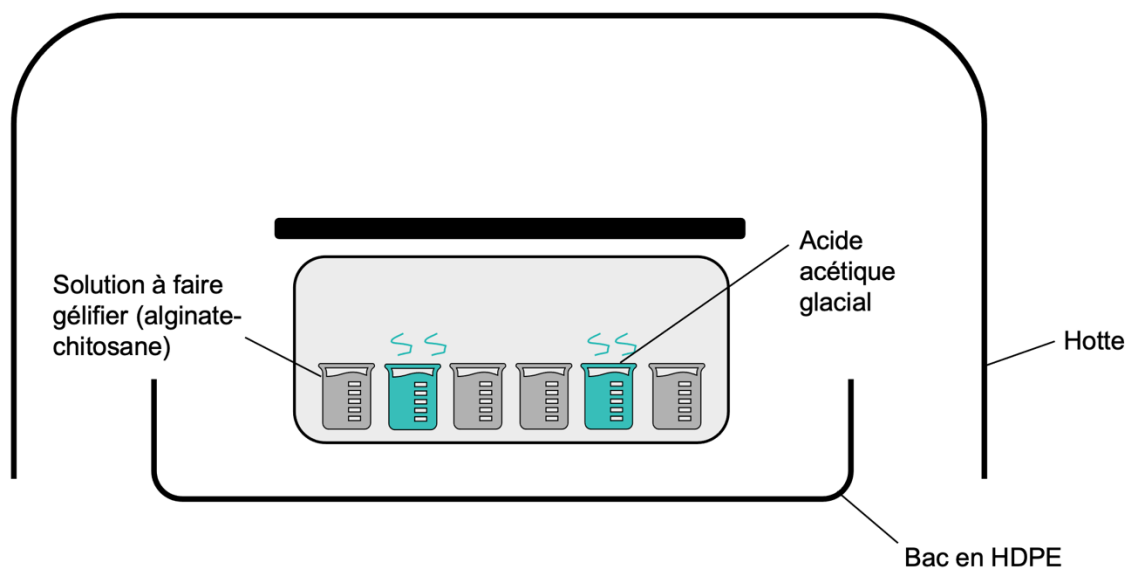


Figure 6.8: Montage pour la technique d'acidification par vapeurs acides

Le procédé par vapeurs acides a permis de démontrer l'importance du mode d'intégration du chitosane sur la qualité du gel formé. La **Figure 6.9** montre les différents complexes/gels formés suite à leur exposition aux vapeurs acides (au moins 15 heures) lorsque a) une solution de chitosane est mélangée au barreau magnétique à une solution d'alginate, b) une solution de chitosane est mélangée à l'aide d'un homogénéisateur à une solution d'alginate et c) une suspension de chitosane est mélangée à une solution d'alginate.

Il est à noter que le gel obtenu après mélange à l'homogénéisateur est fragmenté lorsqu'on la sort de sa bouteille – le procédé ayant probablement brisé le réseau initialement formé.

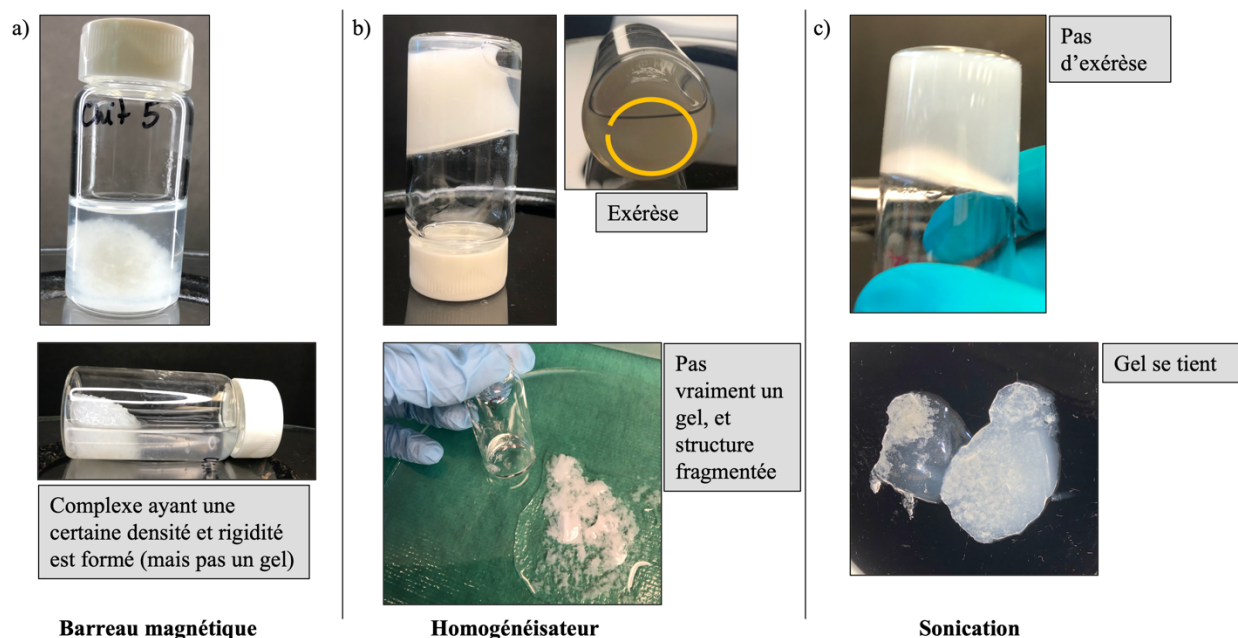


Figure 6.9: Acidification par voie acide de mélanges alginate-chitosane préparés de diverses manières.

La **Figure 6.9 c)** montre ainsi la capacité de former un gel qui se tient relativement bien en acidifiant une suspension de chitosane, mélangée à de l'alginate, par exposition aux vapeurs d'acide acétique. On remarque cependant la présence d'agrégats blancs, qui pourraient être du chitosane, ou des précipités alginate-chitosane. En général, ces agrégats se retrouvaient davantage vers le fond de la bouteille que dans tout le volume, ce qui laisse suspecter une décantation du chitosane durant le processus d'acidification. Comme le temps requis pour gélifier le volume est de plusieurs heures, il est fort probable qu'une fraction des particules de chitosane en suspension ait pu sédimenter avant que la gélification ne soit complète.

En effet, dans le cas où un récipient ayant un diamètre plus large était utilisé pour contenir le même volume de solution, la réticulation était beaucoup plus rapide. Comme il s'agit d'une acidification externe, un compromis entre la cinétique de diffusion et celle de décantation doit être étudié. Une suspension très fine pourrait en contrepartie réduire cet effet de suspension. La **Figure 6.10** montre d'ailleurs la différence entre une acidification externe uniquement (exposition à des vapeurs acides) (a), et une combinaison d'une acidification externe par vapeurs acides et interne dans tout le volume à l'aide de GDL.

Ceci met de l'emphase sur l'importance de rendre plus systématique cette méthode de préparation (taille de la chambre, nombre et diamètre des fioles contenant l'acide, nombre et diamètre des récipients contenant le mélange) et de raffiner la préparation de la suspension de chitosane.

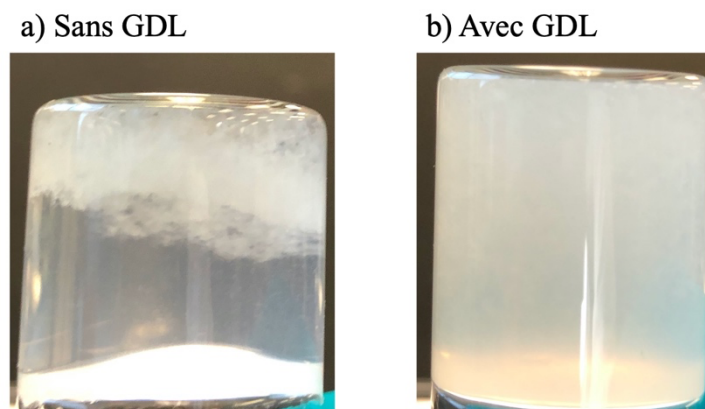


Figure 6.10: Réticulation par vapeurs acides d'une suspension de chitosane mélangée à de l'alginate a) sans GDL et b) avec GDL.

Il est à noter que, pour des raisons similaires qu'exprimées à la sous-section précédente, la réticulation par acidification par vapeurs n'a pas été retenue pour la fabrication de gels macroporeux, dû au risque que le moule s'évide par le temps que le gel ne se forme.

iii. Acidification externe par bain acide

Afin de tenter d'intégrer le chitosane dans un processus de fabrication de gels macroporeux, une suspension a été produite et mélangée à l'alginate. Comme le moule risque de s'évider si la réticulation n'est pas rapide, une première gélification s'est faite en trempant les échantillons dans une solution de calcium. Dans le protocole préexistant, les moules seraient restés toute une nuit dans cette solution. Parmi les expériences tentées, certains moules furent plongés, suite à 30 secondes dans un bain de Ca^{2+} , dans du HCl à pH=4. Cette avenue s'est avérée peu concluante, car les matrices obtenues étaient partielles et mal formées; signe d'une réticulation incomplète.

Subséquentement, des matrices réticulées par la solution de calcium durant une nuit, puis extraits au chloroforme, ont été plongées dans cette même solution de HCl pendant 6 à 8 heures. L'objectif était de faire interagir l'alginate qui n'était pas réticulé par le calcium avec le chitosane. Les

résultats des tests mécaniques de cette étude ont montré qu'au lieu de renforcer la matrice en ajoutant des liaisons intermoléculaires, le gel s'était plutôt ramolli. Une hypothèse d'hydrolyse de l'alginate a été formulé pour expliquer ce constat. Le processus de fabrication pour cette méthode de fabrication est schématisé à la **Figure 6.11**. Puisque l'objectif de ce protocole était de réticuler partiellement au calcium l'alginate, le temps passé dans la solution de CaCl_2 devrait être grandement réduit pour de prochains essais. Ainsi, il y aurait davantage de chance que des chaînes d'alginate soient réellement libres et prêtes à être réticulées avec le chitosane, l'étape d'acidification venue. D'ailleurs, une période plus courte devrait être accordée à l'étape du bain acide, et le pH devrait également être revu à la hausse également.

Le bénéfice de cette méthode est que le chitosane peut être immobilisé dans le pré-gel alginate-calcium, et donc être disponible en tous points du volume. Cela s'apparente au bénéfice d'utiliser du GDL, qui lui acidifie tout le volume ce qui réduit l'effet de décantation.

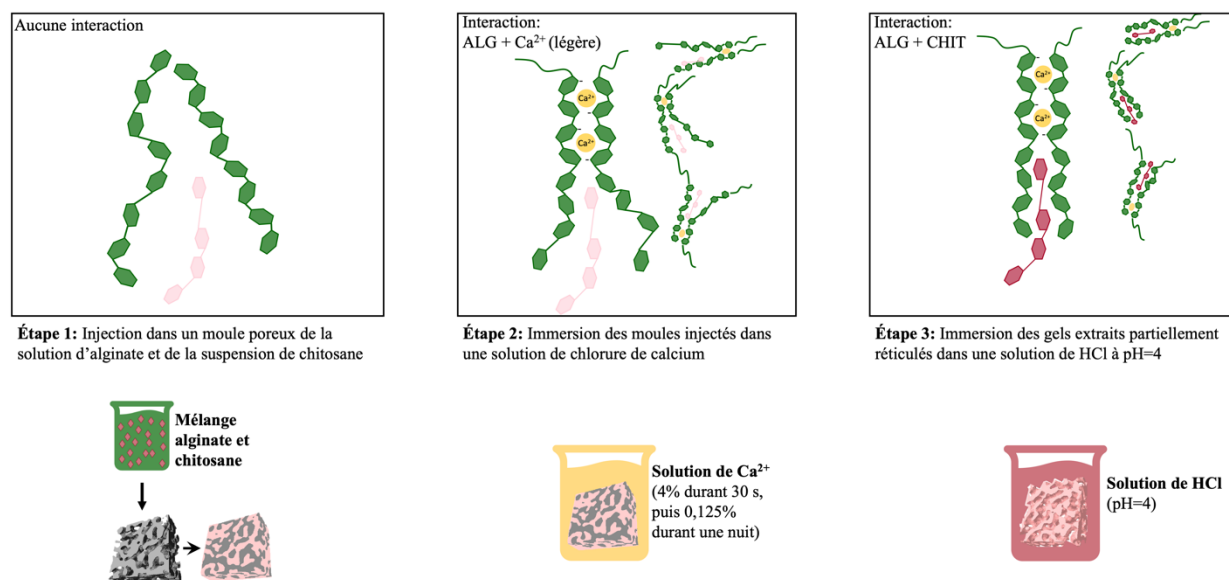


Figure 6.11: Processus de fabrication de gels macroporeux d'alginate et de chitosane partiellement réticulé dans une solution calcium et acidifié dans une solution de HCl

6.4 Résultats complémentaires à ceux de l'article scientifique

La figure suivante présente des résultats mécaniques complémentaires pour un hydrogel macroporeux d'alginate.

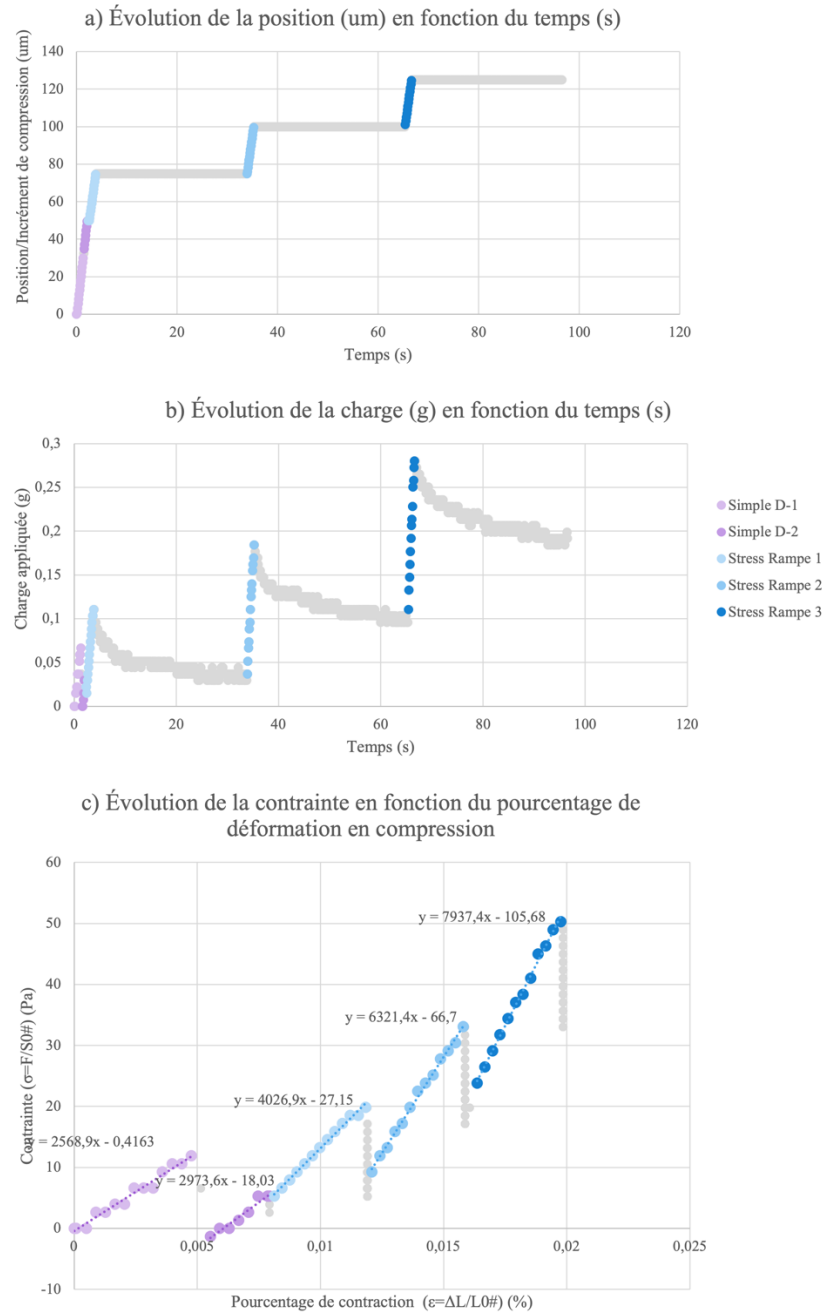


Figure 6.12 Évolution de a) la position et de b) la charge appliquée, en fonction du temps, sur un hydrogel macroporeux d'alginate, et de c) la contrainte en fonction du pourcentage de déformation en compression.

La **Figure 6.12** est représentative des résultats de tous les hydrogels macroporeux testés, qu'ils soient fonctionnalisés ou non avec le peptide RGD ou qu'ils contiennent ou non du chitosane.

i. Défaillance mécanique en cours de test de compression

La **Figure 6.12** a) et b) montrent le test expérimental réalisé sur les gels. On débute le test avec une pré-compression afin de s'assurer que le pied de compression touche la surface du gel. Cette étape est identifiée « Simple D-1 » et « Simple D-2 » (Déplacement simple). À la **Figure 6.12** b), on constate que la charge pour cette étape n'augmente pas de manière constante, mais se divise plutôt en deux courbes. En effet, alors que le déplacement simple revient essentiellement à abaisser la position du pied de compression de manière continue, la force appliquée sur le gel diminue subitement puis reprend sa remontée. Cela indiquerait par exemple une irrégularité à la surface du gel, par exemple dans une zone où un pore est d'un ordre de grandeur nettement supérieur. Ce type de défaut était assez fréquent chez les moules poreux confectionnés, tel que présenté à la **Figure 6.13**.



Figure 6.13: Défauts de fabrication des moules macroporeux ayant subis un recuit de 45 minutes

La majorité des moules présentés à la **Figure 6.13** ont été rejetés pour la préparation d'hydrogels. Néanmoins, vu la fréquence de ces millipores, il fut inévitable d'utiliser des moules présentant des défauts similaires quoique plus fins et moins visibles. Cela explique donc ces défaillances mécaniques lors des tests qui, d'ailleurs, pouvaient se produire en tous points du test, mais particulièrement au début. La présence de ces pores est suspectée de provenir d'un mauvais mélange des phases lors de l'extrusion des moules.

ii. Effets capillaires nuisant à l'observation d'une potentielle relaxation du gel

Suite au déplacement simple initial, une série de compressions-relaxation, suivi de périodes où la position est maintenue, s'est ensuivie. Les courbes de la partie b) de la **Figure 6.12** montrent une

descente progressive de la charge durant les phases de maintien de la position. Alors que ce résultat semblait signifier que le matériau entrait en phase de relaxation, une telle conclusion n'a pu être ultimement tirée. En effet, des tests complémentaires ont montré que des effets capillaires s'exerçaient sur le pied de compression par le gel mouillé. Des tests futurs en traitant le pied de compression avec un enduit hydrophobe devraient être réalisés afin de pouvoir étudier la présence ou l'absence d'un phénomène de relaxation chez ces hydrogels.

iii. Augmentation du module de compression par incrément

La partie c) de la **Figure 6.12** montre l'interprétation des données de position et de charge afin d'exprimer l'évolution de la contrainte en fonction de la déformation. Les modules de compression mécanique (égaux aux pentes des courbes) sont constants durant les périodes de compression du test, en considérant que ces courbes sont des fonctions linéaires. Or, suite à chaque phase de maintien de la position – où l'on ne sait pas exactement ce qu'il advient réellement de la charge ressentie par le gel (relaxation ou non) puisque ces données sont brouillées par les effets capillaires – on remarque une augmentation soudaine et marquée du module de compression pour chaque nouvelle phase de compression. Ce résultat, retrouvé systématiquement chez tous les gels d'alginate contenant ou non du chitosane, n'a pu être expliqué à ce stade. Une hypothèse de consolidation des pores lors de la phase de maintien a été émise. Il est à noter qu'à la fin des tests, après une déformation d'au plus 2%, les gels reprenaient qualitativement leur taille initiale, quoique certains semblaient avoir perdu en hauteur. En somme, l'évolution du module laisse transparaitre soit que les tests se déroulaient dans la zone plastique du matériau plein ou que des forces viscoélastiques sont en jeu; ou soit que la morphologie macroporeuse du matériau se densifie en cours de déformation et change les propriétés de rigidité de la matrice.

CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce projet de maîtrise a permis de montrer l'impact sur la stabilité mécanique et l'adhésion cellulaire du chitosane lorsqu'ajouté à des matrices macroporeuses d'alginate réticulé par des ions calcium. Le chitosane semble ainsi permettre d'une part une interaction partielle avec l'alginate et empêcher le gel de se détériorer complètement lorsqu'une chélation et/ou une substitution ionique du calcium s'opèrent; et d'autre part, permettre à la matrice de profiter d'une chimie de surface qui interagit avec la membrane cellulaire. La **Figure 7.1**, qui reprend les résultats présentés à la **Figure 5.4** de l'article au **Chapitre 5**, montre sous un autre angle les gels après avoir été trempés dans différentes solutions. L'impact du chitosane dans la conservation des gels à une concentration de 0,2% (m/v) est significatif lorsque les matrices sont trempées dans une solution de PBS 1X.

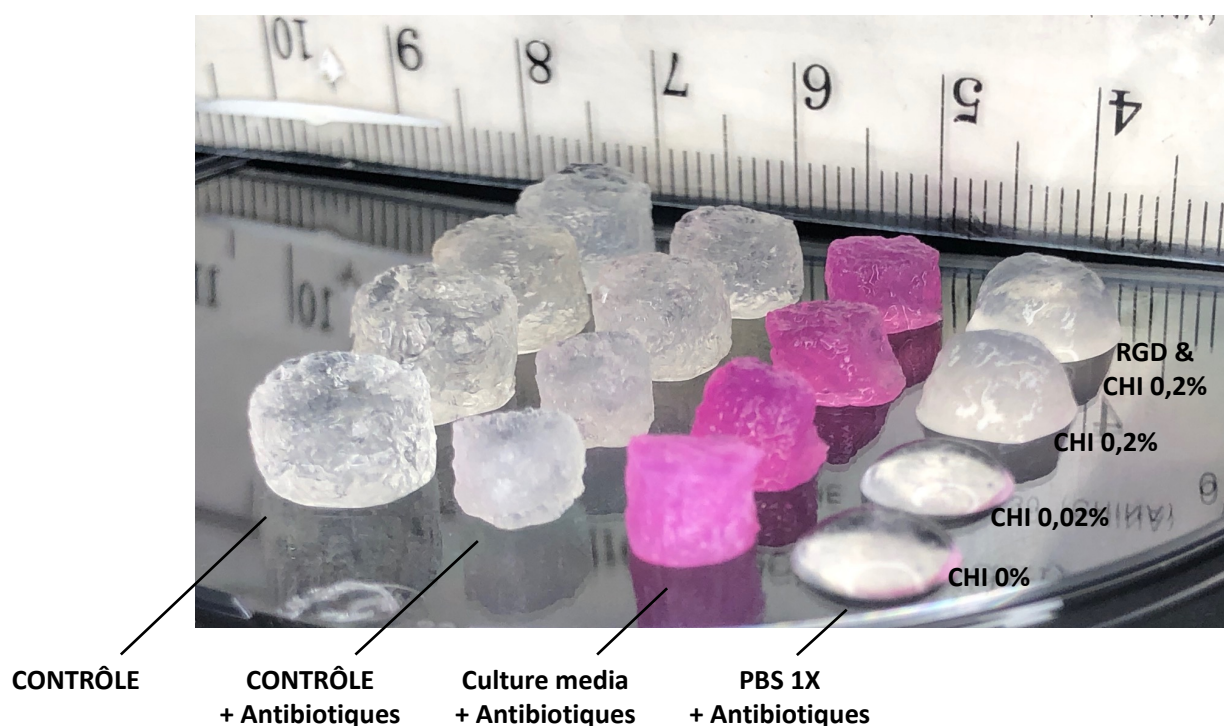


Figure 7.1: Hydrogels macroporeux d'alginate 1% à différentes teneurs en chitosane (0%, 0,02% et 0,2%) et fonctionnalisés, ou non, à l'aide du peptide RGD, trempés durant 15 jours dans différentes solutions.

La quantité de chitosane n'a cependant pas permis d'éviter une certaine dégradation et de perdre la porosité. En considérant que la littérature médicale indique que la plaie causée par la chirurgie doit être guérie avant de débiter l'irradiation¹³, on en comprend qu'il est désiré que les gels ne se

dégradent pas du tout afin de conserver leur macrostructure et leurs propriétés mécaniques jusqu'à la fin de leur phase utile.

Dans la méthodologie décrite dans l'article du **Chapitre 5**, le chitosane est réparti dans tout le gel. Le chitosane a en fait un double rôle. D'abord, il remplit un rôle de renfort chimique, et il lui est requis d'être réparti dans tout le gel pour cela; en effet, la perméabilité des hydrogels donne accès aux ions de pénétrer la matrice et de la dégrader dans tout son volume – phénomène que l'on veut éviter. Son second rôle, qui ne lui nécessite pas de se trouver dans tout le volume mais en particulier à la surface des pores, est celui de promouvoir l'adhésion cellulaire.

Pour de prochaines itérations de la formulation d'hydrogels alginate-chitosane, il serait donc nécessaire de continuer de produire un mélange, c'est-à-dire d'intégrer le chitosane dans le volume et la surface. De plus, une concentration plus grande de chitosane devrait être tentée, afin de mieux résister à la dégradation. Similairement, il faudrait explorer davantage la préparation des gels par voies acides, en particulier celle présentée à la **Figure 6.11**. En effet, en réduisant le temps de réticulation par calcium, passant d'une nuit de trempage à quelques minutes par exemple, il serait possible de former un pré-gel laissant encore plusieurs chaînes d'alginate relativement libres. Une phase de trempage acide courte et à pH faible (par exemple pH = 4 comme ce qui avait été testé), ou longue mais à pH plus élevé (par exemple légèrement en-dessous du point d'insolubilité du chitosane, par exemple à pH = 6,5), pourrait permettre de favoriser les interactions entre le chitosane et l'alginate, sans créer de dégradation.

Le bénéfice d'avoir du chitosane dans le volume n'exclut pas la possibilité d'en ajouter une couche plus concentrée à la surface. Cela pourrait être possible en utilisant une technique de dépôt fin de couches de polymères, soit la méthode *layer by layer*. De fines couches pourraient être déposées sur la surface du moule poreux et, suite à l'injection, la réticulation et l'extraction du moule, un hydrogel alginate-chitosane, recouvert d'une couche de chitosane, pourrait être obtenu. Il est à noter qu'il faudrait vérifier la faisabilité de cette technique sur un moule de PLA, et au besoin changer le mélange immiscible utilisé dans la préparation des moules.

Une couche de chitosane à la surface des matrices pourrait permettre : (1) d'augmenter l'adhésion cellulaire des cellules cancéreuses à la matrice. Il faudrait cependant vérifier que cette modification à la chimie de surface ne vienne pas promouvoir la prolifération cellulaire, c'est-à-dire la multiplication des cellules cancéreuses une fois l'implant atteint. Et (2) cette couche de chitosane aurait potentiellement un effet structurant sur la macrostructure poreuse. En effet, on note que les matrices contenant 0,2% de chitosane montrent une meilleure stabilité en solution, mais ne parviennent pas à conserver la porosité du gel. Une couche de chitosane agirait comme un filet ou un maillage structurant pour le système poreux, et ce, sans forcément venir affecter le module de compression. En effet, une solution alternative pourrait être de choisir de fabriquer des gels avec une solution d'alginate plus concentrée, en ajoutant une quantité proportionnelle de chitosane. Cela ne viendrait cependant pas forcément réduire la perte de porosité, et aurait un effet potentiel sur la rigidité du matériau. Ce serait donc une avenue moins intéressante que celle proposée avec la technique *layer by layer*. Rappelons que l'objectif est de fabriquer une matrice à bas module de compression (entre 0,1 et 16 kPa⁵²), mais qui conserve bien sa structure macroporeuse.

Au sujet du test de stabilité en solution, ce dernier aurait pu être réalisé de manière davantage quantitative. En effet, les gels étaient trop mous, ou carrément détruits, pour être suivis par pesée – d'autant qu'un séchage uniforme n'a pu être réalisé et en tous les cas causait un rétrécissement des gels. Le suivi du changement de concentration des solutions de trempage pourrait être un moyen. D'autre part, ce test a été réalisé à des températures de réfrigération. Ceci n'est évidemment pas représentatif des conditions du corps humain. Un test à une température de 37°C accélérerait probablement la dégradation des gels durant le test, car causerait une diffusion plus rapide des ions chélateurs et de substitution.

En regard aux propriétés mécaniques, la température physiologique aurait probablement également un effet sur la rigidité des matrices et devrait être étudiée. D'autre part, un test en compression qui mènerait à l'écrasement total de l'échantillon permettrait de déterminer les zones du domaine élastique et plastique de la matrice. Cela aurait peu d'intérêt pour le projet de la gliotrappe, vu que l'implant ne subira pas une déformation très importante lors de sa manipulation par le médecin ni durant sa phase d'utilisation. Cependant, ce test aurait un intérêt dans le cadre d'une démarche plus fondamentale. Similairement, des tests pour mieux comprendre la potentielle relaxation du

matériau, et la contribution des pores aux propriétés viscoélastiques de la matrice, seraient d'intérêt. Au niveau des résultats pertinents obtenus dans le cadre de ce projet sur cet aspect, il a été montré que les propriétés physico-chimiques des hydrogels pouvaient être dissociées de la concentration en chitosane, pour la gamme de concentrations étudiées. Il s'agit d'un résultat intéressant, car cela pourrait permettre de moduler indépendamment les propriétés mécaniques (via la concentration en alginate), et l'adhésion des cellules cancéreuses (via la concentration en chitosane).

Concernant les moules polymères, tel que décrit au **Chapitre 6.4 i)**, le processus d'extrusion des moules a montré des lacunes dans la production d'un mélange PS et PLA hautement uniforme, entraînant des difficultés dans la reproductibilité de la morphologie poreuse. Ceci explique les défauts macroscopiques observés pour certains moules, écartés de l'étude, mais explique peut-être aussi l'écart-type important du module de compression moyen des quatre conditions étudiées à la **Figure 5.3**. Au sujet de la caractérisation des pores, le diamètre moyen est calculé comme le rapport entre l'aire et le périmètre interfacial des images analysées. Or, le diamètre de chaque pore devrait être évalué par analyse d'images. D'autre part, les images de MicroCT ont été prises dans le sens de la hauteur du moule cylindrique. Or, le processus d'extrusion cause probablement une élévation dans le sens de la section. Une étude complémentaire en utilisant des images MicroCT montrant l'autre dimension permettrait de mieux visualiser l'orientation des pores dans toutes les directions. La **Figure 7.2** présente un résultat obtenu par Solano⁶ pour des moules fabriqués par notre groupe. L'image MicroCT ayant été prise sur la section, on peut observer cette orientation autour du périmètre du cercle.

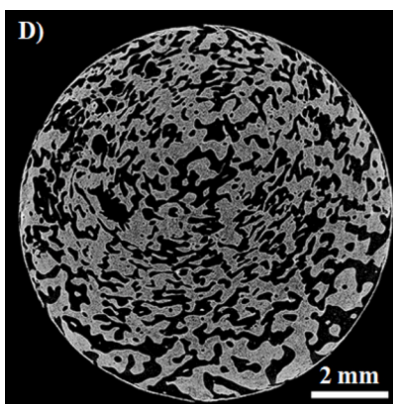


Figure 7.2: Image MicroCT d'un moule de 60 minutes, tel que présenté par Solano⁵⁶. Copyright (2021) Elsevier.

L'image de Solano montre également un autre résultat qui n'est pas observable lorsque les images sont prises sur la dimension latérale : on observe une porosité plus large sur la face extérieure par rapport aux pores situés plus au centre. Cela s'explique probablement par la technique de recuit statique, qui chauffe la tige à partir de la surface latérale externe - la surface atteint donc la température de recuit plus rapidement que le cœur, ce qui crée des gradients de température, et dans la microstructure. Ce gradient de température, et donc de taille de pores, aura probablement un effet plus important lorsque des recuits à des temps plus courts seront réalisés, car la température aura moins de temps pour s'équilibrer en tous points de l'échantillon. Une solution serait de combiner compatibilisation et recuit; selon la quantité de compatibilisant, il serait possible de venir contrôler l'effet du recuit. Ainsi, il serait possible de procéder à des recuits plus longs, afin de s'assurer de l'homogénéité de la température dans tout l'échantillon, car l'effet de coalescence se verrait plafonné par la quantité de compatibilisant ajoutée.

Au sujet de la forme et de la taille des pores, une étude plus poussée sur la question, à différents recuits et en combinant des essais de culture cellulaire, devrait être réalisée. D'autre part, un test en migration cellulaire serait intéressant, car les cellules changent de forme lorsqu'elles se déplacent. Ainsi, il serait intéressant d'établir si des pores avec une certaine orientation permettraient une meilleure colonisation de la matrice.

En somme, ce projet a présenté plusieurs défis expérimentaux, en commençant par la méthode de préparation des hydrogels poreux. Celle-ci a fortement encouragé la poursuite de l'utilisation de calcium. En effet, le calcium permet colmater rapidement les pores de la surface extérieure avec du gel; ceci empêche le reste de la solution de s'écouler hors du moule. Les voies acides ne permettent pas pour l'instant une réticulation rapide. Pourtant, il serait nettement plus intéressant de retirer complètement le calcium de la formulation des gels. En effet, même si l'effet stabilisant du chitosane est optimisé, il y aura toujours un échange d'ions calciums hors de la matrice au profit de d'autres ions et par réaction de chélation. Ainsi, l'environnement vivant immédiat verrait la concentration locale en calcium augmenter, la matrice implantée agissant en quelques sortes comme un réservoir de calcium. De plus, le calcium a un rôle dans la signalisation cellulaire, et pourrait venir déréguler localement le fonctionnement biologique. D'autre part, un surplus de calcium dans l'environnement cellulaire pourrait avoir un impact sur les cellules, qui, par osmose,

pourraient devenir hypertoniques (se vider de leur eau pour réduire la concentration extérieure). Cela est sans même aborder l'effet du phosphate de calcium formé entre le calcium et le phosphate dans la réaction de chélation qui aurait peut-être un impact également. L'effet du corps sur la dégradation de l'implant cause donc, ultimement, un effet de l'implant sur le corps.

D'autre part, plusieurs conditions physiologiques n'ont probablement pas été prises en compte dans l'élaboration de la matrice. En effet, du PBS 1X a initialement été choisi pour représenter le fluide physiologique. Il s'est avéré qu'il s'agissait d'un choix trop agressif par rapport au liquide cérébro-spinal, qui contient largement moins de phosphate. Un résultat inattendu en a cependant émané, alors que l'on sait désormais que le chitosane permet de conserver le gel d'alginate malgré un agent chélateur fort. Pour le projet de la gliotrappe cependant, le fluide choisi pour le test de stabilité mécanique n'intègre probablement pas les contraintes représentatives d'un patient dont le système est sous le choc de l'anesthésie, de la chirurgie et de l'environnement tumoral lui-même. Ce sont ces conditions spécifiques qui doivent servir de guide pour le choix d'une solution contenant des proportions représentatives d'ions, mais également d'enzymes et de cellules immunitaires, qui eux aussi sont susceptibles d'avoir un impact sur l'implant. Tous ces éléments sont essentiels à l'étude de la dégradation de la matrice, conjointement bien sûr à la température physiologique, au pH et l'exposition aux radiations.

Le projet a également subi une contrainte par rapport au temps que nécessitait la fabrication de matrices poreuses. L'extrusion des barreaux de polymères, leur coupe et extraction de la première phase, leur injection et extraction de la deuxième phase, et enfin leur stérilisation et caractérisation, alourdissaient chaque cycle de formulation. Il était alors peu aisé de tenter plusieurs conditions. Des études sur la fabrication de moules pleins (non-poreux) d'alginate-calcium ont été réalisées durant ce projet de maîtrise. Ces résultats sont présentés en **Annexe 6**. Ceci pourrait aiguiller les prochains collaborateurs de ce projet afin de pouvoir tester de nombreuses conditions sur des cycles de quelques jours plutôt que de quelques semaines.

Des tests de fluorescence n'ont malheureusement pas pu être réalisés dans le cadre de ce travail, et auraient pu permettre d'observer la complexation des biopolymères. Tel que démontré par Wang et al.¹²⁹, cette technique pourrait permettre de visualiser l'interaction entre l'alginate et le chitosane.

D'autre part, des études plus approfondies sur la préparation des suspensions de chitosane, afin de minimiser la taille des particules obtenues, pourraient permettre d'améliorer l'interaction entre les chaînes d'alginate et de chitosane dans l'ensemble du volume.

Pour finir, notons que la matrice poreuse a une forme standard cylindrique. Ceci est intéressant pour la production industrielle, car une mise à l'échelle est possible. Par contre, l'adaptation de cette solution à chaque patient et la taille de sa tumeur et cavité chirurgicale s'avéreront un défi.

CHAPITRE 8 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Ce projet de maîtrise a permis d'explorer le système d'alginate et de chitosane par l'étude de différentes voies de gélification et d'interaction entre ces deux polysaccharides. Il a aussi permis de développer un mélange d'alginate et de chitosane qui s'intègre à la méthodologie pré-existante de fabrication de gels poreux par dissolution sélective d'un moule en polymère. Ces hydrogels s'inscrivent dans un projet de développement d'un nouveau traitement du glioblastome multiforme, la *Gliotrappe*, dans lequel un implant microstructuré permettrait l'attraction et l'emprisonnement de cellules cancéreuses logées à proximité de la cavité chirurgicale. Ces cellules seraient ensuite éliminées par radiothérapie stéréotaxique.

Avec ces hydrogels poreux fabriqués, il a été démontré que le chitosane, lorsque mélangé à une concentration de 0,2% dans tout le volume d'alginate, permet de :

- 1) Stabiliser partiellement une matrice macroporeuse d'alginate, gélifiée par ions calcium, lorsque soumise à un environnement ionique fortement chélateur et contenant des ions de substitution;
- 2) Améliorer l'accumulation et la rétention cellulaire tout en limitant la prolifération. La formulation de gel, combinée à la porosité complexe et entièrement interconnectée, permet aux cellules de glioblastome multiforme de la lignée F98 de pénétrer les gels dans leur volume entier, tel que confirmé par microscopie à fluorescence. Si l'ajout d'un peptide – RGD greffé sur l'alginate, et combiné au chitosane, améliore significativement l'adhésion et la rétention des cellules F98 au sein des gels, il favorise également leur prolifération indésirable. De ce fait, le meilleur compromis entre une faible prolifération et un haut niveau d'accumulation et de rétention des cellules F98 a été obtenu avec l'hydrogel formulé avec 1% d'alginate et 0,2% de chitosane, sans le peptide d'adhésion -RGD.

Les Tableaux 8.1 énumèrent des recommandations pour la poursuite du projet gliotrappe, et d'autres plus générales au bénéfice de la science et de la caractérisation des matériaux hydrogels formés à partir d'alginate et de chitosane.

Le projet gliotrappe vise à développer un implant qui servira de piège à cellules cancéreuses de glioblastome, un cancer invasif. Ce concept pourrait s'appliquer à d'autres types de gliomes, et pas uniquement au glioblastome multiforme. Il pourrait être également utilisé pour les cancers du système maxillo-facial. Dans ce dernier cas, les cancers sont très invasifs et attaquent de manière éparses les os et les organes du visage et du cou. Il s'agit de néoplasies souvent récurrentes et capables de produire des métastases¹³⁹. Un implant similaire à la gliotrappe permettrait d'attirer et de détruire des cellules cancéreuses en minimisant le besoin d'effectuer un retrait chirurgical très étendu qui s'avère coûteux à l'apparence et la qualité de vie du patient.

Un implant comme la gliotrappe agit comme la combinaison d'une pompe et d'un filtre; c'est un épurateur sélectif d'impuretés présentes dans les tissus et potentiellement les fluides animaux. Ce principe pourrait donc s'appliquer à d'autres conditions médicales. Sous toutes réserves, un tel implant pourrait être placé dans un rein atteint d'insuffisance, dans un contexte où un patient aurait temporairement besoin d'une épuration en complément de sa dialyse dans l'attente d'une greffe. Il s'agirait donc ici d'une chimiotrappe. D'autre part, les patients atteints de septicémie, une affection très courante et souvent mortelle qui se traduit par l'infection incontrôlable du sang et des organes par une bactérie, un virus ou un champignon¹⁴⁰, pourraient filtrer leur sang dans une biotrappe placée à l'extérieur du corps, un peu sous le même principe qu'une dialyse.

Tableaux 8.1 Recommandations futures pour la continuation du projet gliotrappe (GLTRP) et pour l'avancée générale de la science et la caractérisation des matériaux hydrogels formés à partir d'alginate et de chitosane (SC.MTX)

Fabrication et caractérisation du moule poreux		
A. Préparation	I. Bonifier la méthode d'extrusion afin d'uniformiser le mélange co-continu de polymères immiscibles et éviter la présence de millipores.	GLTRP
	II. Déterminer la taille optimale de pores par rapport aux études cellulaires lorsque celles-ci migrent vers la matrice (et non pas lorsqu'elles y sont déposées).	GLTRP
	III. Utiliser la technique layer by layer afin de créer un moule macroporeux fonctionnalisé avec une couche de chitosane. Le mélange de polymères immiscibles à utiliser pour cela pourrait	GLTRP

	devoir être changé selon l'affinité du PS ou du PLA avec le chitosane.	
B. Caractérisation	I. Développer une méthode numérique de calcul des pores qui permet de calculer le diamètre moyen à partir d'une distribution.	GLTRP
	II. Développer une méthode numérique qui permet de visualiser par code de couleurs la polydispersité sur la section d'un échantillon afin de déterminer si l'effet du recuit est uniforme.	GLTRP

Étude des propriétés mécaniques		
A. Équipement	I. Traiter l'embout du pied de compression par une substance hydrophobe afin d'éviter les effets capillaires qui altèrent l'acquisition de données.	GLTRP
B. Protocole expérimental	I. Étudier la compression en continu jusqu'à écrasement total de l'échantillon. Comparer avec les compressions par plage (stress-relaxation) qui semblent fournir des modules qui ne changent pas progressivement mais par incrément de compression.	GLTRP
	II. Étudier la relaxation du matériau.	GLTRP
	III. Étudier les analyses de cas proposées par le fournisseur <i>Biomomentum</i> pour des applications biomédicales, en particulier reliées au cerveau, afin de prendre pleine avantage de l'équipement utilisé.	GLTRP
	IV. Comparer la méthodologie utilisée à celle des références scientifiques qui fournissent des valeurs de modules de tissus cérébraux.	GLTRP
C. Analyse des résultats	I. Développer un programme logiciel (p.ex. VBA/Excel) afin de faciliter et accélérer l'analyse des résultats.	GLTRP

Étude de stabilité chimique		
A. Protocole expérimental	I. Utiliser une solution ionique dont les compositions sont plus proches de celle du liquide cérébro-spinal chez un patient cancéreux après avoir subi une chirurgie.	GLTRP

	II. Réaliser l'étude en incubant les hydrogels à 37°C pour simuler la température du corps.	GLTRP
B. Analyse des résultats	I. Développer une méthode quantitative pour suivre la dégradation chimique.	GLTRP

Nouvelles études de caractérisation		
A. Étude de stabilité biologique	I. Réaliser une étude similaire à celle de stabilité chimique en ajoutant les composés biologiques.	GLTRP
B. Imagerie à fluorescence	I. Réaliser de l'imagerie confocale à fluorescence sur des gels d'alginate et de chitosane afin d'observer la répartition et l'alignement des chaînes entre-elles. Ceci permettrait de mieux comprendre l'interaction probable entre les deux polysaccharides.	GLTRP

Fabrication du gel poreux		
A. Suspension de chitosane	I. Réduire la taille de particules des suspensions produites en utilisant du NaOH moins concentré et délivré au goutte à goutte tout au long de la sonication, plutôt qu'un plus grand volume à quelques points dans le temps.	GLTRP
	II. Évaluer la taille de particules et leur potentiel de rester en suspension (zeta potential).	GLTRP
B. Réticulation de l'alginate et du chitosane	I. Étudier davantage les méthodes d'acidification par vapeurs acides.	SC.MTX
	II. Étudier davantage les méthodes d'acidification par GDL et pas trempage acide en réduisant la quantité d'ions calcium utilisée.	GLTRP
C. Fonctionnalisation du chitosane	I. Tenter de greffer des peptides d'adhésion sur le chitosane plutôt que sur l'alginate, en particulier si ce chitosane est placé à la surface de la matrice. En effet, c'est la surface qui devrait	GLTRP

	avoir de bonnes propriétés d'adhésion cellulaire, et non pas le volume.	
--	---	--

Méthode de travail		
A. Stérilité du processus de fabrication d'hydrogels poreux	I. Adapter les plans de travail afin d'améliorer la stérilité du processus de fabrication des hydrogels poreux, en particulier durant les étapes de caractérisation.	GLTRP
B. Gels pleins	I. Pousser le développement de la méthode de fabrication de gels pleins réticulé au calcium par bassin versant, tel que présenté en Annexe 6 . Cette méthode permettrait d'accélérer un cycle de fabrication de gel et de tester plus rapidement des formulations et conditions.	SC.MTX

RÉFÉRENCES

- (1) Société canadienne du cancer. Statistiques de Survie Pour Les Tumeurs Au Cerveau et à La Moelle Épinière.
- (2) Singh, P. K.; Singh, V. K.; Tomar, J.; Azam, A.; Gupta, S.; Kumar, S. Spinal Glioblastoma Multiforme: Unusual Cause of Post-Traumatic Tetraparesis. *J. Spinal Cord Med.* **2009**, *32* (5), 583–586.
- (3) Tamimi, A. F.; Juweid, M. Epidemiology and Outcome of Glioblastoma. In *Glioblastoma*; De Vleeschouwer, S., Ed.; Codon Publications: Brisbane (AU), 2017.
- (4) Société canadienne du cancer. *Astrocytome - Société canadienne du cancer*. www.cancer.ca. <https://www.cancer.ca:443/fr-ca/cancer-information/cancer-type/brain-spinal/brain-and-spinal-tumours/astrocytoma/?region=on> (accessed 2021-08-22).
- (5) Gascon, S.; Giraldo Solano, A.; El Kheir, W.; Therriault, H.; Berthelin, P.; Cattier, B.; Marcos, B.; Virgilio, N.; Paquette, B.; Faucheux, N.; Lauzon, M.-A. Characterization and Mathematical Modeling of Alginate/Chitosan-Based Nanoparticles Releasing the Chemokine CXCL12 to Attract Glioblastoma Cells. *Pharmaceutics* **2020**, *12* (4), 356. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12040356>.
- (6) Solano, A. G.; Dupuy, J.; Therriault, H.; Liberelle, B.; Faucheux, N.; Lauzon, M.-A.; Virgilio, N.; Paquette, B. An Alginate-Based Macroporous Hydrogel Matrix to Trap Cancer Cells. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *266*, 118115. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118115>.
- (7) Esquirol, A.-L.; Sarazin, P.; Virgilio, N. Tunable Porous Hydrogels from Cocontinuous Polymer Blends. *Macromolecules* **2014**, *47* (9), 3068–3075. <https://doi.org/10.1021/ma402603b>.
- (8) Esquirol, A.-L. CONTRÔLE DE LA MORPHOLOGIE D'HYDROGELS POREUX À PARTIR DE STRUCTURES POLYMÈRES. 125.
- (9) Matyash, M.; Despang, F.; Ikonomidou, C.; Gelinsky, M. Swelling and Mechanical Properties of Alginate Hydrogels with Respect to Promotion of Neural Growth. *Tissue Eng. Part C Methods* **2014**, *20* (5), 401–411. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2013.0252>.
- (10) Sachan, N.; Pushkar, S.; Jha, A.; Bhattcharya, A. Sodium Alginate: The Wonder Polymer for Controlled Drug Delivery. *J. Pharm. Res.* **2009**, *2* (8), 1191–1199.
- (11) Niculescu, A.-G.; Grumezescu, A. M. Applications of Chitosan-Alginate-Based Nanoparticles—An Up-to-Date Review. *Nanomaterials* **2022**, *12* (2), 186. <https://doi.org/10.3390/nano12020186>.
- (12) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- (13) American Association of Neurological Surgeons. *Glioblastoma Multiforme – Symptoms, Diagnosis and Treatment Options*. <https://www.aans.org/en/Patients/Neurosurgical-Conditions-and-Treatments/Glioblastoma-Multiforme> (accessed 2022-03-20).
- (14) Mitchell, R.; Kumar, V.; Fausto, N.; Abbas, A. K.; Aster, J. C. *Pocket Companion to Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease E-Book*; Elsevier Health Sciences, 2016.
- (15) Jang, S. J.; Gardner, J. M.; Ro, J. Y. Diagnostic Approach and Prognostic Factors of Cancers. *Adv. Anat. Pathol.* **2011**, *18* (2), 165–172. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e31820cb39e>.
- (16) Société canadienne du cancer. *Stadification du cancer*. Société canadienne du cancer. <https://cancer.ca/fr/cancer-information/what-is-cancer/stage-and-grade/staging> (accessed 2021-12-03).
- (17) National Cancer Institute. *Adult Central Nervous System Tumors Treatment (PDQ®)*–

- Health Professional Version - National Cancer Institute.*
<https://www.cancer.gov/types/brain/hp/adult-brain-treatment-pdq> (accessed 2021-12-03).
- (18) Miller, K. D.; Ostrom, Q. T.; Kruchko, C.; Patil, N.; Tihan, T.; Cioffi, G.; Fuchs, H. E.; Waite, K. A.; Jemal, A.; Siegel, R. L.; Barnholtz-Sloan, J. S. Brain and Other Central Nervous System Tumor Statistics, 2021. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71* (5), 381–406. <https://doi.org/10.3322/caac.21693>.
- (19) Sanli, A. M.; Turkoglu, E.; Dolgun, H.; Sekerci, Z. Unusual Manifestations of Primary Glioblastoma Multiforme: A Report of Three Cases. *Surg. Neurol. Int.* **2010**, *1*, 87. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.74146>.
- (20) Sarkaria, J. N.; Hu, L. S.; Parney, I. F.; Pafundi, D. H.; Brinkmann, D. H.; Laack, N. N.; Giannini, C.; Burns, T. C.; Kizilbash, S. H.; Laramy, J. K.; Swanson, K. R.; Kaufmann, T. J.; Brown, P. D.; Agar, N. Y. R.; Galanis, E.; Buckner, J. C.; Elmquist, W. F. Is the Blood-Brain Barrier Really Disrupted in All Glioblastomas? A Critical Assessment of Existing Clinical Data. *Neuro-Oncol.* **2018**, *20* (2), 184–191. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox175>.
- (21) Yong, R. L.; Lonser, R. R. Surgery for Glioblastoma Multiforme: Striking a Balance. *World Neurosurg.* **2011**, *76* (6), 528–530. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2011.06.053>.
- (22) Moore, K.; Kim, L. Primary Brain Tumors: Characteristics, Practical Diagnostic and Treatment Approaches. In *Glioblastoma: Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Current Therapeutic Strategies*; Swapan K. Ray, Ed.; Springer: New York, NY, 2010; pp 43–75. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-0410-2_2.
- (23) Campos, B.; Olsen, L. R.; Urup, T.; Poulsen, H. S. A Comprehensive Profile of Recurrent Glioblastoma. *Oncogene* **2016**, *35* (45), 5819–5825. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.85>.
- (24) Patel, A. P.; Tirosh, I.; Trombetta, J. J.; Shalek, A. K.; Gillespie, S. M.; Wakimoto, H.; Cahill, D. P.; Nahed, B. V.; Curry, W. T.; Martuza, R. L.; Louis, D. N.; Rozenblatt-Rosen, O.; Suvà, M. L.; Regev, A.; Bernstein, B. E. Single-Cell RNA-Seq Highlights Intratumoral Heterogeneity in Primary Glioblastoma. *Science* **2014**, *344* (6190), 1396–1401. <https://doi.org/10.1126/science.1254257>.
- (25) Tringale, K. R.; Pang, J.; Nguyen, Q. T. Image-Guided Surgery in Cancer: A Strategy to Reduce Incidence of Positive Surgical Margins. *WIREs Syst. Biol. Med.* **2018**, *10* (3), e1412. <https://doi.org/10.1002/wsbm.1412>.
- (26) Verhoeven, J.; Bolcaen, J.; meulenaere, valerie; Kersemans, K.; Descamps, B.; Donche, S.; Broecke, C.; Boterberg, T.; Okito Kalala, J.-P.; Deblaere, K.; Vanhove, C.; Vos, F.; Goethals, I. Technical Feasibility of [18F]FET and [18F]FAZA PET Guided Radiotherapy in a F98 Glioblastoma Rat Model. *Radiat. Oncol.* **2019**, *14*. <https://doi.org/10.1186/s13014-019-1290-4>.
- (27) Mayles, P.; Nahum, A.; Rosenwald, J. C. *Handbook of Radiotherapy Physics: Theory and Practice*; CRC Press, 2007.
- (28) D'Alessandris, Q. G.; Biffoni, M.; Martini, M.; Runci, D.; Buccarelli, M.; Cenci, T.; Signore, M.; Stancato, L.; Olivi, A.; De Maria, R.; Larocca, L. M.; Ricci-Vitiani, L.; Pallini, R. The Clinical Value of Patient-Derived Glioblastoma Tumorspheres in Predicting Treatment Response. *Neuro-Oncol.* **2017**, *19* (8), 1097–1108. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now304>.
- (29) Agarwala, S. S.; Kirkwood, J. M. Temozolomide, a Novel Alkylating Agent with Activity in the Central Nervous System, May Improve the Treatment of Advanced Metastatic Melanoma. *The Oncologist* **2000**, *5* (2), 144–151. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-2-144>.
- (30) Ballabh, P.; Braun, A.; Nedergaard, M. The Blood–Brain Barrier: An Overview: Structure, Regulation, and Clinical Implications. *Neurobiol. Dis.* **2004**, *16* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2003.12.016>.
- (31) Corniou, M. L'infranchissable barrière hémato-encéphalique - Québec Science, 2020.

- (32) Nassif, X.; Bourdoulous, S.; Eugène, E.; Couraud, P.-O. How Do Extracellular Pathogens Cross the Blood-Brain Barrier? *Trends Microbiol.* **2002**, *10* (5), 227–232. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(02\)02349-1](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(02)02349-1).
- (33) Société canadienne du cancer. *Chemotherapy for brain and spinal cord tumours*. Canadian Cancer Society. <https://cancer.ca/en/cancer-information/cancer-types/brain-and-spinal-cord/treatment/chemotherapy> (accessed 2021-11-20).
- (34) Basso, J.; Miranda, A.; Nunes, S.; Cova, T.; Sousa, J.; Vitorino, C.; Pais, A. Hydrogel-Based Drug Delivery Nanosystems for the Treatment of Brain Tumors. **2018**, *4*. <https://doi.org/10.3390/gels4030062>.
- (35) Chen, Z.; Hambardzumyan, D. Immune Microenvironment in Glioblastoma Subtypes. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 1004. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01004>.
- (36) Société canadienne du cancer. *Immunothérapie*. Société canadienne du cancer. <https://cancer.ca/fr/treatments/treatment-types/immunotherapy> (accessed 2022-03-20).
- (37) Darmanis, S.; Sloan, S. A.; Croote, D.; Mignardi, M.; Chernikova, S.; Samghababi, P.; Zhang, Y.; Neff, N.; Kowarsky, M.; Caneda, C.; Li, G.; Chang, S. D.; Connolly, I. D.; Li, Y.; Barres, B. A.; Gephart, M. H.; Quake, S. R. Single-Cell RNA-Seq Analysis of Infiltrating Neoplastic Cells at the Migrating Front of Human Glioblastoma. *Cell Rep.* **2017**, *21* (5), 1399–1410. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.030>.
- (38) Spector, R.; Robert Snodgrass, S.; Johanson, C. E. A Balanced View of the Cerebrospinal Fluid Composition and Functions: Focus on Adult Humans. *Exp. Neurol.* **2015**, *273*, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.07.027>.
- (39) BROWN, P. D.; DAVIES, S. L.; SPEAKE, T.; MILLAR, I. D. Molecular Mechanisms of Cerebrospinal Fluid Production. *Neuroscience* **2004**, *129* (4), 957–970. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2004.07.003>.
- (40) Robert A. Weinberg. *The Biology of Cancer*; Garland Science: New York, 2014.
- (41) Heipertz, R.; Eickhoff, K.; Karstens, K. H. Magnesium and Inorganic Phosphate Content in CSF Related to Blood-Brain Barrier Function in Neurological Disease. *J. Neurol. Sci.* **1979**, *40* (2–3), 87–95. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(79\)90194-1](https://doi.org/10.1016/0022-510x(79)90194-1).
- (42) Abhik Ray-Chaudhury. Pathology of Glioblastoma Multiforme. In *Glioblastoma: Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Current Therapeutic Strategies*; Swapan K. Ray, Ed.; Springer: New York, 2010; pp 77–84.
- (43) Rowlands, D.; Sugahara, K.; Kwok, J. C. F. Glycosaminoglycans and Glycomimetics in the Central Nervous System. *Molecules* **2015**, *20* (3), 3527–3548. <https://doi.org/10.3390/molecules20033527>.
- (44) Sigma Aldrich. Glycosaminoglycans and Proteoglycans.
- (45) Casale, J.; Crane, J. S. Biochemistry, Glycosaminoglycans. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2022.
- (46) Sahoo, H.; Schwille, P. Influence of Glycosaminoglycans on Lipid Dynamics in Supported Phospholipid Bilayers. *Soft Matter* **2013**, *9* (14), 3859–3865. <https://doi.org/10.1039/C3SM26906J>.
- (47) Wang, X.; Xu, H.; Huang, Y.; Gu, S.; Jiang, J. X. COUPLING EFFECT OF WATER AND PROTEOGLYCANS ON THE IN SITU TOUGHNESS OF BONE. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* **2016**, *31* (5), 1026–1029. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2774>.
- (48) Madhally, S. V.; Matthew, H. W. T. Porous Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering. *Biomaterials* **1999**, *20* (12), 1133–1142. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(99\)00011-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(99)00011-3).
- (49) Mochizuki, M.; Yamagata, N.; Philp, D.; Hozumi, K.; Watanabe, T.; Kikkawa, Y.; Kadoya, Y.; Kleinman, H. K.; Nomizu, M. Integrin-Dependent Cell Behavior on ECM Peptide-Conjugated

- Chitosan Membranes. *Pept. Sci.* **2007**, *88* (2), 122–130. <https://doi.org/10.1002/bip.20684>.
- (50) Schnell, O.; Krebs, B.; Wagner, E.; Romagna, A.; Beer, A. J.; Grau, S. J.; Thon, N.; Goetz, C.; Kretzschmar, H. A.; Tonn, J.; Goldbrunner, R. H. Expression of Integrin Av β 3 in Gliomas Correlates with Tumor Grade and Is Not Restricted to Tumor Vasculature. *Brain Pathol.* **2008**, *18* (3), 378–386. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2008.00137.x>.
- (51) Zhang, L.-Y.; Guo, Q.; Guan, G.-F.; Cheng, W.; Cheng, P.; Wu, A.-H. Integrin Beta 5 Is a Prognostic Biomarker and Potential Therapeutic Target in Glioblastoma. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 904. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00904>.
- (52) Murphy, A. R.; Laslett, A.; O'Brien, C. M.; Cameron, N. R. Scaffolds for 3D in Vitro Culture of Neural Lineage Cells. *Acta Biomater.* **2017**, *54*, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.02.046>.
- (53) Autier, L.; Clavreul, A.; Cacicedo, M. L.; Franconi, F.; Sindji, L.; Rousseau, A.; Perrot, R.; Montero-Menei, C. N.; Castro, G. R.; Menei, P. A New Glioblastoma Cell Trap for Implantation after Surgical Resection. *Acta Biomater.* **2019**, *84*, 268–279. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.027>.
- (54) Chaicharoenaudomrung, N.; Kunhorm, P.; Promjantuek, W.; Heebkaew, N.; Rujanapun, N.; Noisa, P. Fabrication of 3D Calcium-Alginate Scaffolds for Human Glioblastoma Modeling and Anticancer Drug Response Evaluation. *J. Cell. Physiol.* **2019**, *234* (11), 20085–20097. <https://doi.org/10.1002/jcp.28608>.
- (55) Li, Q.; Lin, H.; Rauch, J.; Deleyrolle, L. P.; Reynolds, B. A.; Viljoen, H. J.; Zhang, C.; Zhang, C.; Gu, L.; Van Wyk, E.; Lei, Y. Scalable Culturing of Primary Human Glioblastoma Tumor-Initiating Cells with a Cell-Friendly Culture System. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 3531. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21927-4>.
- (56) Solano, A. G.; Dupuy, J.; Therriault, H.; Liberelle, B.; Faucheux, N.; Lauzon, M.-A.; Virgilio, N.; Paquette, B. An Alginate-Based Macroporous Hydrogel Matrix to Trap Cancer Cells. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *266*, 118115. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118115>.
- (57) Schmeichel, K. L.; Bissell, M. J. Modeling Tissue-Specific Signaling and Organ Function in Three Dimensions. *J. Cell Sci.* **2003**, *116* (Pt 12), 2377–2388. <https://doi.org/10.1242/jcs.00503>.
- (58) Cha, J.; Kim, P. Biomimetic Strategies for the Glioblastoma Microenvironment. *Front. Mater.* **2017**, *4*.
- (59) *Scaffold Techniques and Designs in Tissue Engineering Functions and Purposes: A Review*. <https://www.hindawi.com/journals/amse/2019/3429527/> (accessed 2022-03-27).
- (60) Loh, Q. L.; Choong, C. Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2013**, *19* (6), 485–502. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0437>.
- (61) Utracki, L. A. History of Commercial Polymer Alloys and Blends (from a Perspective of the Patent Literature). *Polym. Eng. Sci.* **1995**, *35* (1), 2–17. <https://doi.org/10.1002/pen.760350103>.
- (62) Utracki, L. A. Compatibilization of Polymer Blends. *Can. J. Chem. Eng.* **2002**, *80* (6), 1008–1016. <https://doi.org/10.1002/cjce.5450800601>.
- (63) Parameswaranpillai, J.; Thomas, S.; Grohens, Y. Polymer Blends: State of the Art, New Challenges, and Opportunities. In *Characterization of Polymer Blends*; John Wiley & Sons, Ltd, 2014; pp 1–6. <https://doi.org/10.1002/9783527645602.ch01>.
- (64) Lee, J.; Yao, S.; Li, G.; Jun, M.; Lee, P. Measurement Methods for Solubility and Diffusivity of Gases and Supercritical Fluids in Polymers and Its Applications. *Polym. Rev.* **2017**, *57*. <https://doi.org/10.1080/15583724.2017.1329209>.
- (65) Esquirol, A.-L. Contrôle de la morphologie d'hydrogels poreux à partir de structures polymères. masters, École Polytechnique de Montréal, 2013.

- (66) Gancheva, T. P. Synthèse et caractérisation d'hydrogels macroporeux contenant des nanoparticules pour des procédés catalytiques hétérogènes en écoulement continu. phd, École Polytechnique de Montréal, 2018.
- (67) Ghavidel Mehr, N.; Hoemann, C. D.; Favis, B. D. Chitosan Surface Modification of Fully Interconnected 3D Porous Poly(ϵ -Caprolactone) by the LbL Approach. *Polymer* **2015**, *64*, 112–121. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2015.03.025>.
- (68) Roy, X.; Sarazin, P.; Favis, B. D. Ultraporous Nanosheath Materials by Layer-by-Layer Deposition onto Co-Continuous Polymer-Blend Templates. *Adv. Mater.* **2006**, *18* (8), 1015–1019. <https://doi.org/10.1002/adma.200501210>.
- (69) Wang, J.; Lessard, B. H.; Maric, M.; Favis, B. D. Hierarchically Porous Polymeric Materials from Ternary Polymer Blends. *Polymer* **2014**, *55* (16), 3461–3467. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2014.06.042>.
- (70) Favis, B. D.; Chalifoux, J. P. Influence of Composition on the Morphology of Polypropylene/Polycarbonate Blends. *Polymer* **1988**, *29* (10), 1761–1767. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(88\)90388-6](https://doi.org/10.1016/0032-3861(88)90388-6).
- (71) Ravati, S.; Favis, B. D. *Morphological states for a ternary polymer blend demonstrating complete wetting* | Elsevier Enhanced Reader. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0032386110006154?token=B737CBDB1C053B105933690AD49182CD537527367D91BA3E4185A5D928968DF4654BC285BF8F14C187B1B0D6EEF201B2&originRegion=us-east-1&originCreation=20220327164505> (accessed 2022-03-27). <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.07.014>.
- (72) Li, J.; Ma, P. L.; Favis, B. D. The Role of the Blend Interface Type on Morphology in Cocontinuous Polymer Blends. *Macromolecules* **2002**, *35* (6), 2005–2016. <https://doi.org/10.1021/ma010104+>.
- (73) Sarazin, P.; Favis, B. D. Morphology Control in Co-Continuous Poly(l-Lactide)/Polystyrene Blends: A Route towards Highly Structured and Interconnected Porosity in Poly(l-Lactide) Materials. *Biomacromolecules* **2003**, *4* (6), 1669–1679. <https://doi.org/10.1021/bm030034+>.
- (74) Encyclopædia Britannica. *Section of a Screw Extruder of Thermoplastic Polymers*; 1997.
- (75) Galloway, J. A.; Jeon, H. K.; Bell, J. R.; Macosko, C. W. Block Copolymer Compatibilization of Cocontinuous Polymer Blends. *Polymer* **2005**, *46* (1), 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.10.061>.
- (76) Yuan, Z.; Favis, B. D. Coarsening of Immiscible Co-Continuous Blends during Quiescent Annealing. *AIChE J.* **2005**, *51* (1), 271–280. <https://doi.org/10.1002/aic.10281>.
- (77) Marin, N.; Favis, B. Co-Continuous Morphology Development in Partially Miscible PMMA/PC Blends. *Polymer* **2002**, *43*, 4723–4731. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00280-X](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00280-X).
- (78) Sarazin, P.; Roy, X.; Favis, B. D. Controlled Preparation and Properties of Porous Poly(l-Lactide) Obtained from a Co-Continuous Blend of Two Biodegradable Polymers. *Biomaterials* **2004**, *25* (28), 5965–5978. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.065>.
- (79) 2.2.1 Monomers, Chain Length, Length Distribution - Knovel. https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpCACVMCA3/cid:kt009WZQ41/viewerType:khtml//root_slug:comprehensive-analytical/url_slug:polymer-definitions?b-q=polymer%20definition&include_synonyms=no&sort_on=default&page=3&view=collapsed&zoom=1&q=polymer%20definition (accessed 2022-03-29).
- (80) Pal, K.; Banerjee, I.; Sarkar, P.; Kim, D.; Deng, W.-P.; Dubey, N. K.; Majumder, K. I. *Introduction of Biopolymers: Food and Biomedical Applications* - Knovel.

- https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpBBFBFA01/cid:kt012LNPL1/viewerType:khtml//root_slug:1-introduction-of-biopolymers-food-and-biomedical-applications/url_slug:introduction-biopolymers?b-q=biopolymer%20biomedical&b-toc-cid=kpBBFBFA01&b-toc-title=Biopolymer-Based%20Formulations%20%20Biomedical%20and%20Food%20Applications&b-toc-url-slug=introduction-biopolymers&include_synonyms=no&view=collapsed&zoom=1&page=2 (accessed 2022-03-20).
- (81) Nagarajan, S.; Radhakrishnan, S.; Kalkura, S. N.; Balme, S.; Miele, P.; Bechelany, M. *Overview of Protein-Based Biopolymers for Biomedical Application - Nagarajan - 2019 - Macromolecular Chemistry and Physics - Wiley Online Library*. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/macp.201900126> (accessed 2022-03-29).
- (82) Grumezescu, A. M. *Food Packaging - Nanotechnology in the Agri-Food Industry, Volume 7 - 19.9.4 Application*. https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpFPNAFIV2/cid:kt00CRUDD2/viewerType:khtml//root_slug:food-packaging-nanotechnology/url_slug:pectin-molecular-structure?b-q=pectin%20molecular%20structure&include_synonyms=no&sort_on=default&page=41&view=collapsed&zoom=1&q=pectin%20molecular%20structure (accessed 2022-03-20).
- (83) *nucléotide* - *LAROUSSE*. <https://www.larousse.fr/encyclopedie/medical/nucl%3%A9otide/14848> (accessed 2022-03-29).
- (84) Sudhakar, Y.; Selvakumar, N.; Bhat, M.; D Krishna. *1.2 Polymer Electrolytes - Knovel*. https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpBEFAES03/cid:kt011PFES1/viewerType:khtml//root_slug:1-an-introduction-of-biopolymer-electrolytes/url_slug:an-introduction-biopolymer?b-q=polyelectrolyte&b-toc-cid=kpBEFAES03&b-toc-title=Biopolymer%20Electrolytes%20%20Fundamentals%20and%20Applications%20in%20Energy%20Storage&b-toc-url-slug=an-introduction-biopolymer&include_synonyms=no&page=8&view=collapsed&zoom=1&q=electroly (accessed 2022-03-29).
- (85) *Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications | Elsevier Enhanced Reader*. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0142961212000117?token=725F849642D4B8752F43FBA51BB394C56FA836E32335CBFFF8A7674E80514CC6A481718CFC437B4760223134B19C96D0&originRegion=us-east-1&originCreation=20220326205111> (accessed 2022-03-26). <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.007>.
- (86) Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Gurny, R. Structure and Interactions in Chitosan Hydrogels Formed by Complexation or Aggregation for Biomedical Applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm. Off. J. Arbeitsgemeinschaft Pharm. Verfahrenstechnik EV* **2004**, 57 (1), 35–52. [https://doi.org/10.1016/s0939-6411\(03\)00160-7](https://doi.org/10.1016/s0939-6411(03)00160-7).
- (87) Lo, Y. M.; Argin-Soysal, S.; Hsu, C.-H. *Bioconversion of Whey Lactose into Microbial Exopolysaccharides* - *ScienceDirect*. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780444521149500232> (accessed 2022-03-28).
- (88) Díaz-Montes, E. Dextran: Sources, Structures, and Properties. *Polysaccharides* **2021**, 2 (3), 554–565. <https://doi.org/10.3390/polysaccharides2030033>.
- (89) *4.8.3.1 Chemical Composition and Structure - Knovel*. https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpBFDHFBV1/cid:kt011PRDO2/viewerType:khtml//root_slug:biopolymers-food-design/url_slug:pullulan-chemical-composition?b-q=pullulan%20chemical%20structure&include_synonyms=no&sort_on=default&page=15&view

=collapsed&zoom=1&q=pullulan%20chemical%20structure (accessed 2022-03-28).

- (90) 13.4.2 *Hyaluronic Acid* - *Knovel*.
https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpNEST0002/cid:kt010V5X84/viewerType:khtml/root_slug:nutraceuticals-efficacy/url_slug:hyaluronic-acid?q=hyaluronic%20acid%20chemical%20structure&include_synonyms=no&sort_on=default&page=7&view=collapsed&zoom=1&q=hyaluronic%20acid%20chemical%20structure (accessed 2022-03-28).
- (91) Cai, W.; Gupta, R. B.; Staff, U. by. Hydrogels. In *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*; John Wiley & Sons, Ltd, 2012; pp 1–20.
<https://doi.org/10.1002/0471238961.0825041807211620.a01.pub2>.
- (92) Buwalda, S. J.; Boere, K. W. M.; Dijkstra, P. J.; Feijen, J.; Vermonden, T.; Hennink, W. E. Hydrogels in a Historical Perspective: From Simple Networks to Smart Materials. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2014**, *190*, 254–273.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.03.052>.
- (93) Aurand, E. R.; Wagner, J.; Lanning, C.; Bjugstad, K. B. Building Biocompatible Hydrogels for Tissue Engineering of the Brain and Spinal Cord. *J. Funct. Biomater.* **2012**, *3* (4), 839–863.
<https://doi.org/10.3390/jfb3040839>.
- (94) Mohan, T.; Kleinschek, K. S.; Kargl, R. *Polysaccharide peptide conjugates: Chemistry, properties and applications* - *ScienceDirect*.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861721012625> (accessed 2022-03-30).
- (95) Chu-hsi, H.; Jui-lien, H.; Rong-huei, C. Wastewater Treatment with Chitosan. *undefined* **2008**.
- (96) Elieh-Ali-Komi, D.; Hamblin, M. R. Chitin and Chitosan: Production and Application of Versatile Biomedical Nanomaterials. *Int. J. Adv. Res.* **2016**, *4* (3), 411–427.
- (97) Chuang, J.-J.; Huang, Y.-Y.; Lo, S.-H.; Hsu, T.-F.; Huang, W.-Y.; Huang, S.-L.; Lin, Y.-S. *Effects of pH on the Shape of Alginate Particles and Its Release Behavior*.
<https://www.hindawi.com/journals/ijps/2017/3902704/> (accessed 2022-03-31).
- (98) Nilsen-Nygaard, J.; Strand, S. P.; Vårum, K. M.; Draget, K. I.; Nordgård, C. T. Chitosan: Gels and Interfacial Properties. *Polymers* **2015**, *7* (3), 552–579.
<https://doi.org/10.3390/polym7030552>.
- (99) Mohammed, M. A.; Syeda, J. T. M.; Wasan, K. M.; Wasan, E. K. An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. *Pharmaceutics* **2017**, *9* (4), 53. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9040053>.
- (100) Wang, L.; Shansky, J.; Borselli, C.; Mooney, D.; Vandenburgh, H. Design and Fabrication of a Biodegradable, Covalently Crosslinked Shape-Memory Alginate Scaffold for Cell and Growth Factor Delivery. *Tissue Eng. Part A* **2012**, *18* (19–20), 2000–2007.
<https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0663>.
- (101) Sagis, L. M. C. *Microencapsulation and Microspheres for Food Applications - 3.3 Macroscopic Alginate Hydrogels*.
<https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00URWE81/microencapsulation-microspheres/ionic-alginate-gels> (accessed 2021-12-27).
- (102) Kievit, F. M.; Floreczyk, S. J.; Leung, M. C.; Veisoh, O.; Park, J. O.; Disis, M. L.; Zhang, M. Chitosan-Alginate 3D Scaffolds as a Mimic of the Glioma Tumor Microenvironment. *Biomaterials* **2010**, *31* (22), 5903–5910. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.03.062>.
- (103) Gurikov, P.; Smirnova, I. Non-Conventional Methods for Gelation of Alginate. *Gels* **2018**, *4* (1), 14. <https://doi.org/10.3390/gels4010014>.
- (104) Li, Y.; Sun, S.; Gao, P.; Zhang, M.; Fan, C.; Lu, Q.; Li, C.; Chen, C.; Lin, B.; Jiang, Y. A

- Tough Chitosan-Alginate Porous Hydrogel Prepared by Simple Foaming Method. *J. Solid State Chem.* **2021**, *294*, 121797. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2020.121797>.
- (105) Bagre, A. P.; Jain, K.; Jain, N. K. Alginate Coated Chitosan Core Shell Nanoparticles for Oral Delivery of Enoxaparin: In Vitro and in Vivo Assessment. *Int. J. Pharm.* **2013**, *456* (1), 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.08.037>.
- (106) Hyland, L. L.; Taraban, M. B.; Hammouda, B.; Bruce Yu, Y. Mutually Reinforced Multicomponent Polysaccharide Networks. *Biopolymers* **2011**, *95* (12), 840–851. <https://doi.org/10.1002/bip.21687>.
- (107) Kopplin, G.; Lervik, A.; I. Draget, K.; L. Aachmann, F. Alginate Gels Crosslinked with Chitosan Oligomers – a Systematic Investigation into Alginate Block Structure and Chitosan Oligomer Interaction. *RSC Adv.* **2021**, *11* (23), 13780–13798. <https://doi.org/10.1039/D1RA01003D>.
- (108) Baysal, K.; Aroguz, A. Z.; Adiguzel, Z.; Baysal, B. M. Chitosan/Alginate Crosslinked Hydrogels: Preparation, Characterization and Application for Cell Growth Purposes. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *59*, 342–348. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.073>.
- (109) Sasmita, A. O.; Wong, Y. P.; Ling, A. P. K. Biomarkers and Therapeutic Advances in Glioblastoma Multiforme. *Asia Pac. J. Clin. Oncol.* **2018**, *14* (1), 40–51. <https://doi.org/10.1111/ajco.12756>.
- (110) Vasile, F.; Dossi, E.; Rouach, N. Human Astrocytes: Structure and Functions in the Healthy Brain. *Brain Struct. Funct.* **2017**, *222* (5), 2017–2029. <https://doi.org/10.1007/s00429-017-1383-5>.
- (111) Blackburn, D.; Sargsyan, S.; Monk, P. N.; Shaw, P. J. Astrocyte Function and Role in Motor Neuron Disease: A Future Therapeutic Target? *Glia* **2009**, *57* (12), 1251–1264. <https://doi.org/10.1002/glia.20848>.
- (112) Société canadienne du cancer. *Statistiques de survie pour les tumeurs au cerveau et à la moelle épinière*. Société canadienne du cancer. <https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/brain-and-spinal-cord/prognosis-and-survival/survival-statistics> (accessed 2021-11-20).
- (113) Ashby, L. S.; Smith, K. A.; Stea, B. Gliadel Wafer Implantation Combined with Standard Radiotherapy and Concurrent Followed by Adjuvant Temozolomide for Treatment of Newly Diagnosed High-Grade Glioma: A Systematic Literature Review. *World J. Surg. Oncol.* **2016**, *14* (1), 225. <https://doi.org/10.1186/s12957-016-0975-5>.
- (114) Rinaudo, M. Main Properties and Current Applications of Some Polysaccharides as Biomaterials. *Polym. Int.* **2008**, *57* (3), 397–430. <https://doi.org/10.1002/pi.2378>.
- (115) Taqieddin, E.; Amiji, M. Enzyme Immobilization in Novel Alginate–Chitosan Core-Shell Microcapsules. *Biomaterials* **2004**, *25* (10), 1937–1945. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.08.034>.
- (116) Gür, S. D.; İdil, N.; Aksöz, N. Optimization of Enzyme Co-Immobilization with Sodium Alginate and Glutaraldehyde-Activated Chitosan Beads. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2018**, *184* (2), 538–552. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2566-5>.
- (117) Hariyadi, D. M.; Islam, N. Current Status of Alginate in Drug Delivery. *Adv. Pharmacol. Pharm. Sci.* **2020**, *2020*, 8886095. <https://doi.org/10.1155/2020/8886095>.
- (118) He, L.; Shang, Z.; Liu, H.; Yuan, Z. Alginate-Based Platforms for Cancer-Targeted Drug Delivery. *BioMed Res. Int.* **2020**, *2020*, 1487259. <https://doi.org/10.1155/2020/1487259>.
- (119) Xu, M.; Qin, M.; Cheng, Y.; Niu, X.; Kong, J.; Zhang, X.; Huang, D.; Wang, H. Alginate Microgels as Delivery Vehicles for Cell-Based Therapies in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Carbohydr. Polym.* **2021**, *266*, 118128. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118128>.
- (120) Bhujbal, S. V.; de Vos, P.; Niclou, S. P. Drug and Cell Encapsulation: Alternative Delivery

- Options for the Treatment of Malignant Brain Tumors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *67–68*, 142–153. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.01.010>.
- (121) Sahoo, D. R.; Biswal, T. Alginate and Its Application to Tissue Engineering. *SN Appl. Sci.* **2021**, *3* (1), 30. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-04096-w>.
- (122) Peniche, C.; Argüelles-Monal, W. Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes. *Macromol. Symp.* **2001**, *168* (1), 103–116. [https://doi.org/10.1002/1521-3900\(200103\)168:1<103::AID-MASY103>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1521-3900(200103)168:1<103::AID-MASY103>3.0.CO;2-K).
- (123) Becherán-Marón, L.; Peniche, C.; Argüelles-Monal, W. Study of the Interpolyelectrolyte Reaction between Chitosan and Alginate: Influence of Alginate Composition and Chitosan Molecular Weight. *Int. J. Biol. Macromol.* **2004**, *34* (1), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2004.03.010>.
- (124) Lee, S. J.; Seok, J. M.; Lee, J. H.; Lee, J.; Kim, W. D.; Park, S. A. Three-Dimensional Printable Hydrogel Using a Hyaluronic Acid/Sodium Alginate Bio-Ink. *Polymers* **2021**, *13* (5), 794. <https://doi.org/10.3390/polym13050794>.
- (125) Ménard, M.; Dusseault, J.; Langlois, G.; Baille, W. E.; K. Tam, S.; Yahia, L.; Zhu, X. X.; Hallé, J.-P. Role of Protein Contaminants in the Immunogenicity of Alginates. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2010**, *93B* (2), 333–340. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31570>.
- (126) López-Barrón, C. R.; Macosko, C. W. A New Model for the Coarsening of Cocontinuous Morphologies. *Soft Matter* **2010**, *6* (12), 2637–2647. <https://doi.org/10.1039/B926191E>.
- (127) Galloway, J. A.; Montminy, M. D.; Macosko, C. W. Image Analysis for Interfacial Area and Cocontinuity Detection in Polymer Blends. *Polymer* **2002**, *43* (17), 4715–4722. [https://doi.org/10.1016/S0032-3861\(02\)00282-3](https://doi.org/10.1016/S0032-3861(02)00282-3).
- (128) Spector, R.; Robert Snodgrass, S.; Johanson, C. E. A Balanced View of the Cerebrospinal Fluid Composition and Functions: Focus on Adult Humans. *Exp. Neurol.* **2015**, *273*, 57–68. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.07.027>.
- (129) Wang, C.-S.; Virgilio, N.; Wood-Adams, P. M.; Heuzey, M.-C. Protein/Polysaccharide-Based Hydrogels Prepared by Vapor-Induced Phase Separation. *Macromol. Chem. Phys.* **2018**, *219* (7), 1700504. <https://doi.org/10.1002/macp.201700504>.
- (130) Simsek-Ege, F. A.; Bond, G. M.; Stringer, J. Polyelectrolyte Complex Formation between Alginate and Chitosan as a Function of PH. *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, *88* (2), 346–351. <https://doi.org/10.1002/app.11989>.
- (131) Girard, M.; Vidal, D.; Bertrand, F.; Tavares, J. R.; Heuzey, M.-C. Evidence-Based Guidelines for the Ultrasonic Dispersion of Cellulose Nanocrystals. *Ultrason. Sonochem.* **2021**, *71*, 105378. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2020.105378>.
- (132) Budday, S.; Nay, R.; de Rooij, R.; Steinmann, P.; Wyrobek, T.; Ovaert, T. C.; Kuhl, E. Mechanical Properties of Gray and White Matter Brain Tissue by Indentation. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2015**, *46*, 318–330. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2015.02.024>.
- (133) Wang, C.-S.; Virgilio, N.; Carreau, P. J.; Heuzey, M.-C. Understanding the Effect of Conformational Rigidity on Rheological Behavior and Formation of Polysaccharide-Based Hybrid Hydrogels. *Biomacromolecules* **2021**, *22* (9), 4016–4026. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00803>.
- (134) Erickson, A. E.; Lan Levengood, S. K.; Sun, J.; Chang, F.-C.; Zhang, M. Fabrication and Characterization of Chitosan-Hyaluronic Acid Scaffolds with Varying Stiffness for Glioblastoma Cell Culture. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7* (15), e1800295. <https://doi.org/10.1002/adhm.201800295>.
- (135) Baei, P.; Daemi, H.; Mostafaei, F.; Azam Sayahpour, F.; Baharvand, H.; Baghaban Eslaminejad, M. A Tough Polysaccharide-Based Cell-Laden Double-Network Hydrogel Promotes

- Articular Cartilage Tissue Regeneration in Rabbits. *Chem. Eng. J.* **2021**, *418*, 129277. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2021.129277>.
- (136) Eslahi, M.; Dana, P. M.; Asemi, Z.; Hallajzadeh, J.; Mansournia, M. A.; Yousefi, B. The Effects of Chitosan-Based Materials on Glioma: Recent Advances in Its Applications for Diagnosis and Treatment. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *168*, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.180>.
- (137) Gibot, L.; Chabaud, S.; Bouhout, S.; Bolduc, S.; Auger, F. A.; Moulin, V. J. Anticancer Properties of Chitosan on Human Melanoma Are Cell Line Dependent. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *72*, 370–379. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.033>.
- (138) Salehi, F.; Behboudi, H.; Kavooosi, G.; K. Ardestani, S. Chitosan Promotes ROS-Mediated Apoptosis and S Phase Cell Cycle Arrest in Triple-Negative Breast Cancer Cells: Evidence for Intercalative Interaction with Genomic DNA. *RSC Adv.* **2017**, *7* (68), 43141–43150. <https://doi.org/10.1039/C7RA06793C>.
- (139) Tan, B.; Tang, Q.; Zhong, Y.; Wei, Y.; He, L.; Wu, Y.; Wu, J.; Liao, J. Biomaterial-Based Strategies for Maxillofacial Tumour Therapy and Bone Defect Regeneration. *Int. J. Oral Sci.* **2021**, *13* (1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41368-021-00113-9>.
- (140) Gyawali, B.; Ramakrishna, K.; Dhamoon, A. S. Sepsis: The Evolution in Definition, Pathophysiology, and Management. *SAGE Open Med.* **2019**, *7*, 2050312119835043. <https://doi.org/10.1177/2050312119835043>.
- (141) Seker-Polat, F.; Pinarbasi Degirmenci, N.; Solaroglu, I.; Bagci-Onder, T. Tumor Cell Infiltration into the Brain in Glioblastoma: From Mechanisms to Clinical Perspectives. *Cancers* **2022**, *14* (2), 443. <https://doi.org/10.3390/cancers14020443>.
- (142) Société canadienne du cancer. *Statistiques de survie pour les tumeurs au cerveau et à la moelle épinière*. www.cancer.ca. <https://www.cancer.ca:443/fr-ca/cancer-information/cancer-type/brain-spinal/prognosis-and-survival/survival-statistics/?region=nl> (accessed 2021-08-22).
- (143) Paul, D. R.; Newman, S. *Polymer blends*; Academic Press: New York, 1978.

ANNEXES

Annexe 1. Mécanisme de formation des métastases

Une tumeur primaire, lorsqu'agressive ou quand elle se sent menacée, peut envoyer une partie de ses unités cellulaires vers une paroi sanguine ou lymphatique. Ces-dernières peuvent la dégrader et y pénétrer (intravasation), y voyager, puis en sortir (extravasation) pour former une colonie dans un tissu ou un organe complètement distinct.

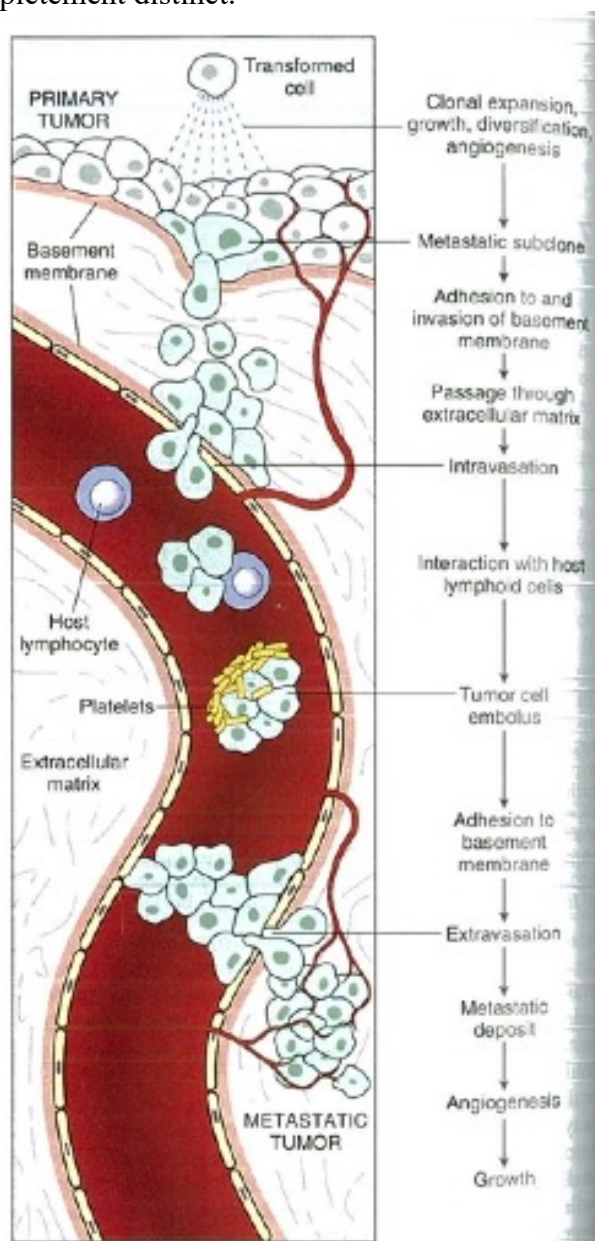


Figure A.1: Étapes de formation de métastases à partir d'une tumeur primaire. Tiré de Mitchell et al. (2016) ¹⁴.

Annexe 2. Morphologie infiltrante du glioblastome multiforme

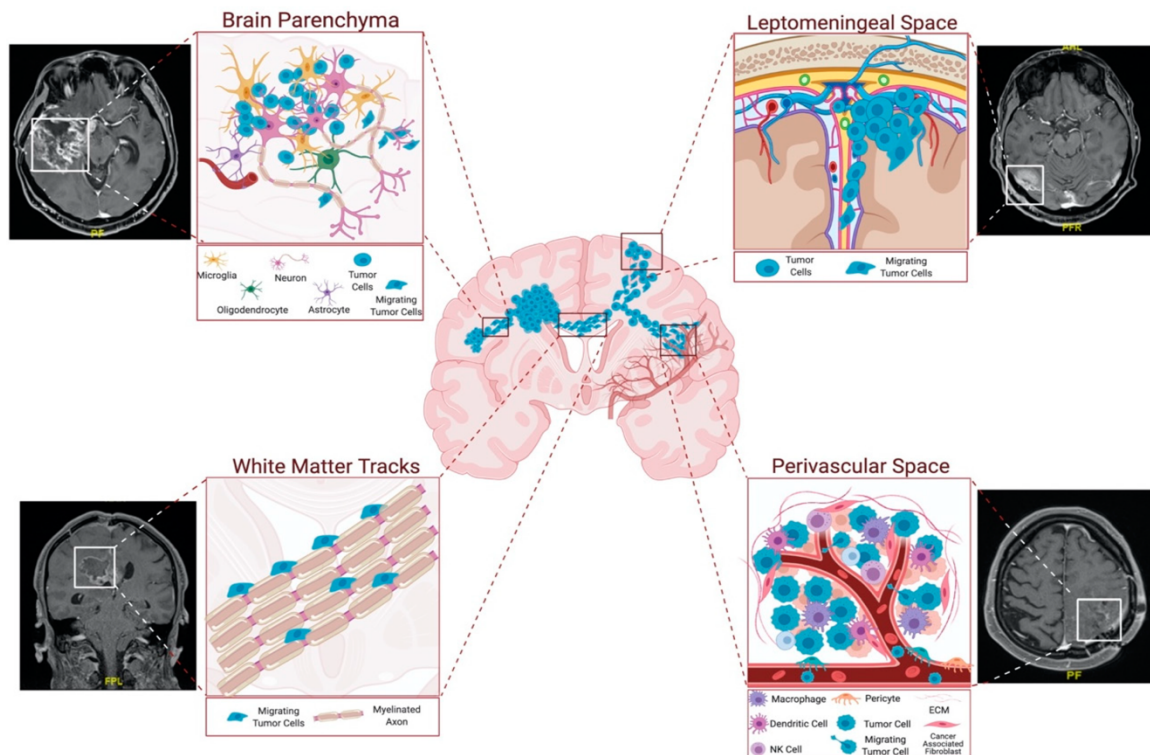


Figure A.2: Représentation des différentes voies de migration des cellules du glioblastome multiforme durant leur invasion. Tiré de Seker-Polat et al. (2022) ¹⁴¹. Copyright (2022) MDPI.

Annexe 3. Classification des astrocytomes selon leur grade

Tableau A.0.1 : Grades, caractéristiques et taux de survie (données entre 1973 et 2004) des astrocytomes. Tableau reproduit à partir de ¹⁴² et ²². Copyright (2010) Springer Nature.

Type de tumeur	Grade OMS	Caractéristiques histologiques	Survie relative après 5 ans selon l'âge (en ans)		Survie médiane
Astrocytome pilocytique	I	Microkystes	Supérieure à 90%		-
Astrocytome diffus	II	Augmentation légère du nombre de cellules ou de leur caractère atypique	20 à 44	57%	5 à 7 ans
			45 à 54	37%	
			55 à 64	10%	
Astrocytome anaplasique	III	Augmentation significative du nombre de cellules et de leur caractère atypique	20 à 44	48%	2 à 3 ans
			45 à 54	25%	
			55 à 64	5%	
Glioblastome multiforme	IV	Nécrose, prolifération endothéliale (angiogénèse)	20 à 44	14%	12 à 14 mois
			45 à 54	4%	
			55 à 64	1%	

Annexe 4. Conditions thermodynamiques nécessaires pour obtenir un mélange de polymères miscibles

La première condition, décrite auparavant, se résume telle que l'énergie de Gibbs de mélange doit être négative ($\Delta G_m < 0$). Ceci est possible d'une part lorsque l'enthalpie de mélange (ΔH_m) est minimale, et que l'on tend vers des systèmes exothermiques, c'est-à-dire qui dégagent de l'énergie lors du mélange. Cela se produit lorsque les interactions chimiques spécifiques, qui rapprochent les chaînes polymères entre-elles et relâchent de l'énergie, telles que dipôle-dipôle, ionique et ponts hydrogène, sont dominantes par rapport aux interactions dispersives qui en absorbent ⁶³. D'autre part, le terme d'entropie se doit d'être maximal; cette notion est abordée plus haut dans le texte.

La deuxième condition veut que la fonction de l'énergie de Gibbs (ΔG_m) en fonction de ϕ_i , la composition de l'un des éléments, ait un minimum $\left(\frac{\delta^2(\Delta G_m)}{\delta \phi_i^2}\right)_{T,P} > 0$ ⁶³. Celle-ci prend son sens en observant la figure suivante :

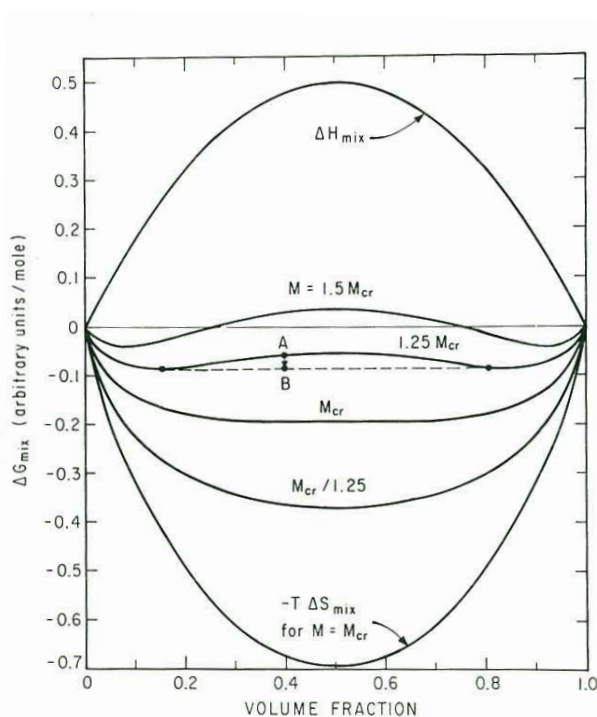


Figure A.3: Énergie libre de mélange de Gibbs en fonction de la concentration d'un composant d'un mélange binaire de polymères ayant le même poids moléculaire M . Tiré de Paul et Newman (1978) ¹⁴³.

La **Figure A.3** modélise une fonction simplifiée (**Équation A.7**) de l'équation de Flory-Huggins (**Équation A.6**) Celle-ci adapte la formule d'énergie libre de mélange de Gibbs (**Équation 3.1**) aux solutions de polymères. Elle introduit notamment un paramètre d'interaction (χ_{AB}) qui prend en compte la réduction d'entropie par rapport au poids moléculaire.

$$\Delta G_m = RTV \left\{ \frac{\varphi_A \ln \varphi_A}{V_A} + \frac{(1 - \varphi_A) \ln(1 - \varphi_A)}{V_B} + \chi_{AB} \varphi_A (1 - \varphi_A) \right\}$$

Équation A.6: Théorie des solutions de Flory-Huggins. Tiré de Paul et Newman (1978) ¹⁴³.

$$\Delta G_m = \frac{\rho RTV}{M_{cr}} \left\{ \frac{M_{cr}}{M} (\varphi_A \ln \varphi_A + (1 - \varphi_A) \ln(1 - \varphi_A)) + 2\varphi_A (1 - \varphi_A) \right\}$$

Équation A.7: Simplification de la loi de Flory-Huggins. Tiré de Paul et Newman (1978) ¹⁴³.

Où M_{cr} est le poids moléculaire critique pour lequel une miscibilité est possible pour certaines compositions, R la constante des gaz parfaits, T la température, V le volume molaire et ρ la masse volumique. Les simplifications de l'**Équation A.7** sont 1) $M = M_A = M_B$ est le poids moléculaire, 2) $\rho = \rho_A = \rho_B$ et 3) $\chi_{AB} = \frac{2\rho}{M_{cr}}$ ¹⁴³.

Annexe 5. Essais et valeurs obtenues pour les propriétés mécaniques des tissus cérébraux

Tableau A.0.2 : Essais et valeurs obtenues pour les propriétés mécaniques des tissus cérébraux.
Tiré de Aurand et al. (2012)⁹³. Copyright (2012) MDPI.

Test Method	Measured Property	ASTM Standards	Measured CNS data	Refs.
Magnetic Resonance Elastography	Shear Modulus	N/A	HUMAN: Grey 5.22 kPa; White 13.6 kPa @ 100 Hz	[191]
	Shear Storage/ Loss Modulus		HUMAN: G' (Storage) = 1.13 kPa; G'' (Loss) = 0.935 kPa @100 Hz	[192]
	Shear Modulus		HUMAN: 3.5 kPa @ 83.33 Hz G'(Storage) Grey matter = 3.1 kPa G'(Storage) White matter = 2.7 kPa @200 Hz	[193,194]
Dynamic Testing	Shear Storage/ Loss Modulus	D4065	PRIMATE: G' = 0.6–1.1 kPa; G'' = 0.35–0.6 kPa @ 9–10 Hz	[194]
	Dynamic Elastic Modulus		HUMAN : E' = 67 kPa; E'' = 26 kPa; E* = 72 kPa @ 34 Hz PRIMATE : E' = 91 kPa; E'' = 54 kPa; E* = 105 kPa @ 31 Hz	[195]
	Dynamic Storage/ Loss Modulus		HUMAN: Storage: 0.39 kPa, 0.47 kPa, 0.65 kPa Loss: 0.075 kPa, 0.094 kPa, 0.190 kPa @ 0.1, 1 and 10 Hz respectively	[196]
Compression Testing	Elastic Modulus	D1621, D695, D575	PORCINE 5.7 kPa @ 1 s ⁻¹ ; 11.9 kPa @ 10 s ⁻¹ ; 23.8 kPa @ 50 s ⁻¹	[197]
	Shear Modulus Mooney Rivlin Material Model		BOVINE : 2.26 kPa (Equation constants for Mooney-Rivlin Model)	[198]
	Elastic Modulus		PORCINE: 38.5 kPa	[199]
Tensile Testing	Elastic Modulus	D1708	PORCINE: 4.2 kPa @ .9 s ⁻¹ ; 4.0 kPa @ 4.3 s ⁻¹ ; 18.6 kPa @ 25 s ⁻¹	[197]

Test Method	Measured Property	ASTM Standards	Measured CNS data	Refs.
Pressure/Volume Testing	Elastic Modulus	N/A	PRIMATE (<i>in vivo</i>): 10.0–3.50 kpa	[200]
Relaxation Testing	Relaxation Modulus	D6048	HUMAN: 6.6 kPa @ 34 Hz PRIMATE: 10.3 kPa @ 31 Hz	[196]
Indentation Testing	Shear Modulus	E2546	PORCINE: Grey Matter 0.74 kPa; White Matter 1.03 kPa @ 0.1 mm/s	[201]*
	Elastic/Shear Modulus		RAT: 13–17 day old: 3.34 kPa; 43–90 day old: 1.72 kPa	[202]*
	Shear modulus and Relaxtion functions		PORCINE: Short Term: <i>In vivo</i> 1.88 kPa; <i>In Situ</i> 2.80 kPa; <i>In Vitro</i> 1.36 kPa Long Term: <i>In vivo</i> 0.685 kPa; <i>In Situ</i> 0.926 kPa; <i>In Vitro</i> 0.468 kPa	[203]
Atomic Force Microscopy	Elastic/Shear Modulus	E42, E2382	RAT (hippocampus): pyramidal layer: CA1 0.14 kPa; CA3 0.23 kPa stratum radiatum: CA1 0.17 kPa; CA3 0.31 kPa @ 3µm indentation	[204]

* It should be noted that these authors calculated Shear Modulus from indentation data per a formula derived by Lee and Radok in 1960. This value is normally calculated using dynamic or oscillatory methods. ASTM standard provides guidelines for using indentation to calculate Elastic modulus.

Annexe 6. Méthodes de fabrication de gels pleins

Au courant de ce projet de maîtrise, différentes voies ont été utilisées afin de fabriquer des gels pleins. Cette technique permettrait d'accélérer la caractérisation de nouvelles formulations. Autrement, chaque lot d'une nouvelle formulation peut prendre jusqu'à 4 semaines pour obtenir des gels poreux. Comme les gels sont principalement à base d'alginate (1%) et sont réticulés au calcium, cette formulation de base a été testée à travers différentes techniques.

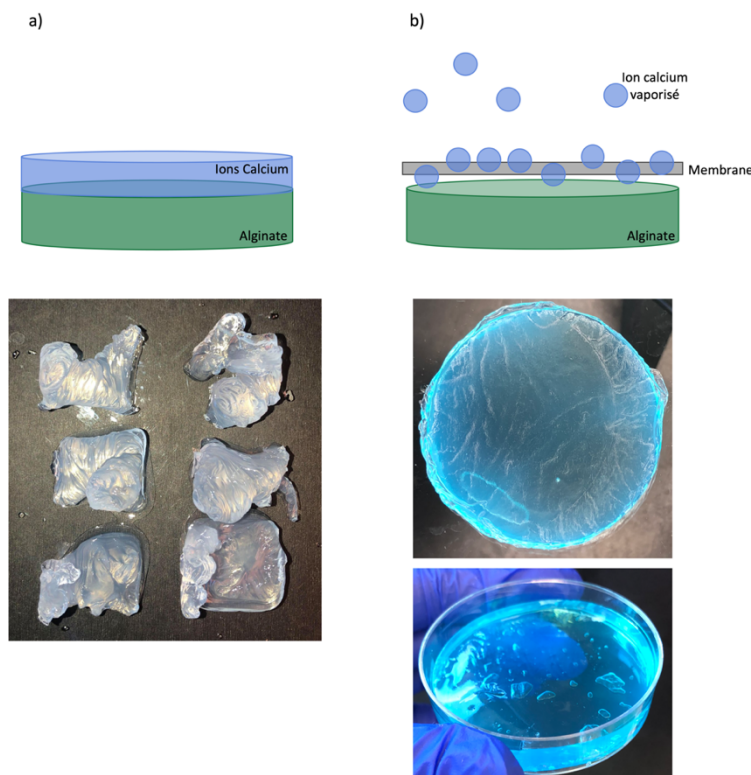


Figure A.4: Fabrication de gels pleins d'alginate et de calcium en a) déposant un volume de CaCl_2 directement sur la surface du gel et b) vaporisant une solution de CaCl_2 sur une membrane à la surface du volume d'alginate.

À la Figure A.4 a) on montre que le dépôt de quelques millilitres d'une solution de CaCl_2 à 4% sur un volume d'alginate dissout engendre une réticulation instantanée très inhomogène. Pour réaliser de l'imagerie ou des essais mécaniques, ces échantillons seraient inutilisables. À la section b) de cette même figure, on montre une amélioration à la méthode précédente. Une membrane de papier (Kimwipe) est déposée à la surface d'un volume d'alginate placé dans un pètri. Le papier s'imbibe doucement d'alginate. Puis, à l'aide d'un vaporisateur, une solution de CaCl_2 (colorée en bleu) est doucement pulvérisée sur la membrane. Lorsqu'une première couche de gel semble avoir été créée,

la surface est suffisamment durcie pour qu'un petit volume de solution soit ajouté. Au fur et à mesure que la solution de calcium diffuse dans la membrane, un volume est ajouté manuellement ou encore une extrémité de la membrane est trempée dans un bassin pour que continue l'absorption de la solution à l'aide des effets capillaires.

Le résultat est très intéressant : en dépit de certaines rainures présentes à la surface du gel à cause de la membrane, le gel est très uniforme et lisse. On peut également retourner le gel et placer la face ridée vers le haut; dans ce cas, le gel offre une topographie très lisse utile pour de la culture cellulaire en deux dimensions, des essais mécaniques ou de l'imagerie.

La méthode suivante est la continuité de celle présentée précédemment, dénommée « gélification par bassins versants ». Une pièce fabriquée par impression 3D a permis de produire une vingtaine de gels d'une plaque à puits en permettant à la solution de calcium de s'écouler lentement d'un réservoir situé en haut du volume d'alginate vers un autre situé en dessous pour récupérer le fluide. Une membrane en fibre de verre a été utilisée pour isoler l'alginate de la solution de calcium. Comme cette membrane était plus épaisse que la Kimwipe, elle était plus stable sur la surface et une gélification initiale par vaporisation ne semblait pas être nécessaire. Une version plus sophistiquée de ce montage a été fabriquée, où une membrane en haut et en bas du volume d'alginate a été placée. Une recirculation du calcium est réalisée à l'aide d'une pompe péristaltique, ce qui permet de travailler avec des concentrations plus faibles en calcium et de potentiellement contrôler le taux de gélification, par exemple si un pré-gel (gel très léger) veut être produit. Il est également possible de fonctionner par cycle de solutions : un pré-gel pourrait être produit, avant qu'une solution acide soit graduellement intégrée pour doucement solubiliser le chitosane par exemple et le faire interagir avec l'alginate.

Ce modèle 2.0 a été fabriqué, mais pas encore testé. Une représentation est proposée à la **Figure A.5**

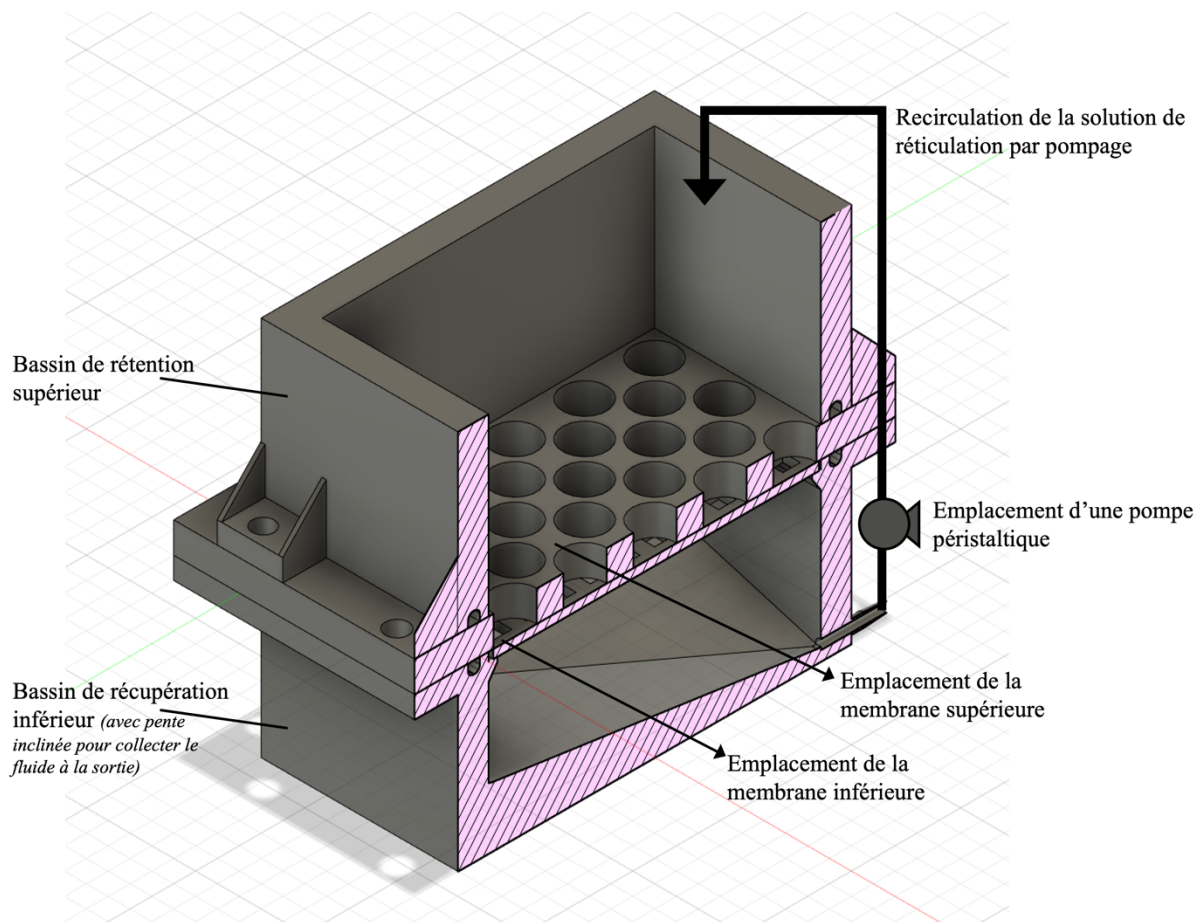


Figure A.5 : Représentation du montage « bassins versants » 2.0, permettant de gélifier une solution d’alginate de manière uniforme tout en faisant recirculer le fluide de réticulation. Concept original, design développé avec des collaborateurs.

Une dernière méthodologie a été testée à des fins exploratoires. Comme le dépôt d’un volume de solution de calcium directement sur un volume d’alginate déforme la surface, des solutions d’alginate gelées ont été immergées dans des solutions de CaCl_2 à différentes concentrations. L’échantillon avec deux astérisques (**) montre la taille de la solution gelée. Les résultats sont surprenants. Dans la section a) de la

Figure A.6, utilisant de l’alginate à 1%, la taille du gel final diminue plus la concentration en calcium augmente. Au fur et à mesure que l’alginate se réchauffe, les couches extérieures entament leur réticulation et un environnement plus concentré semble promouvoir la contraction du gel.

Le gel avec un seul astérisque, correspond à la condition 1% m/v alginate et 1% m/v CaCl_2 et se trouve dans l'image a) et l'image b). On constate que les gels de la section b), utilisant de l'alginate à 0,5% m/v, ne varient pas de manière perceptible en taille selon la concentration de calcium.

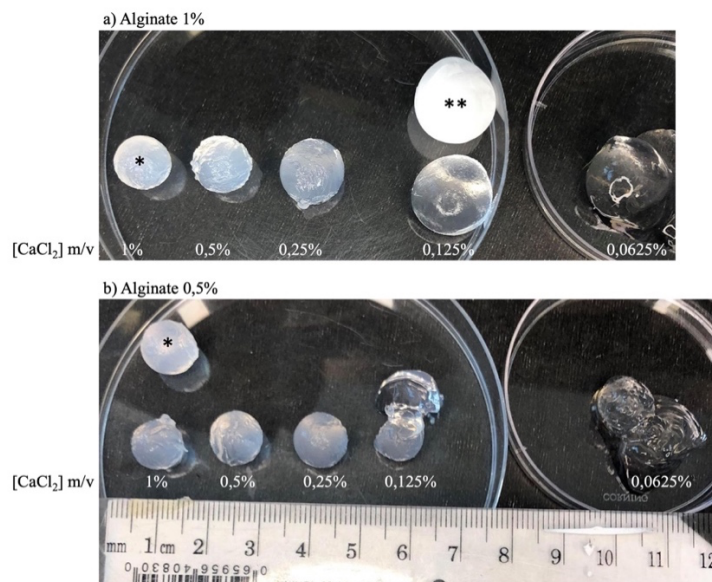


Figure A.6: Immersion de gels d'alginate gelés dans une solution de CaCl_2 à différentes concentrations