

Titre: Hydrogels multifonctionnalisés à effet d'affinité pour la livraison
Title: contrôlée de principes actifs et pour le génie tissulaire

Auteur: Romane Oliverio
Author:

Date: 2023

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Oliverio, R. (2023). Hydrogels multifonctionnalisés à effet d'affinité pour la
Citation: livraison contrôlée de principes actifs et pour le génie tissulaire [Thèse de
doctorat, Polytechnique Montréal]. PolyPublie.
<https://publications.polymtl.ca/56669/>

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

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/56669/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Gregory De Crescenzo, & Xavier Banquy
Advisors:

Programme: Génie biomédical
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Hydrogels multifonctionnalisés à effet d'affinité pour la livraison contrôlée de
principes actifs et pour le génie tissulaire**

ROMANE OLIVERIO

Département de génie biomédical

Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de *Philosophiæ Doctor*
Génie biomédical

Octobre 2023

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Cette thèse intitulée :

Hydrogels multifonctionnalisés à effet d'affinité pour la livraison contrôlée de principes actifs et pour le génie tissulaire

présentée par **Romane OLIVERIO**

en vue de l'obtention du diplôme de *Philosophiæ Doctor*
a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

Géraldine MERLE, présidente

Gregory DE CRESCENZO, membre et directeur de recherche

Xavier BANQUY, membre et codirecteur de recherche

Olivier HENRY, membre

Noémie-Manuelle DORVAL COURCHESNE, membre externe

DÉDICACE

*À tous les courageux·ses qui liront cette thèse ;
À tous ceux·elles qui m'ont supportée (dans tous les sens du terme) toutes ces années ;
Et à la Romane d'il y a cinq ans :
tu vois, tu as fini par en voir le bout.*

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, à celui sans qui cette thèse n'aurait jamais pu voir le jour, mon directeur de recherche, le professeur Gregory De Crescenzo. Greg, tu m'as accueillie dans ton labo quand je n'étais qu'une page blanche. Je partais de loin, tu m'as mise sur des rails, guidée, puis tu m'as progressivement laissée voler de mes propres ailes. Te voir m'accorder, au fil des années, une confiance de plus en plus grande a été vraiment, vraiment gratifiant. Merci pour tout.

À mon codirecteur, le professeur Xavier Banquy. Xavier, merci de m'avoir accueillie dans ton équipe. Tu m'as toi aussi toujours soutenue, et ce même quand l'évolution de mon projet de recherche m'a peu à peu éloignée de ton laboratoire. Bien que mes travaux aient connu plusieurs changements de direction importants, et que je ne me sois plus autant appuyée sur toi qu'à mes débuts, tu as continué à m'apporter un regard critique, à me pousser à me dépasser et m'améliorer sans cesse. Merci pour tout.

Au professeur Nick Virgilio, qui, sans être officiellement mon encadrant, m'a adoptée en cours de projet. Nick, tu as littéralement sauvé mon doctorat : sans ce partenariat avec ton laboratoire, je ne sais honnêtement pas où j'en serais aujourd'hui. Ta porte a toujours été ouverte pour moi, et tu t'es toujours plié en quatre pour me permettre d'avancer mon projet. Merci pour tout.

Greg, Xavier, Nick, vous êtes des personnes brillantes et bienveillantes, ce fut un privilège de vous connaître, de travailler sous votre égide, et d'apprendre de vous.

À tous mes camarades de joies et de galères au laboratoire. À Benoît, la force tranquille. Tu es un point de repère, un sémaphore (et ce n'est pas une plaisanterie sur ta grande taille!), toujours là pour nous guider. À Farzad et Médéric, qui m'ont laissée mettre ma petite patte dans leurs projets. À ceux qui ont déjà gradué ou étaient de passage : Frédéric, Gwendoline, Audrey, Florian, Kurt, Aurélien, Inés. À ceux qui sont encore là : Benjamin, Catherine, Faranak, Jimmy, Lucile, Vaiana, je vous souhaite le meilleur pour vos futures aventures. À tous les étudiants du groupe OMG et autres "enfants adoptifs" du labo, avec qui j'ai interagi de près ou de loin. Merci pour tout.

À la gang de pharmacie qui m'a vue passer occasionnellement : Araceli, Jean-Michel, Marine, Pierre-Luc, Jordan, Sina et tous les autres. Aux étudiant·es et stagiaires de chez Nick : Caroline, Lauriane, Lisa, Melek, Guillaume, Simon, Alex. Merci pour tout.

À mes stagiaires : Victor, Elia, Audrey, Djawed. J'ai eu beaucoup de plaisir à vous encadrer et à vous voir évoluer. Merci pour tout.

À Yuan, sans qui le groupe de recherche ne tournerait pas si rond. Merci pour tout.

Au professeur Marc Lavertu et à Anik Chevrier, qui m'ont laissée utiliser leurs équipements à loisir quand mon projet le nécessitait. Au personnel de Génie Chimique et Génie Physique : Marie-Hélène, Matthieu, Sébastien, Daniel, Gino, Martine, Lydia. Vous m'avez rendu de fiers services, et ce fut un

plaisir de vous connaître. Merci pour tout.

À Janus, qui m’a évité de sévères tendinites au poignet quand je croulais sous les ELISAs. Merci pour tout – et bonne retraite!

Aux personnes impliquées dans mes comités de bourses, mentor·es qui ont suivi mon projet de loin et n’ont jamais hésité à me présenter à leurs contacts : François-Xavier Lacasse, Marie-Pierre Faure, Valérie Calédec. À mes mentor·es chez *The Second Lab* : Gad Sabattier et Laura McKiel, et à l’université Laval : Andy Dimitri Veilleux. Vous m’avez appris tellement de choses. Merci pour tout.

Au professeur Olivier Henry, ainsi qu’à Greg, Xavier et Nick, pour m’avoir confié des charges d’enseignement. À mes étudiant·es, qui n’ont jamais cessé de me surprendre, m’ont permis d’en apprendre beaucoup sur moi-même, et m’en ont fait sacrément baver parfois. Merci pour tout.

Enfin, comme un doctorat déborde forcément sur toutes les autres sphères de la vie, une pensée pour tous ceux qui, sans n’avoir jamais mis les pieds au labo, ont contribué à mon bonheur et mon équilibre.

À ma famille, d’abord. À mon frère Thomas, Charlotte, et leurs enfants, Victor et Mathilde, qui éclairent nos vies du haut de leur trois pommes. À mes grands parents maternels, experts désormais dans l’art du SMS, ce qui rend l’éloignement un chouïa plus facile. À mon grand père paternel, qui nous a fait de belles frayeurs ces dernières années, mais qui finit toujours par se relever de tout. À mes oncles et tantes. Merci pour tout.

À mes beaux-parents : Dominique, Frédéric et Patricia. Vous êtes des modèles de résilience et je suis fière de vous compter parmi mes proches. Merci pour tout.

À mes ami·es, des deux côtés de l’Atlantique. Merci pour tout.

À mes parents. Merci pour tout, et pour bien plus encore.

À Loïc, ma vie, mon tout. Merci pour tout, et pour bien plus encore.

Pendant ces années, je suis passée par bien des émotions, des hauts, des bas, des très bas. Les moments les plus difficiles rappellent l’importance de conserver un équilibre, mais également parfois d’accepter le creux de la vague. Si j’ai surmonté ces obstacles, c’est un peu grâce à chacune des personnes citées ici. En aurais-je été capable sans vous? Je suis bien heureuse de ne pas avoir à connaître la réponse.

Je sors de cette aventure, je pense à la personne que j’étais, à la personne que je suis, à la personne que j’aspire à devenir, et je peux l’affirmer : je vous dois une bien fière chandelle — cette thèse, quelque part, c’est un peu la vôtre.

RÉSUMÉ

Le génie tissulaire est une discipline focalisée sur le développement *in vitro* de **substituts biologiques** pour **réparer ou remplacer des tissus et des organes endommagés ou pathologiques**. Parmi les principaux défis rencontrés en génie tissulaire, on trouve le développement de supports pour la culture de cellules en trois dimensions (3D). Ces supports ont vocation à servir d'échafaudage sur lesquels les cellules peuvent proliférer et s'organiser pour former un nouveau tissu. De tels échafaudages doivent respecter un certain nombre de contraintes : ils doivent notamment (i) être **biocompatibles** et **biodégradables**, (ii) mimer fidèlement le **microenvironnement cellulaire** – propriétés mécaniques, physiques, biochimiques et topologiques – et (iii) permettre la **vascularisation des tissus**.

De nombreux matériaux et de multiples types d'échafaudages ont été proposés pour cet usage, certains aboutissant à des résultats prometteurs *in vitro* ainsi qu'*in vivo* (modèles animaux immunodéficients). Cependant, la majorité de ces plateformes ont un **faible potentiel translationnel**. Les matériaux utilisés sont souvent mal définis et/ou mal caractérisés, et leurs propriétés sont parfois mal connues ou non désirées.

Dans ce travail de recherche, nous proposons l'utilisation d'**hydrogels de dextrane macroporeux pour la culture de cellules vasculaires en 3D**. Le dextrane est un polysaccharide inerte, qui repousse l'adsorption non spécifique des protéines et empêche l'adhésion cellulaire. Nos hydrogels sont biofonctionnalisés par l'intermédiaire d'un système d'affinité, la **superhélice E/K**, composé de deux peptides – Ecoil et Kcoil – ayant une forte affinité en solution. Dans un premier temps, les hydrogels sont fonctionnalisés avec des peptides d'adhésion, qui permettent l'ancrage des cellules sur le dextrane, et avec le peptide Kcoil. Ils sont ensuite incubés avec des facteurs de croissance ou des nanoparticules (NPs) portant des étiquettes Ecoil. Ceux-ci sont capturés à la surface des macropores par la formation de superhélices E/K. Nous utilisons deux facteurs de croissance, (i) le facteur de croissance de l'épiderme (EGF) et (ii) le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), et deux types de NPs, (i) des NPs d'or et (ii) des NPs d'acide polylactique (PLA). Toutes les NPs utilisées possèdent en outre une couronne de polyéthylène glycol (PEG), ce qui permet d'améliorer leur biocompatibilité et leur stabilité.

Ainsi, nous proposons :

- une plateforme **bien définie**, conçue selon un **processus ascendant**. Le dextrane étant inerte, toutes les propriétés désirées sont introduites par la biofonctionnalisation ;
- une plateforme **polyvalente**, grâce à la biofonctionnalisation basée sur l'affinité. Les

hydrogels peuvent être biofonctionnalisés avec n'importe quel objet étiqueté avec Ecoil ;

- une plateforme **modulable**, grâce à l'adaptabilité de la superhélice E/K. En effet, en jouant sur le nombre d'étiquettes Ecoil (valence) et sur la séquence des peptides Ecoil et Kcoil, nous pouvons faire varier la stabilité de la superhélice. Cette approche permet d'obtenir des hydrogels fonctionnalisés avec plusieurs molécules, potentiellement conjuguées à l'hydrogel avec des affinités différentes.

Nous avons organisé ce travail de recherche autour de trois objectifs :

1. **Le développement d'une méthode de quantification de protéines en surface de NPs.** Pour fonctionnaliser les hydrogels avec des NPs via la formation de superhélices E/K, nous avons besoin de conjuguer le peptide Ecoil à la surface des NPs, puis de déterminer la valence (degré de fonctionnalisation) des NPs obtenues. Pour cela, nous présentons dans le chapitre 4 une méthode de quantification qui répond aux trois critères suivants : (i) permettre de quantifier n'importe quelle protéine en surface de plusieurs types de NPs, notamment les NPs d'or et de PLA-*b*-PEG utilisées dans ce projet, (ii) ne pas nécessiter de marquage des protéines et (iii) ne pas nécessiter d'équipement onéreux ou spécialisé. Notre protocole de quantification consiste en trois étapes :

- (i) l'**hydrolyse des liens peptidiques**, qui forme des amines libres en solution, et, simultanément, la **dégradation des NPs** ;
- (ii) l'**incubation avec du TNBS**, une molécule qui réagit avec les amines libres pour former un composé coloré ;
- (iii) la **quantification par absorbance des amines libres** présentes dans la solution. Cette quantification est possible car les NPs, une fois dégradées, ne contribuent plus à l'absorbance de la solution aux longueurs d'ondes étudiées.

L'article présenté dans le chapitre 4 a été publié dans la revue *ACS Applied Nanomaterials* en octobre 2020.

2. **La fonctionnalisation d'hydrogels de dextrane macroporeux avec des facteurs de croissance et des NPs grâce à la superhélice E/K.** Nous moulons le dextrane autour d'un gabarit sacrificiel macroporeux en PLA, et nous fonctionnalisons les hydrogels macroporeux ainsi obtenus avec le peptide Kcoil. Dans le chapitre 5, nous caractérisons la capture et la relâche par les hydrogels de chimères de EGF et VEGF étiquetées avec Ecoil : Ecoil-EGF et Ecoil-VEGF. Nous démontrons notamment que modifier la valence de Ecoil et/ou l'affinité de la superhélice E/K permet de moduler (i) la quantité de facteurs de croissance capturés par les hydrogels et (ii) la stabilité de la capture (quantité relâchée). L'article présenté dans le chapitre 5 a été publié dans la

revue *Acta Biomaterialia* en septembre 2022. Dans le chapitre 7, nous présentons des résultats complémentaires, non publiés, montrant la capture et la relâche de NPs d'or par des hydrogels macroporeux de dextrane.

3. **L'utilisation des hydrogels de dextrane macroporeux biofonctionnalisés pour la culture de cellules vasculaires en 3D.** Dans le chapitre 6, nous fonctionnalisons les hydrogels avec le peptide d'adhésion RGD et le peptide Kcoil, puis avec Ecoil-EGF et/ou Ecoil-VEGF. Ensuite, nous ensemençons les hydrogels avec des organoïdes vasculaires, composés de **cellules endothéliales** et de **cellules musculaires lisses vasculaires**. Nous montrons que la fonctionnalisation avec RGD, Ecoil-EGF et Ecoil-VEGF rend possible le **bourgeonnement des organoïdes** et la **formation de structures proto-vasculaires** dans les hydrogels, y compris lorsque les hydrogels sont conservés dans du milieu de culture appauvri (c'est-à-dire ne contenant pas de facteurs de croissance). L'article présenté dans le chapitre 6 a été soumis dans la revue *Carbohydrate Polymers* en août 2023.

Ce travail de recherche démontre qu'une **biofonctionnalisation adéquate** rend possible l'utilisation d'hydrogels de dextrane comme supports pour la culture de cellules vasculaires en 3D, et ce en dépit des propriétés anti-adhésives natives du dextrane. En outre, nous proposons, grâce à l'utilisation de la superhélice E/K, une **stratégie polyvalente** pour la **multifonctionnalisation** des hydrogels, non seulement avec des facteurs de croissance et des NPs, mais aussi avec n'importe quel objet étiqueté avec Ecoil. En résumé, nous montrons que les hydrogels de dextrane macroporeux sont une **plateforme intrinsèquement bien définie, polyvalente et modulable**, potentiellement adaptable pour des applications variées en génie tissulaire.

ABSTRACT

Tissue engineering refers to the *in vitro* development of **biological substitutes to repair or replace damaged or pathologic tissues and organs**. One of the most prominent challenges in the field is developing scaffolds that support cell culture in three dimensions (3D), on which cells can proliferate to form a new tissue. 3D cell culture scaffolds must (i) be biocompatible and biodegradable, (ii) closely mimic the cellular microenvironment – mechanical, physical, biochemical and topological properties – and (iii) enable tissue vascularization.

Numerous materials and scaffold types have previously been reported for this purpose, with some leading to very promising results *in vitro* and *in vivo* (nude animal models). However, most of these platforms have **poor translational prospects** for clinical applications, as they employ poorly characterized materials with sometimes unknown or unwanted properties.

In this work, we present the use of **macroporous dextran hydrogels as scaffolds for the 3D culture of vascular cells**. Dextran is an anti-fouling polysaccharide that prevents unwanted cell adhesion and repels protein adsorption. Our hydrogels are biofunctionalized using the **E/K coiled-coil** affinity system, composed of two strongly-interacting peptides: Ecoil and Kcoil. Hydrogels are first functionalized with adhesive peptides, which promote cell adhesion. Then, they are functionalized with the Kcoil peptide, thus enabling the capture of Ecoil-tagged growth factors and nanoparticles (NPs) via coiled-coil interactions. We present here the capture of two growth factors, (i) the epidermal growth factor (EGF) and (ii) the vascular endothelial growth factor (VEGF), as well as two NP types, (i) gold NPs and (ii) polylactic acid (PLA) NPs. All NPs are decorated with a polyethylene glycol (PEG) shell to enhance their stability and biocompatibility.

Altogether, we propose:

- a **well-defined platform** designed using a bottom-up approach. The desired properties are obtained via biofunctionalization of the hydrogels, as dextran is naturally low fouling;
- a **versatile platform** that exploits affinity-based biofunctionalization. Any Ecoil-tagged biomolecule can be captured in Kcoil functionalized hydrogels;
- a **customizable platform**, through the fine-tuning of the E/K coiled-coil system. The number of Ecoil-tags per biomolecule (valency) and the sequence of the Ecoil and Kcoil peptides are two parameters that we use here to change the affinity of the coiled-coil interaction, thus enabling the functionalization of the hydrogels with several molecules

that exhibit unique capture and release behaviors.

This work is split into three research objectives:

1. **Developing a protocol for the quantification of proteins at the surface of NPs.** In order to functionalize the hydrogels with NPs through coiled-coil interactions, we need to functionalize the NP surface with the Ecoil peptide, then measure the valency (number of Ecoil tags) of the functionalized NPs. For that purpose, we present in chapter 4 a quantification strategy that: (i) allows for the quantification of any protein on several NP types, (ii) does not require protein labeling and (iii) does not require the use of expensive or specialized equipment. Our protocol comprises three steps:

- (i) the **hydrolysis of the peptide bonds in proteins**, yielding free amines in solution, and the simultaneous **degradation of NPs**;
- (ii) the **incubation with TNBS**, which forms a colored compound upon reaction with free amines;
- (iii) the **quantification by absorbance of the free amines**. This quantification is possible because degraded NPs do not contribute to the absorbance signal at the relevant wavelengths.

The paper presented in chapter 4 was published in *ACS Applied Nanomaterials* in October 2020.

2. **Biofunctionalizing macroporous dextran hydrogels with growth factors and NPs using coiled-coil interactions.** We mold the dextran using sacrificial macroporous PLA templates, and we functionalize the obtained macroporous hydrogels with the Kcoil peptide. In chapter 5, we characterize the capture and release by the hydrogels of Ecoil-tagged chimeras of EGF and VEGF: Ecoil-EGF and Ecoil-VEGF. We demonstrate that modifying the Ecoil valency and/or the affinity of the E/K coiled-coil enables the modulation of the capture and release of the growth factors. The paper presented in chapter 5 was published in *Acta Biomaterialia* in September 2022. In chapter 7, we present unpublished data showing the capture and release of gold NPs by macroporous dextran hydrogels.
3. **Using dextran hydrogels as scaffolds for the 3D culture of vascular cells.** In chapter 6, we functionalize dextran hydrogels with the adhesive peptide RGD and with the Kcoil peptide, enabling the capture of Ecoil-EGF and Ecoil-VEGF. Next, we seed the hydrogels with vascular organoids containing **endothelial cells** and **vascular smooth muscle cells**. The hydrogels are maintained in supplement-depleted culture

medium, which is devoid of any growth factors. We demonstrate that biofunctionalization with RGD, Ecoil-EGF and Ecoil-VEGF enables the **sprouting of the organoids** and the formation of proto-vascular structures in the macropores. The paper presented in chapter 6 was submitted in *Carbohydrate Polymers* in August 2023.

Our work demonstrates that an **adequate biofunctionalization** makes dextran hydrogels suitable for the 3D cell culture of vascular cells, despite dextran being naturally low-fouling and cell-repellent. Using the E/K coiled-coil, we propose a **versatile strategy** for the **multifunctionalization** of hydrogels, not only with growth factors and NPs, but also with any Ecoil-tagged molecule. Altogether, we show that macroporous dextran hydrogels are **intrinsically well-defined, versatile and highly-tunable platforms**, suitable for a wide range of biomedical applications.

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	iii
REMERCIEMENTS	iv
RÉSUMÉ	vi
ABSTRACT	ix
TABLE DES MATIÈRES	xii
LISTE DES TABLEAUX	xvii
LISTE DES FIGURES	xix
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xxii
LISTE DES ANNEXES	xxv
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Le génie tissulaire : pourquoi et comment ?	1
1.2 Supports de culture cellulaire en 3D pour le génie tissulaire : les caractéristiques optimales	2
1.2.1 Prérequis pour une utilisation médicale	2
1.2.2 Propriétés physiques et mécaniques	3
1.2.3 Propriétés chimiques et biologiques	4
1.2.4 Vascularisation	4
1.2.5 Autres caractéristiques recherchées	4
1.3 Cadre du projet et objectif général	6
CHAPITRE 2 FRONTIÈRE DES CONNAISSANCES ET ÉTAT DE L'ART	7
2.1 Le microenvironnement cellulaire : que cherche-t-on à émuler ?	7
2.1.1 Les interactions cellule-cellule	7
2.1.2 La matrice extracellulaire	10
2.1.3 Les facteurs de croissance	13
2.1.4 Vascularisation et angiogénèse	17
2.2 Culture cellulaire en 3D pour le génie tissulaire : les matériaux	20

2.2.1	Les matériaux dérivés de la MEC	20
2.2.2	Les polymères synthétiques	24
2.2.3	Les polysaccharides	26
2.3	Les hydrogels macroporeux pour la culture cellulaire en 3D	30
2.3.1	Définitions et généralités	30
2.3.2	Stratégies de fabrication	32
2.3.3	Les hydrogels macroporeux en génie tissulaire	37
2.4	Biofonctionnalisation des biomatériaux	37
2.4.1	Biofonctionnaliser : avec quelles biomolécules ?	38
2.4.2	Les approches de biofonctionnalisation	42
2.4.3	Les complexes superhélice comme systèmes d'affinité bioinspirés	47
2.5	Stratégies de vascularisation en génie tissulaire	50
2.5.1	L'endothélialisation des implants	51
2.5.2	Les systèmes de co-culture	52
2.5.3	Les sphéroïdes et organoïdes vasculaires	54
CHAPITRE 3 DÉMARCHE D'ENSEMBLE DU TRAVAIL		57
3.1	Hypothèses de recherche et description de l'approche choisie	57
3.1.1	Un processus de conception ascendant	57
3.1.2	Une approche de fonctionnalisation polyvalente	58
3.1.3	L'incorporation de cellules vasculaires	59
3.2	Objectifs de recherche	60
3.2.1	Fonctionnalisation de NPs	60
3.2.2	Multifonctionnalisation des hydrogels	62
3.2.3	Culture de cellules vasculaires	62
CHAPITRE 4 ARTICLE 1 — VERSATILE AND HIGH-THROUGHPUT STRATEGY FOR THE QUANTIFICATION OF PROTEINS BOUND TO NANOPARTICLES		64
4.1	Résumé	64
4.2	Header	64
4.3	Author Affiliations	65
4.4	Abstract	65
4.5	Introduction	66
4.6	Experimental Section	69
4.6.1	Proteins	69
4.6.2	Nanoparticles	70

4.6.3	Sample Hydrolysis	71
4.6.4	Free Amine Quantification	72
4.6.5	Regression Line Comparison	72
4.6.6	CEE grafting on PLA- <i>b</i> -PEG NPs	73
4.7	Results and Discussion	74
4.7.1	Protein Hydrolysis Efficiency	74
4.7.2	Hydrolysis of NP-Protein Mixes	76
4.7.3	Strategies to Improve the Protein per NP Resolution	78
4.7.4	Sensitivity Dependency on the NP Size	81
4.7.5	Quantification of Protein Adsorption and Covalent Grafting on Poly- meric NPs	82
4.7.6	Scope of Applicability and Potential Limitations	83
4.8	Conclusions	85
4.9	Associated Content	85
4.10	Acknowledgements	85

CHAPITRE 5	ARTICLE 2 — MACROPOROUS DEXTRAN HYDROGELS FOR CONTROLLED GROWTH FACTOR CAPTURE AND DELIVERY USING COILED- COIL INTERACTIONS	87
5.1	Résumé	87
5.2	Header	88
5.3	Author Affiliations	88
5.4	Abstract	88
5.5	Introduction	89
5.6	Material and Methods	91
5.6.1	Macroporous PLA Scaffolds	91
5.6.2	Macroporous Dextran Gels Synthesis	92
5.6.3	Macroporous Dextran Gels Functionalization	92
5.6.4	Morphology Analysis	93
5.6.5	Mechanical Characterization of the Gels	93
5.6.6	Cell Culture	94
5.6.7	Protein Production	94
5.6.8	Capture and Release Assays	95
5.6.9	Cell Proliferation Assays	95
5.6.10	Cell Imaging	96
5.6.11	Statistical Analysis	96

5.7	Results	97
5.7.1	Preparation of the Gels	97
5.7.2	Kcoil Grafting to the Dextran Surface	99
5.7.3	Tuning the Kcoil Amount in Gels Controls Capture and Release . . .	101
5.7.4	Ecoil Valency Influences Capture and Release	103
5.7.5	Tuning the E/K Affinity Controls Capture and Release	105
5.7.6	Tuning the Pore Size and Structure of the Gels Controls Capture and Release	107
5.7.7	AoSMC Proliferation and Morphology	108
5.8	Discussion	111
5.8.1	A Finely Controlled Platform	111
5.8.2	Kcoil Grafting After Crosslinking	112
5.8.3	Gel Structure and Pore Size	112
5.8.4	Applications and Perspectives	113
5.9	Conclusion	114
5.10	Supplementary Materials	115
5.11	Acknowledgements	115

CHAPITRE 6	ARTICLE 3 — CO-FUNCTIONALIZATION OF MACROPOROUS DEXTRAN HYDROGELS WITH ADHESIVE PEPTIDES AND GROWTH FAC- TORS ENABLES VASCULAR ORGANOID SPROUTING	117
6.1	Résumé	117
6.2	Header	118
6.3	Author Affiliations	118
6.4	Abstract	118
6.5	Introduction	119
6.6	Material and Methods	121
6.6.1	Material and Reagents	121
6.6.2	Hydrogel Production, Functionalization, and Characterization	122
6.6.3	Cell Assays	125
6.6.4	Statistical Analysis	128
6.7	Results	128
6.7.1	Production of Macroporous Dextran Hydrogels	128
6.7.2	Functionalization of Macroporous Dextran Hydrogels	131
6.7.3	Culture of HUVEC and AoSMC in Macroporous Dextran Hydrogels .	133
6.7.4	Vascular Organoids in Complete Medium	135

6.7.5	Vascular Organoids in Supplement-Depleted Medium	137
6.8	Discussion	140
6.8.1	Dextran-based Materials for Tissue Engineering	140
6.8.2	Tunable Functionalization of Dextran Macroporous Hydrogels	140
6.8.3	Perspectives and Potential Applications	141
6.9	Conclusion	143
6.10	Supplementary Materials	143
6.11	Acknowledgements	143
CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE		145
7.1	Quantification de peptides et protéines en surface de NPs	145
7.1.1	Développement de la méthode de quantification et cas limite	145
7.1.2	Valence de NPs fonctionnalisées avec le peptide Ecoil	146
7.2	Utilisation de la superhélice E/K pour la capture et la relâche d'objets étiquetés avec le peptide Ecoil par des hydrogels de dextrane macroporeux	147
7.2.1	Leviers de contrôle additionnels	148
7.2.2	Biofonctionnalisation d'hydrogels de dextrane avec des NPs portant des étiquettes Ecoil	151
7.3	Culture d'organoïdes vasculaires dans des hydrogels de dextrane macroporeux biofonctionnalisés grâce à la superhélice E/K	153
7.3.1	Caractériser la croissance cellulaire dans des échafaudages de culture en 3D	153
7.3.2	Applications et pistes d'amélioration	155
CHAPITRE 8 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS		159
RÉFÉRENCES		162
ANNEXES		210

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1	Exemples d'utilisation de MECd comme supports pour la culture de cellules en 3D en génie tissulaire.	22
Tableau 2.2	Exemples d'utilisation des macroprotéines de la MEC comme supports pour la culture de cellules en 3D en génie tissulaire.	24
Tableau 2.3	Exemples d'utilisation de polymères de synthèse comme supports pour la culture de cellules en 3D en génie tissulaire.	26
Tableau 2.4	Exemples d'utilisation de polysaccharides comme supports pour la culture de cellules en 3D en génie tissulaire.	28
Tableau 2.5	Exemples d'utilisation d'hydrogels macroporeux comme supports pour la culture de cellules en 3D en génie tissulaire.	38
Tableau 2.6	Exemples d'utilisation de plateformes composites échafaudages/particules comme supports pour la culture de cellules en 3D en génie tissulaire	43
Tableau 2.7	Exemples d'organoïdes pré-vascularisés pour des applications en génie tissulaire	55
Tableau 2.8	Exemples d'organoïdes vasculaires pour des applications en génie tissulaire	56
Table 4.1	Previously published strategies for the characterization of nano-object biofunctionalization with proteins	66
Table 4.2	Characteristics of the NPs used in the present study	76
Table 4.3	Maximum NP mass per microplate well that allows TNBS detection without matrix effect	79
Table 4.4	Typical protein-NP ratios that can be detected using TNBS	82
Table 5.1	Morphological characteristics of PLA scaffolds and dextran hydrogels, as measured by μ CT	97
Table 5.2	Mechanical properties of dextran hydrogels	99
Table 5.3	Amino acid sequence of the peptides used in this study	101
Table 5.4	Estimated density of Kcoil after grafting in the different conditions used in the study	101
Table 6.1	Morphological characteristics of macroporous PLA scaffolds and dextran hydrogels, derived from μ CT scans	130
Table 6.2	Mechanical and physical properties of bulk and macroporous dextran hydrogels	130

Table 6.3	Characterization of functionalized dextran from ^1H NMR peak integration	132
Tableau 7.1	Constantes cinétiques de dissociation apparentes pour l'interaction entre des protéines portant une ou plusieurs étiquettes Ecoil et une surface Kcoil	149
Table A.1	DLS measurements of the hydrodynamic diameter of the NPs, before and after hydrolysis	210
Table A.2	Absolute values of the t-statistics from the comparison between regression lines from figure 4.4 with the corresponding external calibration curve with proteins only	211
Table A.3	Absolute values of the relative gaps (%) between regression lines from figure 4.4 and the corresponding external calibration curve with proteins only.	212
Table B.1	Weighing the gels when the pores are full, then empty, is a reproducible way to measure pore volume	216
Table C.1	Characterization of functionalized dextran from ^1H NMR peak integration	221

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1	Interactions cellule-cellule	9
Figure 2.2	Mécanismes d'angiogénèse	19
Figure 2.3	La superhélice E/K	49
Figure 3.1	Schéma récapitulatif de l'approche choisie	61
Figure 4.1	Graphical abstract	65
Figure 4.2	Experimental strategy for the quantification of proteins on the surface of NPs	68
Figure 4.3	Relative absorbance of CGGYIGSR hydrolysates after derivatization with TNBS for three different hydrolysis durations. Relative absorbance of CGGYIGSR, BSA, and TZM hydrolysates after derivatization with TNBS	75
Figure 4.4	Relative absorbance of CGGYIGSR, BSA, and TZM hydrolysates after derivatization with TNBS in the presence of NPs	77
Figure 4.5	Relative absorbance of CGGYIGSR, BSA, and TZM hydrolysates after derivatization with TNBS when increasing the NP concentration . . .	77
Figure 4.6	Relative fluorescence of CGGYIGSR hydrolysates after derivatization with CBQCA	80
Figure 4.7	Assessment of CEE grafting efficiency using posthydrolysis amine quan- tification and ELISA	83
Figure 5.1	Graphical abstract	89
Figure 5.2	Production and characterization of macroporous dextran hydrogels .	98
Figure 5.3	Affinity-based macroporous dextran gels: principle and functionalization	100
Figure 5.4	Increasing the Kcoil amount in gels improves both capture and release behaviors	102
Figure 5.5	Changing Ecoil valency influences capture and release behaviors . . .	104
Figure 5.6	Changing the sequence of Kcoil alters the capture and release behaviors	106
Figure 5.7	Changing the pore size of the gels influences the capture and release behaviors	108
Figure 5.8	AoSMC metabolic and morphological analysis when cells are exposed to Ecoil-EGF released from dextran hydrogels	110
Figure 6.1	Graphical abstract	119
Figure 6.2	Production of macroporous dextran hydrogels	129
Figure 6.3	Dextran functionalization and characterization	132

Figure 6.4	Metabolic activity of HUVECs and AoSMCs in their respective complete medium, 24 h post seeding in macroporous hydrogels	134
Figure 6.5	Representative confocal microscopy images of HUVECs and AoSMCs, 24 h and 96 h post seeding in macroporous hydrogels	135
Figure 6.6	Generation of HUVEC/AoSMC vascular organoids	136
Figure 6.7	Adhesion and sprouting of vascular organoids in complete medium . .	137
Figure 6.8	Adhesion and sprouting of vascular organoids in supplement-depleted medium	138
Figure 7.1	Sensibilité de la méthode de quantification pour la détection de Ecoil et de CEE en surface de NPs	147
Figure 7.2	Nomenclature des anticorps monoclonaux étiquetés avec le peptide Ecoil	149
Figure 7.3	Fonctionnaliser des AuPEG NPs avec CEE permet la capture et la rétention des NPs dans des gels de dextrane macroporeux fonctionnalisés avec Kcoil	151
Figure 7.4	Images de microscopie confocale montrant la répartition de Kcoil-FAM et Ecoil-TAMRA dans des hydrogels de dextrane macroporeux	157
Figure A.1	Custom-made aluminium heating block with 24 wells designed to fit standard chromatography sampler vials	210
Figure A.2	Relative absorbance of BSA and TZM hydrolysates after derivatisation with TNBS, for three different hydrolysis durations	211
Figure A.3	Relative fluorescence of CGGYIGSR hydrolysates after derivatisation with CBQCA	212
Figure B.1	Schematic procedure of the production of macroporous dextran hydrogels from PS/PLA co-continuous blends	213
Figure B.2	Aspect and structure of 20-min PLA scaffolds and dextran hydrogels	214
Figure B.3	Evolution of Young's moduli of 60-min macroporous dextran hydrogels during the different steps of gel functionalization with Kcoil	215
Figure B.4	Time divided by cumulated release evolves linearly as a function of time	216
Figure B.5	Capture and release are mediated by coiled-coil interactions	217
Figure B.6	Capture and release exhibit similar behavior in AoSMC starving medium and in PBS-T	218
Figure B.7	3D representation of the hanging baskets used in cell proliferation assays	219
Figure C.1	Optical density (600 nm) of LB broth after incubation with functionalized macroporous dextran hydrogels	220
Figure C.2	¹ H NMR spectrum of dextran functionalized with the RGD and Kcoil peptides	221

Figure C.3	Representative confocal microscopy images of HUVECs and AoSMCs in a cell culture plate	222
Figure C.4	Representative confocal microscopy images of vascular organoids in complete medium, in gels functionalized with 10 nmol of Kcoil	222

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

2D	Deux Dimensions (<i>fr</i>) / Two-dimensional (<i>en</i>)
3D	Trois Dimensions (<i>fr</i>) / Three-dimensional (<i>en</i>)
AA	Acide Aminé (<i>fr</i>) / Amino Acid (<i>en</i>)
AAA	Analyse des Acides Aminés (<i>fr</i>) / Amino Acid Analysis (<i>en</i>)
Aha	Azidohomoalanine
AoSMC	Cellule Musculaire Lisse de l'Aorte (<i>fr</i>) / Aortic Smooth Muscle Cell (<i>en</i>)
bFGF	Facteur de Croissance Fibroblastique basique (<i>fr</i>) / Basic Fibroblast Growth Factor (<i>en</i>)
BMP	Protéine Osseuse Morphogénétique (<i>fr</i>) / Bone Morphogenetic Protein (<i>en</i>)
BSA	Albumine de Sérum Bovin (<i>fr</i>) / Bovine Serum Albumin (<i>en</i>)
CAA	Cycloaddition Azoture-Alcyne
CBD	Domaine de Liaison au Collagène (<i>fr</i>) / Collagen Binding Domain (<i>en</i>)
CBQCA	3-(4-Carboxybenzoyl)Quinoline-2-Carboxaldehyde
CCC	Communication Cellule-cellule
CEE	Cys-Ecoil-EGF
DLL	Protéine Delta-Like (<i>fr</i>) / Delta-like Protein (<i>en</i>)
DLS	Diffusion Dynamique de la Lumière (<i>fr</i>) / Dynamic Light Scattering (<i>en</i>)
EGF	Facteur de Croissance de l'Épiderme (<i>fr</i>) / Epidermal Growth Factor (<i>en</i>)
EGFR	Récepteur du Facteur de Croissance de l'Épiderme (<i>fr</i>) / Epidermal Growth Factor Receptor (<i>en</i>)
EGM-2	Milieu de Croissance pour Cellules Endothéliales 2 (<i>fr</i>) / Endothelial Growth Medium 2 (<i>en</i>)
ELISA	Technique d'Immuno-adsorption par Enzyme Liée (<i>fr</i>) / Enzyme-linked Immunosorbent Assay (<i>en</i>)
FAM	5-Carboxyfluorescéine
FBS	Sérum de Veau Foetal (<i>fr</i>) / Fetal Bovine Serum (<i>en</i>)
GAG	Glycosaminoglycane
GPE	Glycidyl Propargyl Ether
HC	Chaîne Lourde (<i>fr</i>) / Heavy Chain (<i>en</i>)
HEK	Cellule Embryonnaire de Rein Humain (<i>fr</i>) / Human Embryonic Kidney cell (<i>en</i>)
HPLC	Chromatographie Liquide à Haute Performance (<i>fr</i>) / High-Performance Liquid Chromatography (<i>en</i>)

HUVEC	Cellule Endothéliale de la Veine Omphalique Humaine (<i>fr</i>) / Human Umbilical Vein Endothelial Cell (<i>en</i>)
IGF	Facteur de Croissance Analogue à l'Insuline (<i>fr</i>) / Insulin-like Growth Factor (<i>en</i>)
LC	Chaîne Légère (<i>fr</i>) / Light Chain (<i>en</i>)
MEC	Matrice Extracellulaire
MECd	Matrice Extracellulaire décellularisée
μP	Microparticule
NMR	Résonance Magnétique Nucléaire (<i>fr</i>) / Nuclear Magnetic Resonance (<i>en</i>)
NP	Nanoparticule (<i>fr</i>) / Nanoparticle (<i>en</i>)
PGA	Acide Polyglycolique (<i>fr</i>) / Polyglycolic Acid (<i>en</i>)
PBS	Tampon Phosphate Salin (<i>fr</i>) / Phosphate Buffered Saline (<i>en</i>)
PCL	Polycaprolactone
PEG	Polyethylene Glycol
PEI	Poly(Ethylene Imine)
PLA	Acide Poly-D,L-lactique (<i>fr</i>) / Poly-D,L-lactic Acid (<i>en</i>)
PLGA	Acide Polylactique-co-glycolique (<i>fr</i>) / Polylactic-co-Glycolic Acid (<i>en</i>)
PS	Polystyrène (<i>fr</i>) / Polystyrene (<i>en</i>)
PVA	Alcool Polyvinylique (<i>fr</i>) / Polyvinyl Alcohol (<i>en</i>)
ROI	Région d'Intérêt (<i>fr</i>) / Region of Interest (<i>en</i>)
ROP	Polymérisation par Ouverture de Cycle (<i>fr</i>) / Ring-opening Polymerization (<i>en</i>)
SLRP	Petit Protéoglycane Riche en Leucine (<i>fr</i>) / Small Leucin-Rich Proteoglycan (<i>en</i>)
SmA	Actine de Muscle Lisse (<i>fr</i>) / Smooth-muscle Actin (<i>en</i>)
SmGM-2	Milieu de Croissance pour Cellules Musculaires Lisses 2 (<i>fr</i>) / Smooth muscle Growth Medium 2 (<i>en</i>)
SSA	Surface Spécifique (<i>fr</i>) / Specific Surface Area (<i>en</i>)
STMP	Trisodium Trimetaphosphate
TAMRA	5-Carboxytetraméthylrhodamine
TGF	Facteur de Croissance Transformant (<i>fr</i>) / Transforming Growth Factor (<i>en</i>)
THPTA	Tris(3-hydroxypropyltriazolmethyl)amine
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzene Sulfonic Acid
TZM	Trastuzumab
VEGF	Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire (<i>fr</i>) / Vascular Endothelial Growth Factor (<i>en</i>)

VSMC	Cellule Musculaire Lisse Vasculaire (<i>fr</i>) / Vascular Smooth Muscle Cell (<i>en</i>)
vWF	Facteur de von Willebrand (<i>fr</i>) / von Willebrand Factor (<i>en</i>)

LISTE DES ANNEXES

Annexe A	Supplementary Information – Versatile and High-throughput Strategy for the Quantification of Proteins Bound to Nanoparticles	210
Annexe B	Supplementary Information – Macroporous Dextran Hydrogels for Control- led Growth Factor Capture and Delivery using Coiled-Coil Interactions	213
Annexe C	Supplementary Information – Co-functionalization of Macroporous Dex- tran Hydrogels with Adhesive Peptides and Growth Factors Enables Vascular Organoid Sprouting	220
Annexe D	Méthodes expérimentales – Compléments	223

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Le génie tissulaire : pourquoi et comment ?

En 2019, les maladies cardio-vasculaires étaient la première cause de mortalité à l'échelle mondiale [1]. Plus généralement, les maladies non transmissibles ont causé 74% des décès enregistrés cette année-là. Parmi ces maladies, plusieurs peuvent être causées par la défaillance d'un organe ou d'un tissu. Leur remplacement, ou le remplacement de leur fonction, serait dans plusieurs cas une solution valide [2].

Le **génie tissulaire** est une discipline en développement qui consiste en la réparation de tissus endommagés ou pathologiques grâce à l'utilisation de substituts biologiques développés *ex vivo* [2]. Les premiers travaux significatifs en ce sens datent du milieu des années 1985 [3] avec notamment les contributions de Vacanti et Langer qui proposent en 1993 la définition suivante :

*"Le génie tissulaire est un champ de recherche interdisciplinaire qui vise à appliquer les principes du génie et des sciences de la vie pour le développement de substituts biologiques visant à restaurer, conserver ou améliorer la fonction des tissus"*¹ [4].

Le génie tissulaire a notamment pour vocation d'être une alternative aux transplantations d'organes, qui sont associées à de nombreux aléas, les principaux étant :

- la **disponibilité** des organes, qui reste **inférieure aux besoins**. Ainsi, fin décembre 2022, près de 4 000 patient-es, soit près d'un individu sur 10 000, étaient enregistré-es sur une liste d'attente pour un don d'organe au Canada [5]. Fin juin 2023, aux États-Unis, ce chiffre s'élevait à environ 100 000 patient-es, soit un individu sur 3 000 [6] ;
- le risque élevé du **rejet de la greffe**.

Pour pallier ces difficultés, le génie tissulaire propose de restaurer les organes ou les tissus à partir de cellules prélevées directement chez l'hôte. Trois types de solutions technologiques sont alors envisageables :

1. l'**injection de cellules saines** afin de coloniser les zones ciblées et permettre la régénération des tissus [7] ;

1. Traduit de la référence [4] : "tissue engineering is an interdisciplinary field which applies the principles of engineering and the life sciences toward the development of biological substitutes that restore, maintain, or improve tissue function".

2. l'**implantation de matrices synthétiques** qui seront colonisées *in situ* par les cellules de l'organisme, permettant ainsi la reconstitution des tissus [8] ;
3. l'**implantation de tissus développés *ex vivo*** à partir de cellules prélevées dans l'organisme. Ces tissus sont généralement supportés par une matrice synthétique ayant servi d'échafaudage lors de leur culture. C'est sur cette troisième option que ce travail sera focalisé.

Il apparaît alors nécessaire de développer des matériaux pouvant servir de support pour la culture de cellules et la maturation de tissus *ex vivo*. De telles matrices doivent donc proposer un **microenvironnement favorable** aux cellules. Les approches traditionnelles de culture cellulaire, soit la culture de cellules adhésives sur un support en deux dimensions (2D) ou la culture de cellules en suspension, sont trop limitées pour pouvoir reconstituer des tissus complexes [9, 10]. Les efforts de recherche se sont donc concentrés sur le développement de supports pour la **culture cellulaire en trois dimensions** (3D).

1.2 Supports de culture cellulaire en 3D pour le génie tissulaire : les caractéristiques optimales

Le microenvironnement d'une cellule désigne (i) les cellules qui l'entourent, (ii) la matrice extracellulaire (MEC) qui la supporte et (iii) les signaux biologiques et chimiques qu'elle reçoit. Ce microenvironnement dépend donc du tissu étudié et varie au cours du développement de celui-ci. Dans un objectif de reconstitution de tissus *ex vivo*, il est alors primordial de développer des plateformes de cultures qui **répliquent l'environnement cellulaire natif**.

Dans cette section, nous récapitulons les principes généraux qui doivent guider le choix des matériaux et les étapes de conception d'un échafaudage pour la culture cellulaire en 3D pour le génie tissulaire. L'objectif est ici d'établir un cahier des charges que devrait respecter un matériau "idéal", en portant une attention particulière à la **versatilité** et à l'**autosuffisance**. Un état de l'art des plateformes existantes sera présenté dans le chapitre 2 et nous analyserons leur conformité avec ce cahier des charges.

1.2.1 Prérequis pour une utilisation médicale

Puisqu'elles ont ultimement vocation à être implantées dans l'organisme, les plateformes de culture cellulaire en 3D pour le génie tissulaire doivent être conçues à partir de matériaux **biocompatibles** [11]. Leur présence ne doit pas nuire au fonctionnement de l'organisme ni endommager les tissus au voisinage de l'implant. Elles doivent également être **biodégradables**, afin de permettre aux tissus implantés d'être intégrés progressivement à la MEC

native.

Pour limiter le risque que l'implantation dans l'organisme ne déclenche une réaction immunitaire aiguë, les matériaux choisis doivent être **non immunogéniques** et **ne pas contenir d'agents pathogènes** [12]. Cela implique notamment d'**éviter les matériaux d'origine animale** et impose un contrôle fin des procédés de fabrication pour limiter tout risque de contamination [13].

Enfin, pour permettre leur translation vers le stade clinique, et faciliter leur homologation par les instances de régulation, les échafaudages doivent être **bien définis** et **bien caractérisés** [13]. Leur composition et la dose de chaque élément doivent être connus, et les procédés de fabrication doivent être reproductibles. La variabilité inter-lot doit être minimale.

1.2.2 Propriétés physiques et mécaniques

La topologie de la MEC native est un aspect déterminant lors de l'organogénèse [14]. Un échafaudage pour la culture cellulaire en 3D doit mimer au mieux cette topologie pour offrir un support de croissance adéquat. Parmi les caractéristiques d'intérêt, on compte :

- la **taille** et la **forme** des motifs topologiques. Les cellules doivent disposer de suffisamment d'espace à coloniser : ainsi, des structures **macroporeuses** ou **fibreuses** doivent être privilégiées. Le contrôle de la taille des pores ou de l'espace entre les fibres est alors déterminant ;
- pour certains types de cellules, comme les neurones ou les cellules musculaires, la présence de **structures anisotropiques** qui contribuent à la polarisation du tissu [15].

Les propriétés mécaniques de la MEC telles que sa **rigidité**, sa **compressibilité** ou sa **résistance au cisaillement** ont également un fort impact sur le développement des tissus [16,17]. *In vivo*, le module élastique des tissus varie entre ~ 1 kPa pour les tissus hépatiques [18,19] et > 1 GPa pour les os, les tendons et les ligaments [17,19,20]. *In vitro* une même lignée cellulaire peut survivre et proliférer sur des substrats artificiels dont les modules élastiques couvrent plusieurs ordres de grandeur [17]. Cependant, ces variations de rigidité vont avoir une influence sur plusieurs caractéristiques, comme la mobilité cellulaire, l'étalement ou la différenciation.

De nombreux types cellulaires peuvent être cultivés adéquatement sur des substrats ayant un **module élastique proche de 10 kPa** [17,19]. Cette valeur, qui peut ensuite être raffinée selon l'application voulue, est *a priori* une bonne cible de départ lors de la conception d'un échafaudage pour la culture cellulaire en 3D.

1.2.3 Propriétés chimiques et biologiques

Le microenvironnement cellulaire natif module le destin cellulaire en exposant les cellules à de nombreux signaux biologiques et chimiques (c.f. section 2.1). Ainsi, l'**adhésion des cellules** est médiée par l'interaction de protéines membranaires, les intégrines, avec la MEC [14]. Le microenvironnement contient également des **facteurs de croissance**, qui peuvent être ancrés à la MEC ou solubles dans le fluide interstitiel. Ces protéines interagissent avec des récepteurs à la surface des cellules pour déclencher des cascades de signalisation et moduler la transcription des gènes [14].

Dans l'objectif de mimer l'environnement cellulaire, un échafaudage pour la culture cellulaire en 3D doit donc avoir des **propriétés adhésives** et intégrer des facteurs de croissance. Certains matériaux, notamment des dérivés de la MEC comme le collagène, ont des propriétés adhésives natives. Dans le cas contraire, il est nécessaire de **biofonctionnaliser** le matériau, en y conjuguant des protéines ou des **motifs peptidiques qui favorisent l'adhésion**. De façon similaire, l'**incorporation de facteurs de croissance** doit se faire par biofonctionnalisation. Les protéines et peptides ainsi conjugués au matériau doivent :

- rester **bioactifs**. La réaction de conjugaison ne doit pas changer leur conformation ni impliquer leur site actif, pour ne pas gêner leur interaction avec les récepteurs ;
- être **biodisponibles**, c'est-à-dire accessibles sans contrainte stérique.

Pour remplir ce double objectif, on privilégiera les réactions de biofonctionnalisation **spécifiques** et **orientées**.

1.2.4 Vascularisation

Dans les tissus dont l'épaisseur dépasse $\sim 200 \mu\text{m}$, la diffusion seule ne suffit pas à (i) assurer aux cellules un apport suffisant en oxygène et nutriments et à (ii) permettre l'élimination des déchets métaboliques [21,22]. Ces fonctions doivent être assurées par **perfusion** des tissus, ou, comme c'est le cas dans les tissus natifs, par le biais d'un **réseau vasculaire** [21,23]. Ainsi, une plateforme de culture cellulaire en 3D pour le génie tissulaire doit permettre la formation d'une vasculature, et ce en parallèle du développement du tissu d'intérêt. Cela implique la présence de cellules vasculaires et de facteurs de croissance qui promeuvent l'angiogénèse (c.f. section 2.5).

1.2.5 Autres caractéristiques recherchées

Une plateforme polyvalente et autosuffisante doit également permettre l'incorporation de **principes actifs**, comme des médicaments ou des molécules chimiotactiques. Ces molécules

peuvent se trouver (i) sous forme soluble, (ii) greffées, ou encore (iii) encapsulées pour être libérées de manière contrôlée [24]. Ainsi, une **plateforme hybride** dans laquelle le support de culture est fonctionnalisé avec des **micro- ou nanoparticules** (NPs) ou des **liposomes** permettrait la livraison contrôlée, locale et prolongée d'un principe actif encapsulé.

D'autres considérations doivent être prises en compte, comme le **coût** et la **disponibilité** des matériaux de base. Dans l'optique de la **mise à l'échelle**, on privilégiera des matériaux faciles à produire ou à extraire.

Enfin, la **rapidité de production** des plateformes, leurs **modalités de conservation** ou encore les **stratégies d'implantation** chez les patient-es sont également des points à considérer. Cependant, ces aspects dépassent le cadre de ce travail et ne seront pas couverts davantage ici.

– À retenir –

CULTURE CELLULAIRE EN 3D POUR LE GÉNIE TISSULAIRE : UNE PLATEFORME OPTIMALE ?

Dans cette section, nous avons établi le profil vers lequel devrait tendre une plateforme **polyvalente** et **autosuffisante** de culture cellulaire en 3D développée pour des applications en génie tissulaire. Ce profil s'articule autour de trois axes :

1. **les propriétés intrinsèques du biomatériau**, incluant :
 - la **biocompatibilité**, la **biodégradabilité**, la **non-immunogénicité** et l'**absence d'agents pathogènes** ;
 - la **bonne définition** du matériau ;
 - une **topologie** permettant la colonisation par des cellules ;
 - les **propriétés directionnelles** du matériau (isotropie ou anisotropie), que l'on souhaite conformes à celles du tissu d'intérêt ;
 - un **module élastique de l'ordre de 10 kPa**, compatible avec de nombreux tissus et types cellulaires ;
 - les propriétés adhésives natives pour certains matériaux ;
2. **les propriétés conférées par la biofonctionnalisation**, telles que :
 - les propriétés adhésives, quand elles ne font pas partie des propriétés natives ;
 - la présence de **facteurs de croissance ancrés de manière orientée à la matrice** et/ou présents sous forme soluble ;

- si nécessaire, la présence de **principes actifs**, libres ou encapsulés dans un **nanotransporteur** ;
- le **contrôle** de la fonctionnalisation ;

3. le **potentiel de vascularisation** des tissus cultivés.

Ce cahier des charges servira de référence pour évaluer les plateformes mentionnées dans la suite du document.

1.3 Cadre du projet et objectif général

L'objectif général du projet est la conception d'une **plateforme modulable pour la culture cellulaire en 3D**, conforme au cahier des charges établi dans la section 1.2. La plateforme sera conçue autour des principes suivants :

- une conception selon un **processus ascendant** (approche "*bottom-up*"). Pour assurer la bonne définition de la plateforme, nous privilégierons des matériaux de base neutres et bien caractérisés. Les caractéristiques souhaitées (c.f. section 1.2) seront introduites par **biofonctionnalisation** des matériaux ;
- une **fonctionnalisation polyvalente** pour une approche "clé en main". Nous choisirons une approche permettant la **multifonctionnalisation** par une **réaction unique**, permettant ainsi de minimiser le nombre d'étapes tout en permettant la fonctionnalisation avec un mélange de molécules complexe ;
- l'incorporation de **cellules vasculaires**, dans le but de favoriser la néo-vascularisation des tissus cultivés. Ces cellules devront s'assembler dans la plateforme pour former des structures (proto)vasculaires autour desquelles les tissus pourront s'organiser.

Sur la base de ces principes et de la revue de la littérature existante (chapitre 2), nous présenterons dans le chapitre 3 la démarche de recherche choisie pour remplir cet objectif général.

CHAPITRE 2 FRONTIÈRE DES CONNAISSANCES ET ÉTAT DE L'ART

2.1 Le microenvironnement cellulaire : que cherche-t-on à émuler ?

Le **microenvironnement cellulaire** désigne l'ensemble des stimuli externes qui influent sur le comportement d'une cellule. Ces stimuli sont de nature différentes et englobent notamment [25] :

- les **cellules** homo- ou hétérotypiques qui entourent la cellule d'intérêt ;
- la **matrice extracellulaire** (MEC), par le biais de sa composition, ses propriétés physiques et mécaniques ou encore sa topographie ;
- les **facteurs de croissance**, que l'on rencontre sous forme soluble ou ancrés à la MEC, et qui modulent la croissance cellulaire en activant des cascades de signalisation via leur interaction avec des récepteurs membranaires [14] ;
- d'autres protéines ou molécules sécrétées, comme les **cytokines** ou les **hormones** ;
- les **propriétés physico-chimiques** du milieu et la composition du **fluide interstitiel** ;
- les **nutriments** et l'**oxygène** acheminés via la circulation sanguine.

Dans cette section, nous nous intéressons aux caractéristiques du microenvironnement cellulaire qu'une plateforme de culture cellulaire en 3D doit modéliser.

2.1.1 Les interactions cellule-cellule

Les interactions et la communication entre cellules sont des éléments clés du développement d'un tissu ou d'un organe. La différenciation cellulaire, notamment, est stimulée par ces signaux externes qui évoluent selon un motif spatio-temporel précis [26]. On peut distinguer deux catégories d'interactions cellule-cellule : (i) les **interactions structurelles**, qui sont contrôlées entre autres par des molécules d'adhésion, et (ii) les **communications cellule-cellule** (CCCs), qui reposent sur la **sécrétion** par les cellules de **molécules messagères** : ions, hormones, cytokines, neurotransmetteurs ou encore chimiokines.

Les interactions structurelles

Les interactions structurelles désignent les mécanismes physiques qui permettent la formation d'une interface cellule-cellule [27]. Bien que ces interactions soient spécifiques aux lignées cellulaires impliquées, elles reposent néanmoins sur des principes et modes d'action communs.

Ainsi, certains types de molécules sont impliqués de façon quasi-universelle dans les jonctions cellule-cellule (figure 2.1A) [27] :

- les **protéines adhésives transmembranaires**, telles les cadhérines. Les protéines adhésives d’une cellule interagissent avec les protéines adhésives de la cellule voisine ;
- des **protéines et enzymes adaptatrices** comme les caténines, qui permettent notamment le recrutement du cytosquelette au voisinage de l’interface, en se liant à la fois aux protéines transmembranaires et aux protéines du cytosquelette ;
- des **glycanes** et **glycoprotéines** transmembranaires qui contribuent à la stabilité et à la spécificité de la jonction ;

Reproduire ces interactions structurelles est l’un des principaux défis rencontrés par les modèles de culture *in vitro* [28]. Notamment, les interactions ligand/récepteur qui se produisent à l’interface cellule-cellule ont des affinités différentes en 2D et en 3D, entre autres en raison des effets d’avidité qui existent en 3D [27]. Des modèles ont été imaginés pour corrélérer l’affinité en 3D ($K_{D,3D}$) à l’affinité en 2D ($K_{D,2D}$) [29], mais leur validité est limitée à des cas idéaux. Notamment, deux paires ligand/récepteur ayant des $K_{D,3D}$ identiques peuvent avoir des $K_{D,2D}$ différents, ce qui n’est pas prévu par le modèle proposé dans la référence [29]. C’est par exemple le cas des paires CD2/CD58 et pMHC/TCR, qui ont un $K_{D,3D} \sim 1 \mu\text{M}$ et des $K_{D,2D}$ qui diffèrent de deux ordres de grandeur [30,31].

Le fait que l’affinité dépende de la dimensionnalité est une limite évidente à l’utilisation de modèles cellulaires en 2D pour des applications en génie tissulaire. Les changements d’affinité affectent les cascades de signalisation en aval, ce qui a une influence sur l’expression des gènes, les cinétiques de prolifération et la différenciation des cellules [27]. Utiliser des modèles 3D est donc une **condition nécessaire** pour permettre des interactions cellule-cellule structurelles représentatives de l’environnement natif. Ce n’est en revanche pas une **condition suffisante** : les propriétés physiques, mécaniques et biochimiques du substrat choisi doivent également être adaptées aux cellules et tissus cultivés [28].

Les communications cellule-cellule

Les CCCs sont catégorisées selon leur mode d’action sur la cellule cible (figure 2.1B) [26] :

- la **signalisation autocrine** est un mécanisme d’**autorégulation** : la molécule messagère a un effet sur la cellule sécrétrice. Ce type de CCC est le plus simple à modéliser *in vitro* : il n’implique qu’une seule cellule ;
- la **signalisation paracrine** repose sur la diffusion de la molécule sécrétée de la cellule sécrétrice jusqu’à la cellule réceptrice. Lorsqu’elle implique des cellules hétérotypiques,

une telle signalisation peut se modéliser *in vitro* de plusieurs façons : (i) via la co-culture des lignées cellulaires sécrétrice et réceptrice, (ii) par l'apport continu de la molécule messagère dans le milieu, ou (iii) via un système de livraison contrôlée. Il faut alors prendre en compte la vitesse de dégradation (demi-vie) de la molécule messagère pour choisir le système approprié ;

- la **signalisation endocrine** permet la CCC à distance : la molécule messagère est acheminée jusqu'à la cellule réceptrice via la circulation sanguine. Comme précédemment, la modélisation d'une CCC endocrine peut se faire (i) par l'apport continu de la molécule messagère dans le milieu, ou (ii) via un système de livraison contrôlée ;
- la **signalisation juxtacrine** implique deux cellules en contact l'une avec l'autre. Les molécules messagères ne sont pas sécrétées dans le fluide interstitiel, mais passent d'une cellule à l'autre via des **canaux transmembranaires** ou des **jonctions communicantes**. La modélisation de ce type de CCC dans une plateforme de culture cellulaire en 3D pose de nombreux défis, car elle nécessite de **reproduire fidèlement les contacts cellule-cellule natifs**.

Les CCCs ont un rôle déterminant dans le destin cellulaire, l'homéostasie et le développement des organes [26,32]. Les cellules sont exposées à différentes molécules messagères, qui peuvent avoir des effets additifs, antagonistes ou synergiques, selon des motifs spatio-temporels précis. Compte tenu de leur complexité et de la diversité des molécules impliquées, reproduire ces motifs *in vitro* est un défi, et ce, que l'on choisisse d'apporter les molécules directement dans

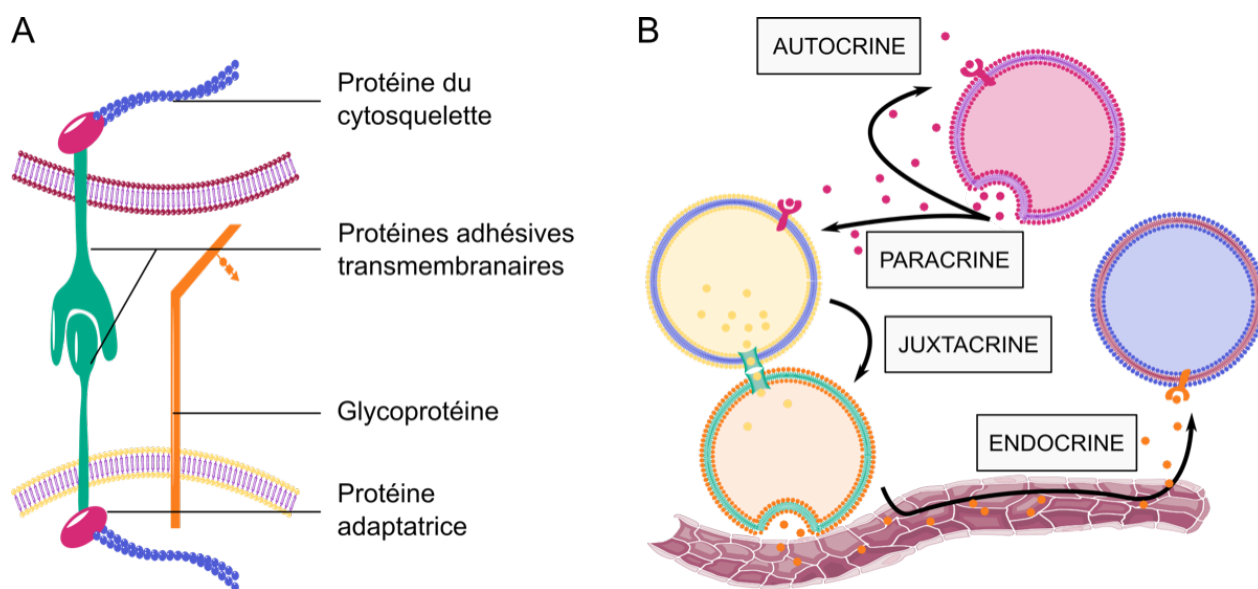


FIGURE 2.1 Interactions cellule-cellule. (A) Interactions structurelles à l'interface cellule-cellule. (B) Catégories de communications cellule-cellule. Figure adaptée de [26, 27].

le milieu de culture ou par le biais d'un système de relâche contrôlée. Le principe d'un système de **livraison activée par des stimuli** semble cependant prometteur : un tel système permettrait *a priori* un contrôle précis et indépendant de l'apport des molécules d'intérêt [33–35].

2.1.2 La matrice extracellulaire

Le terme **matrice extracellulaire** (MEC) désigne la composante non-cellulaire autour de laquelle s'organisent les tissus et organes. La MEC est un milieu complexe : chez les mammifères, elle comprend plus de 300 protéines différentes [36]. Elle remplit à la fois un **rôle structurel** et un **rôle de régulation** : elle sert de support à la croissance des cellules, tout en relayant de multiples signaux biochimiques [14, 37, 38]. La MEC est principalement composée de **protéines fibreuses**, comme le collagène ou la fibronectine, et de **protéoglycanes**, qui sont des protéines entourées par une couche de **glycosaminoglycanes chargés négativement**. Dans cette section, nous présentons les propriétés et le rôle des principaux composants de la MEC, dans le but d'identifier les éléments clés que l'on cherche à émuler dans le contexte du génie tissulaire.

Le collagène

Le collagène est une **protéine structurelle** qui représente près de 30% de la masse de la MEC chez les animaux [14]. On en recense 28 types, dont les formes les plus répandues sont les collagènes de types I, II et III, qui sont présents dans la MEC sous forme de fibres. Ces fibres sont constituées d'unités de **tropocollagène** qui possèdent une **structure en triple hélice**.

Dans la MEC, le collagène remplit un rôle principalement structurel : il supporte la croissance des cellules et participe à la stabilité des tissus en améliorant leur résistance aux **forces de traction**. Dans une moindre mesure, il contribue à l'élasticité des tissus [37–39].

Le collagène est également impliqué dans des voies de signalisation biologiques [39]. L'organisation et l'alignement des fibres de collagène facilitent la **migration cellulaire**. Les **intégrines** de la sous-famille $\beta 1$, qui sont des protéines membranaires, se lient au collagène, contribuant ainsi à l'**adhésion cellulaire** [40]. Le collagène est aussi impliqué dans les mécanismes de réparation des tissus, également par le biais de son interaction avec les intégrines [39, 40].

L'élastine et les fibres élastiques

Lorsqu'ils remplissent leur fonction physiologique, les organes et tissus de l'organisme sont soumis à des déformations répétitives. La réversibilité de ces déformations est rendue possible par l'**élasticité** intrinsèque de la MEC, elle-même assurée par la présence de **fibres élastiques**

[37]. Les fibres élastiques matures ont une demi-vie d'environ 70 ans chez l'humain, et ont donc un très faible taux de renouvellement à l'âge adulte [38]. Elles sont composées d'un cœur d'**élastine** entouré d'une couche de **microfibrilles**. Les microfibrilles sont essentielles à la formation des fibres élastiques, mais leur rôle précis n'est pas encore bien connu [41].

La dégradation enzymatique des fibres élastiques libère des fragments d'élastine sous la forme de courts peptides, qui peuvent agir comme des molécules chimioattractantes. C'est par exemple le cas du peptide Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly (VGVAPG), qui induit notamment la migration des cellules musculaires lisses [42]. L'épaississement de tissus vasculaires provoqué par un excès de VGVAPG est une cause de développement de l'athérosclérose [43].

La fibronectine

La fibronectine est une glycoprotéine que l'on rencontre dans la MEC sous forme de fibres, qui co-existent sous deux formes : étirées et relâchées. La fibronectine contribue aux propriétés mécaniques de la MEC, mais elle est surtout impliquée dans les mécanismes d'**adhésion cellulaire** [38]. Sa séquence contient notamment le motif peptidique **Arg-Gly-Asp (RGD)**, auquel les **intégrines** $\alpha 5 \beta 1$ et $\alpha v \beta 3$ se lient via des **liaisons de capture** ("*catch bonds*") [44]. Ce type de liaison, qui se renforce sous l'effet de l'application d'une force mécanique, permet notamment aux cellules de rester ancrées à la MEC en présence de forces de cisaillement. Le motif peptidique Pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN), également présent dans la fibronectine, a quant à lui un effet synergique sur l'adhésion via les intégrines [44, 45]. Une revue détaillée des mécanismes cellulaires d'adhésion via les intégrines est présentée dans la référence [46].

Les protéoglycanes

Les protéoglycanes sont des glycoprotéines. Ils sont composés d'une protéine centrale sur laquelle sont attachés des **glycosaminoglycanes** (GAGs) chargés négativement. Ils contribuent à la résistance aux forces compressives. On en distingue trois principaux types [39, 47] :

- les **petits protéoglycanes riches en leucine** ("*small leucine-rich proteoglycans*", SLRPs). Ces protéoglycanes sécrétés interagissent avec la matrice de collagène qu'ils protègent de la dégradation [48]. Ils interagissent également avec (i) des **cytokines** et **facteurs de croissance** et (ii) des récepteurs à la surface des cellules [48, 49], contribuant ainsi aux communications matrice-cellule ;
- les **protéoglycanes modulaires**, catégorisés en fonction de leur capacité à lier l'acide hyaluronique et les lectines. Ils sont impliqués dans divers processus, incluant la régulation de l'adhésion, la prolifération et la migration cellulaire et l'assemblage de la MEC [49] ;

- des protéoglycanes présents à la surface des cellules, souvent impliqués dans les cascades de signalisation en tant que co-récepteurs [47].

Les GAGs sont des polysaccharides dont l'unité de base est un disaccharide. Ils sont non-branchés et la plupart portent des substitutions sulfate : chondroïtine sulfate, héparane sulfate ou encore kératane sulfate. Parmi les GAGs rencontrés sur les protéoglycanes, seul l'acide hyaluronique n'est pas sulfaté [37, 49]. La charge négative des GAGs facilite la rétention d'eau : les protéoglycanes contribuent ainsi à l'**hydratation des tissus** [39].

– À retenir –

LA MEC : QUELLES PROPRIÉTÉS ÉMULER ?

Dans cette section, nous avons établi que la **MEC**, grâce à sa composition complexe et spécifique à chaque tissu, était impliquée dans de nombreux processus physiologiques liés au développement et à la maturation d'un tissu :

- elle fournit un **support aux propriétés mécaniques propices** au tissu d'intérêt, conférant ainsi la **résistance aux contraintes mécaniques**, l'**élasticité** et l'**hydratation** nécessaires ;
- elle est un **treillis moléculaire** qui guide la croissance des cellules grâce à l'orientation et l'alignement de ses macroprotéines fibreuses ;
- elle permet l'**adhésion cellulaire**, médiée, entre autres, par les intégrines. On peut ainsi identifier des séquences peptidiques minimales, parmi lesquelles le tripeptide RGD, pouvant promouvoir l'adhésion cellulaire ;
- elle contribue à la **régulation des voies de signalisation**, en séquestrant ou présentant des molécules. Des composants de la MEC agissent également comme co-récepteurs à la surface des cellules.

La composition de la MEC évolue selon les tissus et dans le temps. Elle repose sur un **équilibre subtil**, dont la perturbation peut causer de multiples pathologies. Pour cette raison, dans un contexte de génie tissulaire, la **bonne définition** et le **contrôle précis sur la composition** d'une plateforme de culture cellulaire en 3D sont des aspects primordiaux.

2.1.3 Les facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des molécules messagères impliquées dans les mécanismes de prolifération et différenciation cellulaire, ainsi que dans divers processus métaboliques [50,51]. Certains sont spécifiques à des tissus, d'autres ont une activité plus répandue voire universelle. Les facteurs de croissance ont un mode d'action général pouvant être résumé en plusieurs sous-étapes [50–52] :

1. la **complexation** du facteur de croissance avec un récepteur en surface de la cellule cible ;
2. simultanément :
 - (i) l'**agrégation** des récepteurs complexés. Les récepteurs diffusent latéralement dans la membrane cellulaire pour venir s'agréger, augmentant ainsi la concentration locale des complexes. Ceci permet de moduler l'intensité de la réponse physiologique ;
 - (ii) la **phosphorylation** des récepteurs complexés, catalysée par l'agrégation. La phosphorylation induite par la complexation se produit sur la partie cytoplasmique des récepteurs. Elle permet l'activation de cascades de signalisation ;
3. le complexe peut être **internalisé**, ce qui entraîne une régulation négative de la cascade de signalisation. Les complexes sont alors dégradés par la cellule. Dans certains cas, les récepteurs peuvent également être recyclés.

Les mécanismes d'action des facteurs de croissance sur leurs cellules cibles peuvent être (i) **diffusifs** – modes de signalisation autocrine, paracrine et endocrine (figure 2.1) – ou (ii) **non-diffusifs** – modes de signalisation juxtacrine (figure 2.1), ou **matricrine**, c'est-à-dire que le facteur de croissance est ancré à la MEC. La co-existence des modes diffusifs et non-diffusifs est essentielle pour assurer l'action correcte des facteurs de croissance en contexte physiologique :

- les modes diffusifs sont associés à des événements courts. Les complexes formés d'un récepteur et d'un facteur de croissance libre sont facilement internalisés : les facteurs de croissances sont alors dégradés ;
- au contraire, quand le facteur de croissance est ancré à la MEC ou fourni de façon continue par une cellule juxtaposée, son effet est **localisé** et **prolongé**. Les complexes ne sont alors pas internalisés.

Dans la suite de cette section, nous présentons une sélection non-exhaustive de facteurs de croissance parmi les plus étudiés, sous le prisme de leur importance biologique dans la formation de tissus et organes matures. Cependant, le détail des processus métaboliques et physiologiques impliqués sort du cadre de cette étude, et ne sera abordé que de façon superficielle.

Le facteur de croissance de l'épiderme

Le facteur de croissance de l'épiderme ("*epidermal growth factor*", EGF) mature est une protéine comportant 53 résidus. Son site de production principal chez l'humain est le rein [53], et on le trouve dans de nombreux fluides biologiques, incluant le plasma, la salive ou encore le lait [54, 55]. Son récepteur EGFR ("*epidermal growth factor receptor*") est une **tyrosine kinase transmembranaire**. La complexation de EGF et EGFR induit l'homo- ou l'hétérodimérisation (avec un récepteur de la même famille) de EGFR. Cette dimérisation induit l'autophosphorylation de EGFR [55]. Les cascades de signalisation ainsi déclenchées affectent la **prolifération**, la **différenciation** ou encore l'**apoptose** des tissus ciblés, et régulent ainsi différents processus physiologiques :

- le **développement**. EGF est présent dès les stades pré-embryonnaire et embryonnaire, durant lesquels il agit en synergie avec d'autres facteurs de croissance [56, 57] ;
- la **croissance** des tissus et organes [55]. De multiples types cellulaires expriment EGFR, notamment les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules stromales et les cellules musculaires lisses ;
- la **régénération des tissus**. Il contribue, entre autres, à la régulation des cellules souches [55], et influence la migration cellulaire en régulant l'action des intégrines [58, 59].

Les processus physiologiques médiés par EGF dépendent de son mode d'action. Ainsi, EGF en solution induit la prolifération des cellules stromales multipotentes, alors que EGF ancré à la MEC induit leur différenciation [60–62].

La dérégulation des voies de signalisation de EGF/EGFR est associée à des pathologies. La surexposition à EGF induit l'**hyperplasie** des tissus touchés, c'est-à-dire l'augmentation anormale du nombre de cellules, et favorise l'angiogénèse [63]. La surexpression ou la mutation de EGFR est un biomarqueur associé au développement de cancers [64], incluant le glioblastome, le cancer colorectal, le cancer du sein et le cancer du pancréas.

Les facteurs de croissance transformants

Les facteurs de croissance transformants ("*transforming growth factors*", TGFs) incluent **TGF- α** et la sous-famille des **TGF- β** , qui diffèrent en structure et en fonction malgré leur dénomination commune [65].

TGF- α est un analogue de EGF, dont il partage 40% de la séquence. Comme EGF, il promeut la **migration et la prolifération cellulaire**, et il se lie à **EGFR avec la même affinité que EGF** [66–68]. Il induit une phosphorylation transitoire de EGFR [69, 70]. Son action lors de l'embryogénèse est similaire à celle de EGF malgré une expression temporelle différente

[55, 71]. TGF- α est surexprimé lors de la **cicatrisation** [72]. Au niveau du système nerveux central, il est exprimé selon un motif périodique et a un rôle dans la **régulation du cycle circadien** [68, 73]. La dérégulation des voies de signalisation associées à TGF- α est associée au développement de pathologies et de cancers [68].

La sous famille TGF- β contient les trois isoformes TGF- β 1, TGF- β 2 et TGF- β 3. Les TGF- β matures sont des homodimères. Ils sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires dans la majorité des tissus [74, 75]. Les TGF- β remplissent un double rôle :

- ils **stimulent** (i) la croissance des **cellules mésenchymateuses** comme les fibroblastes et (ii) la production de collagène [76, 77] ;
- ils **inhibent** la croissance des cellules **épidermales**, **endothéliales** et **hématopoïétiques** [76].

On recense trois types de récepteurs des TGF- β ("*TGF- β receptors*", T β R). T β RI et T β RII sont des récepteurs transmembranaires qui activent les voies de signalisation en aval [74]. T β RI est une sérine kinase et T β RII une thréonine kinase. T β RIII (betaglycane) est un protéoglycane présent à la surface des cellules : il n'a pas de domaine cytoplasmique et n'est donc pas directement impliqué dans les voies de signalisation. Il agit en tant que **co-récepteur** : il module l'interaction entre TGF- β et les T β R transmembranaires [78].

Dans de nombreux tissus, les TGF- β inhibent la prolifération cellulaire et promeuvent l'apoptose. Les TGF- β sont donc des **suppresseurs de tumeurs** [74]. De nombreux cancers sont associés à la perte de cette caractéristique, via la dérégulation des voies de signalisations contrôlées par TGF- β [79, 80]. Dans des cancers de stade avancé, les TGF- β peuvent agir comme **oncogènes**, notamment en favorisant l'immunosuppression [81, 82].

Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Le bon fonctionnement d'un organe ou organisme est conditionnel au développement d'un **système vasculaire fonctionnel**. De nombreux facteurs de croissance sont impliqués à divers degrés dans les processus d'angiogénèse [83, 84] : c'est par exemple le cas de EGF, des TGF- α et β ou des facteurs de croissance fibroblastiques ("*fibroblast growth factors*", FGFs). Parmi eux, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ("*vascular endothelial growth factor*", VEGF) joue un rôle essentiel [85, 86] par son action spécifique sur les cellules endothéliales.

Les principaux membres de la famille des VEGFs sont VEGF-A, souvent appelé simplement VEGF, VEGF-B, VEGF-C et VEGF-D. VEGF-A a une action prédominante dans la formation du système vasculaire, tandis que les autres VEGFs ont des actions locales ou pathologiques (VEGF-B) ou agissent au niveau du système lymphatique (VEGF-C) [85, 87].

On recense neuf isoformes de VEGF-A, de différentes longueurs, produits à partir d'un unique gène par épissage alternatif [88]. Ces neuf isoformes présentent un domaine commun qui permet leur interaction avec leurs récepteurs. Deux des exons alternatifs codent pour un domaine permettant la liaison de VEGF-A à l'héparine de la MEC. Ainsi, les isoformes de VEGF-A se classent en deux catégories :

- les **isoformes de bas poids moléculaires**, tels VEGF₁₂₁, ne possèdent pas de domaine de liaison à l'héparine. Ils se trouvent donc exclusivement **sous forme diffusible**. Ces isoformes diffusifs promeuvent la **perméabilité vasculaire** et l'**hyperplasie** des cellules endothéliales [89] ;
- les **isoformes de haut poids moléculaire**, tels VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆, peuvent se lier à l'héparine et sont majoritairement **ancrés à la MEC**. Ils promeuvent le **bourgeonnement** et le **branchement** des vaisseaux sanguins [90].

L'ARN messager qui code pour l'isoforme VEGF₁₆₅ possède un seul des deux exons codant pour le domaine d'interaction avec l'héparine. Ainsi, VEGF₁₆₅ co-existe sous les deux formes : diffusible et ancré à la MEC [91].

Il existe deux principaux récepteurs de VEGF-A : VEGF-R1 et VEGF-R2, qui sont des **tyrosine kinases transmembranaires**. VEGF-R1 est celui pour lequel VEGF-A a la plus forte affinité : la constante de dissociation du couple VEGF/VEGF-R1 est 10 à 100 fois plus petite que celle de VEGF/VEGF-R2 [84, 87]. VEGF-R1 a une faible activité kinase, et déclenche donc des voies de signalisation de faible ampleur. Au contraire, VEGF-R2 possède plusieurs sites de phosphorylation sur son domaine cytoplasmique, et est donc impliqué dans de nombreuses voies de signalisation qui visent à réguler la **sélection**, la **migration**, la **prolifération** et la **survie** des cellules endothéliales [84, 87, 92]. L'activité biologique de VEGF-A est donc principalement acheminée par VEGF-R2. VEGF-R1, ayant à la fois à une forte affinité avec VEGF et une faible activité de signalisation en aval, possède avant tout un rôle de **régulation compétitive** : il piège VEGF-A, empêchant ainsi sa liaison avec VEGF-R2 [83, 87]. Sa fonction est cependant plus complexe : il peut induire la prolifération des cellules endothéliales dans certaines conditions, notamment pathologiques. Il est également un récepteur de VEGF-B [85, 87].

– À retenir –

LES FACTEURS DE CROISSANCE : UN INGRÉDIENT PRIMORDIAL

Les facteurs de croissance sont **essentiels au développement** d'un organisme ou d'un nouveau tissu :

- ils sont **impliqués dans l'ensemble des processus physiologiques**, dans tous les tissus de l'organisme ;
- leur **mode d'action**, diffusif ou non-diffusif, **détermine leur fonction** ;
- les différents facteurs de croissance interagissent selon des **motifs spatio-temporels précis** pour réguler les voies de signalisation. Un même facteur de croissance peut avoir une action différente sur des tissus différents ;
- la **dérégulation** de la signalisation induite par les facteurs de croissance est à la fois une **cause possible** et une **conséquence** de multiples pathologies, notamment certains cancers.

Dans l'optique du développement d'une plateforme de culture cellulaire en 3D pour le génie tissulaire, les facteurs de croissance sont des ingrédients clés. Incorporer des facteurs de croissance est un pré-requis. Choisir la **bonne combinaison** de facteurs de croissance, et **contrôler leur fenêtre temporelle d'interaction** avec les cellules en culture est un aspect déterminant.

2.1.4 Vascularisation et angiogénèse

Le système vasculaire est l'un des premiers axes formés lors du développement. Il permet d'assurer le transport des nutriments, de l'oxygène et des cellules immunitaires dans l'organisme, et assure également l'élimination des déchets métaboliques [93]. Un vaisseau sanguin mature est composé de trois couches [94] :

- la couche interne, l'**intima**, est constituée de **cellules endothéliales** ;
- la couche intermédiaire, la **media**, est majoritairement composée de cellules musculaires lisses ;
- la couche externe, l'**adventice**, est composée de tissu conjonctif et assure le lien entre le vaisseau et la MEC environnante.

L'épaisseur et la rigidité des vaisseaux sanguins dépendent du nombre de cellules qui forment chaque couche, ainsi que de l'épaisseur de la membrane basale et la composition de la MEC [94].

Le développement du système vasculaire se fait suivant deux mécanismes [93,95] :

1. la **vasculogénèse** consiste en la formation *ex nihilo* des premières structures vasculaires au stade embryonnaire [96,97]. La vasculogénèse débute par la différenciation de précurseurs, les **angioblastes**, en cellules endothéliales [93,95]. Cette différenciation est induite par l'action des facteurs de croissance FGF-2 et la protéine osseuse morphogénétique

("bone morphogenetic protein", BMP) 4 [98,99]. BMP-4 fait partie de la super-famille des TGF- β , qui contient également la sous-famille TGF- β présentée dans la section 2.1.3 ;

2. le système vasculaire s'étend ensuite à partir du réseau existant par des mécanismes d'**angiogénèse** (figure 2.2).

- l'angiogénèse par **intussusception** consiste en la séparation d'un vaisseau parent en deux sous-vaisseaux et contribue au **remodelage** du réseau existant (figure 2.2A). Le vaisseau se déforme de façon à ce que deux points opposés de la couche endothéliale se rejoignent dans le lumen, formant ainsi un "pilier" perpendiculaire au flux sanguin. Une nouvelle paroi vasculaire est alors formée par propagation de ce pilier parallèlement au flux [83,100,101] ;
- l'**angiogénèse bourgeonnante** correspond à l'expansion du réseau vasculaire vers l'extérieur du réseau existant (figure 2.2B) [83,97]. L'exposition à un **signal angiogénique chimioattractant** – en réponse par exemple à l'hypoxie d'un tissu voisin – provoque le détachement de la membrane basale et des péricytes, ce qui permet la **sélection des cellules endothéliales**. Celles-ci sont alors organisées selon deux phénotypes : (i) les **cellules de front** ("*tip cells*"), qui développent des **filopodes** leur permettant de migrer hors du vaisseau sanguin vers la source du signal, et (ii) les **cellules de soutien** ("*stalk cells*"), moins mobiles, qui assurent l'imperméabilité du lien avec le vaisseau mère [102,103].

Dans une perspective de vascularisation de tissus artificiels pour le génie tissulaire, le **mécanisme d'angiogénèse bourgeonnante est a priori le plus intéressant à émuler**. En effet, le phénomène de vascularisation se produit majoritairement dans le microenvironnement embryonnaire et n'est donc pas adapté à des tissus spécialisés [97]. Quand à l'angiogénèse par intussusception, elle repose sur la présence initiale d'un réseau vasculaire mature.

VEGF est un acteur déterminant de l'angiogénèse bourgeonnante (figure 2.2B). Il est notamment impliqué dans les voies de signalisation qui régissent la **sélection des cellules de front** [83,97]. Les mécanismes à l'origine de la sélection d'une cellule plutôt qu'une autre sont encore mal connus. L'hypothèse privilégiée serait que les cellules de front soient les cellules endothéliales qui possédaient, au moment de leur exposition à VEGF, la densité de VEGF-R2 la plus élevée [95]. L'exposition de la cellule de front à VEGF déclenche les mécanismes suivants : (i) l'**extension de filopodes** qui permettent l'exploration cellulaire, (ii) la **sécrétion d'enzymes protéolytiques** qui vont dégrader la MEC au voisinage de la cellule et (iii) l'**augmentation des niveaux d'expression de la protéine Delta-like 4 (DLL-4)**. DLL-4 est une protéine transmembranaire. Présente en surface d'une cellule de front, elle interagit

avec son récepteur, **NOTCH**, sur les cellules adjacentes. L'activation de la voie Notch dans ces cellules (signalisation juxtacrine) induit l'**augmentation de leur niveau d'expression de VEGF-R1**, qui piège VEGF (section 2.1.3) et inhibe l'activité de VEGF régie par VEGF-R2. Ainsi, ces cellules ne sont pas sélectionnées comme cellules de front. Elles deviennent des **cellules de soutien**, qui suivent la progression des cellules de front pour assurer la formation du corps du vaisseau sanguin [95,97]. Les nouveaux capillaires ainsi formés sont initialement très perméables et sont ensuite consolidés par la reconstitution de la MEC.

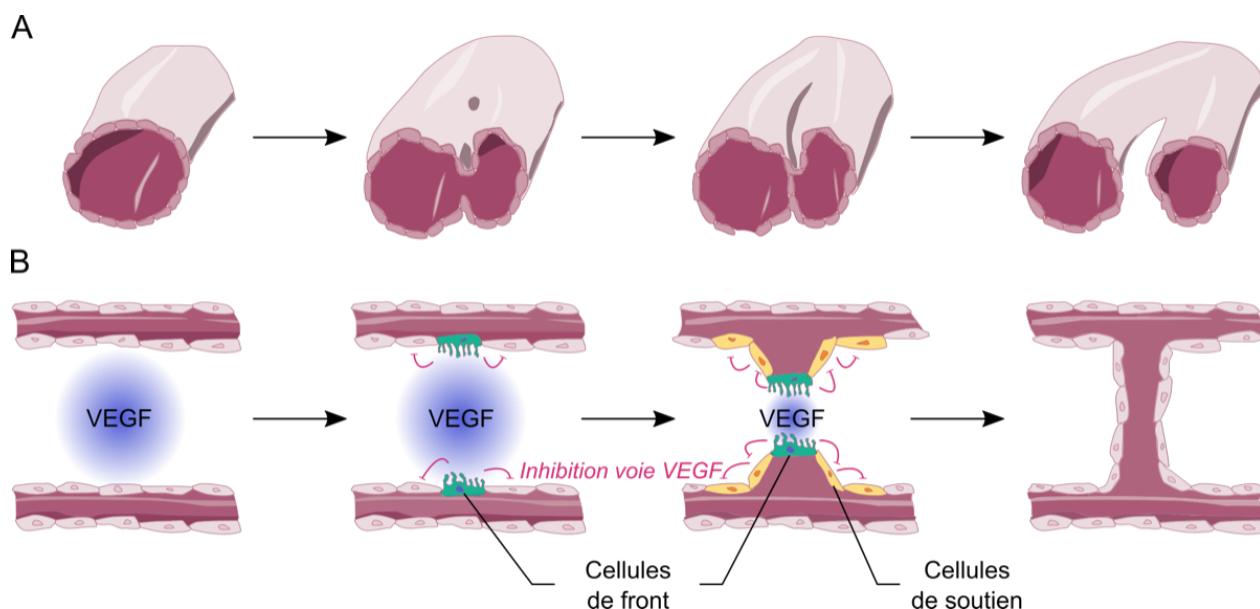


FIGURE 2.2 Mécanismes d'angiogenèse. (A) L'angiogenèse par intussusception consiste en la séparation d'un vaisseau sanguin en deux sous-vaisseaux. (B) L'angiogenèse bourgeonnante fait intervenir VEGF qui recrute les cellules de front via l'interaction avec VEGF-R2. Les cellules de front inhibent la signalisation VEGF chez les cellules de soutien. Sous-figure adaptée de [97].

– RÉCAPITULATIF –

LE MICROENVIRONNEMENT CELLULAIRE : QUE CHERCHE-T-ON À ÉMULER ?

Dans l'organisme, le comportement et le destin d'une cellule ou d'un tissu sont orchestrés par de multiples stimuli **physiques, mécaniques** et **biochimiques** qui constituent le microenvironnement cellulaire. **Ces stimuli interagissent selon un motif spatio-temporel précis.** Compte tenu de la complexité et de la spécificité du microenvironnement cellulaire, il est difficile d'émuler parfaitement les conditions physiologiques dans un modèle de culture *in vitro*. Cependant, sur la base de l'état des connaissances présenté dans

ce chapitre, nous pouvons identifier des propriétés clés pour le développement d'une plateforme de culture cellulaire pour le génie tissulaire :

- les cellules et tissus doivent être **cultivés en 3D** pour ne pas fausser les interactions cellule-cellule ;
- l'échafaudage doit avoir une **rigidité**, une **élasticité** et un **degré d'hydratation** proches de ceux de la MEC native ;
- l'échafaudage doit **permettre l'adhésion cellulaire** par les mêmes mécanismes que dans les tissus natifs, par exemple via les **intégrines** ;
- la plateforme doit contenir au minimum une **combinaison de base de facteurs de croissance**, adaptée aux cellules et tissus étudiés ;
- pour permettre la vascularisation des tissus, la plateforme doit au minimum contenir des **cellules endothéliales vasculaires exposées à VEGF**.

2.2 Culture cellulaire en 3D pour le génie tissulaire : les matériaux

La culture de cellules en 3D requiert souvent la présence d'un support permettant le développement spatial des nouveaux tissus. Depuis l'avènement du génie tissulaire à la fin du XX^e siècle, de multiples stratégies ont été proposées, et ce champ de recherche suit une croissance soutenue.¹

Dans cette section, nous présentons un état de l'art des échafaudages de culture cellulaire en 3D pour des applications en génie tissulaire, sous le prisme des matériaux choisis. Nous évaluons les forces et les lacunes des principaux matériaux étudiés au regard du cahier des charges établi dans la section 1.2.

2.2.1 Les matériaux dérivés de la MEC

La MEC décellularisée

La MEC est le support natif des tissus dans l'organisme. Elle véhicule une partie significative des signaux biologiques nécessaires au développement de tissus sains, et possède nativement les propriétés physiques et mécaniques souhaitées (cf. section 2.1.2). Dès lors, **décellulariser des tissus pour en isoler la MEC** est une approche privilégiée [104, 105] en génie tissulaire. La MEC décellularisée (MECd) sert ensuite d'échafaudage pour la culture de cellules en 3D.

1. Une recherche autour des termes "*3D cell culture*" sur la plateforme Pubmed® en juillet 2023 aboutit à plus de 30 000 résultats, dont plus de 7 000 sur la seule période 2020-2023.

Le procédé général est le suivant [105] :

1. **prélèvement du tissu source.** Pour assurer la spécificité de la MEC et la présence des signaux biologiques appropriés, le type de tissu prélevé doit correspondre à celui que l'on cherche à reconstruire. Plusieurs approches existent [105] :
 - le prélèvement **autogène** : le tissu est directement prélevé chez le patient. Cette approche limite les risques de rejet ou de réponse immunitaire violente lors de la réimplantation. Cependant, elle n'est pas toujours possible, car elle dépend de la disponibilité de tissus sains en quantité suffisante chez le patient ;
 - le prélèvement **allogène**, chez un individu de la même espèce. Cette approche dépend de la disponibilité d'un donneur ;
 - prélèvement **xénogène**, chez un individu d'une autre espèce. Cette approche est la plus à risque de provoquer des réactions immunitaires fortes lors de la réimplantation [106–108]. Les tissus ainsi prélevés font donc l'objet de traitements particuliers pour diminuer leur immunogénicité [109, 110] ;
2. **décellularisation du tissu.** Plusieurs stratégies existent, parmi lesquelles (i) la lyophilisation, (ii) l'exposition à des agents détergents, ou (iii) l'exposition à des acides et bases fortes. Aucune de ces approches n'est *a priori* supérieure aux autres, et plusieurs approches différentes peuvent être employées pour décellulariser le même tissu. Une revue détaillée des techniques de décellularisation ainsi que de leurs applications est présentée dans la référence [111]. Après décellularisation, l'échafaudage est désinfecté et stérilisé [105, 112] ;
3. **reconstitution de l'échafaudage.** La MECd doit être reconstituée pour former un échafaudage. Elle peut par exemple (i) être réticulée sous la forme d'un hydrogel ou (ii) être assemblée par électrofilage pour former un treillis fibreux. Depuis les années 2015-2020, l'essor des techniques de bio-impression et de fabrication additive a également mené au développement d'échafaudages imprimés en 3D, grâce à des bio-encre formulées à partir de MECd [113] ;
4. **recellularisation.** L'échafaudage est recellularisé par ensemencement, perfusion ou injection, généralement avec des cellules souches ou des cellules autologues [104]. La complexité de cette étape dépend du tissu considéré et du nombre de lignées cellulaires impliquées.

La MECd a été utilisée pour de multiples applications cliniques et précliniques impliquant des tissus variés [105, 112, 114]. Des valves cardiaques d'origine porcine sont notamment utilisées en clinique depuis les années 1970 [115]. On recense également des échafaudages décellularisés

d'origine humaine ou porcine en chirurgie de reconstruction [114]. Des exemples d'application de la MECd en génie tissulaire (stade préclinique) sont présentés dans le tableau 2.1.

TABLEAU 2.1 Exemples d'utilisation de MECd comme supports pour la culture de cellules en 3D en génie tissulaire.

Organe / Tissu	Matériau	Application	Référence
Cœur	Tranches de MECd osseuse	Différenciation de cellules souches embryonnaires en tissu cardiaque	[116]
	Échafaudage de MECd bioimprimé	Maturation de cardiomyocytes	[117]
	Hydrogel de MECd injectable	Formation d'artérioles <i>in vivo</i>	[118]
Foie	Hydrogel de MECd	Amélioration de la fonction hépatocyte dans des organoïdes de cellules hépatiques	[119]
	Hydrogel de MECd	Formation d'un réseau de voies biliaires	[120]
	Hydrogel de MECd	Amélioration de la fonction hépatocyte de cellules implantées <i>in vivo</i>	[121]
	Échafaudage de MECd bioimprimé	Différenciation de cellules souches en hépatocytes	[122]
Muscle	MECd électrofilée	Différenciation de myoblastes et formation de myotubes	[123]
Pancréas	Microcapsules de MECd	Sécrétion d'insuline par les cellules encapsulées et amélioration du contrôle de la glycémie <i>in vivo</i>	[124]
	Échafaudage de MECd bioimprimé	Sécrétion d'insuline par des îlots pancréatiques	[125]
Poumon	Tranches de MECd pulmonaire	Différenciation de cellules souches embryonnaires en cellules pulmonaires progénitrices puis en tissu pulmonaire différencié	[126]
Rein	MECd électrofilée	Formation de jonctions intracellulaires serrées et de microtubules rénaux	[127]

Les macroprotéines fibreuses de la MEC

Les protéines dérivées de la MEC, comme le collagène, la fibronectine ou la laminine, peuvent également être utilisées comme échafaudages pour la culture cellulaire en 3D. Elles sont isolées à partir de tissus (tendons ou peau) d'origine animale, notamment porcine, et sont commercialisées à l'échelle industrielle et à relativement **faible coût** [13]. Les macroprotéines dérivées de la MEC sont recherchées pour des applications *in vitro* et *in vivo* en génie tissulaire

en raison des avantages qu’elles partagent avec la MECd :

- elles sont **biocompatibles** et s’intègrent facilement aux tissus natifs [128] ;
- dans une certaine mesure, elles **promeuvent nativement l’adhésion, la migration, la différenciation ou la prolifération** de certains types cellulaires [128].

Cependant, contrairement à la MECd, les protéines dérivées de la MEC **ne transmettent qu’une partie des signaux biochimiques du microenvironnement cellulaire**, et ne sont **pas spécifiques** au tissu étudié [13]. Elles ne possèdent pas les propriétés mécaniques natives de la MEC [129] et ne suffisent pas à assurer seules le développement correct d’un tissu en 3D *in vitro*. Pour acquérir les propriétés manquantes, elles doivent être **biofonctionnalisées** (cf. section 2.4) ou **associées à d’autres matériaux** [130, 131].

Des exemples d’applications des macroprotéines de la MEC pour le génie tissulaire sont présentées dans le tableau 2.2.

– À retenir –

LES MATÉRIAUX DÉRIVÉS DE LA MEC POUR LA CULTURE CELLULAIRE EN 3D

La MECd est la **solution technique permettant la meilleure modélisation du microenvironnement cellulaire natif**. Cependant, elle présente des inconvénients majeurs qui empêchent son adoption systématique comme support pour la culture cellulaire en 3D :

- sa **disponibilité** est **limitée** par la disponibilité des donneurs, ce qui la rend inadaptée pour des études de grande échelle ;
- sa **préparation** est **complexe** et les protocoles ne sont pas normalisés ;
- elle est **intrinsèquement mal définie**. Sa composition n’est pas contrôlée et peut varier d’un lot à l’autre.

Ainsi, malgré la multiplication des études et protocoles utilisant la MECd comme support pour la culture cellulaire en 3D, **son potentiel translationnel est limité**.

Les macroprotéines dérivées de la MEC sont, quant à elles, **disponibles à grande échelle et à faible coût**. Néanmoins :

- comme la MECd, leur composition est sujette à **variation d’un lot à l’autre** ;
- elles **ne possèdent qu’une partie des propriétés intrinsèques de la MEC**, et en particulier présentent pas les propriétés mécaniques ni les caractéristiques physiques natives ;

- elles doivent souvent subir des **étapes additionnelles de biofonctionnalisation** pour acquérir les propriétés nécessaires.

Compte tenu de ces limitations, il est préférable, pour des applications en génie tissulaire, de remplacer les matériaux dérivés de la MEC par des matériaux mieux définis, dont le potentiel translationnel est supérieur.

TABLEAU 2.2 Exemples d'utilisation des macroprotéines de la MEC comme supports pour la culture de cellules en 3D en génie tissulaire.

Organe / Tissu	Matériau	Application	Référence
Cartilage	Échafaudage de collagène + alginate bioimprimé	Prolifération et différenciation de chondrocytes	[132]
	Hydrogel d'élastine + acide hyaluronique	Prolifération et différenciation de chondrocytes	[133]
Foie	Polymère électrofilé modifié avec fibronectine + collagène	Effet synergique de la fibronectine et du collagène pour supporter la culture de cellules hépatiques fonctionnelles	[134]
	Hydrogel enrobé avec fibronectine + collagène	Différenciation de cellules souches mésenchymateuses en hépatocytes	[135]
Hernie ventrale	Collagène + élastine	Réparation et diminution de la récurrence des hernies <i>in vivo</i>	[136]
Os	Collagène + chitosane	Adhésion et prolifération de cellules souches mésenchymateuses	[137]
Peau	Collagène + chitine	Réparation de plaies d'épaisseur totale <i>in vivo</i>	[138]
	Échafaudage de fibrinogène + thrombine + collagène bioimprimé	Réparation de plaies d'épaisseur totale <i>in vivo</i>	[139]
	Échafaudage de collagène bioimprimé	Réparation de plaies d'épaisseur totale <i>in vivo</i>	[140]

2.2.2 Les polymères synthétiques

Les polymères de synthèse sont des matériaux **bon marché**, produits **chimiquement via des procédés répétables et contrôlables**. Ils sont polyvalents et disponibles dans une large gamme de poids moléculaires. Certains sont biocompatibles et biodégradables, ce qui en fait des matériaux d'intérêt pour le génie tissulaire [141,142]. Ainsi, de nombreux polymères de synthèse sont utilisés comme matériaux de base de plateformes de culture cellulaire en 3D, les plus répandus étant :

- le **polycaprolactone** (PCL), qui est un polyester aliphatique très résistant. En conditions physiologiques, sa dégradation prend plusieurs années [143]. Il est donc principalement utilisé en tant qu'implant de longue durée ou pour la régénération de tissus durs comme les os [144]. Il est cependant aussi étudié, dans une moindre mesure, pour la culture de tissus mous [143]. Le PCL est hydrophobe et ne promeut pas l'adhésion des cellules : pour des applications en génie tissulaire, il doit donc être biofonctionnalisé [143] ;
- l'**acide polylactique** ("*polylactic acid*", PLA). Le PLA a des propriétés mécaniques favorables et se dégrade plus rapidement que le PCL en conditions physiologiques. Il est notamment utilisé pour la réparation des ligaments ou des tendons, ou dans des endoprothèses vasculaires [145]. Il est cependant cassant, et il ne promeut pas l'adhésion cellulaire. La biofonctionnalisation des matériaux à base de PLA est difficile en raison de l'absence de groupes fonctionnels propices [141]. Le PLA est donc souvent utilisé mélangé à d'autres matériaux [146] ;
- l'**acide polyglycolique** ("*polyglycolic acid*", PGA), dont les applications sont similaires à celles du PLA [141, 142]. C'est un polymère hydrophile. Cependant, le PGA n'est soluble que dans certains solvants fluorés, ce qui complique son modelage et limite ses applications biomédicales [147]. On rencontre également l'**acide polylactique-co-glycolide** ("*polylactic-co-glycolic acid*", PLGA), qui est un co-polymère de PLA et de PGA [141, 142]. Le taux de dégradation du PLGA peut être contrôlé en modifiant les proportions respectives de PLA et de PGA [141] ;
- le **polyéthylène glycol** (PEG) est un polymère très hydrophile et minimalement immunogénique, majoritairement rencontré sous la forme d'hydrogels [141, 142]. Il résiste à l'adsorption des protéines, ce qui en fait un matériau anti-thrombotique intéressant pour le développement d'implants ou cathéters [148].

Ces polymères sont utilisés comme matériaux de base d'échafaudages de culture cellulaire en 3D. N'ayant pas de conformation tridimensionnelle native, ils doivent être préalablement structurés, soit (i) par réticulation pour former des hydrogels [159], (ii) par électrofilage [160] ou encore (iii) par bioimpression 3D [161]. Les polymères de synthèse sont intéressants pour leur propriétés mécaniques, notamment leur robustesse et leur résistance à la traction. Cependant, contrairement aux matériaux dérivés de la MEC, ils ne sont pas nativement capables de fournir aux cellules les signaux biochimiques nécessaires à leur développement. Ils doivent donc être biofonctionnalisés (cf. section 2.4) pour acquérir les propriétés nécessaires. De nombreuses réactions de synthèse de polymères nécessitent l'utilisation de solvants et produits chimiques potentiellement toxiques : pour des applications en génie tissulaire, il est primordial d'assurer leur bonne élimination [141, 142].

TABLEAU 2.3 Exemples d'utilisation de polymères de synthèse comme supports pour la culture de cellules en 3D en génie tissulaire.

Organe / Tissu	Matériau	Application	Référence
Cerveau	Hydrogel de PEG biofonctionnalisé	Différenciation de cellules souches pluripotentes induites en cellules progénitrices neuronales	[149]
	Échafaudage de PEG/PCL électrofilé et biofonctionnalisé	Différenciation de cellules souches mésenchymateuses	[150]
	PLGA électrofilé	Formation d'une barrière hémato-encéphalique à partir de cellules souches pluripotentes induites	[151]
Cœur	Échafaudage poreux de PCL	Formation de myotubes	[152]
Foie	Échafaudage poreux de PLGA	Différenciation de cellules souches pluripotentes induites en cellules progénitrices hépatiques	[153]
	Échafaudage de PCL bioimprimé et biofonctionnalisé	Culture de cellules hépatiques fonctionnelles et formation de structures vasculaires	[154]
Intestin	Hydrogel de PEG biofonctionnalisé	Formation d'organoïdes intestinaux, qui se différencient en tissu intestinal mature <i>in vivo</i>	[155]
Os	Échafaudages poreux de PLA et PLGA enrobés et biofonctionnalisés	Formation et minéralisation de tissu osseux	[156]
	Échafaudage poreux de PCL/PLA	Formation de tissu osseux <i>in vivo</i>	[157]
	Échafaudage fibreux de PCL/PLA	Prolifération et migration orientée d'ostéoblastes et de cellules stromales de la moelle osseuse	[158]

Des exemples d'applications des polymères de synthèse pour la culture de cellules en 3D sont présentés dans le tableau 2.3.

2.2.3 Les polysaccharides

Les polysaccharides sont des polymères composés d'unités glucidiques liées par des liens glucosidiques. Très répandus dans la nature, ils sont produits dans l'ensemble des règnes taxonomiques du vivant [162–164], notamment :

- par des **bactéries** et autres microorganismes. Ainsi, les bactéries sécrètent des polysaccharides pour former des **biofilms** ;

- par les **plantes** et les **algues**, qui les utilisent pour consolider les **parois cellulaires** ;
- par les **animaux** : les **GAGs de la MEC** sont des polysaccharides.

Les polysaccharides sont particulièrement adaptés pour des applications en génie tissulaire [162, 163]. Outre leur **grande abondance**, ils sont **hydrophiles**, **biocompatibles** et **biodégradables**. Leur **biofonctionnalisation est aisée**, grâce à leurs multiples groupes fonctionnels réactifs : ainsi, tous les polysaccharides présentent des groupes hydroxyle [164]. Certains possèdent en plus des groupes carboxyle ou amine [164]. La majorité des polysaccharides sont solubles dans l'eau : pour former des échafaudages pour la culture cellulaire en 3D, ils doivent donc être réticulés ou mélangés à d'autres matériaux [163].

Les polysaccharides peuvent être classés en fonction de leur charge. On distingue ainsi :

- les polysaccharides **polyanioniques**, qui peuvent être réticulés par leur interaction électrostatique avec des cations. Cette propriété, qui permet la réticulation réversible et la réticulation *in situ*, fait des polysaccharides chargés des matériaux idéaux pour former des **hydrogels injectables** [163]. Parmi ces polymères, on compte :
 - l'**alginate**, produit par des algues brunes et sécrété par certaines bactéries [180]. L'alginate est composé de monomères d'acide mannuronique et d'acide guluronique, en proportions variables, liés par des liens $(1 \rightarrow 4)$;
 - l'**acide hyaluronique**, dont les monomères sont des disaccharides de glucuronate- β -(1 $\rightarrow$ 3)-acétylglucosamine liés par des liens β -(1 $\rightarrow$ 4). Ce GAG non sulfaté est un composant essentiel de la MEC chez les mammifères. Industriellement, il est produit par des bactéries [181]. Nativement présent en grande quantité dans le cartilage et les tissus conjonctifs, il est très étudié en génie tissulaire pour le traitement des maladies articulaires comme l'arthrose [182] ;
 - la **chondroïtine sulfate**, qui est un GAG de la MEC présent quasi-universellement chez les animaux [183]. Elle est présente en grande quantité dans le cartilage, les ligaments ou encore les tendons. Ses monomères sont des disaccharides de glucuronate- β -(1 $\rightarrow$ 3)-acétylgalactosamine liés par des liens β (1 $\rightarrow$ 4) ;
- les polysaccharides **polycationiques**, dont la **chitine** et le **chitosane** sont les principaux représentants. La chitine est l'un des principaux composants de l'exosquelette des crustacés et des insectes [184]. Elle est composée de monomères d'acétylglucosamine (majoritaires) et de glucosamine, liés par des liens β -(1 $\rightarrow$ 4). Le chitosane est un dérivé de la chitine, obtenu par déacétylation. Il est également composé de monomères d'acétylglucosamine et de glucosamine (majoritaires). Contrairement à la plupart des polysaccharides, la chitine et le chitosane sont très peu solubles dans l'eau [184]. La chitine est également insoluble dans la plupart des solvants organiques courants, ce qui

TABLEAU 2.4 Exemples d'utilisation de polysaccharides comme supports pour la culture de cellules en 3D en génie tissulaire.

Organe / Tissu	Matériau	Application	Référence(s)
Cartilage	Billes d'alginate	Traitement de lésions cartilagineuses par l'injection de chondrocytes allologues encapsulés : essai clinique pilote	[165]
	Hydrogel de chondroïtine sulfate biofonctionnalisé	Croissance et différenciation de chondrocytes et réparation de lésions cartilagineuses <i>in vivo</i>	[166]
	Hydrogel d'acide hyaluronique biofonctionnalisé	Différenciation de cellules souches mésenchymateuses et réparation de lésions cartilagineuses <i>in vivo</i>	[167]
	Échafaudage d'alginate-chondroïtine sulfate	Différenciation de cellules souches mésenchymateuses	[168]
Cerveau	Hydrogel d'hydroxypropyl-méthylcellulose fonctionnalisé	Différenciation de cellules neurales exposées à un principe actif relâché dans l'hydrogel	[169]
	Hydrogel d'acide hyaluronique	Différenciation de cellules progénitrices neurales	[170]
	Hydrogel de chitosane biofonctionnalisé	Différenciation de cellules souches neurales	[171]
	Gomme gellane biofonctionnalisée et bioimprimée	Formation de réseaux de cellules corticales primaires et de cellules gliales	[172]
	Hydrogel de gomme gellane	Agglomération de cellules progénitrices neurales et formation de neurites	[173]
	Cellulose électrofilée biofonctionnalisée	Formation de réseaux neuronaux autour de fibres conductrices	[174]
Cœur	Alginate biofonctionnalisé	Adhésion et alignement de cellules cardiaques en co-culture	[175, 176]
	Hydrogel d'alginate-acide hyaluronique biofonctionnalisé	Différenciation et alignement de cardiomyocytes	[177]
	Hydrogel de chitosane biofonctionnalisé	Réduction du stress oxydatif chez des cardiomyocytes	[178]
Peau	Hydrogel de chitosane biofonctionnalisé	Réparation de plaies d'épaisseur totale <i>in vivo</i>	[179]

limite ses applications. Le chitosane, soluble dans certains acides organiques, est surtout utilisé en génie tissulaire pour former des échafaudages solides ou comme revêtement d'implants [185] ;

— les polysaccharides neutres, parmi lesquels :

— la **cellulose**, qui est le polysaccharide le plus abondant dans la nature. La cellulose est le principal composant de la paroi cellulaire chez les végétaux, mais elle est

également produite par certaines bactéries et certains champignons [186]. Elle est composée de monomères de glucose reliés par des liaisons β -(1 $\rightarrow$ 4). Nativement peu soluble dans l'eau, la cellulose peut être facilement modifiée chimiquement. Ainsi, des dérivés solubles de la cellulose, comme la méthylcellulose, l'éthylcellulose ou encore l'hydroxypropylcellulose sont utilisés pour des applications en génie tissulaire [186, 187] ;

- le **dextrane**, produit par des bactéries. Le dextrane est composé de monomères de glucose reliés par des liens α -(1 $\rightarrow$ 6). Il est principalement utilisé pour sa grande résistance à l'adsorption non spécifique des protéines et cellules [188, 189], qui permet, au choix : (i) le développement de matériaux fonctionnalisés sur-mesure, dépendamment des propriétés désirées, ou (ii) le développement de matériaux et revêtements inertes. Le dextrane est également commercialisé pour ses propriétés anti-thrombotiques [190, 191].

Les échafaudages polysaccharidiques présentent un haut degré d'hydratation (cf. rôle natif des protéoglycanes et GAGs de la MEC, section 2.1.2). Leurs propriétés mécaniques rappellent celles des tissus mous de l'organisme [17, 189]. Des propriétés plus spécifiques, comme les fonctionnalités liées aux interactions matrice-cellule, peuvent leur être conférées par bio-fonctionnalisation (cf. section 2.4). Ainsi, les polysaccharides sont des matériaux privilégiés pour la culture de cellules en 3D, et des exemples d'application sont présentés dans le tableau 2.4.

– RÉCAPITULATIF –

CULTURE CELLULAIRE EN 3D POUR LE GÉNIE TISSULAIRE : LES MATÉRIAUX

En génie tissulaire, concevoir des échafaudages qui modulent adéquatement le comportement cellulaire est un défi. L'échafaudage doit remplir les conditions suivantes :

1. ses **propriétés physiques et mécaniques** doivent correspondre à celles de l'environnement natif du tissu ;
2. il doit incorporer des **signaux biochimiques** pouvant influencer le comportement cellulaire.

La MECd est le seul matériau permettant, sans modification, de remplir simultanément ces deux conditions, mais elle ne répond pas aux critères du cahier des charges établi dans la section 1.2 car sa composition n'est pas définie. De plus, sa disponibilité limitée restreint son potentiel translationnel.

L'approche privilégiée devient donc de choisir un ou plusieurs matériaux de base, bien définis et bien caractérisés, de façon à respecter la condition 1. Les matériaux ainsi choisis doivent ensuite être biofonctionnalisés : ce **processus de conception ascendant** permet une **fonctionnalisation sur mesure**, et un **contrôle indépendant sur chaque ingrédient** de l'échafaudage.

Sur la base de l'état des connaissances présenté dans cette section, les **polysaccharides** apparaissent comme les matériaux les plus adaptés à ces contraintes. En tant que matériaux structuraux universellement répandus dans le monde vivant, ils ont des caractéristiques physiques et mécaniques propices. De plus, leur biofonctionnalisation est aisée. Selon l'application, des **échafaudages hybrides**, où les polysaccharides sont **combinés à d'autres polymères ou à des protéines de la MEC**, peuvent également être intéressants.

Enfin, certains matériaux, comme le **PEG** ou le **dextrane**, sont **résistants à l'adsorption non spécifique des protéines et des cellules**. Choisir des **matériaux nativement inertes** permet de renforcer le **contrôle sur les propriétés finales** – après biofonctionnalisation – de l'échafaudage de culture cellulaire en 3D.

2.3 Les hydrogels macroporeux pour la culture cellulaire en 3D

Une fois les matériaux de base choisis, ceux-ci doivent être assemblés pour former un échafaudage tridimensionnel. De nombreuses approches de fabrication existent, et le choix de la stratégie la plus adaptée dépend des propriétés intrinsèques du matériau, notamment sa solubilité dans l'eau et dans certains solvants organiques. Dans ce chapitre, nous nous concentrons sur le type d'échafaudage qui est au centre de ce travail de recherche : les **hydrogels macroporeux**. Des revues plus exhaustives, présentant d'autres stratégies de fabrication, sont disponibles dans la littérature [192–199].

2.3.1 Définitions et généralités

Les hydrogels

Les hydrogels sont des matériaux spongieux qui présentent un haut degré d'hydratation. Ils sont obtenus par la réticulation de polymères, peptides ou protéines **hydrophiles** et **solubles**. Sous l'effet de la réticulation, ils forment une matrice insoluble capable de gonfler en absorbant de grandes quantités d'eau – parfois plus de 100 fois sa masse à sec [19, 200, 201].

Les hydrogels sont des matériaux de choix pour le génie tissulaire, en particulier pour la régénération de tissus mous. Leur degré d'hydratation élevé, tout comme leurs propriétés mécaniques – la majorité des hydrogels ont un module élastique compris entre 0,1 et 100 kPa –, sont proches de ceux des tissus natifs [19]. Pour synthétiser des hydrogels, les matériaux les plus couramment utilisés sont (i) des protéines et peptides, (ii) des polymères synthétiques solubles comme le PEG et (iii) des polysaccharides [19, 200]. Les deux approches de réticulation possibles sont :

- la **réticulation physique**, qui repose sur des interactions non covalentes entre les composants du gel pour assurer la stabilité de la structure. Des interactions hydrophobes, électrostatiques, ou encore des liaisons hydrogène peuvent être utilisées ;
- la **réticulation chimique**, qui consiste à relier les polymères par des **liaisons covalentes**. Celles-ci peuvent impliquer directement les chaînes polymériques, ou bien se faire par l'intermédiaire d'un agent réticulant.

Maillage et macroporosité

L'un des défis rencontrés lors de la conception de plateformes de culture pour le génie tissulaire est la co-existence de phénomènes interdépendants impliquant deux échelles de taille différentes :

1. la **migration** et la **prolifération** des cellules, qui mesurent généralement quelques **dizaines de micromètres** ;
2. la présence de protéines, peptides ou principes actifs utilisés pour biofonctionnaliser l'hydrogel (cf. section 2.4), qui ont pour la plupart une diamètre hydrodynamique de l'ordre de la **dizaine de nanomètres**. Pour représenter fidèlement le microenvironnement cellulaire, ces objets doivent être présents sous formes **diffusive** et non diffusive (cf. section 2.1).

Les hydrogels présentent une structure en treillis, ce qui implique que **des objets peuvent diffuser à l'intérieur de la matrice** polymérique. Le comportement diffusif est régi par plusieurs paramètres [202] :

- La taille r_{maille} des mailles de la matrice, qui est déterminée par (i) la densité de la réticulation et (ii) la capacité de gonflement de l'hydrogel. Elle peut être estimée par des mesures rhéologiques, et est reliée au module de cisaillement G du gel par la relation 2.1 :

$$r_{maille} = \sqrt[3]{\frac{6RT}{\pi N_A G}} \quad (2.1)$$

où R est la constante des gaz parfaits, T la température et $\mathcal{N}_A$ la constante d'Avogadro [203–205] ;

- Les interactions de l'objet avec la matrice ;
- L'utilisation d'un système d'affinité pour ralentir les molécules (cf. section 2.4).

En l'absence d'affinité entre l'hydrogel et l'objet étudié, si la taille des mailles est significativement supérieure à celle de l'objet, celui-ci n'est pas retenu par le gel. L'objet a alors un comportement purement diffusif. Au contraire, si la taille des mailles est inférieure à celle de l'objet, celui-ci est complètement immobilisé dans la matrice polymérique. C'est *a priori* le cas pour des cellules : un hydrogel dont le module de cisaillement est de 10 kPa a une taille de maille $r_{maille} \sim 10$ nm à température ambiante (équation 2.1). Pour des applications en génie tissulaire, le défi est donc de concevoir des hydrogels dont la porosité est suffisamment élevée pour permettre la **migration des cellules** au sein du gel, tout en maintenant des propriétés mécaniques adéquates et en permettant le **confinement de protéines et d'objets de petite taille** au voisinage des cellules.

Les hydrogels macroporeux, qui présentent une double échelle de taille, sont une solution à ce défi. Leur treillis polymérique ($r_{maille} \sim 1$ -10 nm) est organisé autour d'un réseau de macropores ($r_{pore} > 10$ μ m) [15, 206] pouvant être colonisé par les cellules. Un tel hydrogel doit cependant être biofonctionnalisé pour retenir les protéines et objets de petite taille, et les empêcher de diffuser librement hors du gel par le réseau de macropores. Cet aspect est discuté en détail dans la section 2.4.

2.3.2 Stratégies de fabrication

Modelage cristallin et modelage porogénique

Le modelage cristallin est l'une des approches les plus utilisées pour la préparation d'hydrogels macroporeux [206]. Cette approche, facile à mettre en œuvre et bon marché, consiste à mélanger des cristaux salins à la solution de polymère, et à réticuler l'hydrogel autour de ces cristaux. Les cristaux sont ensuite **extraits par lixiviation**, et les macropores ainsi formés ont la taille des cristaux initiaux. Les cristaux les plus utilisés sont le chlorure de sodium [207–209] et le carbonate de sodium [210].

Le principal inconvénient de cette approche est lié à la difficulté d'extraction des cristaux après la réticulation. Si le sels sont mal extraits, l'**osmolarité** locale peut être trop élevée pour permettre la survie des cellules [206].

Pour pallier cet inconvénient, il est possible de remplacer les cristaux de sel par des **agents porogènes non salins** [211–213]. Ainsi, des équipes ont modelé des hydrogels macroporeux

autour de microbilles d’alginate [212] ou encore de gélatine [213, 214]. En plus de (i) permettre un meilleur contrôle sur la taille des macropores et de (ii) limiter les problèmes liés à l’osmolarité, l’érosion progressive des microbilles peut permettre la libération contrôlée de principes actifs dans l’hydrogel. Ainsi, Park *et al.* ont proposé un hydrogel colonisé par des chondrocytes qui permet la libération contrôlée de TGF- β 1 encapsulé dans des microbilles de gélatine [214].

Malgré le remplacement des cristaux salins par des porogènes biodégradables, le modelage d’hydrogels macroporeux autour d’un agent porogène reste une approche sous-optimale pour des applications en génie tissulaire. En particulier, cette stratégie ne garantit pas l’**interconnexion du réseau de macropores**, qui est une condition nécessaire à la migration des cellules à travers le gel [15, 206].

Moussage gazeux

La préparation d’hydrogels macroporeux par moussage gazeux consiste à **générer des bulles de gaz** dans la solution de polymères pendant la réticulation [206]. Deux approches peuvent être envisagées :

- produire le gaz *in situ* pendant la réticulation. Pour cela, on utilise des sels qui réagissent pour former un gaz dans les conditions d’incubation utilisées [215–217]. Par exemple, le bicarbonate de sodium réagit avec les acides pour former du CO_2 [206, 215]. Cette approche est facile à mettre en œuvre, mais a l’inconvénient de produire des résidus difficiles à éliminer. Ces résidus se trouvent néanmoins en quantité moindre qu’avec les approches de modelage cristallin [206] ;
- perfuser la solution avec un gaz sous pression (bullage) ou supercritique [218, 219].

Les macropores obtenus par moussage gazeux sont souvent peu homogènes, et leur taille est encore moins bien contrôlée qu’avec les approches de modelage porogénique. L’absence de contrôle sur le degré d’interconnexion des pores limite également les applications de cette méthode pour le génie tissulaire [15, 206].

Cryogélation

La cryogélation consiste à produire des hydrogels macroporeux par des cycles de congélation/décongélation [220, 221].

1. **congélation** : sous l’effet de la température négative, des cristaux de glace se forment dans la solution. La réticulation se produit simultanément, ce qui permet au treillis polymérique de se constituer autour des cristaux ;

2. **décongélation** : les cristaux de glace fondent, laissant derrière eux des macropores.

Avec cette approche, la réticulation de l'hydrogel se produit à température négative, ce qui limite les applications (p. ex, encapsulation de cellules) et les chimies de réticulation possibles [206]. Cependant, la nature fractale des cristaux de glace permet aux hydrogels produits par cryogélation d'avoir une meilleure interconnexion de leurs macropores par rapport à des gels produits par moussage ou modelage porogénique [222, 223].

Dans une certaine mesure, la taille des macropores peut être ajustée en corrélation avec (i) le nombre de cycles de congélation/décongélation, (ii) la progressivité des changements de température ou encore (iii) la présence d'additifs et de surfactants. Ces leviers de contrôle restent cependant grossiers, et la distribution de taille des macropores d'un hydrogel préparé par cryogélation est souvent très hétérogène [206].

Mélanges biphasiques co-continus

Les méthodes de génération de macropores citées ci-dessus ont l'inconvénient de ne pas véritablement permettre la création d'un réseau interconnecté de macropores. D'autres approches ont donc été développées dans cet objectif, parmi lesquelles l'utilisation de mélanges biphasiques co-continus [206, 224]. Le principe général est le suivant :

1. préparation d'une solution aqueuse de polymère, prête à être réticulée ;
2. ajout d'un deuxième liquide non miscible : typiquement, une phase huileuse ;
3. — mélange et formation d'une émulsion huile-dans-eau ;
— réticulation simultanée de l'hydrogel pendant que l'émulsion est stable ;
4. rinçage de la phase interne, qui laisse ainsi place à des macropores.

On utilise typiquement des **émulsions à haut rapport de phase interne** ($> 74\%$ de phase interne, ici la phase huileuse). Ce type d'émulsion permet d'obtenir deux phases co-continues, plutôt que des gouttelettes d'huile isolées dans la phase aqueuse [206, 224]. Ainsi, après extraction de la phase interne, l'hydrogel obtenu possède un **réseau de macropores parfaitement interconnecté**.

Dans la majorité des cas, la phase interne est un solvant organique non miscible dans l'eau comme le toluène ou le cyclohexane [224–226]. Elle peut également être une seconde phase aqueuse, contenant un polymère incompatible avec le polymère formant l'hydrogel. Ainsi, Lévesque *et al.* ont utilisé comme phase interne une solution de PEG pour former un hydrogel de dextrane macroporeux [227].

Bien que cette approche permette de garantir l'interconnexion des macropores, elle n'offre que peu voire pas de contrôle sur la taille et l'homogénéité des macropores obtenus [206].

Bioimpression 3D

La bioimpression d'hydrogels en 3D permet un contrôle fin de la topologie du gel. Cette approche repose sur la conception assistée par ordinateur d'un modèle 3D et permet donc de moduler toutes les caractéristiques topographiques du gel : outre la taille et l'interconnexion des macropores, elle permet de contrôler l'orientation des pores et d'introduire de l'hétérogénéité si désiré [206]. Les principales stratégies de bioimpression d'hydrogels macroporeux sont les suivantes :

- l'**impression par extrusion**. La bioencre est ici un hydrogel déjà polymérisé, extrudé par la tête d'injection [228, 229] ;
- la **réticulation post-injection**. La bioencre est ici une solution polymérique injectée sous forme liquide, réticulée une fois imprimée par l'une des approches suivantes :
 - par **photoréticulation** sous l'effet d'un rayonnement ultraviolet [230, 231] ;
 - par **réticulation ionotropique** qui consiste à injecter un polymère chargé dans une solution de contre-ion (p. ex., injecter de l'alginate dans une solution d'ions calcium [232]) ;
 - par **thermogélation** où la réticulation est provoquée par un changement de température post-injection [233, 234] ;

Avec ces approches, la réticulation doit être très rapide pour ne pas perdre les propriétés topologiques conférées lors de l'impression. Cela limite donc les chimies de réticulation utilisables [206] ;

- la **lithographie multiphotons**. Avec cette approche, il n'y a pas d'injection de bioencre. L'hydrogel est directement bio-imprimé dans l'espace, en éclairant une solution de polymère photoréticulable par un faisceau laser concentré, un microvolume à la fois [235, 236]. C'est l'approche qui permet la plus grande précision d'impression, avec une résolution de l'ordre de la centaine de nanomètres [206], mais elle est en pratique trop lente pour la conception d'échafaudages dont les dimensions sont supérieures à $\sim 500 \mu\text{m}$.

Sur le principe, la bioimpression 3D semble être l'approche la plus prometteuse pour la conception d'hydrogels macroporeux pour la culture de cellules en 3D. La conception assistée par ordinateur permet de moduler à volonté la taille, la structure, l'orientation ou encore la distribution des pores. Cependant, les techniques de bioimpression ne sont pas encore pleinement matures. À l'exception de la lithographie multiphotons, elles ont une résolution encore trop grossière ($\sim 10 \mu\text{m}$) pour permettre des applications fines en génie tissulaire [206].

Modelage sacrificiel

L'approche de modelage sacrificiel consiste à générer un gabarit monolithique solide sur lequel la solution polymérique est ensuite moulée. Après réticulation de l'hydrogel *in situ*, le monolithe est dissous de façon sélective. L'hydrogel obtenu est l'image négative du monolithe initial. Le défi technique ne se trouve donc plus au niveau de l'étape de réticulation, mais en amont, au moment de la conception du gabarit. Nous présentons ici deux techniques permettant de produire des gabarits monolithiques macroporeux :

- l'**impression 3D** du monolithe [237,238], selon les principes déjà énoncés dans la section 2.3.2 ;
- la production du monolithe à partir d'un **mélange de polymères co-continu** [239].

L'utilisation de mélanges de polymères co-continus pour produire des monolithes macroporeux a été initialement proposée par Sarazin *et al.* [240]. Deux polymères non miscibles, le PLA et le polystyrène (PS), sont fondus, mélangés et co-extrudés sous leur forme liquide, puis immédiatement refroidis, ce qui a pour effet de figer la morphologie en solidifiant la tige extrudée. Le produit solide obtenu présente deux phases co-continues, parfaitement interpénétrées. Les tiges sont alors recuites ("annealing"), ce qui provoque la coalescence des deux phases. Plus le temps de recuit est long, plus la morphologie des phases épaissit et moins la morphologie est tortueuse, mais le mélange conserve sa co-continuité. Le PS est ensuite extrait dans du cyclohexane, permettant d'obtenir un monolithe de PLA macroporeux [240]. Ce moule peut ensuite être utilisé comme gabarit pour le modelage d'hydrogels macroporeux parfaitement interconnectés, comme proposé dans plusieurs études [239, 241, 242].

Cette approche repose sur les mêmes principes que les mélanges biphasiques co-continus (cf. section 2.3.2), mais offre un meilleur contrôle sur la morphologie de l'hydrogel. En effet, (i) les propriétés du gabarit sont connues avant la réticulation, ce qui permet de contrôler la morphologie finale du gel, et (ii) travailler avec une **phase solide** permet de **figer la morphologie**, et ainsi de s'affranchir des phénomènes de coalescence pendant la réticulation.

– À retenir –

STRATÉGIES DE FABRICATION D'HYDROGELS MACROPOREUX

Parmi les stratégies de fabrication présentées dans cette section, seules trois permettent *a priori* de garantir l'obtention d'un **réseau de macropores interconnecté**, indispensable pour des applications en génie tissulaire :

- les deux approches reposant sur l'utilisation de mélanges co-continus, soit :

- (i) la réticulation au sein d’une émulsion, qui ne permet pas de contrôler facilement la taille des macropores ;
- (ii) l’utilisation d’un gabarit sacrificiel, où la taille et l’homogénéité des pores sont déterminées par le gabarit solide utilisé ;
- la bioimpression 3D.

La bioimpression 3D présente des avantages très nets par rapport aux autres approches, notamment car elle permet d’intégrer facilement une **orientation** ou des **motifs** définis dans les macropores. Cette technologie a cependant le désavantage d’être peu répandue à l’heure actuelle. Dans de nombreux cas, on lui préférera le **modelage sacrificiel** qui permet également d’obtenir des hydrogels macroporeux aux propriétés prédictibles et reproductibles.

2.3.3 Les hydrogels macroporeux en génie tissulaire

Les propriétés mécaniques favorables ainsi que le degré d’hydratation élevé des hydrogels en font des candidats d’intérêt pour la culture de cellules en 3D. Le développement d’approches permettant d’établir un réseau de macropores à l’intérieur des hydrogels valide d’autant plus ce potentiel [15,206,255]. Des exemples d’utilisation d’hydrogels macroporeux pour la culture cellulaire en 3D sont présentés dans le tableau 2.5.

2.4 Biofonctionnalisation des biomatériaux

Dans les sections précédentes, nous avons établi qu’une plateforme de culture cellulaire en 3D pour le génie tissulaire devait pouvoir fournir un certain nombre de signaux biochimiques aux cellules. Si certains biomatériaux possèdent nativement cette capacité, ce n’est pas le cas des biomatériaux inertes, que l’on privilégie par ailleurs pour leur bonne définition (cf. section 2.2). **Biofonctionnaliser** ces biomatériaux consiste à **incorporer des biomolécules actives** qui seront conjuguées au substrat. Le choix des biomolécules ainsi que la stratégie d’incorporation dépendent de l’application visée. Dans cette section, nous présentons les principales classes de molécules actives d’intérêt pour le génie tissulaire, ainsi que les approches de biofonctionnalisation les plus courantes.

TABLEAU 2.5 Exemples d'utilisation d'hydrogels macroporeux comme supports pour la culture de cellules en 3D en génie tissulaire.

Organe / Tissu	Matériau & Fabrication	Application	Référence
Cartilage	Alginate réticulé autour de billes de gélatine	Prolifération de chondrocytes dans les macrocavités	[243]
	Acide hyaluronique réticulé autour de billes de gélatine	Prolifération de chondrocytes dans les macrocavités	[244]
	Dextran/lysate plaquettaire préparé par cryogélation	Différenciation chondrogénique de cellules souches adipeuses	[245]
Cerveau	Dextrane préparé par émulsion avec du PEG	Adhésion de cellules nerveuses et formation de neurites	[246]
	Cryogel de PEG	Différenciation de cellules progénitrices neurales	[247]
Foie	Alginate réticulé autour de billes de gélatine	Différenciation de cellules souches embryonnaires et de cellules souches pluripotentes induites en hépatocytes	[248]
Muscle	Cryogel d'alginate	Augmentation de la signalisation paracrine de cellules souches mésenchymateuses. Différenciation de myocytes et formation de myotubes	[249]
Os	Acide hyaluronique préparé sur un gabarit sacrificiel	Différenciation adipogénique ou ostéogénique de cellules souches mésenchymateuses selon la taille des macropores	[250]
	Gélatine préparée par émulsion à haut rapport de phase interne	Adhésion et prolifération de cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse	[251]
Vaisseaux sanguins	Acide hyaluronique réticulé autour de billes de gélatine	Migration et prolifération de cellules endothéliales vasculaires	[252]
	Gélatine-alginate bioimprimé (réticulation ionotropique)	Prolifération de cellules endothéliales et angiogénèse <i>in vivo</i>	[253]
	Dextrane réticulé autour de cristaux de sel	Colonisation, survie et prolifération de cellules endothéliales vasculaires	[208]
	PEG préparé par moussage gazeux	Colonisation, survie et prolifération de cellules endothéliales vasculaires	[254]

2.4.1 Biofonctionnaliser : avec quelles biomolécules ?

Protéines et motifs adhésifs

À l'exception des cellules hématopoïétiques, les cellules utilisées en génie tissulaire sont **ancrage-dépendantes**, c'est-à-dire qu'elles nécessitent un support et un mécanisme d'ancrage

pour survivre et proliférer [256]. Dans le microenvironnement cellulaire natif, l'ancrage cellulaire est assuré par les composants de la MEC (cf. section 2.1.2), en particulier la fibronectine, la vitronectine et la laminine. Biofonctionnaliser les biomatériaux inertes avec des motifs biochimiques permettant l'ancrage des cellules est donc un pré-requis pour toute plateforme de culture cellulaire en 3D [257]. On peut envisager deux approches : (i) l'incorporation directe de protéines de la MEC ou (ii) l'incorporation de **motifs peptidiques** correspondant aux **sites d'ancrage des cellules sur les protéines de la MEC**. En pratique, les peptides sont davantage utilisés :

- contrairement aux protéines complètes, ils ne risquent pas la dénaturation [258] ;
- ils sont moins susceptibles de provoquer une réaction immunitaire *in vivo* [257] ;
- en utilisant des peptides, on s'assure de maintenir la **bonne définition** de la plateforme et de ne pas introduire de propriétés non désirées. En effet, (i) promouvoir l'adhésion cellulaire n'est pas la seule fonction des protéines de la MEC et (ii) toutes les fonctions des protéines de la MEC ne sont pas connues ou bien caractérisées [258].

Le motif adhésif le plus utilisé en génie tissulaire est le peptide Arg-Gly-Asp (RGD). Initialement dérivé de la fibronectine (séquence RGDS), ce motif se retrouve dans plusieurs autres protéines de la MEC [257]. Le motif RGD peut se lier à **plusieurs sous-types d'intégrines** et promeut l'adhésion pour la **majorité des types cellulaires** [46, 257].

D'autres peptides peuvent également être utilisés pour promouvoir l'adhésion des cellules sur un support de culture en 3D, notamment :

- Pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN), dérivé de la fibronectine. PHSRN est connu sous le nom de "peptide de synergie" en raison de son **effet synergique sur l'adhésion cellulaire lorsqu'utilisé en combinaison avec RGD**. Utilisé seul, il promeut l'adhésion cellulaire via les intégrines du sous-type $\alpha 5\text{-}\beta 1$, bien que son affinité pour les intégrines soit plus faible que celle de RGD [259] ;
- Arg-Glu-Asp-Val (REDV), également dérivé de la fibronectine. REDV promeut l'adhésion cellulaire via les intégrines du sous-type $\alpha 4\text{-}\beta 1$ [257] ;
- Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg (YIGSR), dérivé de la laminine. Il promeut l'adhésion cellulaire via la protéine de liaison à la laminine ("*laminin-binding protein*") [260].

Contrairement à RGD, ces peptides ne se lient qu'à un sous-type de récepteurs. Ils sont dès lors **spécifiques aux cellules qui expriment ces récepteurs**, ce qui les rend intéressants pour des applications en génie tissulaire, car ils peuvent promouvoir l'adhésion et la prolifération d'un ou plusieurs types cellulaires précis.

La quantité de peptides d'adhésion dans un échafaudage de culture en 3D peut influencer sur le comportement des cellules, notamment la vitesse de migration et la polarisation [261]. Le

mode de présentation et la distribution des peptides dans l'espace sont également importants : ainsi, la présentation de peptides d'adhésion en grappe améliore l'adhésion et la prolifération par rapport à une présentation homogène [262–264].

Facteurs de croissance

Comme exposé dans la section 2.1.3, la présence de facteurs de croissance est essentielle au bon développement d'un tissu. En génie tissulaire, l'approche la plus directe consiste à apporter les facteurs de croissance sous forme soluble dans le milieu de culture, mais cette stratégie possède plusieurs inconvénients :

- les facteurs de croissance solubles sont internalisés en même temps que les récepteurs, mais ne sont pas toujours recyclés (cf. section 2.1.3). Dès lors, la concentration des facteurs de croissance diminue rapidement après leur ajout ;
- l'utilisation exclusive de facteurs de croissance en solution ne permet pas d'émuler le mode d'action non diffusif des facteurs de croissance (cf. section 2.1.3), et ne rend donc pas totalement compte des conditions physiologiques natives.

Dès lors, biofonctionnaliser des biomatériaux avec des facteurs de croissance est essentiel pour des applications en génie tissulaire [257, 265]. Parmi les facteurs de croissance les plus utilisés, on recense notamment :

- EGF, pour promouvoir la prolifération et la migration de multiples types cellulaires [266–269] ;
- VEGF ou le peptide mimétique de VEGF², utilisés pour promouvoir l'angiogénèse via la prolifération et la migration de cellules endothéliales [254, 270–274] ;
- les TGFs et en particulier les TGF- β , pour promouvoir la prolifération, la chimiotaxie et la sécrétion de MEC par de multiples types cellulaires [275, 276] ;
- les BMPs pour promouvoir la différenciation des tissus adipeux, osseux ou cartilagineux [270, 272].

Selon l'application visée, d'autres protéines bioactives telles que des hormones peuvent être incorporées dans un échafaudage de culture cellulaire en 3D. C'est par exemple le cas de l'insuline [277] ou encore de cytokines [278].

2. Peptide de séquence Lys-Leu-Thr-Trp-Gln-Glu-Leu-Tyr-Gln-Leu-Lys-Tyr-Lys-Gly-Ile (KLTWQELY-QLKYKGI), aussi appelé "peptide QK".

Micro- et nanoparticules

Les micro- (μ Ps) et nanoparticules (NPs) sont des objets dont les dimensions caractéristiques typiques sont de l'ordre de quelques dizaines de micromètres (μ Ps) ou quelques dizaines de nanomètres (NPs). On peut les catégoriser en fonction de leur matériau de base, qui contrôle leurs propriétés :

- les particules **lipidiques**, comme les liposomes, sont principalement utilisées pour encapsuler des molécules actives (i) hydrophobes, au cœur de la bicouche lipidique, ou (ii) hydrophiles, dans le compartiment aqueux délimité par la bicouche lipidique [279] ;
- les particules **polymériques** sont également utilisées pour l'encapsulation de molécules actives [280]. Leur principe d'utilisation dépend de leur structure :
 - les **nanocapsules** sont composées d'une couche de polymère qui entoure un compartiment aqueux. La molécule encapsulée est généralement hydrophile, et confinée dans ce compartiment central ;
 - les **nanosphères** sont composées d'un réseau polymérique plein. La molécule encapsulée est généralement hydrophobe. Des interactions hydrophobes la retiennent dans la particule ;
 - les **micelles** sont composées de copolymères portant un bloc hydrophobe et un bloc hydrophile. Elles adoptent une organisation radiale où un cœur hydrophobe, encapsulant des molécules hydrophobes, est entouré d'une couronne hydrophile ;
 - les **micro-** et **nanogels** sont composés de polymères hydrophiles réticulés. La molécule encapsulée, généralement hydrophile, est retenue par le treillis polymérique [281] ;
- les NPs **métalliques** – or, argent, alliages métalliques, etc. – sont reconnues pour leurs propriétés physiques, notamment optiques ou électromagnétiques [282]. Bien qu'elles soient formées de matériaux souvent toxiques, leur fonctionnalisation de surface avec des polymères inertes comme le PEG permet d'améliorer leur biocompatibilité ;
- les particules **inorganiques non métalliques** – silice, carbone, minéraux, céramiques, etc. [283, 284].

Incorporer des μ Ps ou des NPs dans un échafaudage de culture cellulaire permet d'étendre les propriétés de celui-ci, en y ajoutant les propriétés intrinsèques des particules, ainsi que celles des molécules actives encapsulées ou conjuguées à la surface des NPs. Ainsi, les plateformes composites échafaudage/particules sont présentes dans trois catégories d'applications :

- la **livraison contrôlée** de principes actifs ou de facteurs de croissance au voisinage immédiat des cellules en culture. Les μ Ps et NPs sont alors utilisées comme réservoirs,

permettant (i) de protéger les molécules encapsulées de la dégradation, (ii) d'assurer l'apport de molécules bioactives à moyen voire long terme et (iii) d'augmenter le nombre de molécules incorporées à l'hydrogel sans multiplier les réactions de biofonctionnalisation. La libération des molécules encapsulées peut se faire de façon passive, par diffusion hors des particules ou par dégradation de celles-ci, ou en réponse à un stimulus – changement de température ou de pH, réaction à la présence d'une molécule dans le milieu, etc. [280] ;

- la **présentation en grappe** de molécules à la surface des particules, notamment des motifs adhésifs ou des facteurs de croissance. Cette approche permet d'augmenter l'activité biologique des molécules grâce aux **effets d'avidité** induits par l'augmentation locale de la **valence des interactions** [285, 286] ;
- l'**utilisation des propriétés intrinsèques des particules**.

Des exemples de plateformes de culture cellulaire incorporant des μ Ps ou des NPs pour des applications en génie tissulaire sont présentées dans le tableau 2.6.

2.4.2 Les approches de biofonctionnalisation

Biofonctionnaliser un matériau consiste à conjuguer une entité bioactive – peptide, protéine, NP, etc. – à la surface ou dans le volume du biomatériau. Les objets conjugués doivent respecter certains critères [296] :

- **bioactivité** : les réactions chimiques utilisées ne doivent pas dénaturer l'objet ou impliquer son site actif ;
- **biodisponibilité** : l'objet conjugué et son site actif doivent être accessibles par leurs récepteurs.

Pour simultanément préserver la bioactivité et assurer la biodisponibilité des biomolécules conjuguées, on cherche à biofonctionnaliser les matériaux par des réactions :

- **biocompatibles**. Les réactions doivent se dérouler en phase aqueuse, dans des conditions (température, pH, etc.) dans lesquelles la biomolécule conjuguée est stable ;
- **spécifiques**. Les groupes réactionnels impliqués doivent être présents seulement sur les molécules d'intérêt. La réaction de biofonctionnalisation doit être la seule réaction possible dans les conditions expérimentales et l'environnement choisis. Comme ce critère implique l'utilisation de groupes réactionnels peu répandus, il est souvent nécessaire de pré-fonctionnaliser le biomatériau et la biomolécule pour introduire les groupes réactionnels d'intérêt. Pour le biomatériau, cette fonctionnalisation se fait la plupart du temps via une réaction chimique. La stratégie de fonctionnalisation de la biomolécule

TABLEAU 2.6 Exemples d'utilisation de plateformes composites échafaudages/particules comme supports pour la culture de cellules en 3D en génie tissulaire. IGF : facteur de croissance analogue à l'insuline ("*insulin-like growth factor*"). PVA : alcool polyvinylique ("*polyvinyl alcohol*")

Catégorie	Plateforme composite	Application	Référence
Livraison contrôlée	μPs d'alginate et de PLGA dans des hydrogels de chitosane	Livraison séquentielle de BMP-6 et de IGF-1 pour la culture de cémentoblastes	[287]
	Microsphères de PLGA-fibronectine dans des hydrogels de méthylcellulose	Livraison du facteur neurotrophique dérivé du cerveau pour promouvoir la différenciation neuronale de cellules souches mésenchymateuses	[169]
	μPs de PLGA dans un hydrogel de PVA entouré de fibres de PGA	Livraison de IGF-1 pour la culture de chondrocytes et la formation de cartilage <i>in vivo</i>	[288]
	μPs de gélatine dans une bioencre à base d'alginate	Livraison de BMP-2 pour la différenciation ostéogénique de cellules stromales multipotentes	[289]
Présentation en grappe	NPs de silice dans des fibres d'amphiphiles peptidiques	Présentation en grappe de RGD et PHSRN pour améliorer l'adhésion et l'étalement de fibroblastes	[290]
	NPs d'or dans un hydrogel d'alginate	Présentation en grappe de REDV pour améliorer l'angiogénèse <i>in vivo</i>	[291]
Propriétés des particules	Nanobâtons d'or dans une bioencre à base d'alginate et de gélatine	Bioimpression d'un échafaudage conducteur pour la culture de fibroblastes cardiaques	[292]
	Nanotubes de carbone dans un hydrogel de gélatine	Échafaudage conducteur pour la culture de cardiomyocytes	[293]
	NPs d'argent dans un hydrogel de PEG	Hydrogel antibactérien pour la régénération osseuse <i>in vivo</i>	[294]
	NPs d'argent dans des hydrogels de collagène	Hydrogel antibactérien pour la culture de fibroblastes et de kératynocytes	[295]

dépend de sa nature. Pour un peptide ou une protéine recombinante, on peut ajouter à la séquence un acide aminé – naturel ou non naturel – portant le groupe fonctionnel d'intérêt. Pour une μP ou une NP, on peut envisager la fonctionnalisation via un ligand bifonctionnel ;

- **orientées.** Les réactions doivent permettre la bonne exposition du site actif pour faciliter son interaction avec les récepteurs. Typiquement, on choisit un groupe réactionnel situé à l'opposé du site actif sur la biomolécule. Il est également possible d'utiliser un espaceur pour éloigner la biomolécule de la surface du biomatériau et limiter ainsi

l'encombrement stérique.

Dans cette section, nous nous concentrons sur les stratégies de biofonctionnalisation qui respectent ces trois conditions. D'autres approches, notamment non spécifiques ou non orientées, sont cependant couramment utilisées pour leur commodité. Elles sont passées en revue dans les références [257, 265, 297].

Les réactions chimiques bioorthogonales

Les réactions bioorthogonales sont des réactions de couplage covalent **site-spécifiques** et **bio-compatibles**. Elles peuvent se dérouler en conditions physiologiques, dans des milieux biologiques complexes, sans interférer avec les processus natifs [296]. En particulier, les réactions chimiques dites "clic" sont des réactions bioorthogonales à haut rendement qui ne produisent pas de sous-produits, ou dont les sous-produits ne sont pas toxiques. Parmi les réactions les plus utilisées pour la biofonctionnalisation de biomatériaux, on compte :

- le couplage **thiol-ène** (thiol + alcène $\rightarrow$ thioéther) [298]. En pratique, la biofonctionnalisation par couplage thiol-ène d'un matériau avec un peptide ou une protéine se fait via les **cystéines**, nativement présentes ou incorporées artificiellement dans la séquence. Le couplage thiol-ène nécessite la présence d'un catalyseur, qui peut être :
 - (i) un **radical libre** formé par la chaleur ou un rayonnement ultra-violet [299]. Cette approche peut être utilisée pour introduire un motif spatial de fonctionnalisation par masquage [300]. Cependant, la présence de radicaux libres ou l'irradiation peuvent endommager les cellules et protéines présentes dans l'échafaudage ;
 - (ii) un **nucléophile** – on parle alors d'**addition thiol-Michael** [301]. Parmi les alcènes les plus utilisés pour les additions thiol-Michael, on trouve les vinylsulfones [208, 302], les maléimides [303] ou les métacrylates [304].

La sensibilité des thiols à l'oxydation (thiol + thiol $\rightarrow$ disulfide) peut diminuer les rendements de couplage thiol-ène [296] ;

- la **cycloaddition azoture-alcyne** (CAA) (azoture + alcyne $\rightarrow$ triazole), dont on distingue deux principales variantes :
 - (i) la **CAA catalysée au cuivre I**, aussi appelée cycloaddition de Huisgen [305, 306]. Cette réaction nécessite l'utilisation d'un réducteur pour empêcher l'oxydation de Cu(I) en Cu(II). En raison de la cytotoxicité de Cu(I), celui-ci doit être utilisé en conjonction avec un ligand séquestrateur ou être éliminé avant toute utilisation en présence de cellules [296, 305] ;
 - (ii) la **CAA favorisée par contrainte de cycle**, qui permet la réaction d'un azoture avec un cyclooctyne sans nécessiter de catalyse au cuivre [307].

Les groupes fonctionnels alcyne et azoture ne réagissent pas avec d'autres groupes fonctionnels [296], ce qui assure la spécificité des réaction de CAA. Cependant, comme ils ne sont pas nativement présents dans les peptides et protéines, ils doivent être incorporés artificiellement, par exemple par l'intermédiaire d'acides aminés non naturels comme l'azidohomoalanine (Aha) ;

- la **cycloaddition de Diels-Alder** (diène + alcène substitué $\rightarrow$ cyclohexène substitué). Plus lente que la CAA et le couplage thiol-ène, elle a l'avantage de ne former aucun sous-produit [296, 308] .

Les approches de conjugaison enzymatique

Les stratégies de couplage enzymatique reposent sur des **réactions métaboliques natives** et sont donc intrinsèquement physiologiquement compatibles. Elles permettent de limiter le recours à des intermédiaires chimiques. Elles sont basées sur la présence de **motifs de reconnaissance**, typiquement des peptides courts, sur les biomatériaux et la biomolécule d'intérêt [296]. Plusieurs systèmes enzymatiques ont été documentés pour la biofonctionnalisation de biomatériaux pour le génie tissulaire, parmi lesquels :

- la **sortase A**, qui est une transpeptidase d'origine bactérienne. Elle catalyse la formation d'une liaison peptidique entre une séquence de polyglycine et le motif de reconnaissance Leu-Pro-Xxx-Thr-Gly (LPXTG). Cette stratégie a notamment été utilisée pour biofonctionnaliser des hydrogels de PEG avec EGF [309]. Le couplage catalysé par la sortase A est stable et spécifique, mais a des rendements faibles. En effet, le produit obtenu contient également le motif LPXTG : il est donc encore reconnaissable par la sortase A et peut être découplé du biomatériau ;
- la **transglutaminase**. Cette enzyme catalyse la formation de liens isopeptidiques entre les chaînes latérales de la glutamine (carboxyl) et des amines primaires. Ses motifs de reconnaissance sont (i) un substrat acétylé (Ac) contenant une lysine, Ac-Phe-**Lys**-Gly et (ii) un motif contenant une glutamine, Asn-**Gln**-Glu-Gln-Val-Ser-Pro-Leu. Le couplage par la transglutaminase a notamment été utilisé pour fonctionnaliser des hydrogels de PEG avec VEGF [310] ;
- les **peroxydases**, qui permettent le couplage oxydatif entre deux phénols en présence de peroxyde d'hydrogène. Cette approche a été utilisée pour incorporer le motif peptidique RGD dans des hydrogels d'acide hyaluronique [311].

Les systèmes d'affinité

La biofonctionnalisation par effet d'affinité est une approche non covalente qui exploite la forte affinité de liaison entre deux ou plusieurs partenaires. Il s'agit donc d'un couplage réversible : l'équilibre entre les formes libre et liée est déterminé par la constante de dissociation K_D du système d'affinité [296, 312, 313]. Les systèmes d'affinité utilisés pour la biofonctionnalisation de biomatériaux peuvent être classés selon trois catégories :

1. les **partenaires biologiques natifs**, directement inspirés du vivant, tels que :
 - l'**héparine** et certains **facteurs de croissance**. La séquestration des facteurs de croissance dans la MEC est assurée par l'héparine et l'héparane sulfate. Il s'agit d'une interaction électrostatique entre les groupes sulfate chargés négativement sur l'héparine et les facteurs de croissance [314]. Ce système d'affinité a été utilisé pour biofonctionnaliser des biomatériaux à base d'héparine avec plusieurs facteurs de croissance, notamment EGF [315, 316], VEGF [317] ou BMP-2 [317, 318], ou encore pour recruter des facteurs de croissance *in vivo* [319] ;
 - le système **biotine/(strept)avidine**, d'origine bactérienne. Avec un $K_D \sim 10^{-14}$ M, c'est l'une des interactions les plus fortes recensées dans la nature. Ce système a été utilisé pour fonctionnaliser des biomatériaux avec des facteurs de croissance [320, 321] ou des anticorps monoclonaux [322, 323] ;
 - le **collagène** et les **domaines de liaison au collagène** ("*collagen binding domains*", CBDs). Ainsi, l'utilisation de protéines de fusion portant un CBD permet la fonctionnalisation de biomatériaux contenant du collagène [324] ;
 - les couples **anticorps/antigène**. Biofonctionnaliser un matériau avec un anticorps ou son fragment Fab permet ensuite la capture de son antigène par effet d'affinité. Ainsi, des anticorps anti-polyhistidine ont été utilisés pour immobiliser BMP-2 portant une étiquette polyhistidine dans des hydrogels de collagène [325] ;
2. les **cages moléculaires** telles que les cyclodextrines. Les cyclodextrines sont des polysaccharides cycliques composés de six, sept ou huit unités de glucose qui délimitent un cœur hydrophobe. L'utilisation de cyclodextrines peut permettre la capture de petites (quelques ångströms) molécules hydrophobes dans un hydrogel [326, 327] ;
3. les **systèmes d'affinité synthétiques**, tels que :
 - les **aptamères**, qui sont des oligonucléotides conçus pour se lier avec une forte affinité à une protéine apparentée [312]. Plusieurs groupes ont utilisé des aptamères pour fonctionnaliser des hydrogels avec (i) des facteurs de croissance [254, 328, 329] ou (ii) d'autres oligonucléotides à effet thérapeutique [330] ;

- les **complexes superhélice**, présentés en détail dans la section 2.4.3 ;
- les **peptides d'affinité**. Ces systèmes sont composés de deux peptides ou d'un peptide et d'une protéine, et sont souvent bioinspirés. Les couples formés (i) du domaine d'homologie SRC 3 (SH-3) et du peptide de liaison à SH-3 [331–333] ou encore (ii) de bFGF et du peptide Lys-Arg-Thr-Gly-Gln-Tyr-Lys-Leu [334] sont des exemples de tels systèmes.

Les systèmes d'affinités présentés ici nécessitent l'utilisation de protéines de fusion ou des étapes préalables de fonctionnalisation pour que le matériau et la protéine d'intérêt puissent interagir. Cependant, une fois cette pré-fonctionnalisation effectuée, l'interaction se produit en conditions physiologiques, sans nécessiter la présence d'intermédiaires réactionnels et sans former de sous-produits. Ces systèmes ont des affinités variées, ce qui permet de contrôler l'équilibre entre les formes séquestrée et libre de la protéine d'intérêt [313]. Les systèmes d'affinité sont donc des outils polyvalents pour la biofonctionnalisation de biomatériaux.

2.4.3 Les complexes superhélice comme systèmes d'affinité bioinspirés

Le terme "superhélice" désigne le complexe formé lorsque deux ou plusieurs hélices α s'auto-assemblent en s'enroulent les unes autour des autres [335, 336]. Nativement, ces complexes se trouvent typiquement dans les macroprotéines structurales, comme la kératine ou la fibrine, que les superhélices contribuent à stabiliser [337, 338]. On recense des superhélices dites "gauches" et "droites", en fonction du sens d'enroulement des hélices α .

Conception de superhélices de synthèse

La structure d'une superhélice est déterminée par la séquence des hélices α qui la composent. En respectant certains principes, il est donc possible (i) de concevoir *de novo* et (ii) d'optimiser des superhélices de synthèse [339–344]. Dans ce paragraphe, nous nous intéressons aux superhélices gauches composées de deux hélices α , qui sont à la fois les plus étudiées et les plus pertinentes dans le cadre de ce travail de recherche.

Ces superhélices sont stabilisées par des interactions interhélices entre les chaînes latérales des acides aminés de chaque hélice α . Si l'on note $(abcdefg)_n$ et $(a'b'c'd'e'f'g')_n$ les séquences respectives des deux hélices α , n étant le nombre d'heptades composant chaque hélice, alors la formation des complexes se fait selon les principes suivants (un exemple est représenté figure 2.3) [335] :

- Les positions a , a' , d et d' sont occupées par des **résidus hydrophobes**. Ces résidus forment le **cœur de la superhélice**, stabilisé par des interactions hydrophobes entre les

résidus b et b' d'une part, e et e' d'autre part ;

- Les positions b , b' , c , c' , f et f' sont occupées par des **résidus hydrophiles** dont la chaîne latérale est exposée en surface de la superhélice ;
- Les positions e , e' , g et g' sont occupées par des **résidus polaires**. Choisir des résidus chargés permet de favoriser la formation d'hétérodimères, grâce aux interactions électrostatiques entre les résidus f' et a d'une part et f et a' d'autre part.

Ainsi, le choix des résidus utilisés dans chaque position va déterminer [339, 342, 345] :

- la stabilité de l'interaction ;
- l'orientation (parallèle ou antiparallèle) des deux hélices ;
- la composition du complexe (homo- ou hétérodimère).

La superhélice E/K

La **superhélice parallèle E/K** (figure 2.3) est constituée des peptides **Ecoil** et **Kcoil**, synthétisés *de novo* en 1996 par Chao *et al.* [346]. Leur séquence est la suivante (nomenclature (gabcdef)_n) :

- E-coil : **(EVSALEK)_n** où $n \geq 3$ (généralement, $n = 5$) ;
- K-coil : **(KVSALKE)_n** où $n \geq 3$ (généralement, $n = 5$).

La superhélice E/K est très stable ($K_D \sim 100$ pM [340, 347]), y compris en conditions non physiologiques et en présence d'agents dénaturants [348]. Son affinité peut être modulée de plusieurs façons :

1. en changeant le nombre d'heptades. Ainsi, l'hétérodimère E_4/K_3 a un $K_D \sim 20$ μ M [340] ;
2. en substituant certains résidus, typiquement au niveau du cœur hydrophobe, pour déstabiliser le complexe. Ainsi, introduire une, deux ou trois substitutions leucine $\rightarrow$ alanine dans les heptades centrales du peptide Kcoil permet d'augmenter le K_D de l'hétérodimère E_5/K_5 de un, deux ou trois ordres de grandeur, respectivement [347].

Des travaux antérieurs de notre groupe de recherche ont permis de systématiser l'utilisation de la superhélice E/K pour la biofonctionnalisation de matériaux, grâce à une approche en trois étapes :

1. la **production de protéines recombinantes** [349–352] ou de NPs [353, 354] portant une ou plusieurs étiquettes Ecoil ;

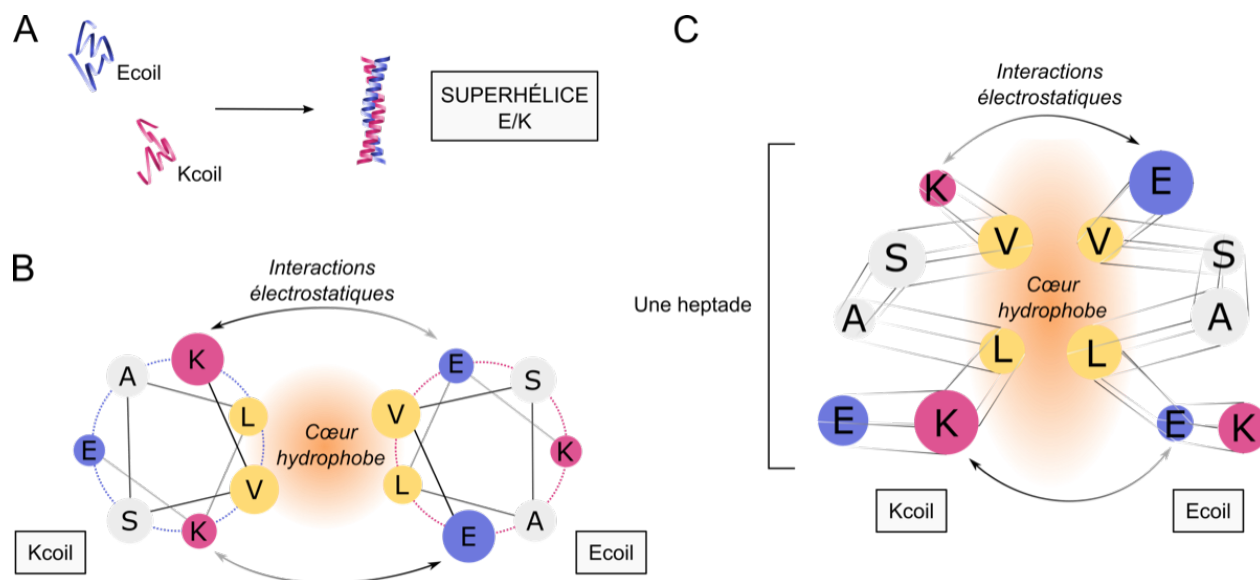


FIGURE 2.3 La superhélice E/K. (A) Les peptides Ecoil et Kcoil ont une conformation aléatoire en solution. Une fois en présence l'un de l'autre, ils s'auto-assemblent pour former une superhélice gauche parallèle. (B-C) Vue du dessus (B) et vue latérale (C) d'une heptade de la superhélice E/K. Sous-figure (B) adaptée de [340].

2. la **fonctionnalisation** de revêtements polymères [302, 355–357], de NPs ou nanobâtons d'or [354, 358] et d'hydrogels [352, 353] avec le peptide Kcoil ;
3. la **capture du ligand étiqueté avec Ecoil par le substrat fonctionnalisé avec Kcoil**.

Nous avons utilisé cette approche de biofonctionnalisation pour de multiples applications, incluant (i) le développement de revêtements pour la culture cellulaire [302, 355, 356], (ii) la livraison contrôlée par des hydrogels [352, 353] ou (iii) l'optimisation d'essais biologiques et d'essais de biocapteurs [359–361]

D'autres groupes ont utilisé des analogues des peptides Ecoil et Kcoil [362] pour d'autres applications, comme (i) l'autoassemblage d'hydrogels [363] ou (ii) le contrôle de la perméabilité de liposomes pour la livraison contrôlée de médicaments [364]. Cette dernière étude est particulièrement pertinente : elle ouvre la voie à l'utilisation de la superhélice E/K pour contrôler temporellement, par des mécanismes compétitifs, la libération d'un principe actif encapsulé.

– RÉCAPITULATIF –

BIOFONCTIONNALISATION DES BIOMATÉRIAUX

La biofonctionnalisation permet de conférer des propriétés biologiques à des matériaux nativement inertes. Cette approche s'inscrit dans le cadre de la conception, selon un processus ascendant, de **biomatériaux bien définis** : pour chaque propriété souhaitée, on biofonctionnalise le matériau avec une biomolécule spécialisée.

Ainsi, en génie tissulaire, les principales catégories de biomolécules utilisées pour la fonctionnalisation de biomatériaux sont :

- les **peptides d'adhésion** pour promouvoir l'adhésion cellulaire ;
- les **facteurs de croissance** pour contrôler le destin cellulaire ;
- des **μPs et NPs**, qui permettent notamment (i) l'encapsulation et la livraison contrôlées de molécules ou protéines et (ii) la présentation en grappe de molécules en surface des particules.

Les approches basées sur l'affinité sont des stratégies de choix pour la biofonctionnalisation des biomatériaux. Les complexes superhélice, et en particulier la **superhélice E/K**, en sont un exemple polyvalent :

- les peptides Ecoil et Kcoil sont faciles à intégrer à des protéines recombinantes ou à greffer sur des biomatériaux. Certains objets peuvent également porter plusieurs étiquettes Ecoil, ce qui augmente leur affinité pour les matériaux fonctionnalisés avec Kcoil ;
- ils permettent la **multifonctionnalisation** simultanée de biomatériaux avec plusieurs protéines recombinantes ou μP/NPs ;
- l'affinité de la superhélice E/K peut être modulée en changeant le nombre d'heptades ou en changeant certains résidus.

2.5 Stratégies de vascularisation en génie tissulaire

La vascularisation des néo-tissus est un défi à part entière en génie tissulaire. En effet, les tissus d'une épaisseur supérieure à $\sim 200 \mu\text{m}$ doivent être vascularisés pour assurer les apports en oxygène et en nutriments ainsi que l'élimination des déchets métaboliques [22, 365]. Deux principales stratégies s'opposent :

1. la **vascularisation post-implantation**. Avec cette approche, les néo-tissus implantés ne sont pas vascularisés ni matures. L'implant induit sa propre vascularisation *in situ* en recrutant le réseau de vaisseaux existant. Pour cela, on utilise des biomatériaux fonctionnalisés avec des facteurs de croissance pro-angiogéniques, tels VEGF, qui vont stimuler l'angiogénèse bourgeonnante et ainsi promouvoir l'intégration du néo-tissu aux

tissus natifs [22] ;

2. la **pré-vascularisation** dans la plateforme, avant l’implantation. Cette stratégie consiste à développer *in vitro*, simultanément au développement du néo-tissu, des structures vasculaires qui seront connectées au réseau sanguin existant après l’implantation. Cette approche permet de développer des tissus plus épais et plus matures, car ils présentent une vascularisation intrinsèque [365,366].

La vascularisation *in vivo* implique un contrôle fin de l’apport en facteur de croissance. En effet, un excès de VEGF ou un mauvais contrôle spatio-temporel de son expression peut provoquer une croissance anormale des vaisseaux [22,367].

Dans la suite de cette section, nous nous concentrons sur les approches de pré-vascularisation *in vitro*, qui font l’objet de ce travail de recherche.

2.5.1 L’endothélialisation des implants

La formation d’un endothélium organisé autour d’un lumen est un pré-requis pour le développement d’une vasculature fonctionnelle [366]. Dès lors, tout implant pré-vascularisé doit intégrer des cellules endothéliales. Celles-ci peuvent être obtenues de plusieurs façons :

- par **isolement direct** depuis une source de cellules endothéliales, comme la veine ombilicale, l’aorte ou encore des micro-vaisseaux [368]. En particulier, les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) sont les cellules endothéliales les plus utilisées pour la vascularisation en génie tissulaire. Faciles à isoler, elles ont un potentiel angiogénique élevé [366] ;
- à partir de **cellules endothéliales progénitrices**, isolées depuis la moelle osseuse [369]. Ces cellules sont très utilisées pour des applications en vascularisation, mais leurs populations ne sont pas toujours homogènes. Ainsi, on distingue les cellules endothéliales progénitrices précoces et tardives. Les cellules précoces ont une morphologie en fuseau. Leur capacité de prolifération est limitée, et elles peuvent déclencher des réactions inflammatoires. Les cellules tardives s’organisent selon des motifs en pavés et prolifèrent davantage [366] ;
- par **différenciation** de cellules souches pluripotentes [370]. La différenciation correcte en cellules endothéliales est alors vérifiée par l’expression de biomarqueurs tels que le **facteur de Von Willebrand** et certains clusters de différenciation, notamment CD31 [366].

Les approches de vascularisation les plus directes reposent donc sur l’**utilisation de cellules endothéliales**. Bien qu’elles ne permettent pas de représenter fidèlement la complexité des

mécanismes d'angiogénèse natifs, ces stratégies sont simples à mettre en œuvre et permettent d'identifier de façon spécifique les paramètres impliqués dans l'endothélialisation *in vitro*.

L'**ensemencement direct** avec des **cellules endothéliales en suspension** est l'approche la plus utilisée. Elle a cependant de nombreuses limitations [366] :

- le **manque de contrôle** sur la diffusion des cellules dans l'échafaudage suite à l'ensemencement. Il est ainsi difficile d'assurer un ensemencement homogène et de garantir une densité cellulaire suffisante pour permettre l'angiogénèse ;
- le **faible taux d'adhésion des cellules**. Au moment de l'implantation, celles-ci n'ont aucun ancrage au biomatériau et sont soumises à des contraintes de cisaillement ;
- la faible reproductibilité qui rend les **paramètres expérimentaux difficiles à optimiser**.

Des approches visant à contourner ces limitations ont cependant été développées. Ainsi, plusieurs groupes de recherche ont proposé d'ensemencer les échafaudages avec des **cellules endothéliales cultivées sur des microbilles** [371, 372]. Cette approche permet d'utiliser des cellules pré-conditionnées, qui forment des jonctions cellule-cellule et sont déjà ancrées sur un support. Ainsi, Li *et al.* ont pu montrer que la fonctionnalisation d'un hydrogel d'acide hyaluronique avec VEGF et des motifs adhésifs permet le bourgeonnement de cellules endothéliales et la formation de vaisseaux *in vitro* et *in vivo* [372]. Cette étude montre en particulier que le choix des motifs adhésifs, qui détermine quelles intégrines sont impliquées dans l'adhésion, permet de contrôler la perméabilité des néo-vaisseaux.

Une autre approche consiste à **contraindre** la distribution des cellules endothéliales dans les échafaudages, par exemple en les confinant dans des **canaux microfluidiques** ou **bioimprimés** [373–375]. Les cellules endothéliales peuvent ainsi recouvrir la paroi des canaux, de façon à former un pseudo-endothélium à partir duquel de nouveaux vaisseaux peuvent être formés par angiogénèse bourgeonnante. Liu *et al.* ont ainsi délimité deux canaux microfluidiques parallèles dans un hydrogel de dextrane fonctionnalisé avec des peptides d'adhésion. L'un des canaux contient des cellules endothéliales et l'autre est perfusé avec VEGF. Sous l'effet du gradient de VEGF, les cellules endothéliales colonisent l'hydrogel en formant de nouveaux vaisseaux dotés d'un lumen [374]. Une revue des solutions technologiques permettant la conception de plateformes perfusées par des microcanaux pour la vascularisation de tissus est présentée dans la référence [376].

2.5.2 Les systèmes de co-culture

L'utilisation de cellules endothéliales seules aboutit à la formation incontrôlée de vaisseaux fragiles et perméables. La co-culture avec des cellules murales permet de guider les cellules

endothéliales dans les tissus et d'augmenter la stabilité des vaisseaux nouvellement formés [366,377]. Parmi ces cellules, les plus répandues pour des applications en génie tissulaire sont les suivantes :

- les **fibroblastes**. Ces cellules sont les principales productrices du collagène de la MEC. Les fibroblastes régulent l'activité des cellules endothéliales et l'angiogénèse par des interactions paracrines [378] et des contraintes mécaniques [379] ;
- les **cellules musculaires lisses vasculaires** (*vascular smooth muscle cells*, VSMCs), cellules de la media qui entourent les vaisseaux de large diamètre. L'interaction entre les VSMCs et les cellules endothéliales induit l'augmentation de l'expression des facteurs de croissance pré-angiogéniques [380] ;
- les **péricytes**, que l'on retrouve autour des capillaires. Les péricytes stabilisent les vaisseaux nouvellement formés en ralentissant la prolifération des cellules endothéliales par inhibition de contact [381]. Ainsi, ils contraignent la forme des vaisseaux ;
- les **cellules souches mésenchymateuses**. Elles peuvent être isolées dans différents tissus, incluant la moelle osseuse et les tissus adipeux. Leur effet sur l'angiogénèse via les cellules endothéliales dépend de leur tissu d'origine [366].

Plusieurs études par Chen *et al.* ont montré que la co-culture d'HUVEC ou de cellules endothéliales progénitrices avec des fibroblastes (i) accélérerait la formation de vaisseaux *in vitro* et (ii) favorisait la connexion aux vaisseaux natifs *in vivo*, comparée à la culture de cellules endothéliales seules [382,383]. Des résultats similaires ont été obtenus pour la co-culture de cellules endothéliales avec (i) des cellules souches mésenchymateuses [384] ou encore (ii) des VSMCs [385,386]. Pour le succès de la formation d'une néo-vasculature, il est nécessaire de déterminer les quantités relatives optimales de chaque lignée [366].

Les stratégies d'ensemencement pour des co-cultures sont similaires à celles employées pour l'ensemencement d'une lignée unique. Ainsi, des études ont proposé (i) l'ensemencement direct [382,383,385,386], (ii) le confinement dans des microcanaux [387], (iii) la bioimpression, où les cellules sont encapsulées dans la bioencre [375], ou encore (iv) l'ensemencement avec des sphéroïdes (cf. section 2.5.3). On recense également l'utilisation de feuillets cellulaires, qui permettent de s'affranchir de la nécessité d'un échafaudage en adoptant une stratégie pseudo-3D. Avec cette approche, les cellules sont cultivées en 2D jusqu'à l'obtention de feuillets confluents. Ces feuillets sont ensuite détachés puis superposés pour former des assemblages en couches multiples [366,388]. Ainsi, plusieurs groupes de recherche ont rapporté l'utilisation de co-cultures en feuillets cellulaires pour la vascularisation de tissus *in vitro* [389–391] et *in vivo* [392].

2.5.3 Les sphéroïdes et organoïdes vasculaires

Les sphéroïdes et organoïdes sont des modèles de culture cellulaire en 3D. Bien que reposant sur des principes similaires, leurs définitions ne sont pas identiques :

- les **sphéroïdes** sont des grappes sphériques, assemblées par (i) la formation de jonctions cellule-cellule entre cellules homotypiques et (ii) la prévention de l'adhésion cellulaire sur un support. Leur taille dépend du nombre de cellules qui les composent, mais est généralement comprise entre 50 et 250 μm . Ils peuvent être composés de un ou plusieurs types cellulaires, qui peuvent s'organiser spontanément dans la grappe. Les cellules cultivées sous la forme de sphéroïdes peuvent sécréter leur propre MEC et former un microenvironnement cellulaire spécifique [393] ;
- les **organoïdes** sont des modèles plus complexes. Ils présentent à la fois une **morphologie** et une **fonctionnalité** similaires à celles des tissus natifs [393].

Cependant, la distinction entre sphéroïdes et organoïdes est parfois subtile, et de nombreuses études utilisent les deux termes de façon indifférenciée.

Les sphéroïdes et les organoïdes sont très utilisés pour des applications en vascularisation de tissus. Deux stratégies sont fréquemment employées :

1. la **pré-vascularisation** d'organoïdes. Des organoïdes sont formés à partir de lignées cellulaires spécifiques aux tissus étudiés, co-cultivées avec des cellules endothéliales. L'auto-assemblage des cellules aboutit à la formation d'un tissu perfusé par des micro-vaisseaux [366, 394] ;
2. l'utilisation d'**organoïdes vasculaires** [395–397]. Ces organoïdes sont formés en plusieurs étapes :
 - (i) la formation de sphéroïdes :
 - à partir d'un mélange de cellules endothéliales et de cellules murales ;
 - à partir de cellules souches mésenchymateuses ;
 - (ii) l'auto-organisation et, le cas échéant, la différenciation des cellules au sein du sphéroïde ;
 - (iii) l'ensemencement dans un support ;
 - (iv) le bourgeonnement autour du sphéroïde et le développement d'une vascularisation dans l'échafaudage.

Le ratio entre les quantités des différents types cellulaires est un critère primordial pour la formation d'organoïdes fonctionnels [366]. Des exemples d'applications de ces deux stratégies pour la vascularisation de tissus en génie tissulaire sont présentés dans les tableaux 2.7 et 2.8.

TABLEAU 2.7 Exemples d'organoïdes pré-vascularisés pour des applications en génie tissulaire. * Quand plusieurs ratios sont utilisés dans l'étude, seul le ratio optimal est rapporté ici.

Cellules		Ratio	Application	Référence
vasculaires (CVs)	spécifiques (CSs)	CVs:CSs *		
HUVEC et fibroblastes	Cardiomyocytes	(3:3):14	Bioimpression de patches cardiaques	[398]
Cellules endothéliales et fibroblastes	Cardiomyocytes	(1:3):6 (approx.)	Génération d'organoïdes cardiaques vascularisés	[399]
HUVEC	Cellules souches mésenchymateuses (différenciation ostéogénique)	1:1	Génération d'un tissu osseux vascularisé	[400]
HUVEC	Cellules souches adipeuses	1:9	Bioimpression d'un tissu adipeux pré-vascularisé	[401]
Cellules endothéliales microvasculaires	Ostéoblastes	1:1	pré-vascularisation de tissus osseux et connexion au réseau vasculaire natif <i>in vivo</i>	[402]
HUVEC	Hépatocytes	2:1 (approx.)	Génération d'un tissu hépatique pré-vascularisé	[403]

TABLEAU 2.8 Exemples d'organoïdes vasculaires pour des applications en génie tissulaire. *
Quand plusieurs ratios sont utilisés dans l'étude, seul le ratio optimal est rapporté ici.

endothéliales (CEs)	Cellules	Ratio	Application	Référence
	murales (CMs)	CEs:CMs *		
HUVEC	Cellules souches mésenchymateuses (moelle osseuse)	1:1	Formation d'une vasculature dans des hydrogels de fibrine et connexion au réseau vasculaire natif <i>in vivo</i>	[404]
Cellules souches pluripotentes induites (différenciation endothéliale)	Cellules souches mésenchymateuses (moelle osseuse)	1:1	Formation d'une vasculature dans des hydrogels de fibrine et connexion au réseau vasculaire natif <i>in vivo</i>	[405]
HUVEC	VSMC	9:1	Formation d'une vasculature dans des hydrogels de collagène-fibronectine et connexion au réseau vasculaire natif <i>in vivo</i>	[397]
HUVEC	Cellules souches mésenchymateuses	1:3	Formation d'un réseau pré-vasculaire dans des hydrogels de collagène-fibrine et différenciation ostéogénique	[406]
HUVEC	Fibroblastes et cellules souches mésenchymateuses	2:(9:9)	Formation d'un réseau vasculaire par bioimpression des sphéroïdes dans un hydrogel de gélatine	[407]
Cellules souches pluripotentes		-	Différenciation en cellules endothéliales et murales, formation d'une vasculature dans du Matrigel	[396]

CHAPITRE 3 DÉMARCHE D'ENSEMBLE DU TRAVAIL

3.1 Hypothèses de recherche et description de l'approche choisie

Dans cette section, nous détaillons les hypothèses posées et l'approche de recherche choisie pour répondre à l'objectif général formulé dans la section 1.3. La plateforme proposée, élaborée sur la base de la revue de la littérature présentée dans le chapitre 2, est schématisée dans la figure 3.1.

3.1.1 Un processus de conception ascendant

La structure de base de la plateforme est un **hydrogel macroporeux**, réticulé de manière covalente autour d'un gabarit sacrificiel en acide polylactique (PLA). Ce gabarit est lui-même formé à partir d'un mélange co-continu de PLA et de polystyrène (PS), ce qui assure que l'hydrogel obtenu possède un réseau de macropores continu et hautement interconnecté. Ainsi, **la topologie de l'hydrogel permet la colonisation des macropores par des cellules**. Les hydrogels ainsi produits sont **isotropes** : leurs macropores sont de taille et de forme homogènes et leur orientation est aléatoire.

Le polymère choisi pour former l'hydrogel est le **dextrane**, un polysaccharide **biocompatible** et **biodégradable**. Il est **non immunogène** et possède des propriétés anti-adhésives natives : il doit donc être fonctionnalisé pour être utilisé pour des applications de culture cellulaire. Ceci permet le contrôle de la composition de la plateforme et assure que celle-ci soit **bien définie**. Dans ce travail, les propriétés adhésives seront obtenues en fonctionnalisant les hydrogels avec la **séquence peptidique RGD**. Ce motif, dérivé de la fibronectine, est non sélectif et promeut l'attachement des cellules via les intégrines.

Cette approche a été élaborée dans le but de valider les deux hypothèses suivantes :

– Hypothèse biologique n°1 –

Des peptides adhésifs dérivés de la MEC, en répliquant des mécanismes d'adhésion natifs, rendent possible l'adhésion de cellules sur une structure 3D de dextrane.

– Hypothèse technologique n°1 –

Les propriétés topologiques et mécaniques d'un hydrogel macroporeux produit à partir d'un gabarit sacrificiel de PLA sont propices à sa colonisation par des cellules.

3.1.2 Une approche de fonctionnalisation polyvalente

Pour permettre la **multifonctionnalisation des hydrogels en une étape unique**, nous avons choisi de fonctionnaliser le dextrane à l'aide du **système d'affinité** composé des peptides **Ecoil** et **Kcoil** – la **superhélice E/K** (cf. section 2.4.3). Ainsi, le peptide **Kcoil** sera **greffé de manière covalente sur la matrice de dextrane**. Les hydrogels seront ensuite incubés avec un mélange de **molécules portant une ou plusieurs étiquettes Ecoil**. Choisir un tel système d'affinité plutôt qu'une approche covalente a plusieurs avantages :

- à l'équilibre, les molécules portant une étiquette Ecoil sont présentes sous deux formes : **en solution**, ou **conjuguées à la matrice de dextrane** via une interaction superhélice. La prévalence de chacune des deux formes est dictée par la **constante de dissociation** du complexe. Cet équilibre est **représentatif du microenvironnement cellulaire**, dans lequel de nombreux composants, dont des facteurs de croissance, se trouvent à la fois greffés et en solution ;
- la capture via l'interaction E/K permet d'assurer la **présentation orientée** de la molécule. Positionner adéquatement l'étiquette Ecoil permet de préserver la **bioactivité** de la molécule. De plus, la superhélice agit comme un espaceur qui éloigne la molécule de la matrice et améliore ainsi sa **biodisponibilité** en réduisant l'encombrement stérique ;
- la superhélice E/K se forme en **conditions physiologiques**, sans nécessiter d'intermédiaire réactionnel.

Comme d'autres systèmes d'affinité, le système E/K permet une **multifonctionnalisation polyvalente** grâce au contrôle sur la **valence de l'interaction** (nombre d'étiquettes Ecoil) [347]. Il offre également d'autres leviers de contrôle. Ainsi, modifier le nombre d'heptades ou introduire des mutations ponctuelles dans la séquence de Ecoil ou Kcoil sont deux façons de moduler la constante de dissociation de la superhélice.

Dans le cadre de ce travail, nous envisageons de fonctionnaliser les hydrogels avec plusieurs entités :

- des **facteurs de croissance**, pour favoriser la prolifération, la migration ou la différenciation cellulaire dans les hydrogels de dextrane macroporeux. Nous avons restreint l'étude au **facteur de croissance de l'épiderme** (EGF) et au **facteur de croissance de l'endothélium vasculaire** (VEGF). EGF est impliqué dans le fonctionnement de nombreux types cellulaires, tandis que VEGF est impliqué dans les processus d'angiogénèse (cf section 2.1.3). Des chimères de ces deux facteurs de croissance portant **une étiquette Ecoil** dans le cas de EGF (Ecoil-EGF) et **deux étiquettes Ecoil** dans le cas de VEGF (Ecoil-VEGF) ont été précédemment produites et caractérisées dans notre groupe de recherche [349, 350] ;

- des **nanoparticules** (NPs) fonctionnalisées avec Ecoil, pour permettre l’incorporation de **principes actifs encapsulés** dans l’hydrogel. Nous avons restreint l’étude à deux familles de NPs : (i) des NPs de PLA, qui permettent l’encapsulation d’un principe actif hydrophobe, et (ii) des NPs d’or, dont les propriétés optiques permettent la détection facile dans les hydrogels. Plus précisément, nous utiliserons des NPs PEGylées : AuPEG et PLA-*b*-PEG. La présence d’une couche de PEG en surface des NPs améliore la stabilité colloïdale et la biocompatibilité des NPs [408]. Comme la valence de l’interaction E/K détermine l’affinité apparente des NPs pour le substrat [347], nous aurons besoin d’une méthode permettant de **quantifier le nombre d’étiquettes Ecoil greffées en surface des NPs**.

Cette approche a pour objectif de valider les deux hypothèses suivantes :

– **Hypothèse biologique n°2** –

Dans un hydrogel de dextrane macroporeux, la présence conjointe (i) de multiples facteurs de croissance, à la fois solubles et ancrés à la matrice, et (ii) de principes actifs relâchés de façon contrôlée par des NPs permet de moduler la réponse cellulaire en activant les mêmes voies de signalisation que dans un contexte natif.

– **Hypothèse technologique n°2** –

La superhélice E/K permet la multifonctionnalisation modulable et contrôlée d’hydrogels de dextrane avec des facteurs de croissance et des NPs.

3.1.3 L’incorporation de cellules vasculaires

Afin de favoriser la néovascularisation de tissus cultivés dans des hydrogels de dextrane macroporeux, nous avons identifié deux lignées cellulaires qui serontensemencées dans les hydrogels :

- des **cellules endothéliales** de la veine ombilicale humaine (*human umbilical vein endothelial cells*, **HUVEC**). L’endothélium forme la paroi interne des vaisseaux sanguins (cf. section 2.1.4). VEGF est impliqué dans la sélection, la migration et la prolifération des cellules endothéliales ;
- des **cellules musculaires lisses** vasculaires, issues de l’artère aorte (*aortic smooth muscle cells*, **AoSMC**). Ces cellules, qui n’expriment pas de récepteurs de VEGF, sont des cellules murales que l’on retrouve dans la couche intermédiaire des vaisseaux sanguins (media, cf. section 2.1.4).

Avant d’êtreensemencées dans les hydrogels, ces cellules seront co-cultivées sous la forme

d'organoïdes vasculaires (cf. section 2.5.3). Cette approche permet aux cellules de s'auto-assembler avant leur ensemencement.

L'objectif de cette approche est de valider les deux hypothèses suivantes :

– **Hypothèse biologique n°3** –

Dans un hydrogel de dextrane macroporeux fonctionnalisé pour mimer leur environnement natif, des organoïdes composés de cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses peuvent bourgeonner et former des structures néovasculaires.

– **Hypothèse technologique n°3** –

Ensemencer un hydrogel avec des organoïdes vasculaires favorise le développement de structures proto-vasculaires dans les macropores.

3.2 Objectifs de recherche

Afin de valider les hypothèses présentées dans la section 3.1, nous avons divisé le travail de recherche en trois axes, articulés autour des objectifs spécifiques proposés ici.

3.2.1 Fonctionnalisation de NPs

Nous avons choisi de fonctionnaliser les hydrogels de dextrane macroporeux avec des facteurs de croissance et des NPs grâce à des interactions E/K. Les facteurs de croissance EGF et VEGF existent déjà sous la forme de protéines de fusion étiquetées avec Ecoil (Ecoil-EGF : une étiquette, Ecoil-VEGF : deux étiquettes). Au contraire, les NPs doivent être fonctionnalisées pour présenter le peptide Ecoil à leur surface. De plus, nous avons identifié la valence de l'interaction E/K comme un potentiel levier de contrôle pour la multifonctionnalisation des hydrogels. Dès lors, il est nécessaire de pouvoir caractériser la fonctionnalisation des NPs afin d'**estimer le nombre de peptides ou protéines présents à leur surface**. Dans cette optique, nous avons formulé l'objectif suivant :

– **Objectif n°1** –

Développer une méthode de quantification de protéines en surface de NPs, et l'utiliser pour déterminer la valence de NPs fonctionnalisées avec le peptide Ecoil.

Cette méthode doit avoir les caractéristiques suivantes :

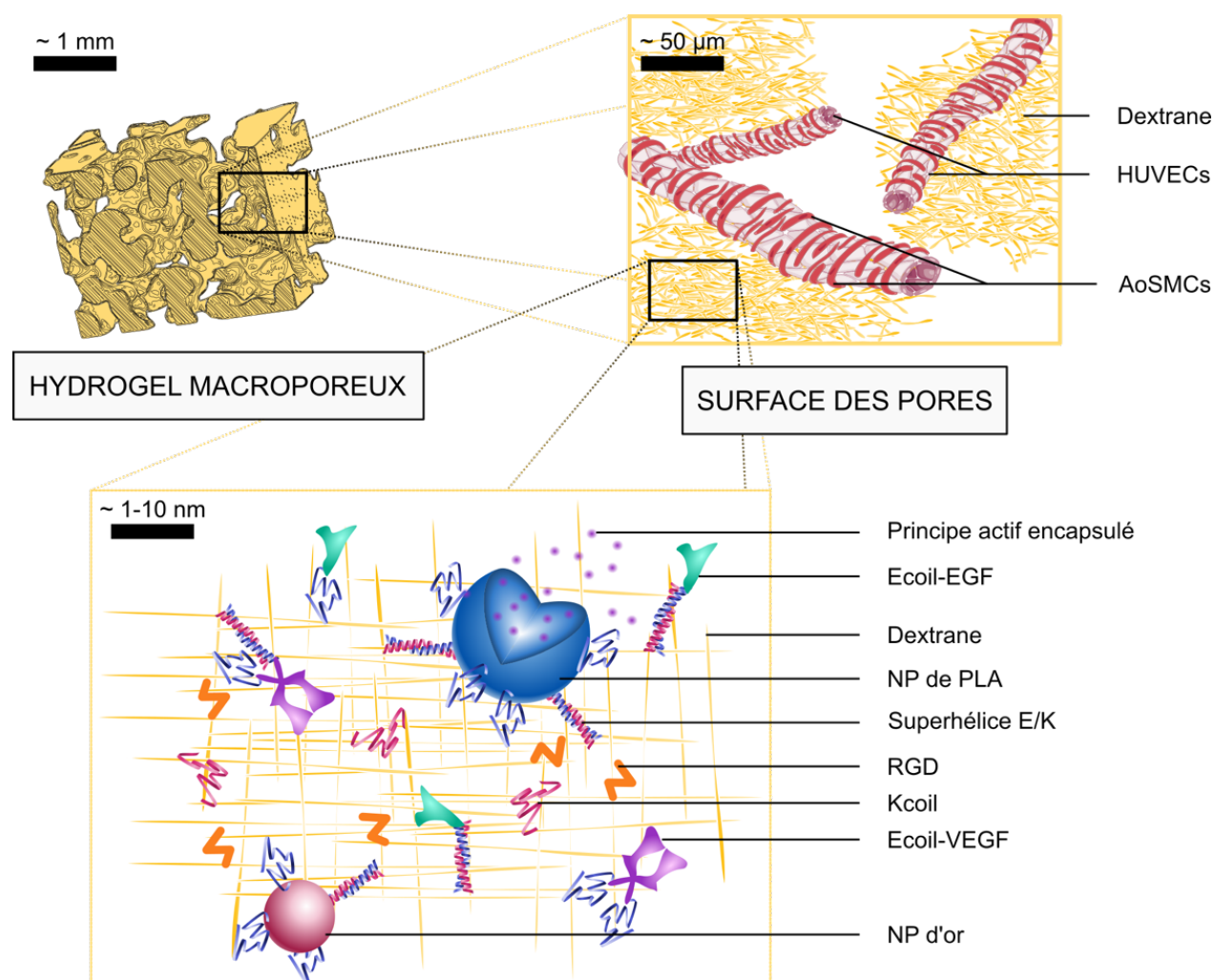


FIGURE 3.1 Schéma récapitulatif de l'approche choisie. Un hydrogel macroporeux de dextrane est fonctionnalisé avec les peptides RGD et Kcoil. On incorpore ensuite des facteurs de croissance et des nanoparticules grâce aux interactions Ecoil/Kcoil. L'hydrogel estensemencé avec des cellules vasculaires (HUVECs et AoSMCs) dans le but de former une néovascularure.

- Permettre de **quantifier n'importe quelle protéine en surface de multiples types de NPs**. Notamment, elle doit être utilisable sur les NPs d'AuPEG et de PLA-*b*-PEG choisies pour cette étude ;
- **Ne pas nécessiter de matériel onéreux ni d'équipements spécialisés**. L'objectif est rendre cette méthode utilisable dans la plupart des laboratoires de recherche ;
- **Ne pas nécessiter de marquage ou de modification préalable des protéines**, pour ne pas ajouter d'étapes de réaction et de purification pouvant biaiser la quantification.

Les travaux effectués en ce sens sont présentés dans le chapitre 4 sous la forme d'une étude publiée dans la revue *ACS Applied Nanomaterials* en octobre 2020 [409].

3.2.2 Multifonctionnalisation des hydrogels

Nous abordons ici la fonctionnalisation des hydrogels de dextrane macroporeux avec des facteurs de croissance ou des NPs. Nous devons **vérifier si la présence de Kcoil dans les hydrogels permet de capturer des objets étiquetés avec le peptide Ecoil**, et **caractériser la stabilité de cette capture dans le temps**. Ainsi, nous avons défini l’objectif suivant :

– Objectif n°2 –

Démontrer que la superhélice E/K est un outil très modulable qui permet la capture et la relâche contrôlées d’objets étiquetés avec le peptide Ecoil.

En particulier, nous utiliserons plusieurs leviers de contrôle, incluant :

- la **valence** de l’interaction E/K ;
- l’**affinité** de la superhélice, en introduisant des mutations ponctuelles dans la séquence des peptides pour déstabiliser l’interaction.

Une partie des travaux effectués pour mener à bien cet objectif est présentée dans le chapitre 5, sous la forme d’un article publié dans la revue *Acta Biomaterialia* en septembre 2022 [410]. Des résultats complémentaires sont présentés dans le chapitre 7.

3.2.3 Culture de cellules vasculaires

Enfin, nous souhaitons utiliser les hydrogels de dextrane macroporeux pour la culture d’organoïdes vasculaires auto-assemblés à partir d’HUEVC et d’AoSMC. Nous nous intéressons ici à l’**adhésion** des cellules à la surface des macropores, ainsi qu’à leur **bourgeoisement** autour d’un organoïde central. Nous devons notamment nous **assurer que les cellules s’organisent pour former des structures protovasculaires**. L’objectif associé est le suivant :

– Objectif n°3 –

Observer l’adhésion cellulaire et la formation de structures vasculaires dans des hydrogels de dextrane macroporeux multifonctionnalisés ensemencés avec des organoïdes vasculaires.

Cet objectif sera décomposé en plusieurs étapes :

- confirmer l’**adhésion cellulaire** dans des gels fonctionnalisés avec le peptide RGD. Ce sous-objectif sera considéré comme atteint si les cellules adhèrent dans les hydrogels et y survivent pendant au moins cinq jours. Nous utiliserons pour cela du milieu de culture complet commercial, qui contient déjà les facteurs de croissance et suppléments permettant la croissance optimale des cellules ;

- étudier l'impact de la présence de **EGF** et **VEGF**, capturés à la surface de macropores via la formation de superhélices E/K, sur le comportement cellulaire pendant cinq jours de culture. Nous utiliserons pour cela du milieu de culture minimalement supplémenté, qui ne contient pas de facteurs de croissance.

Les travaux menés dans cet objectif sont présentés dans le chapitre 6, sous la forme d'un article soumis dans la revue *Carbohydrate Polymers* en août 2023.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1 — VERSATILE AND HIGH-THROUGHPUT STRATEGY FOR THE QUANTIFICATION OF PROTEINS BOUND TO NANOPARTICLES

Stratégie polyvalente à haut débit pour la quantification de protéines en surface de nanoparticules

L'article présenté dans ce chapitre a été publié le 6 octobre 2020 dans la revue ACS Applied Nanomaterials [409]. Il récapitule les travaux menés pour remplir l'objectif n°1 de ce travail de recherche.

4.1 Résumé

La biofonctionnalisation de nanomatériaux est un outil indispensable à de nombreuses applications biomédicales. De multiples stratégies existent pour conjuguer des protéines à des particules colloïdales ; cependant, déterminer l'efficacité du greffage — c'est-à-dire, la quantité de protéines conjuguées à la surface d'une nanoparticule (NP) — reste un défi. Les produits formulés pour un usage biomédical sont soumis à des contraintes strictes ; ainsi, l'absence d'une caractérisation rigoureuse peut nuire au développement de formulations par ailleurs prometteuses. Dans cet article, nous proposons une stratégie simple pour mesurer de façon précise le greffage de molécules biologiques à la surfaces de trois familles de NPs parmi les plus répandues : les NPs polymériques, les NPs inorganiques et les NPs métalliques. Cette approche repose sur (i) l'hydrolyse de la protéine greffée et la dégradation simultanée des NPs en conditions acides, suivies par (ii) une quantification spectrophotométrique des amines primaires en solution. Cette stratégie est adaptable à n'importe quel type de protéine et ne nécessite aucun étiquetage préalable. La procédure est parallélisable, s'intègre facilement à une routine de caractérisation systématique, et ne nécessite pas d'équipement autre qu'un four conventionnel et un lecteur de microplaques.

4.2 Header

Versatile and High-Throughput Strategy for the Quantification of Proteins Bound to Nanoparticles

Romane Oliverio^{a,b}, Benoît Liberelle^a, Frédéric Murschel^b, Araceli Garcia-Ac^b, Xavier Banquy^{b,*}, and Gregory De Crescenzo^{a,*}

4.3 Author Affiliations

^a Department of Chemical Engineering, Groupe de Recherche en Sciences et Technologies Biomédicales (GRSTB), Bio-P2 Research Unit, École Polytechnique de Montréal, Montréal H3T1J4, Québec, Canada.

^b Canadian Research Chair in Bioinspired Materials, Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, Montréal H3T1J4, Québec, Canada.

* Corresponding authors. Email: xavier.banquy@umontreal.ca, gregory.decrescenzo@polymtl.ca.

4.4 Abstract

Biofunctionalized nanomaterials have been extensively studied as a tool for a wide range of applications in biomedical fields. Despite many existing strategies to conjugate proteins to colloidal particles, determining the grafting efficiency — that is, the amount of protein conjugated to the surface of a nanoparticle (NP) — remains challenging. Formulations for biomedical applications are subjected to strict constraints, and a lack of precise characterization can prevent otherwise promising formulations to be explored further. Here, we propose a simple approach to precisely measure the grafting efficiency of biological molecules on the surface of three types of widely used NPs: polymeric NPs, inorganic NPs, and metallic NPs. This approach relies on the simultaneous hydrolysis of the grafted protein and the NP degradation in acidic conditions, followed by a spectrophotometric quantification of primary amines in solution. This strategy can be applied to any type of protein and does not require any labeling agent. It can be performed in a high-throughput manner as a routine experiment and only requires a conventional oven and a microplate reader.

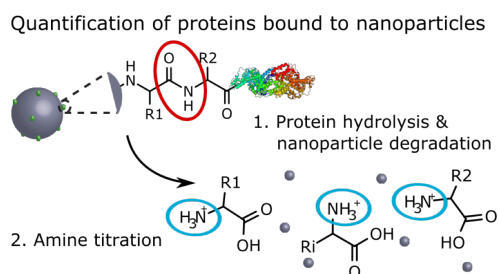


Figure 4.1 Graphical abstract

Keywords: nanoparticle biofunctionalization, protein quantification, protein surface coverage, protein hydrolysis, spectroscopic quantification.

4.5 Introduction

Quantification of the number of proteins grafted or adsorbed on the surface of biofunctionalized nano-objects is a crucial characterization step in the development of nanoparticles (NPs) and nanoformulations. It provides insights for the optimization of grafting protocols, helps in predicting the targeting efficiency of the NPs [411], or allows for the analysis of the nonspecific adsorption of proteins on NPs in complex biological environments — protein corona [412]. Despite its importance, this characterization step remains challenging. The usually low amounts of available materials, the small dimensions of the involved entities, and the sometimes-strong interference from the suspending media are all elements that can hamper the success of the quantification.

Previous studies have focused on the development of context-dependent strategies, in which specific features of either the NPs or the grafted proteins are used for quantification purposes. An overview of these strategies is presented in Table 4.1.

Table 4.1 Previously published strategies for the characterization of nano-object biofunctionalization with proteins

Category	Techniques	Limitations
NP size and density variation	dynamic light scattering [413, 414] differential centrifugal sedimentation [413, 415–417] analytical ultracentrifugation [418]	low sensitivity suitable for protein coronas, but fail to precisely characterize bioconjugation efficiencies
NP elementary composition	X-ray photoelectron spectroscopy [413] thermogravimetric analysis [419] nuclear magnetic resonance [420] inductively coupled plasma-mass spectrometry [421]	lack of versatility require specialized equipment and highly trained operators
preliminary protein labeling	fluorescence correlation spectroscopy [422–425] single-molecule photobleaching imaging [426–428] flow cytometry [429, 430] NP-selective dissolution after conjugation of labeled proteins [431]	protein labeling may induce a bias highly hydrophobic fluorescent tags can impact the conjugation efficiency
traditional protein quantification methods	spectroscopic quantification reagents [417, 430, 432, 433] enzyme-linked immunosorbent assay [353, 431, 434, 435] amino acid analysis [435, 436]	the presence of NPs in the medium affects the measurements indirect approaches have low precision for the characterization of low-yield conjugations

Most of these methods lack versatility because they are only valid for a certain category of NPs or require protein labeling. Moreover, they sometimes require expensive or specialized

equipment as well as highly trained operators.

In the absence of NPs, quantification of proteins in solution is a routine assay that can be performed in a microplate setting for high-throughput measurements. Numerous spectroscopic methods have been developed for this purpose [437, 438] and rely on the protein intrinsic properties [438, 439] (ultraviolet absorbance at a wavelength of 280 or 205 nm), on external reagents, [437, 440, 441] or on immunoenzymatic approaches [442]. Spectroscopic quantification of amine functional groups is another strategy commonly used to measure protein titer in solution, in which a reagent reacts with the available amino groups in proteins to produce colored or fluorescent compounds. [443–445] Spectroscopic methods have several weaknesses, the main one being their sensitivity to the composition of the suspending medium. More specifically, they cannot be used in the presence of NPs that would interfere with the spectroscopic measurements and cause steric hindrance issues. Spectroscopic amine quantification is also limited by the fact that only a few protein residues¹ carry reactive amino groups, and the detection sensitivity depends on the concentration of these residues.

Quantifying proteins on the surface of NPs using spectroscopic methods can be done by the competitive titration of an excess intermediate protein [433] or by the indirect quantification of the unbound proteins [431, 432, 434]. However, these approaches lack sensitivity regarding the characterization of low-yield conjugations. Indeed, differences smaller than at least several times the confidence interval on the measurements cannot be assessed precisely. Besides, indirect quantification approaches are more liable to experimental biases and have already been shown to highly overestimate the grafting efficiency, when compared to direct quantification methods [431].

Amino acid analysis (AAA) is another protein characterization approach which is traditionally used to determine the amino acid (AA) composition of proteins [446, 447]. AAA relies on the cleavage of peptide bonds of the proteins in hydrolytic conditions. The hydrolyzed AA residues are then separated and analyzed by liquid chromatography [447]. This strategy has been used for the quantification of proteins at the surface of NPs [435, 436] but has the disadvantage of separating the hydrolyzed residues, thus hampering the detection sensitivity. Besides, AAA requires specialized chromatography equipment and trained operators.

This work focuses on the development of a quantification method that (i) allows the quantification of any grafted protein on the surface of the most widely used NPs, provided they do not contain amino groups, (ii) requires a common oven and a microplate spectrometer as the only equipment, (iii) can be used as a routine experiment, without additional labeling steps of any of the components, and (iv) allows high-throughput measurements.

1. Namely, arginine, asparagine, glutamine, and chain-end cysteine residues.

The strategy we developed is inspired by AAA techniques. A schematic representation of the methodology is presented in Figure 4.2. Samples containing proteins and NPs are hydrolyzed under extremely acidic conditions to cleave the proteins' peptide bonds and degrade the NPs. The obtained hydrolysates are then derivatized with an amine-reactive reporter molecule for subsequent spectroscopic quantification of the free amino groups. This approach has substantial advantages: (i) hydrolysis of each peptide bond produces one extra free amino group. Thus, hydrolyzing the protein increases the amount of free amines in the solution and improves the test sensitivity; (ii) after the degradation of NPs, their contribution to the background signal in spectroscopic measurements is significantly suppressed.

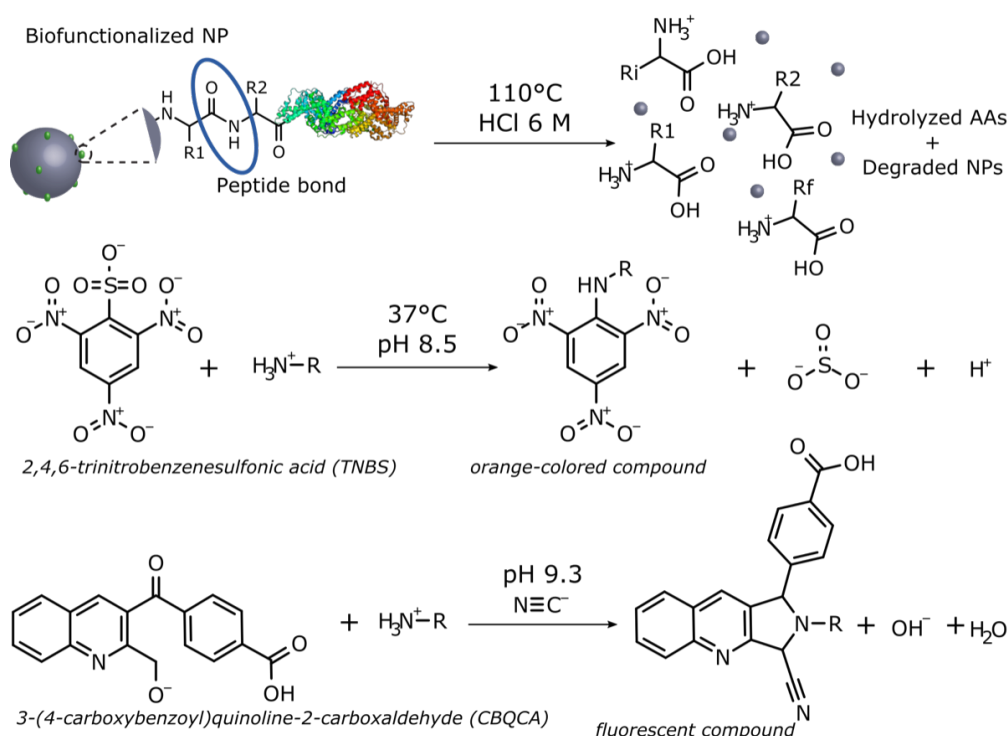


Figure 4.2 Experimental strategy for the quantification of proteins on the surface of NPs. Samples are hydrolyzed in 6 M hydrochloric acid (HCl), leading to the cleavage of peptide bonds and the degradation of NPs. Free amino groups in the hydrolysates are then quantified using TNBS or CBQCA reagents. AAs: amino acids.

In this study, we use this approach for the quantification of proteins in the presence of three types of NPs: (i) polymeric NPs made of poly-D,L-lactic acid (PLA), (ii) metallic gold (Au) NPs with a polyethylene glycol (PEG) shell, and (iii) inorganic silica (SiO_2) NPs. PLA is a hydrophobic polymer, and PLA-based NPs are investigated for drug encapsulation and controlled delivery [448, 449]. Gold NPs have applications in targeting, imagery, phototherapy, or as a diagnostic tool because of their optical properties [450, 451]. Silica NPs are nonmetal-

lic inorganic particles, with applications in drug delivery and imaging [283,452]. After the hydrolytic treatment, these three types of NPs are degraded [453] (Table A.1).

We studied the hydrolysis of three different proteins: (i) CGGYIGSR, an 8-residue-long peptide where “YIGSR” is an adhesive peptide motif derived from laminin [260], (ii) bovine serum albumin (BSA) (583 residues), and (iii) trastuzumab (TzM) (1328 residues), a recombinant monoclonal antibody first commercialized under the name of Herceptin for the treatment of breast cancer.

After the hydrolysis of the samples composed of a mixture of proteins and NPs, we used two reagents to quantify the amount of free amino groups in the hydrolysates: (i) 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid [443] (TNBS) that produces a strongly absorbing compound in the UV-vis spectrum and (ii) 3-(4-carboxybenzoyl)quinoline-2-carboxaldehyde [445] (CBQCA) that forms a fluorescent derivative (Figure 4.2).

To perform the parallel hydrolysis of the samples, we used a custom-made 24-well aluminum heating block we designed to accommodate standard chromatography sampler vials with screw-thread caps (Figure A.1) in an approach inspired by Damm *et al.* [454]. Vials are maintained in the rack and kept closed thanks to a screwed lid (Figure A.1B) to prevent vial opening due to the increasing pressure during hydrolysis. A silicon gasket helps in keeping the platform sealed (Figure A.1C).

The results reported in this paper demonstrate our ability to properly quantify the amount of bound proteins in the presence of NPs by the elimination of the NP-related background noise. In addition to set the range of application of the approach in terms of protein quantity, we report a concrete application of our strategy for the quantification of both adsorbed and covalently grafted proteins on the surface of polymeric NPs.

4.6 Experimental Section

4.6.1 Proteins

CGGYIGSR was synthesized using a standard solid-phase peptide synthesis methodology at the peptide facility of the University of Colorado.

BSA (#A7979) was purchased from Sigma-Aldrich.

TzM was produced in a Chinese hamster ovary cell line and purified as previously described [361], and it was obtained from the Human Health Therapeutics Centre of the National Research Council of Canada.

Cysteine-terminated E-coil-EGF (CEE) is a custom-made 119-residue-long fusion protein

composed of an N-terminal cysteine, a 35-residue-long peptide tag (E-coil), and the human epidermal growth factor (hEGF). CEE was produced in human embryonic kidney 293-6E cells and purified as previously described [455].

4.6.2 Nanoparticles

Poly-D,L-lactic Acid and PLA-*b*-polyethylene Glycol Nanoparticles

PLA and PLA-*b*-PEG were synthesized by ring-opening polymerization (ROP) of dilactide (3,4-dimethyl-1,2-dioxane-2,5-dione, Sigma-Aldrich #303143) as previously described [456, 457] using tin(II) 2-ethylhexanoate (Sigma-Aldrich #S3252) as a catalyst. For PLA-*b*-PEG, PEG (2000 g/mol, Sigma-Aldrich #821037) was used as the polymerization initiator. Briefly, dilactide was recrystallized twice in anhydrous toluene (Sigma-Aldrich #244511) and dried under vacuum for 24 h. Then, dilactide and PEG (1:10 PEG/dilactide mass ratio, for PLA-PEG only) were placed in a flask with the catalyst (1:2000 catalyst/monomer molar ratio). The mixture was heated at 165 °C under argon atmosphere and mechanically stirred for 4 h. The crude product was then dissolved in methylene chloride (Fisher Scientific #D37) and purified by two liquid-liquid extractions against water. It was then precipitated twice in cold methanol (Fisher Scientific #A452). The resulting polymer was then dried under vacuum for 48 h and stored at room temperature under a dry atmosphere until use.

Similarly, PLA-*b*-PEG-maleimide was synthesized by ROP of dilactide, this time using maleimide-PEG-OH (2000 g/mol, JenKem Technology #A5034) as the polymerization initiator, the terminal maleimide functional group being used for subsequent NP biofunctionalization. Recrystallized dilactide, PEG (1:10 PEG/dilactide mass ratio), and the catalyst were placed in a round flask in anhydrous toluene. The mixture was then heated at 120 °C and stirred for 24 h under an argon atmosphere. After subsequent toluene evaporation, the reaction product was purified as described above and stored at -80 °C under argon atmosphere until use.

PLA and PLA-*b*-PEG NPs were then synthesized using a confined impinging jet micromixer built according to Han *et al.* [458] and assembled on a NanoAssemblr Benchtop Instrument platform (Precision NanoSystems). Briefly, equal volumes of organic phase — polymer dissolved in acetone (Fisher Scientific #A929) — and aqueous phase — ultrapure water (Milli-Q grade from a Millipore Gradient A10 purification system) — were injected in the two inlets of the mixer at the same flow rate. The resulting nanosuspension was immediately quenched under stirring in a volume of ultrapure water twice larger than the injection volumes. The nanosuspension was then dialyzed (cutoff 50 kDa, Spectrum Laboratories #888-

11044) against ultrapure water and further purified by tangential flow filtration (Repligen #C02-S05U-05-N). The obtained NPs were stored at 4 °C until use.

PEGylated Gold Nanoparticles

Gold NPs were synthesized using a citrate reduction method as previously described [353,459]. Briefly, trisodium citrate (Sigma-Aldrich #S1804, 10 mg/mL in ultrapure water) was added to a boiling chloroauric acid solution (gold(III) chloride hydrate, Sigma-Aldrich #254169, 0.1 mg/mL in ultrapure water) for a final mass ratio of 2:1 trisodium citrate/chloroauric acid. The solution was stirred and boiled for 5 min. Once cooled, the citrate-capped NP suspension was incubated overnight with 10 μ M methoxy-PEG-SH (5 000 g/mol, JenKem Technology #A3029). The suspension was then purified by three cycles of centrifugation (Thermo IEC Micromax centrifuge, 15 000 g, 15 min) to remove the citrate and unreacted PEG. The obtained AuPEG NPs were kept at 4 °C until use.

SiO₂ NPs

LUDOX TM-40 colloidal silica (#420786) was purchased from Sigma-Aldrich and stored at room temperature until use.

NP Characterization

NP hydrodynamic diameter was determined by dynamic light scattering (DLS) using a Malvern ZetaSizer instrument (Malvern Instruments).

4.6.3 Sample Hydrolysis

Freeze-dried samples (protein-NP mixes or biofunctionalized NPs) were resuspended in 200 μ L of 6 M hydrochloric acid (HCl) (Fisher Scientific #A144) in chromatography sampler vials (Thermo Fisher #C4013-1) with screw-thread caps (Thermo Fisher #C4013-40A for TNBS quantification, #C4013-30A for CBQCA quantification). Closed vials were then placed into a custom-made aluminum block with a screwed lid (Figure A.1) and heated at 110 °C for 24 h unless otherwise specified. Vials were then opened and kept at 110 °C under a fume hood for six additional hours to allow for HCl evaporation. Dried hydrolysates were kept at -20 °C until characterization.

4.6.4 Free Amine Quantification

UV-Vis Absorbance Quantification Method

Dry hydrolysates were resuspended in 100 mM sodium bicarbonate, pH 8.5. The solution (100 μ L) was pipetted in a clear flat-bottom 96-well microplate before addition of 50 μ L of a 0.01% TNBS [443,460] (G-Biosciences #BC86) solution in 100 mM sodium bicarbonate. The microplate was then kept at 37 °C for 2 h. 10% sodium dodecyl sulfate (50 μ L, Sigma-Aldrich #822050) was then added, and absorbance at 340 nm (correction: 631 nm) was measured on a plate reader (Victor V Multilabel Counter, PerkinElmer Inc.).

Fluorescence Spectroscopy Quantification Method

Dry hydrolysates were resuspended in 100 mM sodium borate, pH 9.2. The solution (98.75 μ L) was pipetted in a black flat-bottomed fluorescence microplate before addition of 3.75 μ L of 10 mM potassium cyanide (Fisher Scientific #P223I) and 7.5 μ L of a 4 mM CBQCA [445] (Invitrogen #A6222) solution in 100 mM sodium borate. The plate was then kept for 2 h in the dark at room temperature. Fluorescence emission (excitation: 485 nm, emission filter: 535 nm) was measured on a plate reader (Victor V Multilabel Counter, PerkinElmer Inc.).

4.6.5 Regression Line Comparison

Statistical Analysis

Statistical comparison of the slopes of two regression lines was performed following a procedure summarized by Andrade *et al.* [461].

First, the equality of the residual variances of both regressions was assessed with a bilateral Fisher-Snedecor's F-test ($p < 0.05$) with $(n - 1, n - 1)$ degrees of freedom, where $n = 8$ was the sample size. When the null hypothesis could not be rejected, residual variances were considered equal and the slopes were then compared using a Student t -test with $2n - 2$ degrees of freedom. Considering two lines with respective equations $\bar{y}_1 = a_1\bar{x}_1$ and $\bar{y}_2 = a_2\bar{x}_2$, the parameter t is given by relation 4.1.

$$t = \frac{a_1 - a_2}{\sqrt{s^2 \left(\frac{1}{\sum_{i=1}^N (x_{1,i} - \bar{x}_1)^2} + \frac{1}{\sum_{i=1}^N (x_{2,i} - \bar{x}_2)^2} \right)}} \quad (4.1)$$

In 4.1, s^2 represents the common residual variance of the two regressions. s^2 is given by 4.2,

in which for $j \in [1, 2]$, $s_j^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_{j,i} - \bar{y}_j)^2}{(n-1)}$.

$$s^2 = \frac{(n-1)s_1^2 + (n-1)s_2^2}{2n-2} \quad (4.2)$$

It should be noted that the above formula is only valid when comparing the slopes of regression lines whose y -intercept is assumed to be zero. For a line for which a nonnull y -intercept has been determined, the degree of freedom becomes $n-2$ and the formula is transformed accordingly.

In the rest of this paper, two slopes have been considered significantly different when $t > 2.98$ ($p < 0.01$).

Relative Gap

For a more accurate estimation of the matrix effect induced by the presence of hydrolyzed NPs in the samples, relative gaps between experimental curves were calculated. Considering two regression lines with respective equations $\bar{y}_1 = a_1\bar{x}_1$ and $\bar{y}_2 = a_2\bar{x}_2$ and an identical ordinate value y , the relative gap between the corresponding abscissa values is given by equation 4.3.

$$\text{Relative gap (\%)} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{|\bar{x}_1|} \times 100 \quad (4.3)$$

This relative gap is independant from the ordinate value y , and equation 4.3 simplifies to give 4.4.

$$\text{Relative gap (\%)} = \left| 1 - \frac{a_1}{a_2} \right| \times 100 \quad (4.4)$$

4.6.6 CEE grafting on PLA-*b*-PEG NPs

NP Synthesis

PLA-PEG NPs were synthesized as described above. Either pure PLA-*b*-PEG or a 1:10 mass ratio PLA-*b*-PEG-maleimide/PLA-*b*-PEG mix was used for the synthesis of NPs. All NPs used in this section had a hydrodynamic diameter of 115 ± 2 nm.

CEE Adsorption on NPs

CEE and PLA-*b*-PEG NPs were incubated (1 000:1 molar ratio) overnight in 100 mM saline phosphate buffer (pH 7.4).

The samples then underwent three cycles of purification through an Amicon centrifugal filter unit (cutoff 50 kDa, Millipore Sigma #UFC9050). Supernatants were kept for further quantification of the unadsorbed CEE. The purified samples were freeze-dried and hydrolyzed as described above for TNBS amine quantification.

CEE Covalent Grafting on NPs

CEE and 10% PLA-*b*-PEG-maleimide NPs were incubated (1 000:1 molar ratio) overnight in 100 mM saline phosphate buffer (pH 7.4) in the presence of the reducing agent tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP, 100:1 TCEP/CEE molar ratio) for the reduction of disulfide bridges that might form between CEE molecules. Previous work in our research group had shown that these reducing conditions prove adequate to promote thiol-maleimide coupling, even when a significant fraction of the cysteine-terminated peptide is oxidized [357].

The samples then underwent three cycles of purification through an Amicon centrifugal filter unit (cutoff 50 kDa, Millipore Sigma #UFC9050). Supernatants were kept for further quantification of the unreacted CEE. The purified samples were freeze-dried and hydrolyzed as described above for TNBS amine quantification.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

The unreacted CEE contained in the supernatants was quantified with an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using an anti-hEGF DuoSet ELISA kit (#DY236) purchased from R&D Systems.

4.7 Results and Discussion

4.7.1 Protein Hydrolysis Efficiency

CGGYIGSR, BSA, and TZM have been chosen as model proteins because they represent different categories of frequently reported proteins for the biofunctionalization of nanomaterials: (i) short signal peptides, growth factors, and other small proteins; (ii) serum proteins that tend to adsorb on biomaterials; and (iii) biomacromolecules with complex quaternary structures and patterns of post-translational modification such as glycosylation profiles.

No hydrolysis protocol allows for the full recovery of every single AA [446]. In this study, we perform the hydrolysis at 110 °C in 6 M HCl. These conditions are frequently reported to be used [446,447], as they enable a high hydrolysis yield, without causing significant losses of the resulting AAs.

We first performed an acid hydrolysis of the three proteins without NPs to assess the hydrolysis efficiency. To that end, we hydrolyzed samples containing between 250 pmol and 6.25 nmol of AA residues, and we measured their absorbance after complexation with TNBS. No statistically significant difference has been observed between the calibration curves obtained for hydrolysis durations varying from 6 h to 48 h (Figures 4.3A and A.2A), which indicates that the chosen conditions prove efficient even for short hydrolysis times. However, we chose to set all further hydrolysis durations to 24 h to ensure the adequate degradation of the sample when NPs are mixed with the proteins (data not shown).

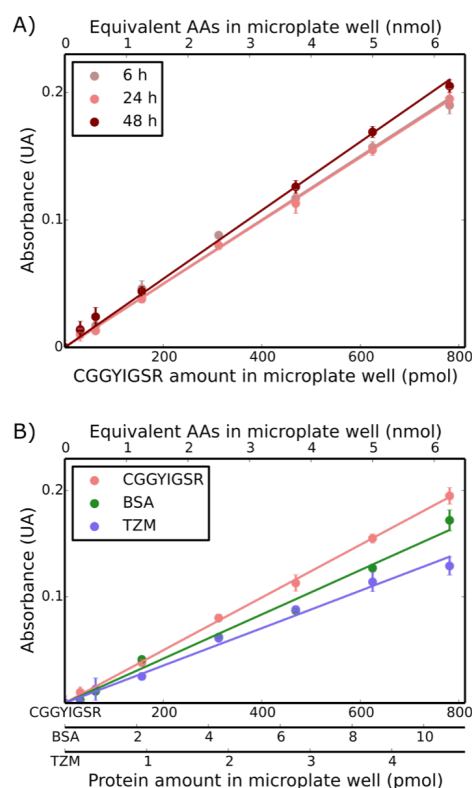


Figure 4.3 (A) Relative absorbance (blank subtracted) of CGGYIGSR hydrolysates after derivatization with TNBS for three different hydrolysis durations. Bottom horizontal axis represents the CGGYIGSR amount in a microplate well, while the top horizontal axis represents the equivalent amount of AAs. (B) Relative absorbance (blank subtracted) of CGGYIGSR, BSA, and TzM hydrolysates after derivatization with TNBS. Hydrolysis duration is 24 h. The top horizontal axis represents the overall corresponding number of AAs, while each bottom horizontal axis represents the amount of one of the three proteins. The lines are linear regressions (y-intercept = 0), with for each line $R^2 > 0.99$. Each data point is the average of nine measurements from three independent experiments. Error bars show the standard deviation.

Figure 4.3B shows that for an identical number of corresponding residues, the two largest proteins yield a lower absorbance signal, indicating a less efficient hydrolysis. In both BSA [462]

and TZM [463] sequences, about 17% of total peptide bonds are between two hydrophobic residues. These specific bonds are very stable and have been proven to be difficult to cleave [446], hence a lower hydrolysis yield. A similar proportion of bonds between two hydrophobic residues is found in CGYIGSR, yet, as a short peptide, its structure does not allow for the deep burying of these bonds.

For glycosylated TZM, the presence of sugars caused secondary reactions with complex side products [446, 464], which hampers the hydrolysis yield even more.

Because the hydrolysis efficiency is highly protein-dependent, we highly recommend to use a specific calibration curve for each protein quantified with this approach.

4.7.2 Hydrolysis of NP-Protein Mixes

We then studied the protein hydrolysis in the presence of each NP type. The characteristics of the NPs used in this experiment are summarized in Table 4.2. The NP amount in each sample is initially fixed so that 2.5 nmol of AA residues correspond to 10 BSA per NP. Then, each sample contains the same number of NPs (4.29×10^{-13} mol per well), while the protein amount varies as described in the previous section. The calibration curves obtained after complexation with TNBS (UV-vis quantification method) are displayed in Figure 4.4.

Table 4.2 Characteristics of the NPs used in the present study ²

	PLA NPs	AuPEG NPs	SiO ₂ NPs
volumetric mass density (g/cm ³)	1.25	19.3	1.3
hydrodynamic diameter (nm)	130±4	18±2	22±2
mass of 4.29×10^{-13} mol NPs (μg)	372.9	15.21	3.82
concentration of the NP solution (g/L)	2.0	5.9×10^{-2}	0.8
corresponding volume (μL)	186.5	257.8	4.8

Except for CGGYIGSR + PLA and BSA + AuPEG, no statistically significant difference in the slope of the calibration curves is observed in the presence or absence of NPs. All statistical parameters are summarized in Table A.2. For both CGGYIGSR + PLA and BSA + AuPEG, complex NP- and protein-dependent matrix effects, which are not elucidated here, might be at the origin of the difference.

The precision of the quantification was further assessed by measuring the relative gaps between each curve in the presence of NPs and the reference curve without NPs. For all curves displayed in Figure 4.4, this relative gap is smaller than 20%. Except for (i) CGGYIGSR

². Concentration of the NP solutions and corresponding volumes are given on an indicative basis because samples are freeze-dried before use.

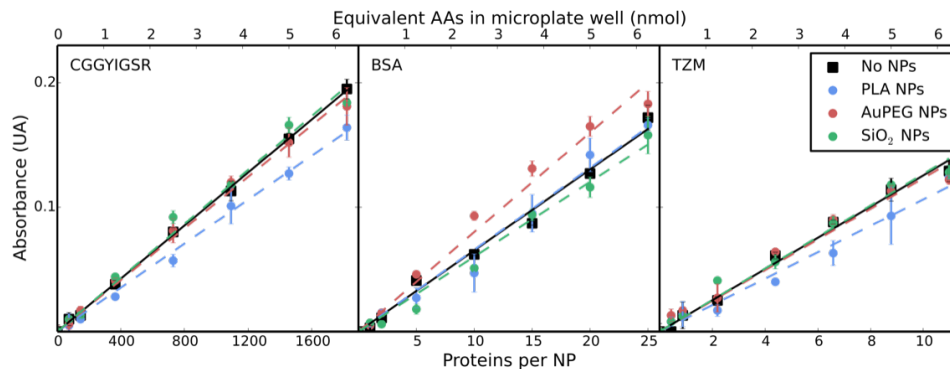


Figure 4.4 Relative absorbance (blank subtracted) of CGGYIGSR, BSA, and TzM hydrolysates after derivatization with TNBS. Bottom horizontal axes represent the average number of proteins per NP in the mix, when using the NPs described in Table 4.2. Top horizontal axes represent the overall equivalent number of AAs. Lines are linear regressions (y -intercept = 0), with for each line $R^2 > 0.99$, except for TzM with AuPEG NPs ($R^2 = 0.988$). Each data point is the average of nine measurements from three independent experiments. Error bars show the standard deviation.

+ PLA and BSA + AuPEG – for which a larger gap is expected because of the difference between the calibration curves – and (ii) TzM + PLA, it is even smaller than 10% (Table A.3).

Besides, the blank absorbance in the presence of NPs is consistently equal to the reference blank absorbance under the conditions described in 4.2 (4.5).

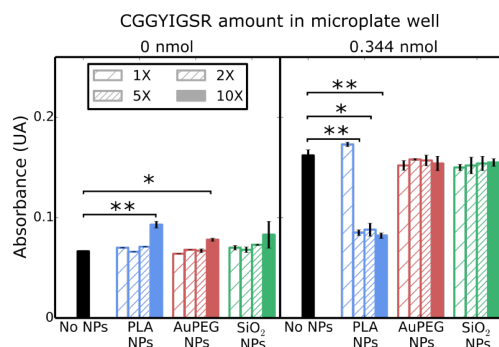


Figure 4.5 Absorbance of blank or CGGYIGSR hydrolysates after derivatization with TNBS. NP concentration varies from 1X (as defined in Table 4.2) to 10X. 0 nmol (0.344 nmol) bars are the average of six (nine) measurements from two (three) independent experiments. Error bars show the standard deviation. * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$) indicate a statistically significant difference from the reference signal without NPs (bilateral t -test).

According to Figure 4.3, the hydrolysis of NP-protein mixes coupled to a TNBS-based amine

quantification allows for the easy detection of as few as 200 CGGYIGSR, 3 BSA, or 2 TzM per NP (indicative values). The resolution is particularly good for bigger proteins because their hydrolysis produces more free amino groups.

All the above observations show that the sample hydrolysis eliminates the NP-induced background noise during the subsequent amine quantification. In practice, this indicates that running a TNBS assay on a hydrolyzed sample containing nano-objects could only require a calibration curve produced without NPs. For large proteins such as BSA or TzM, the average NP functionalization degree can be determined down to the single protein, considering the prediction error to be about 10%.

4.7.3 Strategies to Improve the Protein per NP Resolution

In most cases, the experimental conditions used in Figure 4.4 are sensitive enough to determine the functionalization degree of the NPs. However, it is sometimes necessary to improve the accessible resolution, which here refers to the range of protein/NP ratios that can be measured: (i) to precisely quantify the conjugation rates of peptides or small proteins, (ii) to quantify proteins at the surface of NPs that are bigger than the ones used in this study, or (iii) to quantify the samples that do not contain enough equivalent AAs for TNBS detection.

In this section, we propose two different strategies to address these situations:

1. Increasing the NP amount in each sample, using TNBS for the amine quantification. Indeed, for the same amine amount, the corresponding number of proteins per nano-object decreases when the NP amount increases;
2. Using a more sensitive reagent than TNBS for the detection of small amine amounts. Indeed, TNBS requires the amine amount in the sample to be in the nanomole range

TNBS Detection with an Increased NP Amount

Because nano-objects are hydrolyzed during the process, NP amounts can be described regardless of the original NP geometry. Therefore, in the following sections, the NP amounts will be indiscriminately described by their mass.

For a given mass of NPs, assuming the NP density remains constant, the bigger the NPs, the smaller the NP molarity. Thus, increasing the NP amount in the sample both allows for (i) the quantification of smaller functionalization rates and (ii) the characterization of bigger, therefore heavier NPs.

In Figure 4.5, we determined the maximum NP mass that can be added to a sample without hampering the subsequent TNBS assay. We hydrolyzed samples containing a fixed amount of

CGGYIGSR and 1 (1X), 2 (2X), 5 (5X), or 10 (10X) times as much NPs as defined in Table 4.2. The CGGYIGSR amount is either null or corresponds to 800 CGGYIGSR moieties per NP when the NP concentration is 1X. For each set of conditions, the subsequent TNBS signal is compared to the reference one, obtained without NPs in the mix.

For PLA NPs, 1X is the maximum NP amount that allows a TNBS quantification. Above this concentration, the signal for CGGYIGSR samples strongly decreased down to the same absorbance range as the blank samples (Figure 4.5), which is due to the PLA hydrolysis yielding lactic acid molecules. When the lactic acid concentration exceeds a certain threshold, the TNBS resuspension buffer is not strong enough to preserve the optimal pH (8.5) at which TNBS amine complexation occurs.

For AuPEG NPs, no difference is observed between any of the CGGYIGSR samples and the reference sample without NPs. However, when the AuPEG NP concentration reached 10X, the absorbance of the blank was significantly higher than the reference, indicating that the NP degradation during the hydrolysis was not complete under these conditions. Therefore, 5X is the maximum NP amount that allows a TNBS quantification for AuPEG NPs.

No statistically significant difference is observed between both blank and CGGYIGSR samples and their respective references when the SiO₂ NP concentration is increased. However, when the NP amount reached 10X, the standard deviation of the blank sample was very high, indicating that the SiO₂ NP degradation during the hydrolysis was suboptimal at this concentration. 5X is then reported as the maximum NP concentration allowing a TNBS amine quantification after hydrolysis in the presence of SiO₂ NPs. The maximum amounts determined above and the corresponding masses are summarized in Table 4.3.

Table 4.3 Maximum NP mass per microplate well that allows TNBS detection without matrix effect

	PLA NPs	AuPEG NPs	SiO ₂ NPs
maximum NP amount for a TNBS detection (μg)	372.9 (1X)	76.1 (5X)	19.1 (5X)

Use of a More Sensitive Quantification Reagent

TNBS detection requires the number of free amines in the sample to be in the nanomole range. When only small amounts of materials are available, it is interesting to use more sensitive spectrometric detection methods. In this section, we use CBQCA, which forms a fluorescent compound after complexation with free amines. Fluorometric detection methods often have smaller detection thresholds than colorimetric methods. Besides, CBQCA provides a greater

signal amplitude than other fluorescent amine-reactive reagents such as fluorescamine or o-phthaldialdehyde [445].

Here, we studied CGGYIGSR hydrolysis in the presence of NPs. Samples contained between 25 and 625 pmol of AA residues, being 10 times less than above. The NP amount was as described in Table 4.2. Under these conditions, the range of protein-NP ratios that can be measured is 10 times smaller than shown in Figure 4.4.

The calibration curves obtained after hydrolysis and subsequent amine quantification with CBQCA are shown in Figure 4.6. The first observation is the poor quality of the linear regressions: for each curve, the coefficient of determination R^2 is between 0.95 and 0.99. Besides, the standard deviation between replicates is very high.

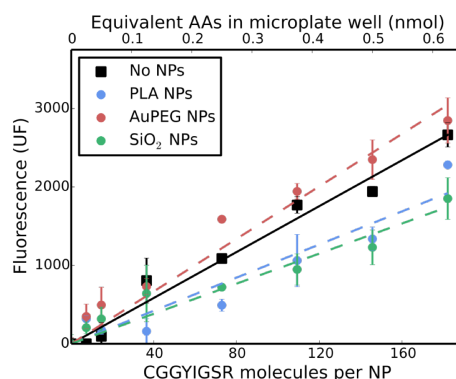


Figure 4.6 Relative fluorescence (blank subtracted) of CGGYIGSR hydrolysates after derivatization with CBQCA. Bottom horizontal axis represents the average number of peptides per NP in the mix, when using the NPs described in Table 4.2. Top horizontal axis represents the overall equivalent number of AAs. Lines are linear regressions (y -intercept = 0), with for each line $0.95 < R^2 < 0.99$. Each data point is the average of nine measurements from three independent experiments. Error bars show the standard deviation.

No statistically significant difference is inferred between the calibration curve in the presence of AuPEG NPs and the reference line without NPs. Furthermore, the relative gap between the calibration curves in the presence and absence of AuPEG NPs is 12.5%.

The slope of the linear regression obtained in the presence of SiO₂ NPs is significantly different from the slope of the control without NPs. Besides, the corresponding relative gap with the reference is 53%. No statistically significant difference can be inferred between the curve in the presence of PLA NPs and the reference line. However, the relative gap between protein amounts calculated using both lines comes to 39%.

Under these experimental conditions, the use of CBQCA as an amine-reactive reagent might prove useful in the presence of AuPEG NPs. In that case, the protein amount can be

determined based on a calibration curve without NPs. On the contrary, this strategy cannot be used for PLA or SiO₂ NPs. In the case of low functionalization rates that fall in the range of CBQCA sensitivity for those types of particles, the calibration must be performed with the same NP amount as in the sample.

In Figure 4.6, we used the same NP amount as the ones reported in Figure 4.4 (Table 4.2). When fewer PLA or SiO₂ NPs are present in the sample, the matrix effect caused by the NPs is slightly reduced [Figure A.3, with 10 times less (0.1X) NPs], with (i) no statistically significant difference between the slope in the presence of PLA and the slope without NPs and (ii) relative gaps with the reference of 21% (PLA) and 25% (SiO₂). However, the previously mentioned concerns regarding the poor quality and high variability of the experimental data remain valid.

CBQCA assay works over a wide amine concentration range, which allows for the detection of up to 10 times smaller protein amounts than TNBS. However, it has several significant drawbacks. First, the signal variability in this amine concentration range is very high. For a better precision, it can be necessary to increase the number of replicates ($n > 4$), thereby increasing the total sample amount needed to perform the measurement. Second, a CBQCA assay is about one hundred times more expensive than a TNBS assay³ for a highly debatable experimental gain. Therefore, when possible, we highly recommend using TNBS over CBQCA for amine quantification after protein-NPs hydrolysis.

4.7.4 Sensitivity Dependency on the NP Size

As mentioned above, the sensitivity of this approach, in terms of number of proteins per NP, depends on both the number of residues in the protein and the NP volume. Considering a protein composed of N_{res} AA residues, the number of proteins per NP is linked to the NP volume V_{NP} by equation 4.5, where n_{AA} is the number of AAs in the sample after hydrolysis (in the nanomole range for TNBS detection), ρ is the NP volumetric mass density, m_{NPs} is the total mass of NPs in the sample, and $\mathcal{N}_A$ is the Avogadro constant.

$$\text{Protein/NP} = \frac{n_{AA}\rho V_{NP}\mathcal{N}_A}{N_{res}m_{NPs}} \quad (4.5)$$

In the case of spherical NPs, this quantity becomes:

$$\text{Protein/NP} = \frac{n_{AA}\rho\pi D^3\mathcal{N}_A}{6N_{res}m_{NPs}} \quad (4.6)$$

3. Comparison based on the prices available on the manufacturers' websites (as of June 2020) and on protocols they supply

where D is the NP diameter.

A few examples of the maximum resolution in terms of protein per NPs when using TNBS detection are given in Table 4.4. Briefly, when considering spherical NPs, doubling the NP diameter causes the sensitivity in terms of proteins per NP to decrease by a factor of 8. In terms of surface protein density, the sensitivity is then divided by 2.

Table 4.4 Typical protein-NP ratios that can be detected using TNBS ⁴

	PLA NPs			AuPEG NPs			SiO ₂ NPs		
NP diameter (nm)	50	100	150	20	50	100	20	50	100
CGGYIGSR (8 residues)	41	330	1114	200	3124	25 000	54	838	6704
BSA (583 residues)	<1	5	15	3	57	343	<1	11	92
TZM (1328 residues)	<1	2	6	1	19	150	<1	5	40

4.7.5 Quantification of Protein Adsorption and Covalent Grafting on Polymeric NPs

All the above experiments have been performed with protein-NP mixes. However, this strategy remains valid for the concrete quantification of proteins grafted or adsorbed at the surface of NPs. In this section, we use two conjugation strategies to functionalize PLA-PEG NPs with CEE, a fusion protein displaying hEGF: (i) passive protein adsorption and (ii) oriented thiol-maleimide coupling via the N-terminal cysteine of CEE. After the reaction, NPs are separated from their supernatant containing unreacted CEE. Both phases are then independently characterized using different methods to assess the robustness of the hydrolysis + TNBS quantification strategy. NP-containing samples are hydrolyzed and quantified by TNBS, while unreacted CEE in the supernatants is quantified by ELISA.

The initial CEE amount added to the reaction mixes was estimated by ELISA to be 100 pmol, which amounts to 11.9 nmol of AA residues. After overnight incubation at room temperature, this amount is quantified again in control samples (without NPs) using both methods. Sample hydrolysis produced a value of 37.8 pmol of CEE, and while ELISA led to a value of 51.2 pmol. Promisingly, those two estimates are within the same order of magnitude. However, those two measurements seem to indicate an important loss during the reaction. Such a loss of matter can be explained by CEE's high propensity to adsorb on hydrophobic labware during the manipulations.

Figure 4.7 shows the results of the comparative characterization using both quantification

4. These values are obtained from equation 4.6 with $n_{AA} = 2.5$ nmol in the middle of the TNBS range and with m_{NPs} as described in Table 4.3.

methods. All amounts are expressed as percentages of the amount measured for the corresponding positive control (37.8 pmol for hydrolyzed samples and 51.2 pmol for supernatants, respectively). The stacked bars represent the total amount of CEE divided between the NP surfaces (conjugated CEE) and the supernatant (unreacted CEE). For both conjugation strategies, the summed amounts come close to 100%. This result demonstrates a high consistency between the two quantification methods.

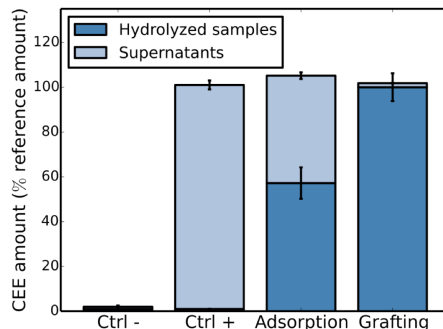


Figure 4.7 Assessment of CEE grafting efficiency using posthydrolysis amine quantification (samples) and ELISA (supernatants). “Ctrl -” is a negative control containing NPs and no CEE. “Ctrl +” contains CEE and no NPs. Amounts are expressed as a percentage of the amount initially added to the reaction mix. Each bar is the average of three replicates. Error bars show the standard deviation.

In this particular example, sample hydrolysis followed by amine quantification allowed us to validate our ability to successfully conjugate a protein to NPs. Besides, it showed that the oriented coupling of the protein is more efficient for conjugation than the random nonspecific adsorption alone.

4.7.6 Scope of Applicability and Potential Limitations

This work presents a quantification strategy to quantify proteins at the surface of NPs. This method relies on hydrolysis to degrade both protein and NP (PLA, AuPEG, and SiO₂ NPs), which allows the subsequent spectroscopic amine quantification to be performed without the NPs contributing to the background signal. However, it cannot be excluded that some NPs remain stable even after the hydrolysis, in which case, we can add a centrifugation step to separate hydrolyzed AAs from the remaining NPs [436].

Performing a control with NPs alone is good practice and should be done systematically. This precaution becomes a prerequisite when either the studied NPs or a conjugation linker contains primary amines. If the spectroscopic contribution of the primary amino groups of

the NPs alone is similar to or has lower intensity than the one of the hydrolyzed proteins, the present quantification approach will remain efficient. It is then enough to subtract the blank absorbance value before using the external calibration curve. However, when this contribution supplants the one of the hydrolyzed proteins — as can be expected, for example, in the case of proteinic NPs or nylon NPs — another quantification strategy may be preferred. For example, Filbrun and Driskell [465] used potassium iodide to selectively dissolve biofunctionalized gold NPs and then used a fluorescent reagent to quantify the intact proteins. Similarly, Kozlowski *et al.* [466] relied on the intrinsic fluorescence of an enzyme to characterize its grafting on gold NPs, after selective NP dissolution in potassium cyanide.

Our quantification strategy possesses several advantages that make it suitable for a wide range of situations. First, it is a general approach which can be used for several types of NPs — regardless of their material, size, or shape — and all types of proteins without labeling. Second, quantifying amino groups allows here for an increased quantification sensitivity because the hydrolysis of peptide bonds produces extra free amines. Finally, the use of a parallel hydrolysis platform and the microplate format of the spectroscopic assay increases the throughput of the method.

The long duration of the hydrolysis step — here, 24 h and six additional hours for HCl evaporation — might prove limiting for some applications. When a time-consuming quantification is not an option, alternative hydrolysis strategies can be considered. For example, microwave-assisted protein hydrolysis can be performed in only 5 min at 160 °C [454].

The approach presented here is not suitable for the quantification of the grafting of more than one protein population to the NPs. Indeed, spectroscopic protein quantification methods only provide an average protein content. When the quantification of protein mixes is needed, the posthydrolysis spectroscopic quantification can be replaced by liquid-chromatography-based methods. The chromatography step will separate the hydrolyzed AAs and allow their independent quantification. Provided that the sequences of the studied proteins are known, peak identification on the chromatogram will provide the relative amount of each AA residue in the mix, from which the relative amount of each protein can be deduced.

The use of high-performance liquid chromatography (HPLC) has been proven efficient to quantify antibodies in the presence of silica [435] and gold NPs [436]. However, because HPLC separates the AAs, we would not recommend to use this method when only one protein is quantified, as the separation fractionates the signal and consequently impacts the sensitivity.

On the contrary, our strategy relies on the quantification of primary amines, which regroups the signal of all hydrolyzed residues for a better sensitivity. Besides, HPLC equipment

is expensive and requires trained operators, while TNBS is an inexpensive derivatization reagent and allows easy spectroscopic characterization.

4.8 Conclusions

In summary, we demonstrate here that the quantification of protein conjugation at the surface of NPs can be carried out by acid hydrolysis of protein-NP mixtures, followed by a spectroscopic quantification of amino groups. This approach is reported here for the characterization of several of the most widely used NPs: polymeric PLA NPs, PEGylated gold NPs, and silica NPs. All types of proteins, embodied here by short peptide CGGYIGSR, serum protein BSA, and glycosylated monoclonal antibody TZM, can be quantified using this strategy. We propose TNBS as an efficient and inexpensive reagent to perform the UV-vis quantification of the amino groups after sample hydrolysis. Other amine-reactive compounds might be used, provided their experimental efficiency is previously assessed.

Altogether, we report here both (i) a versatile approach for the quantification of proteins on biofunctionalized NPs, validated for several types of NPs and all types of proteins and (ii) quantitative considerations on the influence of the NP size on the sensitivity of the method.

This procedure could be widely used as a routine and high-throughput quantification assay for biofunctionalized NPs, thus contributing to the better characterization of formulations for various biomedical applications.

4.9 Associated Content

Supporting information is presented in annex A.

Heating bock detailed blueprints, DLS data, complementary UV-vis absorbance and fluorescence characterization of hydrolyzates, and statistical parameters.

4.10 Acknowledgements

This work was supported by the Canada Research Chair on Bioinspired Materials (X.B.), by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada Discovery Grant (G.D.C. and X.B.), by the Biomedical Science and Technology Research Group (R.O., B.L., F.M., and G.D.C.), and by the Fonds de Recherche du Québec — Nature et Technologies (R.O. and F.M.). The present work was funded by the Natural Sciences and Engineering Research

Council of Canada via the NSERC-CREATE PrEEmiuM program (R.O.) and by the Trans-MedTech Institute (R.O., B.L., A.G.-A., and F.M.) and its main funding partner, the Canada First Research Excellence Fund. The authors would also like to thank Sébastien Chénard from the Department of Chemical Engineering at Polytechnique Montréal for his help on designing the heating block.

The authors declare no competing financial interest.

– RÉCAPITULATIF –

DÉVELOPPEMENT D'UNE STRATÉGIE POLYVALENTE À HAUT DÉBIT POUR LA QUANTIFICATION DE PROTÉINES EN SURFACE DE NPs

Dans cet article, nous proposons une approche de quantification de protéines en surface de NPs basée sur les principes suivants :

1. **quantification par absorbance** : ne nécessite pas d'équipement onéreux ou spécialisé ;
2. **approche destructive** :
 - (i) pour diminuer l'absorbance intrinsèque de la suspension colloïdale, les NPs sont dissoutes ;
 - (ii) pour augmenter la quantité d'amines primaires en solution, et donc la sensibilité de la méthode, les protéines sont hydrolysées ;
3. **stratégie non spécifique** : le TNBS réagit avec les amines libres présentes dans le mélange après l'hydrolyse des protéines et la dissolution des NPs, ce qui élimine la nécessité de marquer les protéines.

La stratégie proposée permet de remplir les trois sous-objectifs établis en amont de l'étude : (i) la validité pour **tous peptides et protéines** en surface de **multiples types de NPs**, (ii) l'**absence de marquage ou de modification** préalable des protéines et (iii) l'utilisation de **matériel de laboratoire courant et non spécialisé**. Dans la section 7.1, nous discuterons de la mise en application de cette stratégie dans le cadre de ce travail de recherche.

CHAPITRE 5 ARTICLE 2 — MACROPOROUS DEXTRAN HYDROGELS FOR CONTROLLED GROWTH FACTOR CAPTURE AND DELIVERY USING COILED-COIL INTERACTIONS

Hydrogels de dextrane macroporeux pour la capture et la relâche contrôlées de facteurs de croissance par des interactions superhélices

L'article présenté dans ce chapitre a été publié le 14 septembre 2022 dans la revue *Acta Biomaterialia* [410]. Il récapitule les travaux menés pour remplir l'objectif n°2 de ce travail de recherche.

5.1 Résumé

Les hydrogels macroporeux sont particulièrement adaptés pour des applications biomédicales variées. Cependant, leur géométrie permet la diffusion libre des molécules dans le réseau de macropores. Il est donc nécessaire de développer des gels biofonctionnalisés à effet d'affinité pour permettre de capturer et/ou relâcher des biomolécules de façon prolongée et contrôlée. Nous proposons l'utilisation du complexe superhélice E/K, composé de la paire de peptides d'affinité Ecoil et Kcoil, pour la capture et la relâche contrôlées de facteurs de croissance par des hydrogels de dextrane aux macropores hautement interconnectés. Nous avons conjugué le peptide Kcoil à la matrice de dextrane pour capturer et relâcher deux facteurs de croissance étiquetés par le peptide Ecoil : le facteur de croissance de l'épiderme (epidermal growth factor, EGF) et le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (vascular endothelial growth factor, VEGF). Nous proposons quatre leviers de contrôle pour modifier finement le comportement des hydrogels : (i) la taille des macropores, (ii) la densité de greffage du peptide Kcoil, (iii) le nombre d'étiquettes Ecoil portées par les facteurs de croissance et (iv) l'affinité du complexe E/K. Nous montrons que fonctionnaliser les hydrogels macroporeux avec le peptide Kcoil permet d'augmenter la capture passive d'un facteur de croissance par un facteur 20. De plus, après une semaine, seulement 20% des facteurs de croissance initialement chargés sont relâchés, avec une bioactivité maintenue. Les hydrogels de dextrane macroporeux à effet d'affinité sont une plateforme polyvalente et hautement paramétrable pour la livraison contrôlée de facteurs de croissance pour des applications biomédicales.

5.2 Header

Macroporous Dextran Hydrogels for Controlled Growth Factor Capture and Delivery using Coiled-coil Interactions

Romane Oliverio^{a,b}, Victor Patenaude^a, Benoît Liberelle^a, Nick Virgilio^c, Xavier Banquy^b, and Gregory De Crescenzo^{a,*}

5.3 Author Affiliations

^a Department of Chemical Engineering, Polytechnique Montréal, Montréal, Québec H3T 1J4, Canada.

^b Faculty of Pharmacy, Axe Formulation et Analyse du Médicament (AFAM), Université de Montréal, Montréal, Québec H3T 1J4, Canada.

^c Department of Chemical Engineering, Centre de Recherche sur les Systèmes Polymères et Composites à Haute Performance (CREPEC), Polytechnique Montréal, Montréal, Québec H3T 1J4, Canada

* Corresponding author. Email: gregory.decrescenzo@polymtl.ca.

5.4 Abstract

Macroporous hydrogels possess a vast potential for various applications in the biomedical field. However, due to their large pore size allowing for unrestricted diffusion in the macropore network, macroporous hydrogels alone are not able to efficiently capture and release biomolecules in a controlled manner. There is thus a need for biofunctionalized, affinity-based gels that can efficiently load and release biomolecules in a sustained and controlled manner. For this purpose, we report here the use of a E/K coiled-coil affinity pair for the controlled capture and delivery of growth factors from highly interconnected, macroporous dextran hydrogels. By conjugating the Kcoil peptide to the dextran backbone, we achieved controlled loading and release of Ecoil-tagged Epidermal and Vascular Endothelial Growth Factors. To finely tune the behavior of the gels, we propose four control parameters: (i) macropore size, (ii) Kcoil grafting density, (iii) Ecoil valency and (iv) E/K affinity. We demonstrate that Kcoil grafting can produce a 20-fold increase in passive growth factor capture by macroporous dextran gels. Furthermore, we demonstrate that our gels can release as little as 20% of the loaded growth factors over one week, while retaining bioactivity. Altogether, we propose

a versatile, highly tunable platform for the controlled delivery of growth factors in biomedical applications.

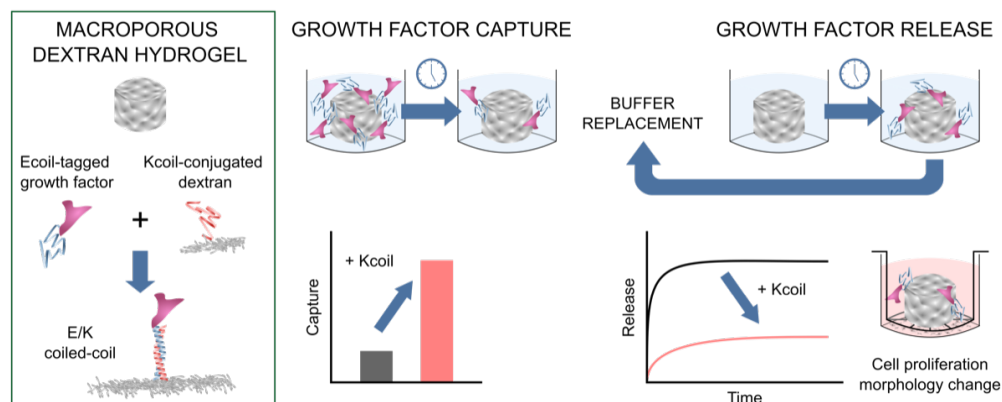


Figure 5.1 Graphical abstract

Statement of significance: this work presents a highly tunable platform for growth factor capture and sustained delivery using affinity peptides in macroporous, fully interconnected dextran hydrogels. It addresses several ongoing challenges by presenting: (i) a versatile platform for the delivery of a wide range of stable, bioactive molecules, (ii) a passive, affinity-based loading of growth factors in the platform, paving the way for *in situ* (re)loading of the device and (iii) four different control parameters to finely tune growth factor capture and release. Altogether, our macroporous dextran hydrogels have a vast potential for applications in controlled delivery, tissue engineering and regenerative medicine.

Keywords: macroporous hydrogels, pore interconnectivity, coiled-coil interactions, growth factors, controlled delivery.

5.5 Introduction

Growth factors are a ubiquitous class of proteins involved in many cellular mechanisms, including cell proliferation and differentiation, as well as wound healing and tissue regeneration [467, 468]. They have long been investigated for therapeutic applications including angiogenesis for tissue vascularization [22], osteogenesis [469], tissue repair [470] or neural growth [471]. However, they are very sensitive and undergo quick degradation in serum, leading to a loss of bioactivity [468]. To tackle this challenge, research has focused on the development of platforms that allow for the sustained delivery of bioactive growth factors [468, 472].

Hydrogels soon emerged as potential tools for achieving this purpose [468]. These highly hy-

drated networks, made from physically or chemically crosslinked hydrophilic polymers, have a high biocompatibility and exhibit interesting extracellular matrix-like properties. The easiest way to deliver growth factors from hydrogels relies on passive diffusion through the hydrogel mesh [203,312]. However, this approach, though efficient in slowing the release by hindering protein diffusion in the tight polymer network [202,203], is not optimal for loading and reloading purposes. An alternative avenue has been proposed in the form of macroporous hydrogels [206,265,473], where the polymer mesh is organized around macropores ($>10\text{ }\mu\text{m}$). These macropores can allow for the loading of bioactive components of different sizes and nature — including proteins [328], nanoparticles [474] and cells [208] — making macroporous hydrogels promising tools for a wide range of biomedical applications. Since they are designed for the desired phenomena to occur in the macropore network, they can be chemically crosslinked, with a dense polymer mesh, which leads to robust, easy to handle materials.

For macroporous hydrogels, where protein diffusion mainly occurs in the macropore network, it is necessary to functionalize the scaffolds to improve retention and prevent abrupt, immediate release *in situ*. Extensive research has focused on the functionalization of both bulk and macroporous hydrogels to allow for affinity-based controlled retention of biomolecules [312,475]. Among the most common strategies, we find the use of heparin for the delivery of heparin-binding proteins [314], aptamers [328,476] or affinity peptides [331,353,477].

Coiled coils are an example of such affinity peptides. These motifs, composed of two or more α -helices assembled to form a superhelix, have been extensively studied, and the elucidation of the sequence-to-structure relationship enabled the design of *de-novo* coiled-coil affinity pairs [339,340,362]. Such synthetic affinity peptides have notably been used for controlled biomolecule delivery [364,478,479] and tissue engineering applications [480,481]. The E/K heterodimer [340], composed of the two peptides Ecoil and Kcoil, is an example of a *de-novo* designed coiled coil. Previous work by our research group has focused on the grafting of Kcoil to polymeric substrates in an oriented manner [302,353,355,357,482], as well as the production of several Ecoil-tagged protein chimeras [349–351]. The induced affinity between the substrates and proteins has been used for vascular applications [302,356,482,483], gene [484] and nanoparticle delivery [353], and for the development of bioassays [359,360].

Here, we propose the use of the E/K affinity pair to (i) improve the loading and (ii) control the release of the Epidermal Growth Factor (EGF) and the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) from macroporous dextran hydrogels. Dextran is a biocompatible and biodegradable polysaccharide, rich in hydroxyl groups that can be used in crosslinking and functionalization reactions [208,246,302]. Additionally, its low fouling properties [188] make dextran an ideal candidate to study specific interactions such as the E/K oligomerization.

In this study, macroporous dextran gels are produced by chemically crosslinking dextran after molding it into macroporous polylactic acid (PLA) scaffolds [240]. This strategy allows for the generation of a homogenous, highly interconnected pore network with controlled pore size [239], thus tackling an ongoing challenge encountered by macroporous hydrogels [206].

This work focuses on the development and characterization of Kcoil-functionalized gels, and their use for the capture and controlled release of Ecoil-tagged EGF and VEGF. We explore four control parameters to finely tune the behavior of the gels: (i) pore size, (ii) Kcoil grafting density, (iii) Ecoil valency and (iv) E/K affinity. In addition, we perform cell proliferation assays to demonstrate that our platform preserves growth factor bioactivity. Altogether, we demonstrate that functionalization with a strong affinity peptide pair like the E/K coil-coil can make macroporous dextran hydrogels powerful tools for protein capture and release.

5.6 Material and Methods

5.6.1 Macroporous PLA Scaffolds

Polylactic acid (PLA) IngeoTM 4032D — melt flow index: 7 g/10 min at 210 °C/2.16 kg, ρ (200 °C) = 1.11 g/cm³ — was purchased from NatureWorks, and Polystyrene (PS) MC3650 — melt flow index: 13.0 g/10 min at 200 °C/5 kg, ρ (200 °C) = 0.97 g/cm³ — was obtained from Americas Styrenics.

Co-continuous PS/PLA blends were prepared as previously described [239]. Briefly, PLA granules were dried in a vacuum oven for 12 h at 60 °C. Dry PLA and PS were then melt-processed using an AG 34 mm Leistritz co-rotating twin-screw extruder at 190 °C, at a 50/50 wt% ratio with two feeders. The extruded polymer blend rods — approx. 1.6 cm in diameter — were immediately quenched and solidified in a cold-water bath to freeze their morphology. Coarsening of the morphology was then achieved by quiescent annealing of 12 cm long rods for 20 min or 60 min using a hot press at 190 °C. After annealing, the rods were again quenched in cold water to freeze their morphology, then dried. The rods were then cut into quarters of cylinders (radius 5-8 mm, height 4-6 mm) and the PS phase was selectively extracted using a Soxhlet apparatus, using cyclohexane (Fisher ChemicalTM #C556) as the extracting solvent. The resulting macroporous PLA scaffolds were then dried in a vacuum oven for 120 h at 60 °C to remove all traces of cyclohexane, then stored at room temperature until use.

5.6.2 Macroporous Dextran Gels Synthesis

Dextran T-500 (Pharmacosmos, 200 mg/mL — 1.1 M) and trisodium trimetaphosphate (STMP) (Sigma #T5508, 40 mg/mL — 0.13 M) were dissolved in ultrapure water (MilliQ grade from a MilliPore Gradient A10 purification system). Sodium hydroxide (final concentration 1 M) was added, and the solution was mixed thoroughly. The solution was then immediately injected into the macroporous PLA scaffolds by pressure/vacuum cycles, using a custom-made injection chamber. The scaffolds were then incubated at 50 °C for 15 min to allow for the crosslinking of dextran by STMP in alkaline conditions [208]. After cooling, the PLA phase was selectively extracted in chloroform (Thermo Scientific™ #42355, changed daily) for 72 h. The obtained macroporous dextran gels were then soaked in Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 (Sigma #D5652, changed twice) overnight. At equilibrium, gels with their macropores filled with buffer weight between 250 and 350 mg.

5.6.3 Macroporous Dextran Gels Functionalization

Kcoil analogs bearing a N-terminal azidohomoalanine (Aha) were used for the conjugation to dextran. All Aha-Kcoil analogs (Table 5.3) were synthesized on a Symphony X (Gyros Protein Technologies) solid phase peptide synthesizer at the University of Sherbrooke (QC, Canada). Aha-Kcoil was grafted to the macroporous dextran gels using copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition [305]. First, dextran gels were incubated overnight in 2 mL of a 200 mM sodium hydroxide solution containing 200 nmol of glycidyl propargyl ether (GPE) (Sigma #50062) on a rotating platform at 37 °C to graft free alkyne groups on the dextran backbone. The gels were then rinsed for 24 h (five buffer changes) in PBS until equilibrium pH was reached. Then, the gels were immersed in 4 mL of a degassed PBS solution containing the desired amount of the selected Aha-Kcoil. A premixed and degassed solution of Tris(3-hydroxypropyltriazolmethyl)amine (THPTA) (Sigma #762342) and copper sulfate pentahydrate (Sigma #C8027) in ultrapure water was then added to the mix (final concentrations: 2 mM THPTA and 0.4 mM CuSO₄), followed by a degassed solution of sodium ascorbate (Sigma #A4034, final concentration 5 mM). The reaction mix was incubated at room temperature on a rotating platform, protected from light. After 24 h, the reaction mix was supplemented with sodium ascorbate to reach a final concentration of 10 mM and incubated as before for an additional 24 h. The gels were then rinsed for 24 h, twice with PBS supplemented with 10 mM ethylenediamine tetraacetic acid (pH 9) to remove copper and three times with PBS only.

5.6.4 Morphology Analysis

The morphologies of the PLA scaffolds and dextran gels were characterized by micro-computed tomography (μ CT). For dextran gels only, pores were emptied by capillarity using a Kimwipe[®] immediately before X-ray imaging, to allow for sufficient contrast. Scans were acquired using a Xradia 520 Versa X-Ray 3D microscope (ZEISS). Volume reconstitutions were performed by the Scout-and-Scan Instrument Control System v16.0 software (ZEISS). Pore sizes and specific surface areas were then measured from 3D reconstitutions of entire samples (> 1000 images per sample, 2 samples per condition) using built-in algorithms on the Dragonfly Pro 2020 software (Object Research Systems). Briefly, based on contrast, pores and material are separated into two complementary regions of interest (ROI). The built-in algorithms then compute (i) the local thickness of each ROI and (ii) the area at the interface of the two ROIs. The thickness mesh directly provides the distribution of pore sizes within the material. The interfacial area is divided by the sample volume to obtain the specific surface area of the material.

5.6.5 Mechanical Characterization of the Gels

Mechanical characterization was performed using a Mach-1 Mechanical Tester (Biomomentum) controlled by the Mach1Motion v3.1.3 software.

Two consecutive 500 μ m vertical compressions were applied on 30 bulk — i.e., non-macroporous, cylindrical (diameter ~ 12 mm, height ~ 10 mm) — dextran hydrogels. Young's modulus (E) is the slope of the linear part of the obtained stress-strain curves.

Similarly, 300 μ m vertical compressions were applied to 30 macroporous dextran hydrogels after each functionalization step, to monitor the influence of Kcoil grafting on Young's modulus.

For both bulk and macroporous gels, the amplitude of the compressions applied for determining Young's moduli was chosen to be $\sim 5\%$ of the total height of the gels.

Poisson's ratio (ν) was measured on 8 bulk dextran hydrogels by applying 3 mm vertical compressions. The diameters of the compressed gels were measured using a caliper. For small compressions, Poisson's ratio can be approximated to the first order by equation 5.1, where ΔL and $\Delta L'$ are the variations in height ($\Delta L = 3$ mm) and diameter, respectively.

$$\nu = -\frac{\Delta L'}{\Delta L} \quad (5.1)$$

Assuming the dextran gels to be isotropic, the shear modulus G is then given by equation

5.2.

$$G = \frac{E}{2 \cdot (1 + \nu)} \quad (5.2)$$

Fatigue tests — two consecutive 500 μm vertical compressions on bulk gels — and elasticity limit assays — 5 mm vertical compressions on porous gels — were also performed to assess the gels' resistance to typical experimental manipulation.

5.6.6 Cell Culture

All cells were kept at 37 °C with 5% CO₂ in a humid incubator.

Human Embryonic Kidney (HEK) 293-6E cells were cultured in shake flasks (120 rpm) in Gibco Freestyle™ F17 Expression medium, supplemented with Geneticin™ G418 (Gibco™ #11811, 50 $\mu\text{g/L}$), Kolliphor® (Sigma #C5135, 1g/L) and L-Glutamine (Gibco™ #A2916801, 4mM).

Human Aortic Smooth Muscle Cells (AoSMC) (Lonza #CC-2571) were cultured in CellBIND® T-flasks and culture plates (Corning) in Smooth muscle Growth Medium-2 (SmGM-2) — basal medium (Lonza #CC-3181) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), insulin, growth factors and antibiotics (SingleQuots™ supplement kit, Lonza #CC-4149). Starving medium corresponds to basal medium supplemented with antibiotics and 0.5% FBS only. “sEGF” medium stands for starving medium supplemented with 5 nM soluble human recombinant EGF (R&D Systems #236-EG).

5.6.7 Protein Production

E5-EGF and E5-VEGF (165 residue-long VEGF isoform) were produced in HEK 293-6E cells as previously described [349, 350, 485]. Briefly, constructs containing the interleukin 2 signal peptide, the desired Ecoil variant, a polyhistidine (His)₈ tag and hEGF (resp. hVEGF₁₆₅) cDNA were inserted into the pTT5 plasmid [485]. HEK 293-6E (cell density of $1.5 - 2 \times 10^6$ cells/mL at the time of transfection) were transiently transfected with a mix of plasmid DNA (final concentration: 1 $\mu\text{g/mL}$) and 25 kDa linear poly(ethylene imine) (Polysciences #23966, PEI:DNA ratio of 2:1 w/w). The cells were supplemented with TN1 peptone (Organotechnie #19553, 0.5% w/v) 24 h post transfection [486]. Cultures were stopped 120 h post transfection and cells were centrifuged (4500 g, 30 min). The supernatant was harvested and 0.45 μm filtered. Proteins were purified by ion metal affinity chromatography (5 mL HisTrap FF crude, Cytiva) and size-exclusion chromatography (HiPrep 26/10 desalting, Cytiva) on an ÄKTA explorer 10 system (GE Healthcare), following the manufacturer's instructions for

buffers and flow rates. The purified proteins were sterile-filtered and stored at -80 °C in PBS.

5.6.8 Capture and Release Assays

Kcoil-functionalized macroporous gels were immersed in 1 mL ($V_{solution}$) of incubation solution containing 50 nM ($C_{solution,init}$) Ecoil-tagged protein solution in PBS + 0.05% v/v Tween-20 (PBS-T) for 72 h, on a rotating platform (125 rpm) in a humid incubator (37 °C, 5% CO₂). The incubation solution was then collected and replaced by 1 mL fresh PBS-T (release medium, t=0 h). At t=1 h, 3 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h and 168 h, the release medium was collected and replaced by 1 mL fresh PBS-T. At the end of the assay, the gels were weighed twice: once immediately after being taken out of the medium (pores full), and a second time after emptying the pores by capillarity using a Kimwipe®. The difference between the two mass measurements was used to determine the pore volume (V_{pores}), assuming a volumetric mass density of PBS-T of 1 g/mL. The measurement of V_{pores} was highly reproducible. In Table B.1, we show that the standard deviation remains typically below 5% for three consecutive measurements.

The collected incubation solution was then analyzed using an anti-hEGF (resp. anti-hVEGF) DuoSet Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit (R&D Systems #DY236, resp. #DY293). This measurement ($C_{solution}$) and the pore volume allowed for the determination of the partition coefficient P_{gel} , characterizing the distribution of the Ecoil-tagged protein between the pores of the gel and the surrounding medium at equilibrium (equation 5.3).

$$P_{gel} = \frac{C_{gel}}{C_{solution}} = \frac{(C_{solution,init} - C_{solution}) \cdot V_{solution}}{C_{solution} \cdot V_{pores}} \quad (5.3)$$

Similarly, all collected release media were analyzed by ELISA to establish the Ecoil-tagged protein release profiles.

5.6.9 Cell Proliferation Assays

3 days before starting an assay, Kcoil functionalized gels were immersed in 1 mL of starving medium containing 50 nM Ecoil-EGF on a rotating platform (125 rpm) in a humid incubator (37 °C, 5%CO₂). On the first day of the assay(D0), at t=0h, 1h and 3h, the solution was collected and replaced by 1 mL of fresh starving medium.

Human AoSMCs were kept in culture in SmGM-2 and used between passages 2 and 4. 24 h before starting the assay, cells were serum-starved with starving medium [302]. On D0, cells were seeded at 15×10^3 cells/cm² in CellBIND® 12-well plates, in starving medium.

After a three-hour adhesion period, an Alamar Blue assay was performed to assess initial cell metabolic activity. Briefly, cells were incubated in starving medium containing 1 mg/mL Resazurin Sodium Salt (Sigma #R7017) for 2 h. Fluorescence intensity ($\lambda_{ex} = 531$ nm, $\lambda_{em} = 595$ nm) was then measured on a Victor 3V 1420 Multilabel Counter plate reader (Perkin Elmer).

At $t=6$ h, cell culture medium was removed, and the gels were placed in custom-made hanging baskets (Figure B.7) to sit 1 mm above the cell layer. 1 mL of fresh starving medium was then added to each well so that the suspended gels are partially immersed. Cells in control wells are incubated without gels and are kept in starving medium or in sEGF medium.

Cell proliferation assays were carried out until D4. Medium was replaced on D1, D2 and D3. On D4, an Alamar Blue assay was performed, and all cells were fixed for 30 min in formaldehyde (4% in PBS, Sigma #1.00496) for subsequent imaging.

5.6.10 Cell Imaging

Fixed cells were permeabilized with Triton X-100 (Thermo ScientificTM #85111, 0.4% v/v in PBS) for 20 min and blocked with 1% Bovine Serum Albumin (BSA) for 1 h. Actin fibers were then stained using 300 μ L/well Alexa FluorTM 488 Phalloidin (1:400 in PBS, InvitrogenTM #A12379). After 1 h, 30 μ L 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:250 in PBS, InvitrogenTM #D1306) were added for nuclei staining and the plates were incubated for an additional 20 min. Plates were then rinsed three times in PBS and imaged using an Eclipse T1 fluorescence microscope (Nikon) equipped with green (for Alexa FluorTM 488) and blue (for DAPI) filter sets and a 10X objective. For each condition, 6 representative images were taken and analyzed using the ImageJ Fiji software [487].

5.6.11 Statistical Analysis

For capture and release assays, Alamar Blue assays and cell image analysis, data correspond to mean $\pm$ standard deviation based on $n = 6$ measurements from two independent experiments. For Young's moduli and Poisson's ratios, data correspond to mean $\pm$ standard deviation for $n = 30$ samples from two independent experiments. Pairwise comparisons were performed using Student bilateral t -tests. Comparison between cumulated release curves was performed by comparing mean areas under curves. For all statistical analyses, a level of confidence of 95% was chosen as the minimum significance threshold.

5.7 Results

5.7.1 Preparation of the Gels

To ensure the creation of a fully interconnected pore network, the dextran gels were molded in porous PLA scaffolds. Detailed schematics of the procedure are available in Figure B.1. The PLA scaffolds are prepared from PS/PLA co-continuous blends [239], coarsened by quiescent annealing after melt-processing. The obtained material presents two intertwined and continuous phases (Figure 5.2A, insert 1). Selective extraction of the PS then leads to a macroporous PLA scaffold (Figure 5.2A, insert 2). Figure 5.2C shows a μ CT image of such a scaffold, where the macroporous morphology is visible. The annealing time has a major effect on the final morphology of the scaffold [239,240]. The longer the annealing, the coarser the pore network, as shown in Table 5.1. Analysis of the pore size distribution, performed by computing a thickness mesh on μ CT 3D reconstitutions of the scaffolds, shows a 20-fold increase in pore size when increasing the annealing time from 20 min to 60 min. The specific surface area of the scaffold, defined as the internal surface area of the pore network per unit of volume, also depends on the annealing time: smaller pores, associated with a more tortuous morphology, lead to a bigger specific surface area (Table 5.1). Macroscopic and μ CT images for 20-min PLA scaffolds and dextran gels are shown in Figure B.2.

Table 5.1 Morphological characteristics of PLA scaffolds and dextran hydrogels, as measured by μ CT ($n = 2$).

Annealing time	PLA scaffold		Dextran hydrogel	
	Specific surface area (cm^{-1})	Average pore diameter (μm)	Specific surface area (cm^{-1})	Average pore diameter (μm)
60 min	51.1	200 ± 100	26.3	400 ± 200
20 min	1880	10 ± 2	n/d	n/d

In the scope of this study, dextran is chemically crosslinked using trisodium trimetaphosphate (STMP) as a crosslinking agent, as previously reported [190,208]. A solution of dextran and STMP dissolved in 1 M NaOH is injected in the PLA scaffold by pressure/vacuum cycles. The highly alkaline conditions allow for the deprotonation of hydroxyl groups, mainly on carbon 2 of the dextran monomers [488], thus enabling the crosslinking by conjugation to the phosphate ions (Figure 5.2B). After a 15 min reaction at 50 °C, the PLA is dissolved in chloroform and the obtained macroporous dextran gel is soaked in PBS until swelling equilibrium is reached (Figure 5.2A, insert 3, also shown in insert 4 with pores emptied). μ CT imaging of a 60-min dextran hydrogel with empty pores (Figure 5.2D) shows that the macroporous structure and the pore interconnectivity are preserved. Interestingly, the pore size is bigger for the

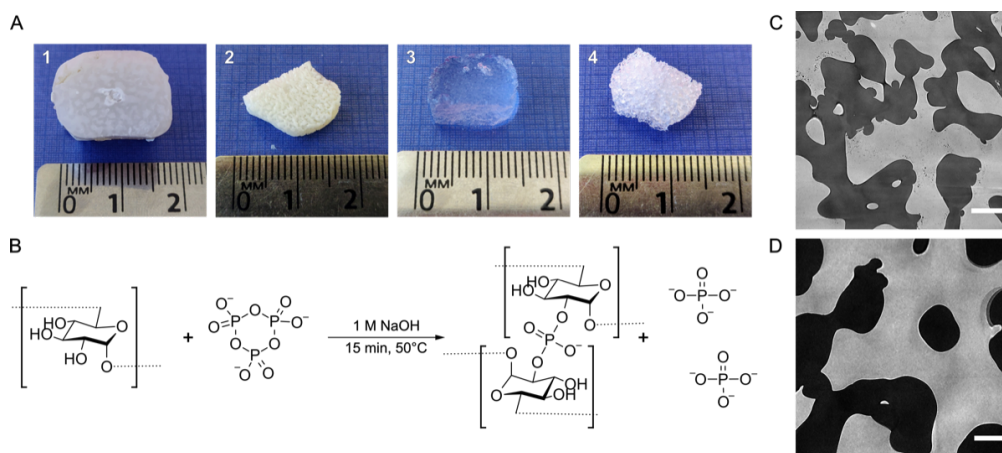


Figure 5.2 Production and characterization of macroporous dextran hydrogels. (A) Macroscopic images of 1) a co-continuous blend of PLA (white) and PS (light grey) after 60 min quiescent annealing, 2) a macroporous PLA scaffold — 60 min quiescent annealing (60-min PLA) — after extraction of the PS phase, 3) a macroporous dextran hydrogel, after molding into a 60-min PLA scaffold, crosslinking, dissolution of the PLA and swelling in PBS and 4) the same dextran hydrogel with emptied pores. (B) Reaction scheme of dextran crosslinking in alkaline conditions. (C) Representative μ CT image of a 60-min PLA scaffold. Light gray areas correspond to the PLA phase. The empty pores are in dark gray. (D) Representative μ CT image of a macroporous dextran hydrogel — molded on a 60-min PLA scaffold. Gray areas correspond to the dextran. The empty pores are in black. For (C) and (D), the scale bar represents 500 μ m.

dextran gels than for the corresponding PLA scaffold (Table 5.1), which is a consequence of the swelling of the dextran matrix. For 20-min dextran hydrogels, μ CT imaging could not be performed because the gels dried out before completing the measurement when their pores were emptied to allow for sufficient contrast. In the rest of this study, 60-min dextran hydrogels will be used, unless otherwise clearly specified. This choice is further discussed in section 5.8.3.

The mechanical properties of the dextran hydrogels were determined using bulk, non-templated gels instead of macroporous gels to assess the intrinsic properties of the dextran matrix rather than the apparent macroscopic moduli. Compression assays measured Young's modulus in the 20 kPa range (Table 5.2). Repeated compressions did not lead to any change in the Young's modulus, indicating a good resistance to mechanical fatigue for small deformations. The measured Poisson's ratio was close to 0.5, which corresponds to the ideal case of a perfectly incompressible material. The shear modulus, calculated from Young's modulus and Poisson's ratio using equation 5.2, is also in the kPa range. The shear modulus G was then used to calculate the mesh size (r_{mesh} , Table 5.2) of the bulk phase of the hydrogels using

equation 5.4, where k_B is the Boltzmann constant and T the temperature.

$$r_{mesh} = \sqrt[3]{\frac{6T}{\pi k_B G}} \quad (5.4)$$

Table 5.2 Mechanical properties of dextran hydrogels. Bulk gels were used to assess the intrinsic properties of the crosslinked dextran, while porous gels were used to investigate the gels' endurance to chemical grafting of Kcoil and experimental manipulation ($n = 30$).

	Young's modulus E (kPa)	Poisson's ratio ν	Shear modulus G (kPa)	Mesh size r_{mesh} (nm)
Bulk dextran hydrogels	18 ± 8	0.5 ± 0.1	6 ± 4	~ 10
	0.2% offset yield point (% deformation)	Variation of Young's moduli during Kcoil grafting (normalized, %)		
		Dex	Dex-GPE	Dex-Kcoil
Porous dextran hydrogels	15 ± 4	100 ± 40	120 ± 30	120 ± 50

60-min porous dextran hydrogels were used to measure the 0.2% offset yield point, which is an indicator of the elasticity limit. The obtained value of $\sim 15\%$ indicates the macroporous gels will not undergo permanent plastic deformation when submitted to routine experimental manipulation. Indeed, no visible deformation of the gels was visible when they were manipulated gently (using a spatula or tweezers). This ensures we remain below the 15% threshold, that is, a 2.4 mm radial deformation for a 16 mm diameter gel.

5.7.2 Kcoil Grafting to the Dextran Surface

Following crosslinking, macroporous dextran hydrogels were functionalized with a Kcoil peptide to allow for coiled-coil-based capture and controlled release of Ecoil-tagged EGF and VEGF (Figure 5.3A).

The dextran surface was first functionalized with alkyne groups (Figure 5.3B). The macroporous gels were incubated in alkaline conditions with glycidyl propargyl ether (GPE). GPE is a linker displaying a terminal epoxide ring and an alkyne moiety. At high pH, most of the hydroxyl groups on carbon 2 of the dextran monomers are deprotonated [488], enabling their reaction with the epoxide. GPE was incubated in excess, (i) to compensate the competing epoxide hydrolysis by hydroxide in solution [489, 490] and (ii) to ensure the subsequent Kcoil grafting is not limited by the availability of the alkyne moieties.

Kcoil was then conjugated to Dextran-GPE by copper-catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition (Figure 5.3C) [305, 491, 492]. To this end, all Kcoil analogs were synthesized with a

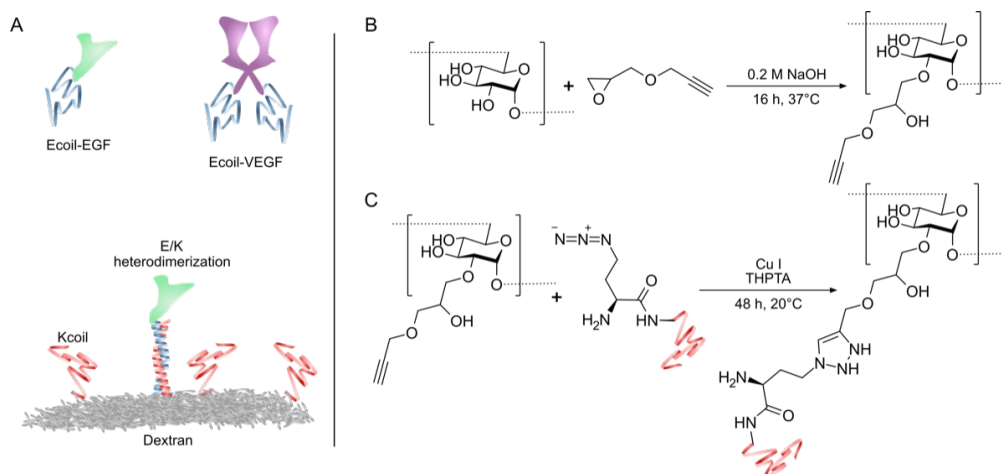


Figure 5.3 Affinity-based macroporous dextran gels: principle and functionalization. (A) Dextran hydrogels are functionalized with the Kcoil peptide. This functionalization allows for the capture of Ecoil-tagged proteins through E/K heterodimerization. In this study, monomeric Ecoil-EGF and heterodimeric Ecoil-VEGF are captured. (B-C) Kcoil is grafted to the dextran gel by click chemistry. (B) Reaction scheme of the coupling of GPE to insert free alkyne groups to the dextran backbone. (C) Reaction scheme of the coupling of Aha-Kcoil by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition.

N-terminal L-azidohomoalanine (Aha, Table 5.3). This non-natural amino acid displays an azide on its side chain, allowing for azide-alkyne bioorthogonal coupling leading to the formation of a triazole ring. Interestingly, no effect on Young's modulus was observed following Kcoil grafting (Table 5.2, Figure B.3), indicating that the amounts of GPE and Kcoil added to the gels do not significantly alter their stiffness.

The sequences of the Ecoil tag and Kcoil analogs used in this study are presented in Table 5.3. All sequences are derived from a wild type, *de novo* designed E/K coiled coil composed of 5 heptads, (EVSALEK)₅ for Ecoil and (KVSALKE)₅ for Kcoil [340].

Once the gels were synthesized and functionalized with the desired Kcoil analog, they were used to perform capture and release assays. First, the gels were immersed in 1 mL of a solution containing an Ecoil-tagged growth factor, namely Ecoil-EGF or Ecoil-VEGF, at a concentration of 50 nM. This allowed for the loading of the gel with the Ecoil-tagged protein, mediated by the E/K interaction. After a 72-h incubation, the surrounding solution was removed and replaced by fresh PBS-T, thus disrupting the equilibrium and triggering growth factor release. Buffer replacement was repeated after 1, 3, 24, 48, 72, 96 and 168 h.

Table 5.3 Amino acid sequence of the peptides used in this study. * The Ecoil sequence represents the Ecoil tag in Ecoil-EGF and Ecoil-VEGF. Amino acids in bold are involved in the hydrophobic core of the coiled coil. Underlined amino acids indicate leucine-alanine substitutions. For Kcoil analogs, thermodynamic dissociation constants for the interaction with Ecoil-EGF are also provided. All dissociation constants come from a previously published work by our group (Murschel et al. [347]).

	Sequence	Ecoil-EGF/Kcoil K_D (M)
Ecoil*	EVSALEK EVSALEK EVSALEK EVSALEK EVSALEK	
K	Ac-AhaGG KVSALKE KVSALKE KVSALKE KVSALKE KVSALKE-NH ₂	$(2 \pm 1) \times 10^{-10}$
K_1	Ac-AhaGG KVSALKE KVSALKE KVSAAKE KVSALKE KVSALKE-NH ₂	$(4.5 \pm 0.2) \times 10^{-9}$
K_2	Ac-AhaGG KVSALKE KVSAAKE KVSALKE KVSAAKE KVSALKE-NH ₂	$(2.4 \pm 0.2) \times 10^{-8}$
K_3	Ac-AhaGG KVSALKE KVSAAKE KVSAAKE KVSAAKE KVSALKE-NH ₂	$(2.7 \pm 0.6) \times 10^{-7}$

5.7.3 Tuning the Kcoil Amount in Gels Controls Capture and Release

Varying the Kcoil amount in gels changes the E/K ratio and is therefore a straightforward strategy to modulate capture and release of Ecoil-tagged proteins by Kcoil-functionalized macroporous dextran hydrogels. In this section, we functionalized dextran gels with various amounts of the Kcoil analog K, reported in Table 5.4, and performed the capture and release assay for Ecoil-EGF. The Kcoil amounts range from 0.5 nmol (10X) to 50 nmol (1000X), which correspond to a 10-fold to 1000-fold molar excess over Ecoil-EGF, respectively. For each Kcoil amount, we provide a value for the Kcoil density after grafting, obtained by dividing the incubated Kcoil amount by the available pore surface area (Table 5.4). These estimates assume a 100% grafting yield at the surface of the pores.

Table 5.4 Estimated density of Kcoil after grafting in the different conditions used in the study. * Values are provided assuming a grafting yield of 100% and must thus be seen as an indicative estimate.

	10X	30X	100X	300X	1000X
Kcoil amount (nmol)	0.5	1.5	5	10	50
Kcoil grafting density (nmol/cm ²)*	6.3×10^{-2}	0.19	0.63	1.9	6.3

The efficiency of growth factor capture after the initial 72 h incubation period is assessed by the partition coefficient P_{gel} defined in equation 5.3. We observe an increase in the partition coefficient as the Kcoil amount increases (Figure 5.4A). At the highest Kcoil amount (1000X), the partition coefficient is 10 times higher than when no Kcoil is grafted (Dex). This suggests

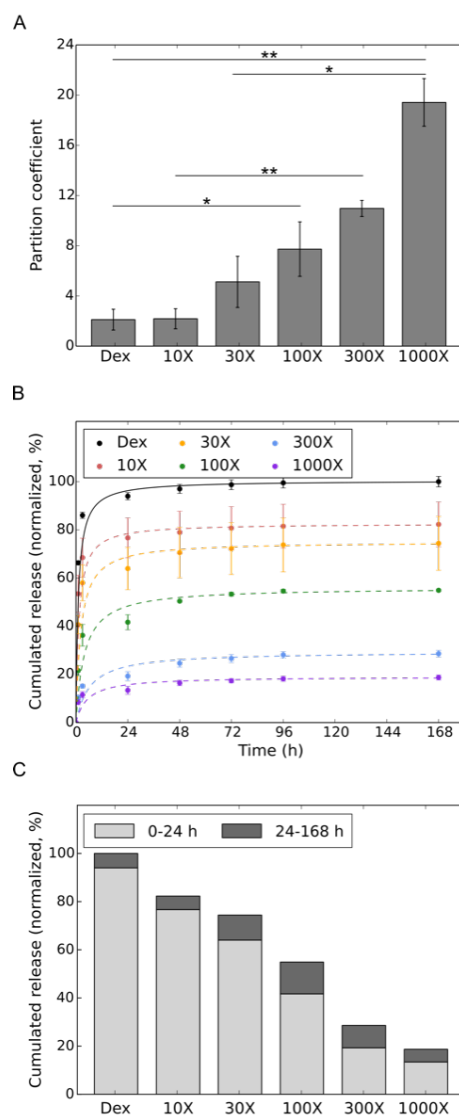


Figure 5.4 Increasing the Kcoil amount in gels improves both capture and release behaviors. Macroporous dextran hydrogels are functionalized with 0.5 nmol (10X), 1.5 nmol (30X), 5 nmol (100X), 15 nmol (300X) or 50 nmol (1000X) of Kcoil. “Dex” represents non-functionalized hydrogels. (A) Partition coefficients characterizing Ecoil-EGF distribution at equilibrium between the gels and the surrounding medium. (B) Cumulated release of Ecoil-EGF by dextran hydrogels. Cumulated release is expressed as a percentage of the amount initially loaded in the gels, and data is normalized to 100%. Curves are hyperbolic fits displayed as guides for the eye (Figure B.4). (C) Cumulated release of Ecoil-EGF by dextran hydrogels, split between early (0-24 h) and prolonged (24-168 h) release. Data is mean $\pm$ standard deviation, $n = 6$ measurements from two independent experiments. * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$) indicate statistically significant differences in pairwise comparisons (bilateral t -test). Some statistical annotations are omitted for figure readability purposes.

it is possible to finely tune the capture of Ecoil-EGF with a wide range of accessible partition coefficient values by varying the Kcoil amount.

Non-functionalized dextran gels have a partition coefficient of 2.1 ± 0.8 . This value, which is higher than the expected value of 1, can be explained by base levels of non-specific Ecoil-EGF adsorption on the labware (pipette tips or tubes). Interestingly, similar values are obtained when capturing non-tagged EGF with either Dex or 100X gels (Figure B.5). This indicates: (i) the presence of the Ecoil tag does not significantly impact non-specific adsorption in the conditions of the assay and (ii) the capture of Ecoil-EGF in the Kcoil-functionalized gels is indeed mediated by coiled-coil interactions.

The release profiles shown in Figure 5.4B represent the cumulative amounts of Ecoil-EGF released from the gels, expressed as a percentage of the amount initially loaded in each gel. Release profiles were further normalized using the highest value (namely, Dex, 168 h) as a reference, to set a baseline and allow for comparison between independent experiments. Each time point corresponds to the replacement of the solution surrounding the gels. After 72 h (5 media changes), the release profile for Dex gels reaches the maximum value of 100%. However, when the gels are functionalized with Kcoil, they exhibit (i) lower levels of initial release and (ii) increased retention of Ecoil-EGF over the timescale of the experiment. After 168 h (7 media changes), as little as $19 \pm 1\%$ of the initially loaded Ecoil-EGF is released from 1 000X gels.

Figure 5.4C represents how the release profiles of Ecoil-EGF split between the early release, that occurs during the first 24 h, and the prolonged release phase (24-168 h). Interestingly, when the Kcoil amount increases, protein release is delayed, leading to increased amounts released during the late phase. However, at very high Kcoil density (1 000X), the probability of rebinding after dissociation increases, leading to a very low release in both early and late phases.

Overall, the amount of Kcoil in the gels is an easily tunable parameter that allows for a great control on both the capture and the release of Ecoil-EGF by macroporous dextran gels.

5.7.4 Ecoil Valency Influences Capture and Release

Vascular endothelial growth factor (VEGF) undergoes post-translational homodimerization via the formation of intermolecular disulfide bonds. This step is critical for VEGF bioactivity, since it enables VEGF to interact with its cellular receptors [493]. In our experimental setup, dimerization leads to Ecoil-tagged VEGF displaying two Ecoil moieties [350]. This increase in valency influences the interaction with Kcoil, as shown by Murschel et al. [347] who reported

a thermodynamic dissociation constant for Ecoil-VEGF/K in the low picomolar range, two to three orders of magnitude below the reported value for Ecoil-EGF/K (Table 5.3). In this section, we functionalized macroporous dextran gels in the conditions summarized in Table 5.4, and studied the capture and release of divalent Ecoil-VEGF.

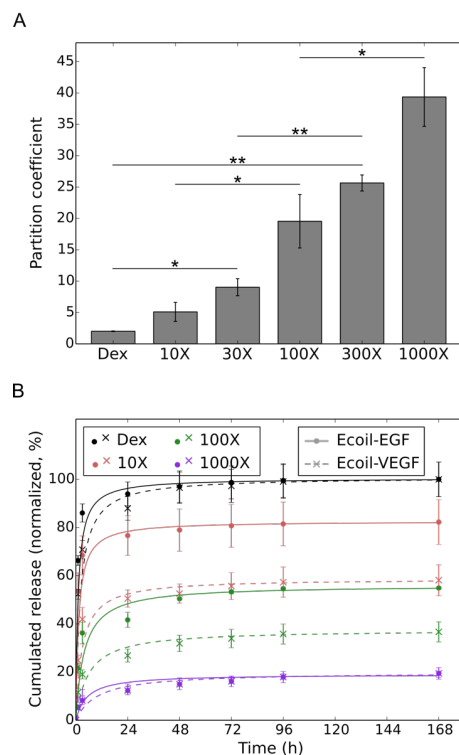


Figure 5.5 Changing Ecoil valency influences capture and release behaviors. (A) Partition coefficients characterizing dimeric Ecoil-VEGF distribution at equilibrium between the gels and the surrounding medium. (B) Cumulated release of Ecoil-VEGF (x-shaped markers & dashed lines) by dextran hydrogels, compared to Ecoil-EGF (dots & full lines). Cumulated release is expressed as a percentage of the amount initially loaded in the gels, and data is normalized to 100%. Curves are hyperbolic fits displayed as guides for the eye. Data is mean $\pm$ standard deviation, $n = 6$ measurements from two independent experiments. * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$) indicate statistically significant differences in pairwise comparisons (bilateral t -test). Some statistical annotations are omitted for figure readability purposes.

Similarly to Ecoil-EGF, increasing the Kcoil amount in gels improves the initial loading with Ecoil-VEGF (Figure 5.5A). The observed partition coefficients range from 5 ± 1 (10X) to 39 ± 5 (1000X) for Kcoil-functionalized gels. Interestingly, for non-functionalized gels (Dex), we measure a partition coefficient of 2.01 ± 0.05 , close to the value measured for Ecoil-EGF on Dex. We then observe a 20-fold increase in the partition coefficient when comparing 1000X to Dex (10-fold increase for Ecoil-EGF, Figure 5.4A). Altogether, this suggests that the observed effect is due to a change in E/K interactions because of increased Ecoil valency

rather than to an increased non-specific adsorption.

In terms of release behavior (Figure 5.5B), similar profiles are obtained for Ecoil-EGF (dots and full lines) and Ecoil-VEGF (x-shaped markers and dashed lines) in the case of non-functionalized dextran gels (black). However, for Kcoil-functionalized gels, we observe a slower release of Ecoil-VEGF compared to Ecoil-EGF, especially at low Kcoil densities. Indeed, 10X gels release Ecoil-VEGF similarly to how 100X gels release Ecoil-EGF (Figure 5.5B). When the Kcoil density is too low to allow for the simultaneous binding of the two Ecoil-tags — Ecoil-VEGF has a hydrodynamic diameter of ~ 6.5 nm — we hypothesize this behavior is due to the increased probability of a divalent Ecoil-VEGF rebinding the same Kcoil immediately after dissociation, compared to monovalent Ecoil-EGF.

Interestingly, at very high Kcoil densities (1000X), the effect of multivalency is not discernable. In this situation, the high Kcoil surface coverage and its large excess over the Ecoil-tagged growth factor outbalances the strength of the individual E/K interaction, since the probability of rebinding after dissociation is high for both proteins.

5.7.5 Tuning the E/K Affinity Controls Capture and Release

Another mechanism to control the affinity-based capture and release of a growth factor is tuning the stability of the E/K coiled coil. In this section, in addition to the wild type Kcoil (K), three analogs are used, bearing 1, 2 or 3 leucine-alanine substitutions (K_1, K_2 and K_3, respectively) in the second, third and/or fourth heptads (Table 5.3) [347]. These substitutions occur in the hydrophobic core of the coiled coil, where replacing a hydrophobic leucine by a less hydrophobic alanine decreases the stability of the E/K heterodimer [494]. Murschel et al. [347], who first introduced these three Kcoil analogs, used surface plasmon resonance biosensing to characterize their interaction with Ecoil-EGF. Interestingly, they observed an increase in the dissociation constant (K_D) of the Ecoil-EGF/Kcoil complex by about one order of magnitude for each additional leucine-alanine substitution (Table 5.3) [347]. This provided additional control over the E/K interaction, with the thermodynamic dissociation constant K_D ranging from ~ 200 pM (E/K) to ~ 300 nM (E/K_3).

All the gels used in this section contain the same amount of Kcoil (100X), but they are functionalized with different Kcoil analogs: either (i) K, K_1, K_2 or K_3 (Figures 5.6A and 5.6B) or (ii) mixes of K and K_2 in various proportions (Figures 5.6C and 5.6D).

Introducing L-A substitutions allows for the fine tuning of the loading of Ecoil-EGF by enabling access to intermediate partition coefficient values (Figure 5.6A). Similarly, as the number of L-A substitutions increases, the release profiles show a decreased effect of Kcoil

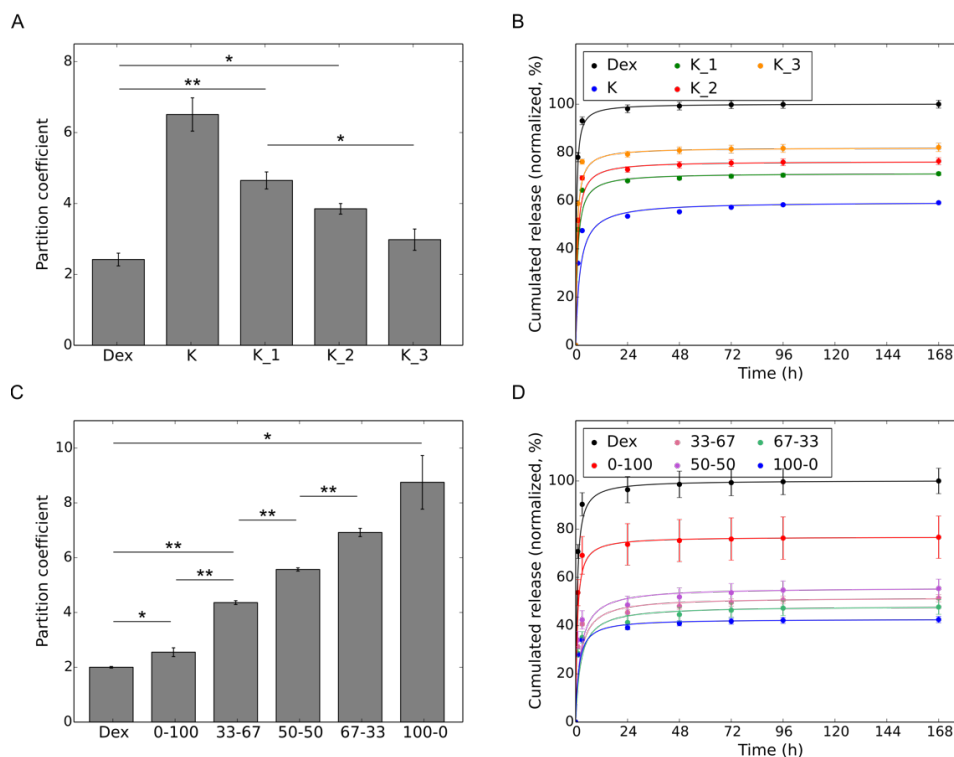


Figure 5.6 Changing the sequence of Kcoil alters the capture and release behaviors. (A-B) Hydrogels are functionalized with 5 nmol (100X) of either wild-type Kcoil (K) or a K analog with 1 (K_1), 2 (K_2) or 3 (K_3) leucine-alanine substitutions. (C-D) Hydrogels are functionalized with 5 nmol (100X) of a mix of K and K_2 coils. The “x-(100-x)” notation refers to the relative proportions of K (x%) and K_2 ((100-x)%) in the mix. (A) and (C) Partition coefficients characterizing Ecoil-EGF distribution at equilibrium between the gels and the surrounding medium. (B) and (D) Cumulated release of Ecoil-EGF, expressed as a percentage of the amount initially loaded in the gels and normalized to 100%. Curves are hyperbolic fits displayed as guides for the eye. Data is mean $\pm$ standard deviation, $n = 6$ measurements from two independent experiments. * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$) indicate statistically significant differences in pairwise comparisons (bilateral t -test). Some statistical annotations are omitted for figure readability purposes.

(Figure 5.6B). Interestingly, for both capture and release, gels with 100X of the K_3 analog display similar behaviors to gels with 10X of the K analog, while K_1 and K_2 profiles fall between K and K_3.

To further explore the possibilities of finely tuning the capture and release of Ecoil-EGF by the macroporous dextran gels, we functionalized gels with a mix of K and K_2 in various proportions, for a total Kcoil amount of 5 nmol — 100X, denoted as “x - (100 - x)” where x is the relative proportion of the K analog in the mix — (Figures 5.6C and 5.6D). This strategy allows for a fine control on the partition coefficient (Figure 5.6C), leading to values

increasing consistently with the relative proportion of the K analog. In terms of release behavior, pair-wise comparisons reveal a statistically significant difference, with a confidence value of 95%, between 50–50 and 100–0 (Figure 5.6C). However, there is no statistically significant difference in pair-wise comparisons for all combinations of 33–67, 50–50 and 67–33. This indicates that for such small differences in Kcoil composition, the effect on the release falls within the range of experimental uncertainty.

Altogether, tuning the affinity provides an additional level of control on the loading and release of growth factors in macroporous dextran gels. Depending on needs, it can be used alone or in combination with some of the other strategies presented in this study.

5.7.6 Tuning the Pore Size and Structure of the Gels Controls Capture and Release

In this section, we compare the 60-min macroporous dextran gels used in the previous sections with 20-min gels. The latter were made from scaffolds exhibiting smaller pores, increased tortuosity, and a bigger specific surface (Table 5.1, Figure B.2). For both annealing times, we measure capture and release of Ecoil-EGF from Dex and 100X gels (Figure 5.7). Since 20-min gels have a larger specific surface area than 60-min gels, the Kcoil grafting density is expected to be lower, for the same Kcoil amount.

Partition coefficients represent loading capacity of the gels at equilibrium (Figure 5.7A). Interestingly, despite differences in Kcoil grafting density, the 100X gels exhibit similar partition coefficients for both annealing times. This result seems to indicate that the change in the aspect and morphology of the gel compensates for the loss in Kcoil density. This is further emphasized by the fact that Dex gels present different partition coefficient values: 2.4 ± 0.5 versus 3.4 ± 0.3 for 60-min and 20-min gels, respectively. Smaller pore size, associated with the more tortuous morphology, improves the capture of the growth factor regardless of the presence of Kcoil. This result is supported by the release profiles shown in Figure 5.7B. While 100X gels display similar profiles at both annealing times, indicating that the different phenomena approximately cancel each other out, results from Dex gels suggest slower release for 20-min gels. Of interest, release rate for the 48–168 h period is approximately 3 times higher for 20-min Dex gels than for 60-min Dex gels (Figure 5.7B).

Overall, changing the annealing time from 60 to 20 min reduces the specific effect of Kcoil on capture and release, as competing phenomena gain prevalence over the affinity effect. This observation is further discussed in section 5.8.3.

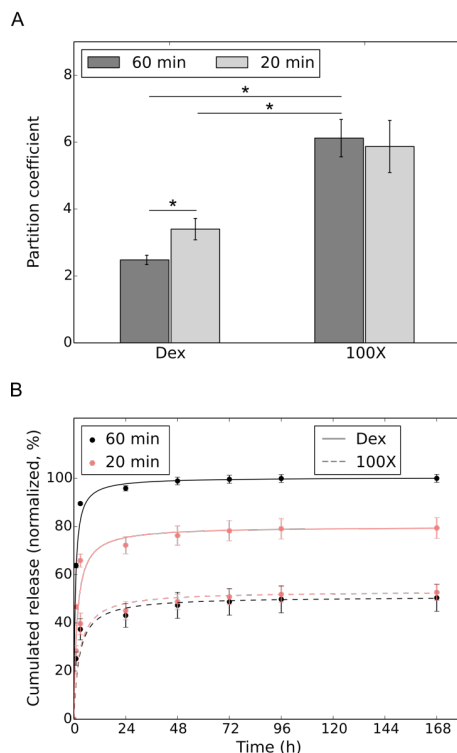


Figure 5.7 Changing the pore size of the gels influences the capture and release behaviors. Hydrogels made from PS-PLA blends annealed for 20 or 60 min are functionalized with 5 nmol (100X) of Kcoil. (A) Partition coefficients characterizing Ecoil-EGF distribution at equilibrium between the gels and the surrounding medium. (B) Cumulated release of Ecoil-EGF, expressed as a percentage of the amount initially loaded in the gels and normalized to 100%. Curves are hyperbolic fits displayed as guides for the eye. Data is mean $\pm$ standard deviation, $n = 6$ measurements from two independent experiments. * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$) indicate statistically significant differences in pairwise comparisons (bilateral t -test). Some statistical annotations are omitted for figure readability purposes.

5.7.7 AoSMC Proliferation and Morphology

To assess the bioactivity of the released growth factor and the impact of its prolonged release on a cell population, we analyzed AoSMC proliferation and morphology, when exposed to Ecoil-EGF released from 60-min macroporous dextran gels. Vascular smooth muscle cells like AoSMCs display EGF receptors at their surface [495–497]. EGF is known to have an impact on smooth muscle cell proliferation [495], migration — via its effect on focal adhesion turnover [498, 499] — and phenotype [500].

In this section, gels loaded for 72 h with Ecoil-EGF in starving medium underwent three medium changes (initial medium replacement, then after 1 h and 3 h). Finally, they were placed in hanging baskets (Figure B.7) and hung 1 mm over the AoSMC layer (15×10^3

cells/cm²), in starving medium. Four gel formulations are tested: Dex (non-functionalized) and three Kcoil amounts: 30X, 100X and 300X, as defined in Table 5.4. The release of Ecoil-EGF from the gels is triggered daily by replacing the surrounding starving medium. Of interest, we have shown that the loading and release of Ecoil-EGF are not affected by replacing PBS-T, used in the previous sections, by starving medium (B.6). These four conditions are compared to cells that are not exposed to gels and grow in either starving medium only (-) or starving medium supplemented with 5 nM soluble EGF (sEGF). We previously demonstrated sEGF and Ecoil-EGF have the same bioactivity in solution [349].

On the 4th day of culture (D4), that is, 96 h and a total of six medium changes since the end of the initial Ecoil-EGF incubation, metabolic activity is measured and expressed as a fold-increase over the reference signal measured immediately after seeding and initial adhesion of the cells (D0) (Cell Proliferation Indices — Figure 5.8A). The Alamar Blue assay was not sensitive enough to exhibit differences between experimental conditions with a 95% confidence threshold. However, when lowering this confidence threshold to 90%, some tendencies appeared: cells that are not exposed to gels and kept in sEGF medium, as well as cells exposed to 30X, 100X and 300X gels all exhibit higher cell proliferation than cells in starving medium only (-). This tendency was confirmed by imaging fixed cells on D4 and measuring cell density using image analysis tools (Figure 5.8B). All Kcoil-functionalized gels exhibit cell densities similar to that of sEGF cells, with an approx. 2.5-fold increase compared to the negative control. No difference is observed between 30X, 100X and 300X experimental conditions, indicating that all three conditions supply enough bioactive Ecoil-EGF for the AoSMCs to proliferate. Notably, cells exposed to Dex gels exhibit an intermediary cell density, significantly lower than with sEGF and Kcoil, but still higher than the negative control. This can be explained by the presence of residual Ecoil-EGF in the Dex gels after the initial three rinses. Indeed, as shown in Figure 5.4B, residual amounts of Ecoil-EGF are still released after 48 h (four rinses). However, these non-prolonged, low levels of Ecoil-EGF are insufficient for optimal cell proliferation.

On D4, representative cell images show low confluency and similar, well-spread phenotypes for both cells in starving medium only (-) (Figure 5.8D) and cells exposed to Dex gels (Figure 5.8F). On the other hand, sEGF (Figure 5.8E) and 100X (Figure 5.8G) conditions lead to highly confluent cell layers, where cells are smaller and exhibit polarized shapes and organized behaviors. A quantification of the average cell surface (Figure 5.8C) further supports this observation, with cells exposed to released Ecoil-EGF from 100X and 300X gels being significantly smaller than their (-) and Dex counterparts.

Altogether, these results suggest that the prolonged release of Ecoil-EGF, in starving medium,

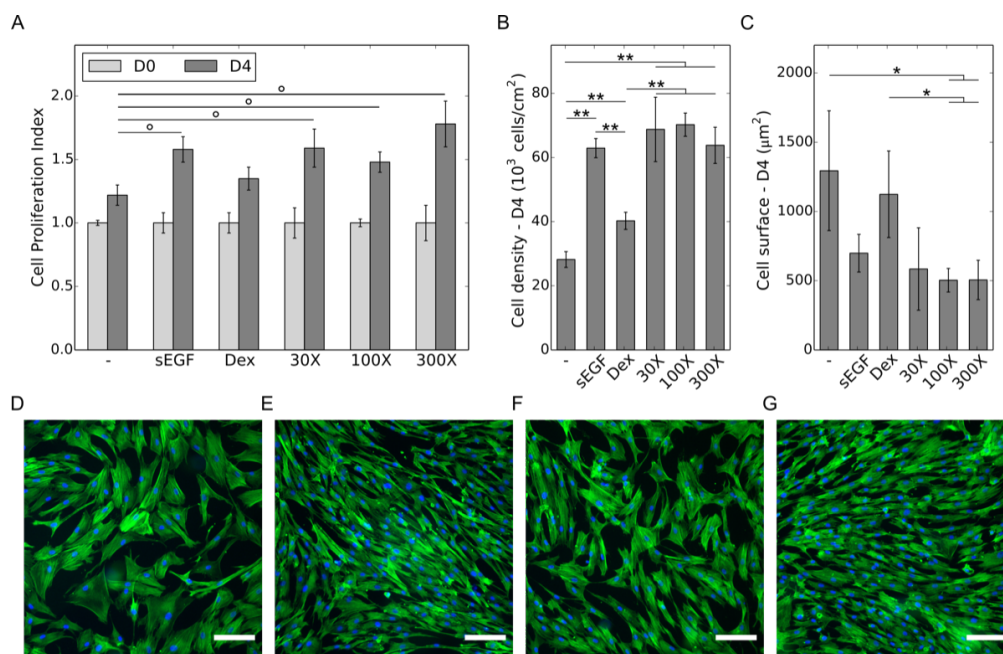


Figure 5.8 AoSMC metabolic and morphological analysis when cells are exposed to Ecoil-EGF released from dextran hydrogels. Macroporous dextran hydrogels are functionalized with 1.5 nmol (30X), 5 nmol (100X) or 15 nmol (300X) of K5. "Dex" represents non-functionalized hydrogels. "-" and "sEGF" represent control cells not exposed to hydrogels, kept in starving and sEGF medium, respectively. (A) Cell proliferation indices on D0 and D4, derived from Alamar Blue metabolic assays. (B) Cell density on D4, derived from image analysis. (C) Average surface covered by a cell on D4, derived from image analysis. Each data point is the average of $n = 6$ fluorescence measurements (A) or representative fluorescence microscopy images (B-C) from two independent experiments. * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$) indicate statistically significant differences in pairwise comparisons (bilateral t -test). $^{\circ}$ corresponds to $p < 0.1$. Some statistical annotations are omitted for figure readability purposes. (D-G) Representative fluorescence microscopy images of AoSMCs on D4. Actin fibers are shown in green and cell nuclei in blue. Scale bar is 100 μm . Cells were kept in starving medium ("-") (D), in sEGF medium (E), or exposed to "Dex" (F) or 100X (G) hydrogels.

by Kcoil-functionalized gels promotes AoSMC proliferation (Figures 5.8A and 5.8B) and morphological changes (Figures 5.8C-G). Of interest, 30X, 100X and 300X conditions were all similar to the sEGF control, in which cells are supplied daily with fresh soluble EGF. This indicates (i) that despite the low apparent release rates observed in Figure 5.4B, the Kcoil-functionalized gels release enough Ecoil-EGF to promote AoSMC proliferation and migration, and (ii) that the bioactivity of the released Ecoil-EGF was preserved over the course of the experiment.

5.8 Discussion

5.8.1 A Finely Controlled Platform

Altogether, macroporous dextran hydrogels functionalized with Kcoil are a highly versatile platform for the capture and controlled release of Ecoil-tagged proteins. The behavior of the gels can be influenced by tuning several parameters, either macroscopic, at the scale of the gels, or nanoscopic, at the scale of the coiled-coil interaction.

Regarding the gels, the two accessible control parameters are the pore size (section 5.7.6, Figure 5.7) and the Kcoil grafting density (section 5.7.3, Figure 4.4). Both will modulate how the Ecoil-tagged protein diffuses within the pore network and interacts with the pore surface. Of interest, previous work demonstrated that, if Kcoil tends to self-associate and form homodimers at high grafting density, it will dissociate to favor heterodimerization upon addition of Ecoil [501]. This indicates that the gels will not lose their affinity properties at high Kcoil densities and is consistent with our observations (Figures 5.4 and 5.5).

The strength of the E/K interaction can be modulated by changing the Ecoil valency (section 5.7.4, Figure 5.5) or by introducing mutations in the coil sequence to destabilize the hydrophobic core (section 5.7.5, Figure 5.6). Another parameter, which is not covered here, could be to vary the number of heptads in the coils (all E and K analogs used in this study count five heptads) [340].

This work focused on the passive capture of the Ecoil-tagged proteins where the gels are soaked in the protein solution. Another strategy, which we did not pursue here, is to dry the pores and directly fill them with the protein solution, as performed in several previous publications [254,328,476]. While this approach allows for a maximal initial protein capture regardless of the degree of functionalization of the gels, our strategy enables the measurement of partition coefficients, thus quantitatively characterizing the gels' ability to segregate the protein. It is an interesting feature for prospective *in vivo* studies, where *in situ* reloading of the gels can be envisioned [502].

Interestingly, over the course of different experiments, we observed a slight variability in the values obtained for identical conditions. For example, for the 100X 60-min gels loaded with Ecoil-EGF, the partition coefficients vary from 6.6 ± 0.5 (Figure 5.6A) to 8.7 ± 0.9 (Figure 5.6C), while the values for Dex remain constant. We hypothesize this behavior is due to irregularities in the shape and volume of the gels, leading to discrepancies in Kcoil grafting densities for the same initial Kcoil amount. This variability, while not affecting the conclusions presented in this work, could be corrected in the future by using precisely machined macroporous PLA scaffolds, as proposed by Solano et al. [241].

5.8.2 Kcoil Grafting After Crosslinking

To synthesize affinity-based hydrogels, the most common approach relies on coupling the molecule of interest to the polymer before crosslinking the gel [331, 353, 476, 477]. In this study, we instead chose to functionalize the gels with Kcoil after the gels were molded and crosslinked. Indeed, the mesh size of the swollen gels is in the 5-10 nm range (section 5.7.1, Table 4.2). This value falls in the range of the hydrodynamic diameters of Ecoil-EGF (14 kDa, $D_H \sim 4$ nm [349]) and dimeric Ecoil-VEGF (60 kDa, $D_H \sim 6.5$ nm [350]), indicating that their transport should mainly occur in the macropore network, rather than in the dextran mesh where steric hindrance occurs [202, 203]. Kcoil (4 kDa, $D_H \sim 3.5$ nm) is small enough to diffuse within the mesh, but does so very slowly compared to its free transport in the macropore network [202, 203]. We hypothesized that performing the grafting chemistry after crosslinking would allow most of the Kcoil to be localized near the macropore surface, where the Ecoil-tagged growth factors can easily interact with it. While we did not explicitly confirm this hypothesis, our results show that our grafting strategy allows for efficient E/K interaction.

The traditional approach of grafting before crosslinking presents the advantage of allowing for in-solution quantification of the conjugated molecule, while we did not determine the Kcoil coupling yield. However, such a quantification does not necessarily reflect the amount of peptide that is effectively accessible for interaction for the reasons stated above. Instead, our approach allows for the easy separation of the unreacted species by simple rinses of the gels, with little to no loss of the functionalized product.

5.8.3 Gel Structure and Pore Size

In this work, we performed most experiments using 60-min macroporous dextran gels, with large pore sizes in the 400 μm range (Table 5.1). This compares to the pore sizes achievable with other synthesis techniques for macroporous hydrogels [206, 265, 473], such as porogen templating [207, 208], gas foaming [328] or cryogelation, with the added advantage of a high (above 95%) pore interconnectivity and determined, reproducible pore size [239].

We also investigated the use of dextran gels molded on 20-min PLA scaffolds that exhibit a significantly lower pore size (Table 5.1). Of interest, we observed improved capture and slower release of Ecoil-EGF in the case of 20-min non-functionalized gels (Figure 5.7). We hypothesize that the increased tortuosity of the macropore network [503] leads to an increased effect of the diffusion of Ecoil-EGF (14 kDa, $D_H \sim 4$ nm) within the dextran mesh (mesh size 5-10 nm). Indeed, 20-min gels have (i) a longer average path through the macropore

network for the protein to diffuse out of the gel, and (ii) a larger pore surface area where the protein can penetrate within the mesh (Table 5.1), making penetration of Ecoil-EGF in the dextran mesh more likely. This hypothesis is consistent with what we observed for the 100X condition (Figure 5.7), where 20-min gels, despite their lower available Kcoil density due to their increased specific surface area, behave similarly to 60-min gels with respect to Ecoil-EGF release. Altogether, we expect gel tortuosity to increase the relative effect of mesh diffusion over affinity in the capture and release behaviors [503].

60-min scaffolds produced easy-to-handle, transparent macroporous dextran hydrogels (Figure 5.2A) that exhibited highly reproducible swelling behaviors when the pores were dried and refilled (Table B.1). On the contrary, 20-min gels (Figure B.2) were more fragile and tended to dry quickly when their pores were emptied. Experimental convenience, combined to the relative increase in the impact of affinity over diffusion discussed above, led us to favor the use of 60-min gels in this study. However, 20-min gels remain an interesting option when smaller pore sizes are needed.

5.8.4 Applications and Perspectives

In this study, the loading of the gel and the subsequent release of the growth factors were controlled by the E/K interaction. This highly versatile approach, where the E/K coiled coil is used as an adaptor, presents many advantages, and has a vast potential for future research.

Previous work from our research group focused on the production of chimeric growth factors bearing an Ecoil tag: EGF [349], VEGF [350], and the basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) [351] and demonstrated that the chimeras did not lose their bioactivity. These studies relied on the production of fusion proteins, where the tag is natively integrated in the protein sequence, thus withdrawing the need for coupling of the tag afterwards. It ensures that (i) all proteins bear the tag and (ii) there is no bioactivity loss from random grafting of the tag. This systematic approach could easily be applied to a wide range of recombinant proteins, like other growth factors or antibodies. Of interest, the use of the E/K adaptor allows for the simultaneous capture and release of several Ecoil-tagged proteins, allowing for the design of polyvalent platforms or the study of synergistic effects [356]. Additionally, the use of competitive approaches to trigger coiled-coil dissociation [481] can allow precise spatiotemporal control of the protein release.

Using macroporous hydrogels with a controllable morphology, where diffusion occurs mainly in the highly interconnected macropore network rather than in the hydrogel mesh, paves the way for a wide range of other applications in controlled delivery. Bigger objects like nanoparticles or microspheres could be delivered by the platform without changing the properties

of the dextran matrix. Of interest, we previously functionalized both PLA-*b*-polyethylene glycol (PEG) [409] and gold [353] nanoparticles with Ecoil-EGF, as well as polyelectrolyte complexes with both Ecoil [347] and Kcoil [484,504]. Further work will focus on the capture and release of such complex objects for the design of hybrid drug and gene delivery platforms.

In this study, we analyzed the release over 168 h, with regular buffer changes. These experimental conditions did not allow for the complete release of the growth factors: up to 80% (1 000X, Figure 5.4B) of the captured Ecoil-EGF was still entrapped within the gels at the end of the assay. As shown in Figure 5.4C and further evidenced by the cell proliferation assay, the late release rate from the Kcoil-functionalized gels, though very low, proves adequate for *in vitro* applications. This emphasizes the stability of the E/K interaction, in accordance with the K_D values presented in Table 5.3, and paves the way for future *in vitro* experimentation for the characterization of the very-long-term behavior of the gels. It is also of interest for the development of prospective *in vitro* or *in vivo* assays where the gels would be submitted to a constant flow rather than to isolated buffer changes.

Lastly, our macroporous dextran gels functionalized with Kcoil could have a wide range of applications in tissue engineering. Their tunable pore size, in the micrometer range, as well as their Young's modulus in the low kilopascal range make them suitable candidates for three-dimensional cell culture of vascular tissues [17, 505–507]. Previous works on the functionalization of dextran 2D coatings [302] and hydrogels [208] with adhesion peptides for vascular applications have already laid the basis for the development of such a tool. Of interest, Solano et al. used alginate hydrogels molded in 60-min PLA scaffolds to trap glioblastoma cells [241], paving the way for the use of macroporous polysaccharide gels as cell culture scaffolds.

5.9 Conclusion

This work focuses on the development of macroporous, highly interconnected dextran hydrogels for the affinity-based loading and controlled release of growth factors. We functionalized the macropore surface of the gels with the Kcoil peptide and studied the capture and controlled release of Ecoil-tagged EGF and VEGF chimeras. In summary, we propose a highly versatile platform with tunable macropore size and Kcoil grafting density, in which fine control of the E/K affinity gives access to a wide range of capture and release behaviors. As a proof of concept, we demonstrated that our platform, through the prolonged release of Ecoil-EGF, can promote AoSMC proliferation in serum-starved conditions. This result is of interest for future research for vascular applications.

Functionalizing the gel after its crosslinking allows for using chemical conditions that deviate from the physiological environment. Besides, since the diffusion of the species of interest mostly occurs in the macropore network, the hydrogel mesh size does not need to be adapted to the studied protein. The macroporous gels used in this study are stable and robust, and they show little to no degradation within the 10 days of the release experiments.

Altogether, our macroporous dextran hydrogels (i) have advantageous structural and mechanical properties and (ii) rely on the flexible E/K affinity system making them suitable for the delivery of recombinant proteins, nano- or microparticles. Besides, the long-lasting protein retention within the macropore network is an interesting feature, that could pave the way for the cell colonization of the gels, for applications in tissue engineering and regenerative medicine.

5.10 Supplementary Materials

Supplementary information is presented in annex B.

5.11 Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada via the NSERC-CREATE PrEEmiuM program (R.O.) and the NSERC Discovery program (N.V.), by the Fonds de Recherche du Québec – Nature et Technologies (R.O., X.B.), and by the TransMedTech Institute and its main funding partner, the Canada First research and excellence fund (R.O., B.L.).

X.B. also acknowledges the financial support from the Canada Research Chair funding program.

The present work was also funded by Polytechnique Montréal via the UPIR stipend program (V.P.)

The authors would also like to thank Marie-Hélène Bernier (Physical Engineering, Polytechnique Montréal) for μ CT measurements, Melek Abdelkhalek, Lisa Delattre, and Caroline Safi for experimental assistance, and Médéric Dégardin, Jimmy Gaudreault, and Benjamin Serafin for the critical proofreading of the manuscript.

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

– RÉCAPITULATIF –

HYDROGELS DE DEXTRANE MACROPOREUX POUR LA CAPTURE ET LA RELÂCHE
CONTRÔLÉES DE FACTEURS DE CROISSANCE PAR DES INTERACTIONS
SUPERHÉLICES

Dans cet article, nous proposons l'utilisation de la superhélice E/K pour la capture et la relâche contrôlée de Ecoil-EGF et Ecoil-VEGF par des hydrogels de dextrane macroporeux fonctionnalisés avec Kcoil. Nous mettons en évidence plusieurs leviers de contrôle pour moduler la capture et la relâche via la superhélice E/K :

- l'**affinité** (K_D) **de la superhélice E/K** ;
- la **densité de Kcoil dans l'hydrogel**. Plus les hydrogels contiennent de Kcoil, (i) plus il peuvent capturer de Ecoil-EGF ou Ecoil-VEGF et (ii) plus la probabilité de recapture après dissociation est élevée, ce qui diminue la relâche à l'extérieur de l'hydrogel ;
- la **valence de Ecoil** : à quantité de Kcoil égale, la quantité de Ecoil-VEGF (deux étiquettes Ecoil) capturée par les gels est plus grande que celle de Ecoil-EGF (une étiquette Ecoil). Similairement, la relâche de Ecoil-VEGF est plus lente.

Nous montrons également que le Ecoil-EGF relâché est bioactif et promeut la prolifération et la migration de cellules musculaires lisses vasculaires cultivées en 2D.

Les travaux menés dans le cadre de cette publication ouvrent la voie vers les applications suivantes :

1. l'utilisation de la superhélice E/K pour biofonctionnaliser des hydrogels de dextrane macroporeux avec d'autres objets portant une étiquette Ecoil, notamment des NPs. Cet aspect est discuté dans la section 7.2 ;
2. la culture de cellules dans les macropores des hydrogels de dextrane biofonctionnalisés. En effet, (i) la taille des macropores ainsi que les propriétés mécaniques sont conformes aux critères établis dans la section 1.2 et (ii) la rétention des facteurs de croissance dans l'hydrogel est élevée. Cet aspect est présenté dans le chapitre 6.

CHAPITRE 6 ARTICLE 3 — CO-FUNCTIONALIZATION OF MACROPOROUS DEXTRAN HYDROGELS WITH ADHESIVE PEPTIDES AND GROWTH FACTORS ENABLES VASCULAR ORGANOID SPROUTING

La co-fonctionnalisation d’hydrogels de dextrane macroporeux avec des peptides adhésifs et des facteurs de croissance permet le bourgeonnement d’organoïdes vasculaires

L’article présenté dans ce chapitre a été soumis le 25 août 2023 dans la revue *Carbohydrate Polymers*. Il récapitule les travaux menés pour remplir l’objectif n°3 de ce travail de recherche.

6.1 Résumé

Le dextrane est un polysaccharide disponible à grande échelle, biocompatible et facile à fonctionnaliser. C’est un matériau inerte qui empêche l’adsorption non désirée des protéines et cellules. La conception de matériaux biofonctionnalisés à base de dextrane permet de répondre à certains défis majeurs pour la culture de cellules en 3D, en assurant notamment la bonne définition et la spécificité des échafaudages. Dans cet article, nous rapportons l’utilisation d’hydrogels de dextrane présentant un réseau de macropores entièrement interconnecté pour la culture d’organoïdes vasculaires *in vitro*. Nous utilisons la superhélice E/K pour la biofonctionnalisation modulable des hydrogels avec des facteurs de croissance. Nous biofonctionnalisons les hydrogels (i) avec le peptide RGD, pour promouvoir l’adhésion cellulaire, puis (ii) avec le peptide Kcoil, pour permettre la capture de facteurs de croissance portant une étiquette Ecoil à la surface des macropores. Les hydrogels sont ensuite biofonctionnalisés avec Ecoil-EGF et Ecoil-VEGF, qui sont capturés dans l’hydrogel grâce à la formation de superhélices E/K. Cette double fonctionnalisation avec des motifs adhésifs et des facteurs de croissance permet aux organoïdes vasculaires de coloniser le dextrane, en dépit de ses propriétés anti-adhésives natives. La biofonctionnalisation permet le bourgeonnement des organoïdes vasculaires, y compris dans du milieu de culture appauvri. Nous rapportons notamment le développement de structures proto-vasculaires après cinq jours de culture. Ainsi, nous proposons une plateforme polyvalente et bien définie pour des applications en génie tissulaire et en vascularisation de tissus.

6.2 Header

Co-functionalization of Macroporous Dextran Hydrogels with Adhesive Peptides and Growth Factors Enables Vascular Organoid Sprouting

Romane Oliverio^{a,b}, Benoît Liberelle^a, Victor Patenaude^a, Vaiana Moreau^{a,c}, Elian Thomas^a, Nick Virgilio^c, Xavier Banquy^b, and Gregory De Crescenzo^{a,*}

6.3 Author Affiliations

^a Department of Chemical Engineering, Polytechnique Montréal, Montréal, Québec H3T 1J4, Canada.

^b Faculty of Pharmacy, Axe Formulation et Analyse du Médicament (AFAM), Université de Montréal, Montréal, Québec H3T 1J4, Canada.

^c Department of Chemical Engineering, Centre de Recherche sur les Systèmes Polymères et Composites à Haute Performance (CREPEC), Polytechnique Montréal, Montréal, Québec H3T 1J4, Canada

* Corresponding author. Email: gregory.decrescenzo@polymtl.ca.

6.4 Abstract

Dextran is widely available, biocompatible, and easy to crosslink and functionalize. It is anti-fouling and repels unwanted cell and protein adsorption. Designing biofunctionalized dextran-based materials thus tackles some of the most prominent challenges encountered in 3D cell culture, by ensuring the precise definition and specificity of the scaffolds. Here, we report the design of dextran hydrogels displaying a fully interconnected macropore network for the culture of vascular organoids *in vitro*. We use an affinity peptide pair, the E/K coiled coil, for the versatile biofunctionalization of the hydrogels with growth factors. We biofunctionalize the hydrogels (i) with the RGD peptide sequence to promote cell adhesion, and (ii) with the Kcoil peptide to enable Ecoil-tagged growth factor capture at the macropore surface. We then load the gels with Ecoil-tagged chimeras of the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor, that are captured by E/K coiled coil interactions. Dual functionalization with these adhesive and proliferative cues allows vascular organoids to colonize the naturally cell-repellant dextran. It enables organoid sprouting in supplement-depleted medium, and we report the development of proto-vascular structures within five

days of culture. Altogether, we propose a well-defined, highly versatile platform for tissue engineering and tissue vascularization applications.

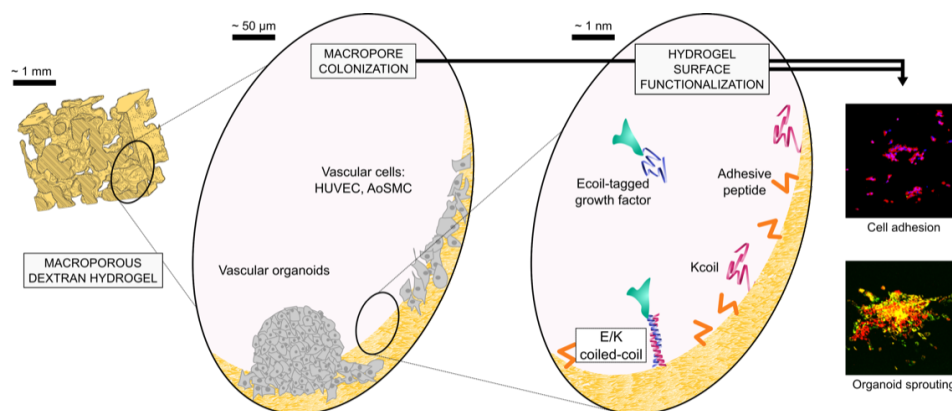


Figure 6.1 Graphical abstract

Statement of hypothesis: adequate biofunctionalization of naturally anti-fouling and cell-repellent dextran enables its use as a base biomaterial for precisely tailored and well-defined 3D cell culture scaffolds.

Keywords: macroporous hydrogels, dextran, vascular organoids, 3D cell culture, hydrogel functionalization, coiled-coil.

6.5 Introduction

Three-dimensional (3D) cell culture is a prerequisite for most applications in tissue engineering and regenerative medicine [9]. The physiological environment of cells is defined by cell-cell and cell-extracellular matrix (ECM) interactions, by the properties of the ECM, and by a set of physical, mechanical, and biochemical cues that regulate cell behavior and cell fate. While traditional 2D culture approaches fail to completely represent this complex environment, 3D culture systems aim to reduce this gap in order to improve the physiological relevance of the research platforms [9,10]. Over the last few decades, researchers have focused on the development of biomaterials that mimic the cellular environment, to serve as culture scaffolds able to promote 3D cell growth [193,508].

While several ECM-derived substrates, such as Matrigel, collagen- or gelatin-based scaffolds, or decellularized ECM, have led to promising developments *in vitro*, their translational potential and use in therapeutic applications are limited [13,195]. These materials are (i) poorly defined and characterized, thus subject to lot-to-lot variability, (ii) difficult to produce at a large scale and at reasonable costs, and (iii) often animal-sourced, which poses immunogenic-

ity and pathogenicity issues [13]. There is thus a need for biocompatible, well-characterized, and non-immunogenic synthetic or bioinspired materials that mimic the ECM and serve as 3D cell culture scaffolds [195].

Hydrogels are 3D sponge-like structures composed of crosslinked, highly hydrated hydrophilic polymers. Macroporous hydrogels exhibit a two-scale structure, with their crosslinked mesh (mesh size $\sim 1\text{-}10\text{ nm}$) organized around a secondary macropore network (macropore size $> 10\text{ }\mu\text{m}$) [206,473]. This geometry allows for the colonization of the macropores with cells, making macroporous hydrogels promising candidates for 3D cell culture applications [15,255,265].

Abundant in nature, polysaccharides are biocompatible, easy to crosslink or functionalize, and available at relatively low cost through their large-scale production in plants, bacteria, yeast, or algae [162,509]. Among biocompatible polysaccharides, the low-fouling [188] and cell-repellent [510] dextran is a good candidate for the development of well-defined, biomimetic cell-culture scaffolds. Biofunctionalization with selected biochemical cues that promote cell adhesion and proliferation offers a further degree of scaffold customization [246,302].

Tissue vascularization is one of the major challenges in 3D cell culture [365,511]. In tissues larger than $\sim 200\text{ }\mu\text{m}$, diffusion alone is not enough to supply oxygen and nutrients to the cells [512]. Tissue perfusion with a vascular network is therefore necessary to achieve that purpose [365,512]. Vascular organoids are *in vitro* culture models composed of endothelial cells and mural cells that self-organize when prompted to adopt a 3D, spheroid-like shape [395,397,513]. Implantation of vascular organoids in a cell culture scaffold, followed by their sprouting into proto-vascular structures, is a first step towards the development of a mature vasculature *in vitro* [397].

In this work, we propose macroporous dextran hydrogels as scaffolds for the 3D culture of vascular organoids containing human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and human aortic smooth muscle cells (AoSMC). The hydrogels are functionalized with the RGD peptide sequence. This sequence, derived from fibronectin, is a ubiquitous, non-selective cue that promotes cell adhesion through integrin activation [514].

Besides adhesive motifs, physiological ECM contains growth factors that control cellular behaviors such as proliferation, migration and/or differentiation [50]. Among them, the vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a critical role in angiogenesis [85,515] and is used in numerous platforms developed to promote tissue vascularization [254,317,372,516]. The epidermal growth factor (EGF) plays a more ubiquitous role in the organism, and promotes proliferation, differentiation or migration in a wide range of cell types [517].

The immobilization of growth factors in the ECM ensures a local and sustained effect on

the targeted cells [518]. The use of affinity peptides and recombinant affinity tags for the affinity-based functionalization of biomaterials is well documented [312,475]. Coiled-coils are composed of two or more α -helices that self-assemble to form a superhelix [339,478]. These motifs are ubiquitous in nature and have been extensively studied, leading to the *de novo* design of synthetic coiled-coils, including the E/K heterodimer [340]. In previous studies, our research group has used this E/K coil affinity pair, composed of the two peptides Ecoil and Kcoil, for numerous applications, including (i) the development of bioassays [359,360], (ii) the functionalization of substrates with Ecoil-tagged recombinant proteins [302,349–351,356,519], and (iii) the controlled delivery of growth factors [410], monoclonal antibodies [352], and nanoparticles [353].

In this work, we propose the use of the E/K coiled-coil as a versatile approach to functionalize macroporous dextran hydrogels with growth factors, for the implantation and sprouting of vascular organoids in supplement-depleted medium. The hydrogels are functionalized with the Kcoil peptide, which allows for the subsequent capture of Ecoil-tagged chimeras of EGF (Ecoil-EGF) and VEGF (Ecoil-VEGF). Altogether, we propose a versatile, intrinsically well-defined 3D cell culture platform, and demonstrate that it promotes the development of proto-vascular structures. Made from non-immunogenic dextran, and potentially functionalizable with any combination of Ecoil-tagged growth factors with no extra functionalization step, this platform could be of great interest for the development of vascularized tissues *in vitro* and *in vivo*.

6.6 Material and Methods

6.6.1 Material and Reagents

Polymers

Poly(lactic acid) (PLA) was obtained from NatureWorks (Ingeo™ #4032D, melt flow index: 7.0 g/10 min at 210°C/2.16, density (200°C): 1.11 g/cm³). Polystyrene (PS) was purchased from Americas Styrenics (#MC3650, melt flow index: 13.0 g/10 min at 200°C/5.0 kg, density (200°C): 0.97 g/cm³). Dextran T-500 (technical quality, 500 000 $\pm$ 50 000 g/mol, specific rotation 198 $\pm$ 3°, purity > 95%) was purchased from Pharmacosmos (#5510 0500) and further characterized by ¹H nuclear magnetic resonance as described in section 6.6.2.

Peptides

Azidohomoalanine (Aha)-terminated peptides AhaGGRGD (RGD) and AhaGG(KVSALKE)₅ (Kcoil) were obtained from the peptide synthesis facility at the University of Sherbrooke (QC, Canada). Peptides were produced using a Symphony X solid-phase peptide synthesizer (Gyros Protein Technologies) and purified by preparative inverse-phase high-performance liquid chromatography. The obtained peptides were characterized by mass spectrometry. Purity of the final product is > 99.9%.

Production of Recombinant Proteins

Ecoil-tagged chimeras of the epidermal growth factor (Ecoil-EGF) and of the vascular endothelial growth factor (165-residue-long isoform, Ecoil-VEGF) were produced in human embryonic kidney cells (HEK293-6E) as previously described [350,485,519]. Cells were cultured in shake flasks (120 rpm) in Freestyle™ F17 Expression medium (Gibco #A1383501), supplemented with Geneticin™ G418 (Gibco #11811, 50 µg/L), Kolliphor® (Sigma #C5135, 1 g/L) and L-Glutamine (Gibco #A2916801, 4 mM).

Briefly, constructs containing cDNA for the interleukin-2 signal peptide, the Ecoil tag (EVSA-LEK)₅, an 8-residue-long polyhistidine tag and the growth factor of interest (hEGF or hVEGF₁₆₅) were inserted in the pTT5 plasmid [485]. HEK293-6E cells were then transiently transfected with plasmid DNA/poly(ethylene imine) (PEI) (Polysciences #23966) complexes using a PEI/DNA ratio of 2/1 w/w. 24 h post transfection, cells were supplemented with 0.5% w/v of TN1 peptone (Organotechnie #19553) [486]. 120 h post transfection, cells were centrifuged (4500 g, 30 min) and the supernatant was harvested and filtered (0.45 µm). The protein of interest was purified by ion metal affinity chromatography (1 mL HisTrap FF crude, Cytiva). The eluate was then further purified by size-exclusion chromatography (HiPrep 26/10 desalting, Cytiva) to remove aggregates. All chromatographies were performed on an ÄKTA explorer 10 system (GE Healthcare), following the manufacturer's instructions for buffers and flow rates. The purified proteins were filtered (0.22 µm) and stored at -80°C in PBS.

6.6.2 Hydrogel Production, Functionalization, and Characterization

Production of Macroporous PLA Scaffolds and Dextran Hydrogels

PS/PLA co-continuous polymer blends were produced as previously described [239,410]. Briefly, dried (60°C, 12 h under vacuum) PLA and PS pellets were melt-processed at 190°C

with a 1/1 w/w ratio, using an AG 34 mm Leistritz co-rotating twin-screw extruder with two feeders. The obtained rods were immediately plunged in cold water to fix the morphology of the PS/PLA blend. The morphology was then coarsened by quiescent annealing using a hot press at 190°C for 30 min. The rods were then plunged in cold water, then dried, and machined into 3 mm-thick slices. The PS phase was then selectively extracted with cyclohexane (Fisher Chemical #C556) for 7 days, leading to macroporous PLA scaffolds. The scaffolds were then dried under vacuum (60°C, 120 h), then stored at room temperature until use.

Macroporous dextran hydrogels were obtained from the PLA scaffolds as previously described [410]. Dextran T-500 was dissolved (200 mg/mL) in ultrapure water (MilliQ grade, MilliPore Gradient A10 purification system), with trisodium trimetaphosphate (STMP, 60 mg/mL) (Sigma #T5508) as a crosslinking agent. Immediately upon the addition of sodium hydroxide (final concentration 1 M), the solution was injected into the macroporous PLA scaffolds by vacuum/pressure cycles. The scaffolds loaded with the dextran solution were then incubated at 50°C for 15 min, allowing for the crosslinking of dextran by STMP. After cooling, the gels were soaked under agitation in chloroform (Thermo scientific #42355) for 72 h to extract the PLA. The obtained macroporous dextran hydrogels were then soaked in Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4, Sigma #D5652) in aseptic conditions.

Functionalization

Macroporous dextran hydrogels were functionalized by copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition [305]. All the functionalization steps were performed in aseptic conditions, using sterile-filtered (0.22 µm) solutions and reagents. To introduce alkyne moieties in the dextran backbone, the gels were first incubated in 500 µL of a glycidyl propargyl ether (GPE) solution (20 mM in 200 mM NaOH, 37°C, 16 h under agitation). They were then extensively rinsed in sterile PBS to wash the unreacted reagents and return to physiological pH. Then, the gels were immersed in degassed PBS containing the desired amount of the Aha-terminated RGD (0 nmol, 30 nmol or 100 nmol) and Kcoil (0 nmol or 10 nmol) peptides. A premixed and degassed solution of Tris(3-hydroxypropyltriazolmethyl)amine (THPTA) (Sigma #762342) and copper sulfate pentahydrate (Sigma #C8027) in ultrapure water was then added to the reaction mix, to reach final concentrations of 2 mM THPTA and 0.4 mM CuSO₄ in a final reaction volume of 500 µL. Finally, 60 µL of a 10 mg/mL sodium ascorbate solution (degassed, in ultrapure water) were added to initiate the reaction. The reaction mix was then incubated under agitation at 37°C, protected from light. After 24 h, the mix was again supplemented with sodium ascorbate (same as before), then incubated at 37°C, protected from light, for

an additional 24 h. The gels were then rinsed twice in PBS + 100 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (pH 9) to inhibit copper action, then extensively rinsed in PBS to remove unreacted material and return to equilibrium pH. The gels were then equilibrated in the adequate cell culture medium before proceeding with the cell assays. In Figure C.1, we verified that the obtained functionalized gels were sterile.

Estimation of the Grafting Yields

The yields of the functionalization reactions were estimated by ^1H nuclear magnetic resonance (NMR). The reactions were carried out in solution to allow for polymer dissolution. Dextran (100 mg/mL) was incubated with 55 mM GPE (10:1 monomer:GPE ratio) in 200 mM NaOH as described in section 6.6.2. The reaction mix was then purified using Amicon Ultra centrifugal filters (Millipore #UFC8050, cut-off 50 000 g/mol) against PBS (5 cycles, 4000 g, 45 min). The obtained polymer (Dex-GPE, 50 mg/mL) was incubated with 250 μM azide-functionalized polyethylene glycol ($\text{N}_3\text{-PEG}$, Sigma-Aldrich #689475, 5 000 g/mol) with THPTA, CuSO_4 and sodium ascorbate, as described in section 6.6.2. The reaction mix was purified using Amicon Ultra centrifugal filters (cut-off 50 000 g/mol) against PBS-EDTA (2 cycles, 4000 g, 45 min) and ultrapure water (3 cycles, 4000 g, 45 min), then freeze-dried. For ^1H NMR analysis, samples were dissolved (5 mg/mL) in D_2O , heated at 50°C and analyzed on a AVANCE 700 spectrometer (Bruker). The obtained spectra were analyzed using TopSpin v4.2.0 (Bruker), using NMRDB (<http://nmrdb.org>) for the prediction of chemical shifts.

Morphological Characterization

The macroporous PLA scaffolds and dextran hydrogels (pores emptied with a Kimwipe[®] to enhance contrast) were imaged using X-ray micro-computed tomography (μCT). μCT scans were acquired on a Xradia 520 Versa X-Ray 3D microscope (ZEISS) and samples were reconstituted using Scout-and-Scan Instrument Control System v16.0 (ZEISS).

The reconstitutions were analyzed using Dragonfly Pro 2020 (Object Research Systems). Objects were segmented into two complementary regions (macropore network and material) based on pixel value. The interfacial area was determined using a built-in algorithm and was divided by sample volume to give the specific surface area. A thickness mesh of the macropore network was computed using a built-in algorithm to obtain the macropore size distribution.

Mechanical Characterization

Compression assays were performed on a Mach-1 Mechanical Tester (Biomomentum) controlled by Mach1Motion v3.1.3. Two consecutive vertical compressions were applied to bulk (i.e., non-macroporous) or macroporous dextran hydrogels. The compression amplitude was 10% of the total gel height. The recorded stress-strain curves were then analyzed to determine the elastic modulus, that is, the slope of the linear part of the curves.

Physical Characterization

The swelling capacity of the hydrogels was measured by comparing the mass of bulk and macroporous (with empty macropores) hydrogels immediately after crosslinking (m_{init}) and after equilibration in cell culture medium (m_{eq}). Hydrogel swelling is given by equation 6.1.

$$Swelling (\%) = \frac{m_{eq}}{m_{init}} \times 100 \quad (6.1)$$

The liquid intake capacity of the macropore network was determined by measuring the mass of the gels with their macropores either empty (m_{empty}) or filled with cell culture medium (m_{full}). Note that for macroporous hydrogels, $m_{empty} = m_{eq}$. Liquid intake is given by equation 6.2.

$$Liquid\ intake\ (\%,\ w/w) = \left(1 - \frac{m_{empty}}{m_{full}}\right) \times 100 \quad (6.2)$$

The liquid intake capacity is also estimated from μ CT scans, by comparing the volume of the macropores (V_{pores}) to the total volume of the sample (dextran + macropores, V_{sample}) (equation 6.3).

$$Liquid\ intake\ (\%,\ v/v) = \frac{V_{pores}}{V_{sample}} \times 100 \quad (6.3)$$

6.6.3 Cell Assays

Cell Culture: Experimental Conditions and Reagents

Cells were kept in a standard humid incubator (37°C, 5% CO₂) for all experiments.

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC, #C2519A) and aortic smooth muscle cells (AoSMC, #CC-2571) were purchased from Lonza and maintained following the manufacturer's instructions. Culture medium was renewed every other day and cells were used be-

tween passages 3 and 5.

Complete culture medium for HUVEC is EGM-2 (Lonza #CC-3162), composed of basal medium (EBM-2, Lonza #CC-3156) supplemented with antibiotics, fetal bovine serum (FBS, 2%), heparin, hydrocortisone, ascorbic acid, and growth factors (hEGF, VEGF, hFGF-B, R3-IGF-1) (SingleQuots™ supplement kit, Lonza #CC-4176).

Complete culture medium for AoSMC is SmGM-2 (Lonza #CC-3182), composed of basal medium (SmBM, Lonza #CC-3181) supplemented with antibiotics, fetal bovine serum (FBS, 5%), insulin and growth factors (hEGF and hFGF-B) (SingleQuots™ supplement kit, Lonza #CC-4149).

“Supplement-depleted medium” refers to EBM-2 (basal) medium supplemented with antibiotics, 2% FBS and ascorbic acid only.

Cell Adhesion in Macroporous Hydrogels

Before the experiment, functionalized hydrogels were equilibrated overnight in complete culture medium. At $t = 0$ h, the medium was delicately removed from the macropores using a micropipette and immediately replaced by 50 μ L of cells (HUVEC or AoSMC, 1M cells/ mL) in suspension in complete medium. After 3 h at 37°C, the gels were delicately transferred into 24-well tissue-culture-treated plates (Corning Costar® #CLS3524) and incubated with 400 μ L of complete medium.

24 h post seeding, an Alamar blue assay was performed to assess cell metabolic activity. Cells were incubated in 400 μ L complete medium supplemented with 1 mg/mL Resazurin sodium salt (Sigma #R7017). After 2 h at 37°C, the surrounding medium was removed, and the fluorescence of the gels ($\lambda_{ex} = 560$ nm, $\lambda_{em} = 590$ nm) was measured on an Infinite 200 plate reader (Tecan).

24 h or 96 h post seeding, the gels were rinsed three times for 5 min in PBS, then incubated for 1 h in 4% formaldehyde (buffered, pH 6.9, Sigma #1.00496) to fix the cells, rinsed three times for 5 min in PBS and stored at 4°C until subsequent immunostaining (section 6.6.3).

Immunostaining of Fixed Cells in Macroporous Hydrogels

Hydrogels containing fixed cells were incubated in Triton X-100 (Thermo Scientific #85111, 0.4% v/v in PBS) for 30 min (cell permeabilization), rinsed 3 times for 5 min in PBS, and blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) for 2 h. The liquid surrounding the gels was then removed. The gels were then covered with 100 μ L of a primary antibody solution

containing 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of mouse anti-von Willebrand factor (vWF) monoclonal antibody (Invitrogen #MA5-14029) and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of rabbit anti-smooth muscle actin monoclonal antibody (Invitrogen #701457) in 1% BSA, then incubated overnight at 4°C. After three rinses (5 min each) in 1% BSA, the gels were covered with 100 μL of a secondary antibody solution containing 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ goat anti-mouse IgG (H+L), Alexa FluorTM 594 (Invitrogen #A32742) and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ donkey anti-rabbit IgG (H+L), Alexa FluorTM 488 (Invitrogen #A32790) in 1% BSA, then incubated for 2 h at room temperature, protected from light. 10 μL of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1:250 in PBS, InvitrogenTM #D1306) were then added on top of the hydrogels for nuclei staining, and the samples were incubated as before for an additional 30 min. The gels were then rinsed three times for 5 min in 1% BSA and stored at 4°C in a humid, airtight container until imaging.

Generation of Vascular Organoids

Live HUVEC and AoSMC were stained with BioTracker cytoplasmic membrane dyes – 655 nm (Sigma #SCT108, red) and 490 nm (Sigma #SCT106, green), respectively – following the manufacturer's instructions, to allow for subsequent live cell imaging. HUVEC/AoSMC vascular organoids were then prepared as described by Markou *et al.* [397,513]. 10 μL droplets of a master mix composed of 20% v/v of sterile methylcellulose in DMEM (Sigma #D5030), 9×10^4 HUVEC/mL and 1×10^4 AoSMC/mL in EGM-2 medium were pipetted on the lid of a Petri dish (turned upside-down). The dish was filled with sterile PBS. The lid was then placed back on the dish, so that the droplets hung above the PBS, which prevented them from drying. The Petri dish was then incubated at 37°C, 5% CO₂ for 48 h, during which HUVEC and AoSMC self-assembled into spherical vascular organoids. The organoids were then collected, centrifuged (600 g, 1 min), resuspended at 1 000 organoids/mL in either complete or supplement-depleted medium and used immediately.

Organoid-based Assays in Macroporous Hydrogels

Before starting the experiments, functionalized hydrogels were equilibrated in the adequate culture medium. For assays using complete medium, gels were equilibrated overnight in EGM-2. For assays using supplement-depleted medium, the gels were preincubated with Ecoil-tagged growth factors. The gels were immersed in 500 μL of supplement depleted medium with 50 nM of Ecoil-EGF, Ecoil-VEGF, or both growth factors (Ecoil-EGF + Ecoil-VEGF) at 37°C for 48 h, then rinsed five times (1 h each) in unsupplemented medium to remove unbound growth factors, then equilibrated overnight in unsupplemented medium.

At $t = 0$ h, medium was delicately removed from the macropores of the gels and was im-

mediately replaced by 50 μL of the organoid solution (1 000 organoids/mL) in the adequate medium. After 3 h at 37°C , the gels were delicately transferred into 24-well tissue-culture-treated plates and incubated with 400 μL of medium. 24 h post seeding, an Alamar blue assay was performed (same procedure as in section 6.6.3) in the adequate medium. The gels were imaged 24, 96, 168 and/or 240 h post seeding to observe live cells.

Cell Imaging

Cells in dextran macroporous hydrogels were imaged on a FV1000 confocal microscope (Olympus) controlled by FluoView 4.2 (Olympus), using 10X and 40X air objectives. Each acquisition images a depth of 100 μm (100 slices, step: 1 μm). Images of fixed cells were acquired using the preset DAPI, Alexa FluorTM 488 and Alexa FluorTM 594 laser configurations. Images of live cells were acquired using the preset Alexa FluorTM 488 and Alexa FluorTM 647 laser configurations. Stack reconstitutions and z-projects were obtained using ImageJ Fiji v2.9.0/1.53t.

6.6.4 Statistical Analysis

For μCT experiments, data is mean $\pm$ standard deviation based on $n = 4$ independent samples, 2 measurements per sample. For mechanical characterization and swelling assays, data is mean $\pm$ standard deviation based on $n = 6$ samples, 3 measurements per sample. For Alamar Blue assays, data is mean $\pm$ standard deviation, $n = 6$ samples from two independent experiments, 3 measurements per sample.

Pairwise comparisons were performed using Student's bilateral t -tests (degree of freedom: $2 \cdot n - 2$), and a level of confidence of 95% was chosen as the minimum significance threshold.

6.7 Results

6.7.1 Production of Macroporous Dextran Hydrogels

An interconnected macropore network is a requisite for subsequent cell colonization of a hydrogel. Templating the gels on a macroporous scaffold is a straightforward way to ensure interconnectivity. In this study, we obtain macroporous dextran hydrogels from macroporous polylactic acid (PLA) scaffolds, as we previously described [410]. The procedure is described in Figure 6.2A. The PLA scaffolds are prepared from co-continuous polystyrene (PS)/PLA blends, after the selective extraction of the PS phase. μCT images of the obtained PLA structure show a homogeneous, macroporous structure with a random macropore distribution

(Figure 6.2C).

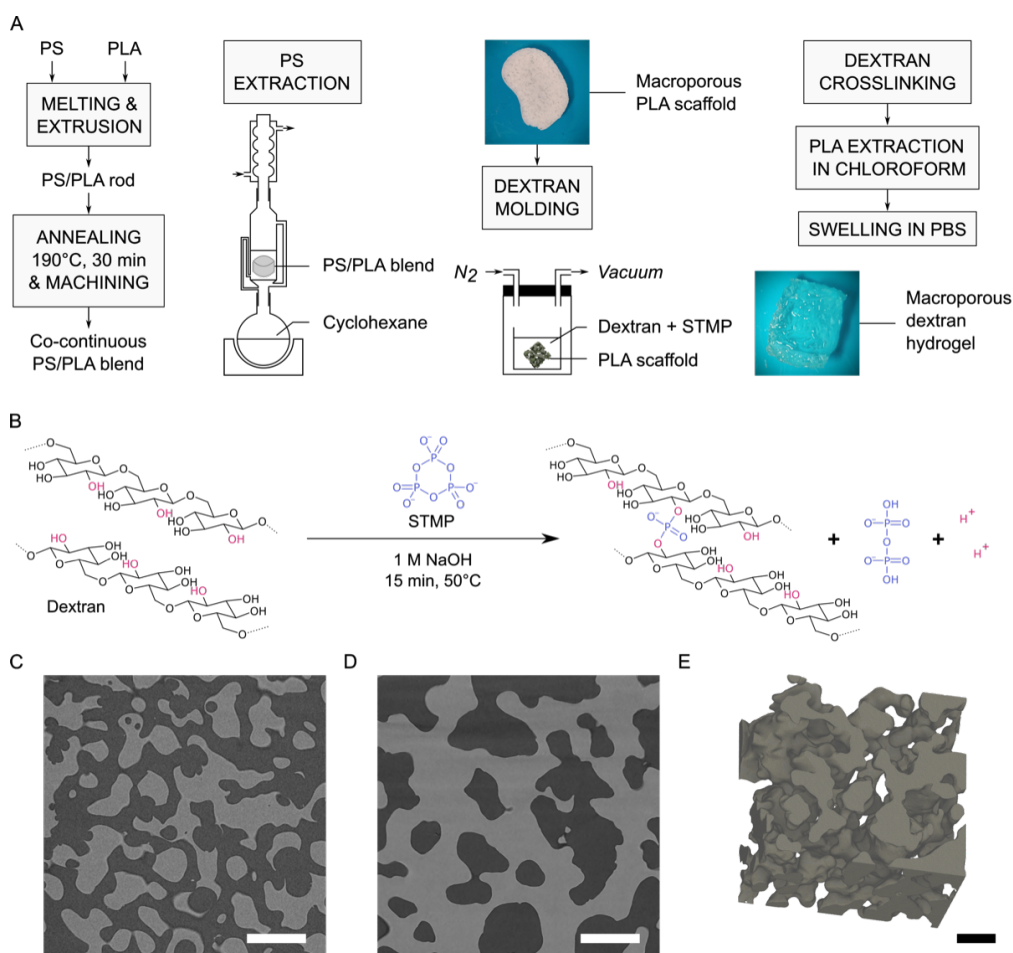


Figure 6.2 Production of macroporous dextran hydrogels. (A) Schematic procedure showing the production steps of macroporous dextran hydrogels. (B) Reaction scheme of dextran crosslinking, using STMP as the crosslinking agent. (C-D) Representative μ CT scans of (C) a macroporous PLA scaffold and (D) a macroporous dextran hydrogel after swelling in PBS. The PLA (C) and the dextran (D) phases appear in light grey, the empty macropores in dark grey. (E) 3D reconstitution of the pore network of a macroporous dextran hydrogel, obtained from a thickness mesh. (C-E) Scale bars: 1 mm.

In highly alkaline conditions, the hydroxyl groups of dextran tend to deprotonate (mostly on carbon 2) [488], allowing for the covalent crosslinking of the dextran chains via reaction with phosphate ions (Figure 6.2B). Molding of a dextran + STMP alkaline solution into the PLA macroporous scaffolds allows for *in situ* crosslinking (Figure 6.2A-B). After the selective extraction of the PLA phase, only the macroporous dextran hydrogel remains (representative μ CT image in Figure 6.2D). Figure 6.2E shows a 3D reconstitution of the pore network, obtained from μ CT scans by computation of a thickness mesh (pores in grey). This confirms

high macropore interconnectivity: the macropore network appears as a single, continuous phase.

The average macropore diameter in dextran hydrogels, obtained from the 3D reconstitution of the pore network (Figure 6.2E), is $370 \pm 90 \mu\text{m}$, about twice the size of the macropores in the PLA scaffold molds (Table 6.1, Figure 6.2C-D). This increase can be attributed to the hydrogels' ability to absorb liquids, including biological media, and is consistent with the swelling ratios measured for both bulk and macroporous dextran hydrogels (Table 6.2, equation 6.1). The increase in pore size results in a decreased specific surface area (SSA), that is, the available area at the material/macropore interface per unit of volume (Table 6.1).

Table 6.1 Morphological characteristics of macroporous PLA scaffolds and dextran hydrogels, derived from μCT scans ($n = 4$).

	Specific surface area (cm^{-1})	Average macropore diameter (μm)
PLA scaffolds	57 ± 1	180 ± 70
Dextran hydrogels	30 ± 5	370 ± 90

The elastic modulus was measured on both bulk and macroporous dextran hydrogels. Data from bulk hydrogels provides insight on the dextran matrix as perceived by a single cell at a microscopic scale. On the other hand, data from macroporous hydrogels demonstrates the overall contribution of both the dextran matrix and the biological medium in the macropores. Contents of the macropores account for about 40% (mass and volume, Table 6.2) of a macroporous dextran hydrogel and impact the sample's structure. The elastic modulus for macroporous hydrogels is in the 10 kPa range (Table 6.2), which falls in the range of values reported elsewhere for the culture of vascular cells – typically, 0.1 to 10 kPa [17,264,505–507]. The elastic modulus of bulk dextran is about twice as big as that of macroporous hydrogels, which is explained by the open, liquid-filled macroporous structure of the latter.

Table 6.2 Mechanical and physical properties of bulk and macroporous dextran hydrogels ($n = 6$). *N.d.*: not determined.

	Elastic modulus E (kPa)	Swelling in EGM-2 (%)
Bulk dextran hydrogels	16.9 ± 0.5	235 ± 7
Macroporous dextran hydrogels	9 ± 3	280 ± 10
EGM-2 intake in macropores (%)		
Macroporous dextran hydrogels	From μCT (v/v)	From hydrogel weighing (w/w)
Dex	37 ± 2	40 ± 3
RGD(+) + Kcoil	<i>n.d.</i>	41 ± 2

Altogether, the hydrogels display a highly interconnected macropore network, with a homogeneous, randomly oriented distribution. Their macropores are large enough to accommodate

complex cellular structures, and their mechanical properties are adequate for a range of cell culture applications, including culture of vascular cells. These considerations and their implications are further discussed in section 6.8.3.

6.7.2 Functionalization of Macroporous Dextran Hydrogels

Dextran is a low-fouling polymer, known to prevent cell adhesion [510]. For cell binding to occur, dextran must be functionalized with cell-signaling adhesive peptides. The dextran matrix can also be functionalized with growth factors to induce further cellular proliferation. In this study, we functionalized macroporous dextran hydrogels with the RGD and Kcoil peptides. RGD is a peptide motif derived from fibronectin, responsible for non-selective integrin-mediated binding of cells to the ECM [514]. The Kcoil peptide allows for the oriented affinity capture of Ecoil-tagged growth factors via E/K coiled-coil heterodimerization.

Functionalization of dextran with RGD and Kcoil was performed in equilibrated hydrogels, in a two-step reaction. The hydrogels were first incubated with GPE to introduce alkyne moieties to the dextran backbone. Aha-terminated peptides were then grafted by the bioorthogonal azide/alkyne cycloaddition (Figure 6.3A).

We relied on ^1H NMR to confirm conjugation and estimate the grafting yields. Since ^1H NMR requires the samples to be dissolved in the deuterated solvent (here, D_2O), we performed a parallel reaction on non-crosslinked dextran chains in solution. Since the ^1H NMR signal of both peptides is too weak to be detected in the experimental conditions used in this work (Figure C.2), we used azide-functionalized PEG as a model molecule (Figure 6.3A). The molecular weight of PEG (5000 g/mol) was chosen to be in the same range as the 38-amino acid-long Kcoil (~ 4000 g/mol).

^1H NMR spectra confirm the successful conjugation of GPE to the dextran backbone (Figure 6.3B), with a peak corresponding to two protons appearing at 4.43 ppm (b). Peak integration, normalized to peak (a) (dextran backbone), leads to a grafting yield of $21.1 \pm 0.5\%$ (Table 6.3). This low yield is explained by the competing hydrolysis of GPE by hydroxide [489]. Indeed, GPE coupling is performed in alkaline conditions, to allow for the deprotonation of the carbon 2 of dextran monomers [488]. However, in the incubation conditions used in this study, this yield is sufficient to ensure the cycloaddition is performed with an excess of alkyne over azide (Table 6.3).

The successful conjugation of N_3 -PEG is also confirmed by the recorded ^1H NMR spectra (Figure 6.3B). Upon the addition of the PEG, three characteristic peaks appear: (i) peak (c), corresponding to the proton of the triazole ring, (ii) peak (d), corresponding to the ~ 452

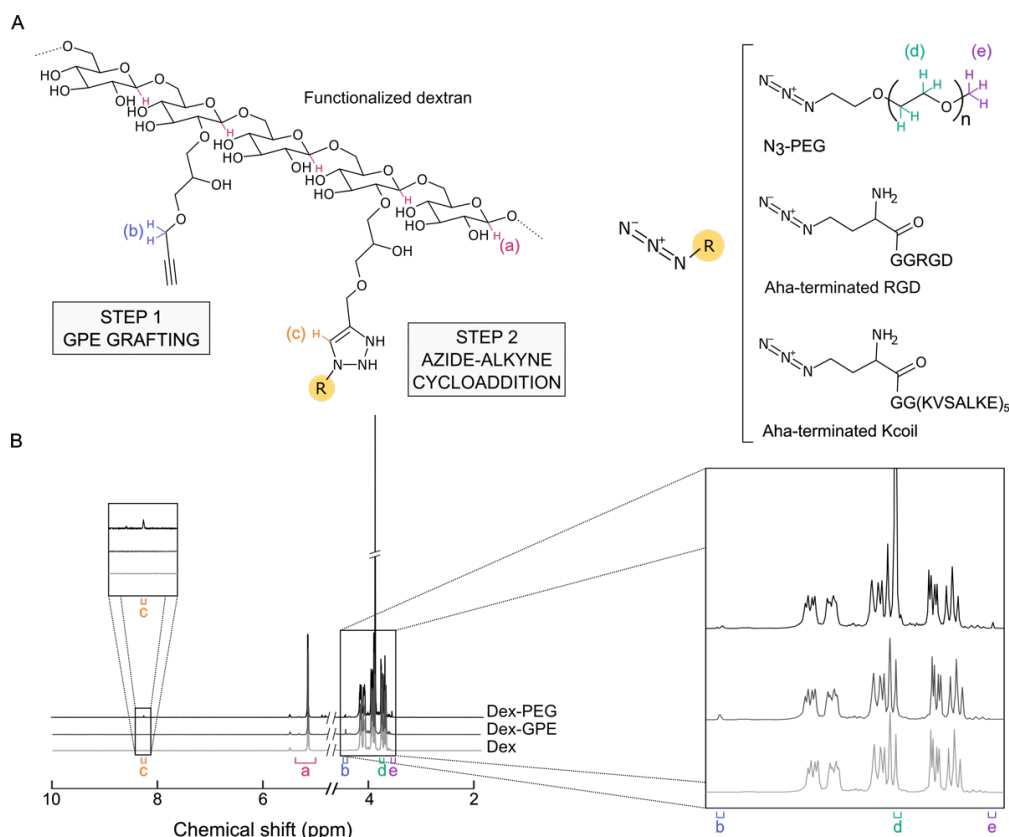


Figure 6.3 Dextran functionalization and characterization. (A) Scheme of the modified dextran. Dextran is first functionalized with GPE to introduce alkyne moieties to the dextran backbone. Dextran is then functionalized (i) with PEG for ^1H NMR characterization (in solution) or (ii) with the RGD and Kcoil peptides for cell experiments (surface modification of macroporous hydrogels). (B) ^1H NMR spectra for each functionalization step. All spectra are normalized to the dextran peak (a). The x-axis break corresponds to the peak of solvent (D_2O), that was removed to improve figure readability.

Table 6.3 Characterization of functionalized dextran from ^1H NMR peak integration ($n = 2$).

	Incubation ratios	Peak integration	Modified monomers (%)	Grafting yield (%)
GPE	10:1 monomer:GPE	$\frac{b}{2 \cdot a}$	2.11 ± 0.05	21.1 ± 0.05
N ₃ -PEG	110:1 monomer:N ₃ -PEG	$\frac{c}{a}, \frac{d}{452 \cdot a}, \frac{e}{3 \cdot a}$	0.68 ± 0.08 (all)	
	2.3:1 alkyne:N ₃ -PEG		32 ± 4 (alkyne-bearing)	74 ± 9

protons of the 5 000 g/mol PEG, and (iii) peak (e), corresponding to the three terminal PEG protons. Note that peak (d) overlaps some peaks of the dextran backbone. Peak integration

leads to a grafting yield of $74 \pm 9\%$ (Table 6.3). All peak integral values are provided in Table C.1.

While not entirely representative of the reaction that occurs on crosslinked hydrogels, ^1H NMR characterization in solution indicates that the functionalization of dextran with Aha-terminated peptides is efficient. Of interest, functionalization of macroporous dextran hydrogels with the RGD and Kcoil peptides does not impact the physical properties of the gels (Table 6.2).

6.7.3 Culture of HUVEC and AoSMC in Macroporous Dextran Hydrogels

Macroporous dextran hydrogels were functionalized with 0, 30 or 100 nM of RGD peptide (Dex, RGD(+)) and RGD(++), respectively) and subsequently equilibrated in complete culture medium (EGM-2 for HUVEC, SmGM-2 for AoSMC). The volume of the hydrogels was $150 \pm 10 \mu\text{L}$, corresponding to a macropore surface area of $5 \pm 1 \text{ cm}^2$ per hydrogel (Table 6.1). 5×10^4 HUVEC or AoSMC were seeded on top of the gels, and were allowed to diffuse through the macropores for 3 h. The gels were then transferred into a 24-well PS tissue culture plate and incubated in complete medium. The chosen seeding density of $\sim 1 \times 10^4$ cells/ cm^2 is consistent with the manufacturer's instructions for culture, and proliferation of vascular cells on dextran (2D) at a similar seeding density has previously been demonstrated by our research group [302].

At 24 h post seeding, we performed an Alamar blue assay to assess the metabolic activity of the cells. For both HUVEC (Figure 6.4A) and AoSMC (Figure 6.4B), metabolic activity was higher for RGD-functionalized gels compared to non-functionalized dextran gels. This indicates that functionalization with RGD enables cell adhesion in macroporous hydrogels.

Cell adhesion appears to be independent of the RGD concentration above a threshold value, as both RGD(+) and RGD(++) conditions lead to similar results. Considering a RGD grafting yield of 75% (Table 6.3), and assuming most of the grafted RGD is bioavailable, RGD(+) gels have a RGD density around $4.5 \text{ nmol}/\text{cm}^2$. This density of RGD is sufficient for promoting HUVEC and AoSMC adhesion on dextran coatings [302] and on top of dextran hydrogels [208]. For AoSMCs, Alamar blue signal in RGD(+) and RGD(++) gels is similar to that of cells seeded in a 24-well PS tissue culture plate (PS, positive control). For HUVEC, RGD enables cell adhesion in gels, though Alamar blue signals remain significantly lower than in PS (Figure 6.4). Note that the comparison between hydrogels and PS is indicative, since (i) the presence of culture media in the macropores and in the dextran matrix dilutes the reagent and (ii) the metabolic activity of the cells depends on the dimensionality [520].

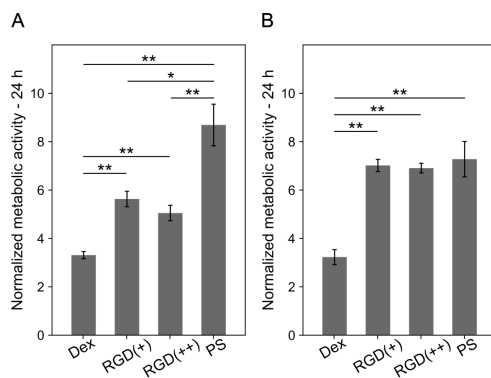


Figure 6.4 Metabolic activity of (A) HUVECs and (B) AoSMCs in their respective complete medium, 24 h post seeding in macroporous hydrogels. Hydrogels are functionalized with 30 nmol (RGD(+)) or 100 nmol (RGD(++)) of the RGD peptide. “Dex” represents non-functionalized hydrogels. “PS” represents cells seeded in a polystyrene cell culture plate. Data is normalized to the blank signal. Data is mean $\pm$ standard deviation ($n = 6$, two independent experiments). * ($p < 0.05$) and ** ($p < 0.01$) indicate statistically significant differences in pairwise comparisons (bilateral t -test).

At 24 h and 96 h post seeding, cells in macroporous dextran hydrogels were fixed and stained for subsequent immunofluorescence observation (Figure 6.5). Both cell lines were probed for smooth muscle actin (SmA) and for the von Willebrand factor (vWF). We confirmed the specificity of the staining on both HUVEC (SmA negative, vWF positive) and AoSMC (SmA positive, vWF negative) by immunofluorescence prior to seeding (Figure C.3). Observations 24 h post seeding confirm the results of the Alamar blue assay. For both HUVEC and AoSMC, cells observed in Dex gels were scarce, round and tended to agglomerate. On the contrary, HUVEC and AoSMC on RGD(+) and RGD(++) gels were more numerous and spread out across the surface of the macropores (Figure 6.5).

Observations 96 h post seeding show that most cells have been washed out of the gels, regardless of RGD functionalization (Figure 6.5), indicating that the cells do not survive in these culture conditions. Observations after 24 h showed that RGD efficiently promoted cell adhesion (Figure 6.4 and Figure 6.5), which discredits the hypothesis that cell loss could be a consequence of poor cell adhesion only.

Altogether, these results show that although RGD initially enabled adhesion of HUVEC and AoSMC in macroporous dextran hydrogels, their long-term culture and proliferation is not possible when the cells are seeded from a cell suspension. This observation is further discussed in section 6.8.1.

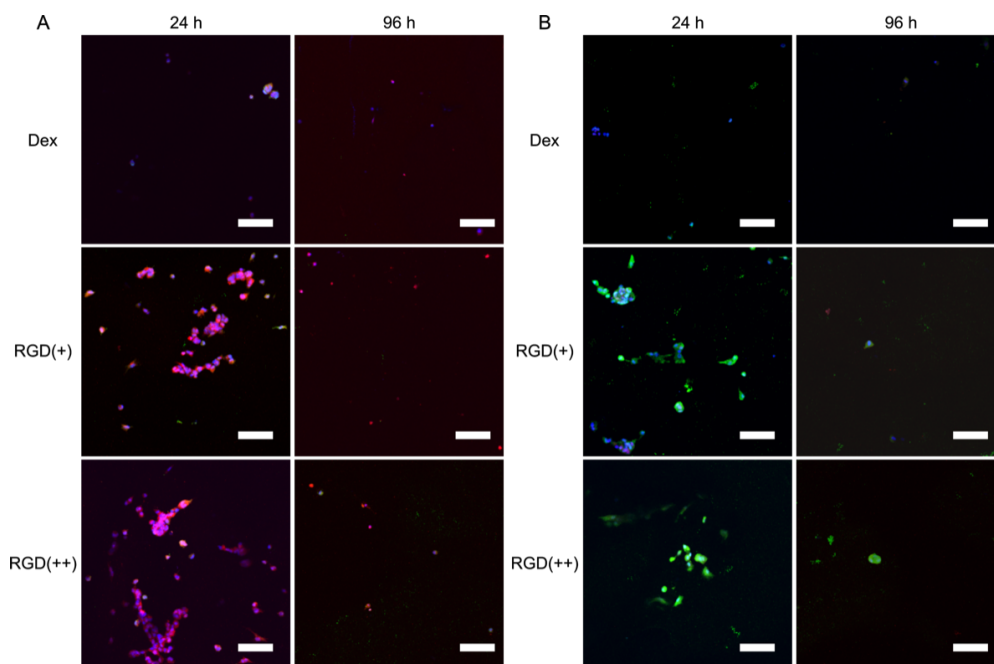


Figure 6.5 Representative confocal microscopy images of (A) HUVECs and (B) AoSMCs, 24 h and 96 h post seeding in macroporous hydrogels. Cells are kept in their respective complete medium. Hydrogels are functionalized with 30 nmol (RGD(+)) or 100 nmol (RGD(++)) of the RGD peptide. “Dex” represents non-functionalized hydrogels. Each image is a projection of a 100 μm -thick section (100 slices, step: 1 μm). Immunostaining of fixed cells: von Willebrand factor (red) and smooth muscle actin (green). Staining of nuclei: DAPI (blue). Scale bars: 100 μm .

6.7.4 Vascular Organoids in Complete Medium

To promote vascular cell survival in macroporous dextran hydrogels, we replaced the cell suspensions used in section 6.7.3 by a co-culture model of HUVEC/AoSMC organoids (Figure 6.6), in an approach inspired by Markou *et al.* [397,513]. This strategy aims to (i) more closely mimic the composition of a vessel wall, and (ii) pre-condition the cells to a 3D morphology and environment, with an emphasis on cell-cell interactions.

We generated the organoids in complete HUVEC culture medium (EGM-2), by incubating HUVEC and AoSMC (9:1 ratio, 1000 cells per organoid) in 10 μL hanging drops. During the 48 h incubation, cells self-assembled to form a spherical organoid (Figure 6.6A, slice, and Figure 6.6B, projection of a 3D scan). As previously reported [397, 513], HUVECs tend to form an outer layer (Figure 6.6A, red cells) around an AoSMC core (green cells), mimicking the inside-out assembly of a vessel wall.

Vascular organoids were seeded in Dex and RGD(+) macroporous hydrogels (50 organoids

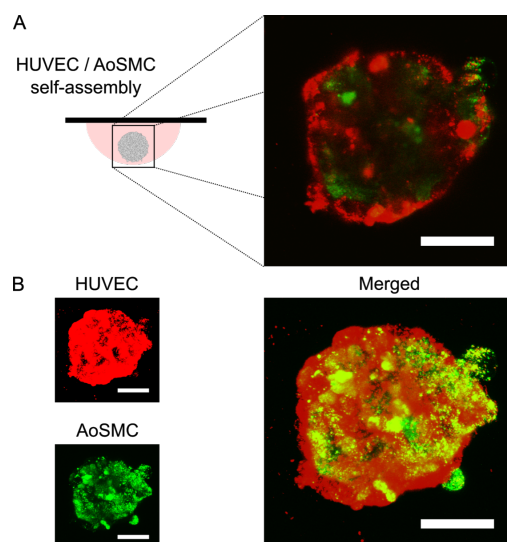


Figure 6.6 Generation of HUVEC/AoSMC vascular organoids. (A) Organoids (1000 cells, 9:1 HUVEC:AoSMC ratio) are generated in 48 h in hanging drops. Representative confocal microscopy 2D slice showing self-assembly into an inside-out core-shell structure. (B) Representative confocal microscopy image of a vascular organoid. Image is a projection of a 100 μm -thick section (100 slices, step: 1 μm). (A-B) Live cell membrane staining: HUVECs in red, AoSMCs in green. Scale bars: 50 μm .

per gel), and the gels were maintained in EGM-2 culture medium. At 24 h post seeding, an Alamar blue assay demonstrated that total metabolic activity was about twice as strong for organoids seeded in RGD(+) gels (Figure 6.7A), consistent with observations made when observing cell suspensions. The signals obtained for both Dex and RGD(+) conditions were approximately one-third lower than those observed for individual HUVEC and AoSMC, even though the gels were seeded with roughly the same number of cells (50 organoids per gel, compared to 5×10^4 cells per gel in section 6.7.3). However, this does not indicate that organoids are less viable than individual cells, as the metabolism of cells organized in monolayers differs from that of 3D-assembled structures [521].

Organoids in Dex and RGD(+) gels were observed by confocal microscopy at 24, 96, 168 and 240 h post seeding (Figure 6.7B). Throughout the entire 240 h, organoids in Dex gels largely remained spheric and did not sprawl onto the macropore surface, consistent with the anti-fouling properties of pristine dextran. Organoids in RGD(+) gels began sprawling on the macropores as quickly as 24 h post seeding. Interestingly, organoid growth appears directional, with distinct sprouting patterns visible at 96, 168 and 240 h. Both HUVEC (red) and AoSMC (green) sprawled around the original organoid, confirming that AoSMC can grow in culture medium optimized for endothelial cells. After 240 h, the observed organoids

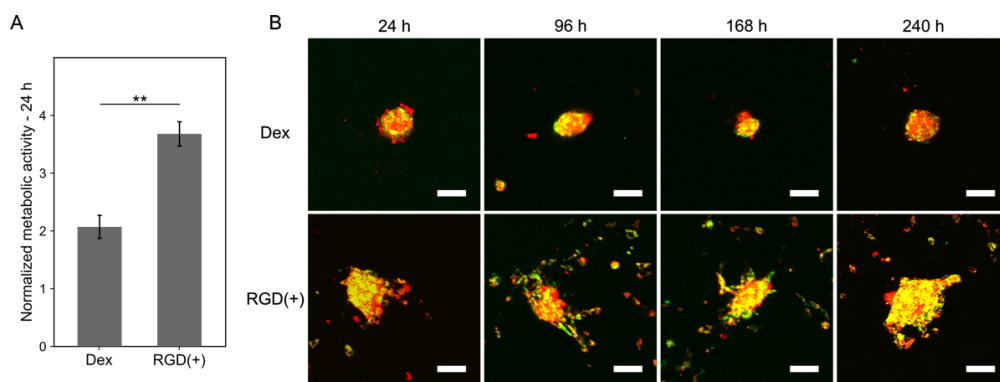


Figure 6.7 Adhesion and sprouting of vascular organoids in complete medium (EGM-2). (A) Metabolic activity of vascular organoids, 24 h post seeding in macroporous hydrogels. Hydrogels are functionalized with 30 nmol (RGD(+)) of the RGD peptide. “Dex” represents non-functionalized hydrogels. Data is normalized to the blank signal. Data is mean $\pm$ standard deviation ($n = 6$, two independent experiments). * ($p < 0.05$) indicates statistically significant difference in pairwise comparison (bilateral t -test). (B) Representative confocal microscopy images of vascular organoids, 24 h, 96 h, 168 h and 240 h post-seeding in macroporous hydrogels. Each image is a projection of a 100 μm -thick section (100 slices, step: 1 μm). Live cell membrane staining: HUVECs in red, AoSMCs in green. Scale bars: 100 μm .

are distinctly polarized, and are the starting point of well-defined proto-vascular structures (Figure 6.7B). Altogether, these results demonstrate that RGD(+) hydrogels can support the culture of vascular cells in complete medium, provided the cells are pre-conditioned to adopt a 3D organization such as self-assembly into vascular organoids.

6.7.5 Vascular Organoids in Supplement-Depleted Medium

Native ECM is a complex microenvironment, in which growth factors can be found both in solution and anchored to the matrix [91]. In a previous study, we demonstrated that two Ecoil-tagged growth factors, Ecoil-EGF and Ecoil-VEGF, were efficiently captured in Kcoil-functionalized gels and could be released in a slow, controlled manner by tuning the affinity of the coiled-coil interaction [410]. We demonstrated that the Kcoil-functionalized gels (i) released sufficient growth factors to promote proliferation of AoSMC cultured in the vicinity of the gels, and (ii) efficiently retained most of the growth factors within the macropores. This preliminary result indicated that cells cultured in the macropores of hydrogels functionalized with Kcoil and Ecoil-tagged growth factors will be exposed to both anchored and soluble growth factors.

The gels were first functionalized with the Kcoil peptide, then incubated with a solution

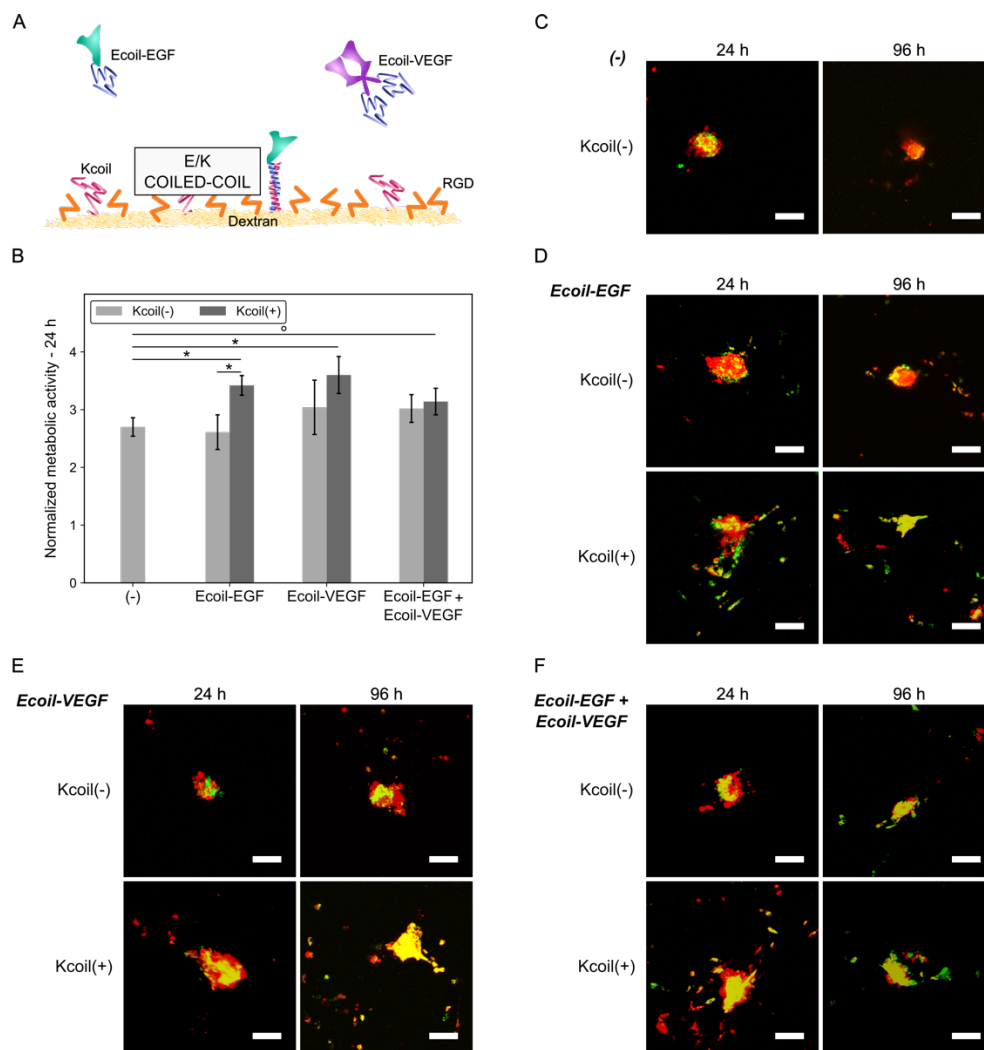


Figure 6.8 Adhesion and sprouting of vascular organoids in supplement-depleted medium. (A) Schematic of the hydrogel functionalization strategy. Macroporous hydrogels are functionalized with the RGD and Kcoil peptides, then pre-incubated with Ecoil-tagged growth factors before organoid seeding. (B) Metabolic activity of vascular organoids, 24 h post seeding in macroporous hydrogels. All hydrogels are functionalized with 30 nmol of the RGD peptide. RGD(+) + Kcoil hydrogels are also functionalized with 10 nmol of the Kcoil peptide. Before organoid seeding, the hydrogels are pre-incubated with 50 nM of Ecoil-EGF, Ecoil-VEGF, or Ecoil-EGF + Ecoil-VEGF. “(-)” represents hydrogels that are not pre-incubated with growth factors. Data is normalized to the blank signal. Data is mean $\pm$ standard deviation ($n = 6$, two independent experiments). * ($p < 0.05$) indicates statistically significant difference in pairwise comparison (bilateral t -test). ° corresponds to $p < 0.1$. (C-F) Representative confocal microscopy images of vascular organoids, 24 h and 96 h post seeding in macroporous hydrogels. Hydrogels are pre-incubated with (C) no growth factors, (D) Ecoil-EGF, (E) Ecoil-VEGF or (F) Ecoil-EGF + Ecoil-VEGF and are subsequently kept in supplement-depleted medium. Each image is a projection of 100 μ m-thick sections (100 slices, step: 1 μ m). Live cell membrane staining: HUVECs in red, AoSMCs in green. Scale bars: 100 μ m.

of Ecoil-tagged growth factors (Ecoil-EGF, Ecoil-VEGF, or both) that were captured on the macropore surface via E/K heterodimerization (Figure 6.8A). Later, vascular organoids maintained in supplement-depleted culture medium (EBM-2 basal medium for endothelial cells, antibiotics, 2% FBS and acid ascorbic) were seeded into the gels. We observed that functionalization with Kcoil alone was not sufficient for organoid growth in macroporous dextran hydrogels (Figure C.4), and thus all the gels used in this section were also functionalized with RGD (Figure 6.8A). After extensive rinsing of the gels to eliminate unbound growth factors, the vascular organoids (50 per gel) were seeded in RGD(+) and RGD(+) + Kcoil macroporous hydrogels pre-loaded with Ecoil-tagged growth factors. The gels were then maintained in supplement-depleted medium.

At 24 h post seeding, we performed an Alamar blue assay to assess the metabolic activity of the organoids (Figure 6.8B). For Kcoil(+) hydrogels respectively loaded with Ecoil-EGF and Ecoil-VEGF (Kcoil(+) / Ecoil-EGF and Kcoil(+) / Ecoil-VEGF), the obtained signals were stronger than those of Kcoil(-) without growth factors (Kcoil(-) / (-)). We observed the same trend, although not statistically significant, for Kcoil(+) gels loaded with Ecoil-EGF + Ecoil-VEGF (Kcoil(+) / Ecoil-EGF + Ecoil-VEGF). In the case of Ecoil-EGF, the obtained signal was also stronger for Kcoil(+) gels than for Kcoil(-) gels (Figure 6.8B). These results show that the presence of growth factors has a positive influence on organoid metabolic activity. Of interest, for Ecoil-VEGF and Ecoil-EGF + Ecoil-VEGF, there is no significant difference between Kcoil(-) and Kcoil(+) gels. We hypothesize that remaining traces of unbound growth factors in the macropores can account for the medium signal levels measured for the Kcoil(-) gels. Indeed, low concentrations of diffusible growth factors are enough to promote cell proliferation *in vitro*. For example, the concentration of EGF and VEGF in complete culture media is approximately in the 100 pM range (Lonza). However, this effect is not long-lasting since diffusible growth factors have a short half-life in serum-containing media [468].

Organoids in Kcoil(-) and Kcoil(+) gels were observed at 24 and 96 h post seeding (Figure 6.8C-F). Organoids in Kcoil(-) / (-) gels (Figure 6.8C) remained spherical and did not exhibit signs of sprawling nor sprouting, emphasizing the need of biological cues such as growth factors to promote angiogenesis. Organoids cultured in Kcoil(+) gels all exhibited sprouting and polarization after 96 h (Figure 6.8D-F, bottom line). The presence of Ecoil-EGF promoted AoSMC spreading (Figure 6.8D and F, green cells), compared to lower AoSMC expression in Kcoil(+) / Ecoil-VEGF gels (Figure 6.8E). This is expected, as VEGF is specific to endothelial cells, and AoSMC do not harbor VEGF receptors [85]. Interestingly, while cells in Kcoil(-) gels did sprawl around the original organoids, they did so to a much lesser extent than in Kcoil(+) gels, which supports the trends observed in Figure 6.8B. Altogether, organoids in gels functionalized with RGD, Kcoil and Ecoil-tagged growth factors bore the

closest resemblance to organoids cultured in complete medium (Figure 6.7).

6.8 Discussion

6.8.1 Dextran-based Materials for Tissue Engineering

In this manuscript, we used dextran as the primary material for cell culture applications. Being naturally low-fouling and cell-repellent [188, 510], dextran is not widely used for this purpose [509]. Using materials directly derived from the ECM, such as collagen, gelatin, Matrigel or decellularized ECM, generally provides better results for in vitro vascularization purposes [372, 505, 522]. For example, Camci-Unal *et al.* [505] developed a hyaluronic acid-gelatin hybrid hydrogel that supported HUVEC proliferation in 3D over one week, while our dextran hydrogels did not (Figure 6.5). Similarly, fibrin gels developed by Li *et al.* [372] supported the fast sprouting from HUVEC-coated beads and the formation of complex branch clusters.

However, most ECM-based materials are complex, poorly defined, and subject to lot-to-lot variations [13]. Materials such as decellularized ECM have limited availability and are difficult to prepare. Mouse-originated Matrigel is highly immunogenic to humans [13]. Therefore, developing inert, well-characterized materials for tissue engineering is of crucial importance from a translational perspective. Polysaccharides are good candidates for this purpose, due to their biocompatibility, relatively low cost, and wide availability [162]. They are rich in reactive hydroxyl groups, which makes them easy to functionalize.

Relying on polysaccharides like dextran for tissue engineering applications requires a bottom-up approach for material design: the chosen polymer must be functionalized with multiple active components until suitable for cell culture application. This allows for tunable functionalization, since only the desired functionalities are incorporated to the matrix. While not as efficient as naturally bioactive materials, a bottom-up approach allows for full material definition, control over material specificity [302], and a better translational potency.

6.8.2 Tunable Functionalization of Dextran Macroporous Hydrogels

In this study, we present a co-functionalization strategy to support organoid sprouting in macroporous dextran hydrogels. Our approach allows for the inclusion of both adhesive peptide motifs and any combination of Ecoil-tagged growth factors. For this proof-of-concept study, we used the non-selective RGD peptide as the adhesive sequence: RGD interacts with several subtypes of integrins and thus promotes adhesion of most cell types [46]. Depending on

the intended application, other adhesion peptides could be used, either to complement RGD action or to introduce cell-selective properties. For example, the REDV and CAG peptide motifs have been reported to selectively promote adhesion of endothelial cells over smooth muscle cells [523, 524]. However, a previous study by our research group has shown that neither REDV nor CAG alone enabled HUVEC adhesion on dextran [302]. Ultimately, the choice between ubiquitous or selective adhesion motifs depends on the intended application. In this study, using the ubiquitous RGD motif for the sprouting of HUVEC/AoSMC organoids proved successful (Figure 6.7). However, Li *et al.* have demonstrated that RGD lacking its synergy domain, PHSRN, does not provide adequate adhesion for complete, healthy angiogenesis, but rather leads to leaky and disorganized vessels [372]. Co-functionalization with several, complementary adhesion motifs could therefore be envisioned for future applications of macroporous dextran hydrogels.

Immobilizing growth factors on the matrix improves their half-life and allows for a sustained and local action on cells [468]. While both covalent [297] and non-covalent [254, 328, 331] strategies have been reported for that purpose, using an oriented grafting strategy is critical to maintain bioavailability and bioactivity of immobilized growth factors. The choice of the E/K coiled-coil affinity pair to capture growth factors to the matrix enables high versatility. First, it allows to functionalize the gels with one, two (Figure 6.8), or even complex combinations of growth factors. In this work, we used the 5-heptad long Ecoil – (EVSALEK)₅ – and Kcoil – (KVSALKE)₅ – peptides (K_D in the 10^{-10} M range, [340]). These sequences can be modified for the fine-tuning of the E/K affinity [340, 347]. We have previously shown that reducing peptide length to 3- or 4-heptads-long [352] or introducing leucine-to-alanine substitutions in the peptide sequences [410] could change the capture and release behaviors of Kcoil-functionalized macroporous dextran hydrogels. For applications in tissue engineering, using a mix of growth factors tagged with different Ecoil variants would enable control over the equilibrium between anchored and diffusible forms independently, for each growth factor, with no extra functionalization step.

6.8.3 Perspectives and Potential Applications

In this work, we present macroporous dextran hydrogels functionalized with adhesive peptides as a working platform for the culture of vascular cells in complete medium (Figure 6.7). Additionally, we propose the use of the E/K coiled-coil for the affinity-based, oriented capture of growth factors (Figure 6.8). The hydrogels have a pore size in the 350-400 μm range (Table 6.1), in the same range [525] or slightly higher [252, 526] than that of several macroporous materials previously reported to support the growth of vascular cells. Of interest, the pore

size of our macroporous PLA scaffolds can be controlled by varying the annealing time. Previous studies have shown that changing the annealing time from 5 to 90 min led to PLA scaffolds with a macropore diameter varying from 3 to 450 μm [239, 410]. Since dextran hydrogels have a swelling ratio of around 250%, the potentially accessible pore sizes are in the 10-1000 μm range. Other groups have reported scaffolds with various pore sizes to promote the growth of other cell types, such as neural (40 μm , [247]) or mesenchymal stromal cells (120 μm , [249]). For a given cell type, varying the pore size can change the proliferative, migrative or differentiative behaviors [15, 250]. Tuning the macropore size of our hydrogels could thus be an avenue to other applications in 3D cell culture.

The PLA scaffolds and dextran hydrogels used in this study are isotropic, with a homogeneous and randomly oriented pore network (Figure 6.2E). Since gel topography and pore orientation are key features that contribute to drive morphogenesis both in native ECM and in artificial scaffolds [15], future work should focus on introducing macropore patterns to our hydrogel design.

The macroporous dextran hydrogels presented in this study could have applications in tissue vascularization. For that purpose, vascular cells or proto-vascular structures can be co-incubated with other cell types [366]. Different growth factors could be integrated to the gels via the versatile E/K affinity platform. Of interest, the stiffness of our macroporous dextran hydrogels – elastic modulus in the 10-kPa-range (Table 6.2) – is suitable for the culture of vascular cells, as previously reported [17, 264, 505–507], but also other cell types [17], including neural stem cells [527], mesenchymal stem cells [528], or myocytes [529]. However, for all these cell types, the range of reported elastic moduli allowing for cell growth covers several orders of magnitude, and varying stiffness along this range can have an impact on cell behaviors such as sprawl area, cell differentiation or cell migration [17]. Therefore, co-cultures for tissue vascularization purposes may require adjusting the stiffness of macroporous dextran hydrogels, either to better mimic the native tissue or to favor a chosen cell behavior.

Finally, gel functionalization with Kcoil allows for the functionalization of the gels with any Ecoil-tagged moiety, including not only growth factors [349–351], but also drugs, other types of proteins such as monoclonal antibodies [352], and nanoparticles [353]. Functionalized hydrogels can be employed in the development of drug screening and testing platforms, cell trapping matrices, or complex tissue engineering scaffolds. Altogether, macroporous dextran hydrogels co-functionalized with Kcoil and adhesive motifs are a highly versatile platform for 3D cell culture applications.

6.9 Conclusion

This work focuses on the development of macroporous dextran hydrogels for applications in tissue engineering. The hydrogels have favorable characteristics and mechanical properties. They are functionalized with the RGD peptide for its adhesive properties, and with the Kcoil peptides for the controlled, oriented capture of any Ecoil-tagged growth factors. We demonstrate that the functionalization of the hydrogels with Ecoil-EGF and Ecoil-VEGF promotes the sprouting of vascular organoids seeded in supplement-depleted medium. This result paves the way for future applications in tissue vascularization, and for the development of 3D co-culture models.

Using the low-fouling and naturally cell-repellent dextran as the base material for a cell culture scaffold requires thorough functionalization to mimic the complexity of the ECM. However, a bottom-up design approach guarantees control over material definition, characterization, and specificity. These aspects are key characteristics for translational applications.

Altogether, macroporous dextran hydrogels functionalized with RGD peptides and growth factors through coiled-coil interactions are a versatile platform and a promising tool for the culture of 3D spheroids or organoids. Future work, focused on the incorporation of more biochemical cues to the dextran matrix via coiled-coil interactions for a more tailored platform, could further increase their potential in that field.

6.10 Supplementary Materials

Supplementary information is presented in annex C.

6.11 Acknowledgements

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada via the NSERC-CREATE PrEEmiuM program (R.O., E.T., V.M.) and the NSERC Discovery program (N.V.), by the Fonds de Recherche du Québec – Nature et Technologies (R.O., X.B.), and by the TransMedTech Institute and its main funding partner, the Canada First research and excellence fund (R.O., B.L.). X.B. also acknowledges the financial support from the Canada Research Chair funding program.

The authors would also like to thank Cédric Malveau and the NMR team (Chemistry, Université de Montréal) for NMR measurements, Marie-Hélène Bernier (Physical Engineering, Polytechnique Montréal) for μ CT measurements, Prof. Marc Lavertu and Anik Chevrier (Chemical Engineering, Polytechnique Montréal) for the use of their confocal microscope

and plate reader, and Faranak Baniahmad, Lucile Gielly, and Benjamin Serafin for the critical proofreading of the manuscript.

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

– RÉCAPITULATIF –

LA CO-FONCTIONNALISATION D'HYDROGELS DE DEXTRANE MACROPOREUX AVEC DES PEPTIDES ADHÉSIFS ET DES FACTEURS DE CROISSANCE PERMET LE BOURGEONNEMENT D'ORGANOÏDES VASCULAIRES

Dans cet article, nous proposons d'utiliser des hydrogels macroporeux de dextrane bio-fonctionnalisés pour la culture d'organoïdes vasculaires en 3D. L'utilisation du dextrane, un matériau inerte qui résiste à l'adsorption non spécifique des cellules et des protéines, garantit la **bonne définition** des hydrogels, ainsi que l'absence de tout effet biologique en dehors des propriétés ajoutées par la **biofonctionnalisation**.

Les hydrogels macroporeux sont biofonctionnalisés :

- avec le peptide RGD pour promouvoir l'**adhésion cellulaire** ;
- avec le peptide Kcoil pour permettre l'incorporation de **Ecoil-EGF** et **Ecoil-VEGF** par la formation de **superhélices E/K**.

Les principales conclusions expérimentales sont les suivantes :

1. les hydrogels de dextrane macroporeux fonctionnalisés avec le peptide **RGD** ne permettent pas la culture sur le long terme d'HUVECs et d'AoSMCs ensemencées à partir d'une suspension. En revanche, ils permettent la **culture** et le **bourgeonnement** d'organoïdes vasculaires dans du **milieu complet** ;
2. les hydrogels fonctionnalisés avec le seul peptide **RGD** ne permettent pas la culture d'organoïdes vasculaires dans du milieu de culture appauvri (sans facteurs de croissance) ;
3. en revanche, l'apport de **Ecoil-EGF** et **Ecoil-VEGF** dans les hydrogels fonctionnalisés avec les peptides RGD et Kcoil permet la **culture** et le **bourgeonnement** d'organoïdes vasculaires dans du **milieu de culture appauvri**.

Ces résultats démontrent qu'une biofonctionnalisation adéquate rend possible l'utilisation du dextrane comme matériau de base pour la conception d'échafaudages de culture cellulaire en 3D, et ce en dépit de ses propriétés anti-adhésives.

CHAPITRE 7 DISCUSSION GÉNÉRALE

7.1 Quantification de peptides et protéines en surface de NPs

Dans le chapitre 4, nous avons présenté une méthode pour la quantification de protéines en surface de trois types de NPs : (i) des NPs polymériques (PLA et PLA-*b*-PEG), (ii) des NPs d'AuPEG et (iii) des NPs de SiO₂. Ces travaux s'inscrivaient dans l'objectif de recherche suivant :

– Objectif n°1 –

Développer une méthode de quantification de protéines en surface de NPs, et l'utiliser pour déterminer la valence de NPs fonctionnalisées avec le peptide Ecoil.

7.1.1 Développement de la méthode de quantification et cas limite

La méthode que nous avons développée remplit les trois conditions identifiées dans le chapitre 3 :

- la **validité pour de multiples types de NPs**. Nous avons notamment validé expérimentalement la méthode pour les NPs utilisées dans ce travail de recherche : les NPs d'AuPEG et les NPs de PLA-*b*-PEG, ainsi que les NPs de SiO₂. Nous avons également identifié des types de NPs incompatibles avec cette méthode de quantification, notamment les NPs à base de matériaux aminés ;
- l'**utilisation de matériel peu onéreux et non spécialisé** : la quantification se fait par des mesures d'absorbance ;
- l'**absence de marquage** des protéines.

Cette méthode permet d'obtenir le **nombre moyen de protéines par NP**. La sensibilité dépend de deux paramètres :

1. la **quantité totale (mol) d'amines libres dans l'échantillon**. Ainsi, pour une même population de NPs, la sensibilité augmente avec la masse moléculaire de la protéine, car l'hydrolyse des liens peptidiques produit davantage d'amines libres ;
2. la **masse totale de NPs dans la solution** (m_{NP_s}). Tant que m_{NP_s} reste sous le seuil identifié dans le tableau 4.3, la sensibilité augmente avec m_{NP_s} (équation 4.6).

Sur la base de ces contraintes, il existe un cas limite dans lequel notre méthode n'est pas applicable : la **quantification de courts peptides en surface de grosses NPs**. Ainsi, pour des

AuPEG NPs de 100 nm de diamètre, la limite de sensibilité pour le peptide CGGYIGSR (8 résidus) est de 25 000 CGGYIGSR/NP (tableau 4.4). Or, CGGYIGSR a un diamètre hydrodynamique de $\sim 1,5$ nm. En assumant une fonctionnalisation en monocouche et une couverture maximale des AuPEG NPs, on peut estimer que le nombre maximal de CGGYIGSR pouvant être greffé à la surface des NPs est de $\sim 15\,000$ CGGYIGSR/NP. Dès lors, **la quantification de CGGYIGSR en surface de AuPEG NPs de 100 nm est impossible.**

Nous avons été confrontés à ce cas limite dans le cadre d'une publication plus récente de notre groupe de recherche. Dans les travaux de Dégardin *et al.*, des AuPEG NPs de 100 nm ont été fonctionnalisés avec le peptide Kcoil (séquence : CGG-(EVSALEK)₅, 38 résidus) afin de capturer des anticorps monoclonaux étiquetés avec Ecoil [358]. Si notre méthode de quantification a permis de mettre en évidence la conjugaison des anticorps monoclonaux à la surface des NPs, elle n'était pas assez sensible pour quantifier le Kcoil initialement greffé.

7.1.2 Valence de NPs fonctionnalisées avec le peptide Ecoil

Dans le chapitre 4, nous présentons comme exemple d'application la quantification de Cys-Ecoil-EGF (CEE), une chimère de EGF portant une étiquette Ecoil et une cystéine *N*-terminale, greffé en surface de NPs de PLA-*b*-PEG ($D_H = 115 \pm 2$ nm). Nous quantifions un niveau de fonctionnalisation moyen de 380 ± 20 CEE/NP, dont 160 ± 20 CEE/NP greffés de façon covalente via la cystéine (figure 4.7). Ce niveau de fonctionnalisation est largement supérieur à la limite de sensibilité de la méthode, estimée à ~ 34 CEE/NP pour ces NPs (équation 4.6, figure 7.1A).

Nous avons initialement envisagé de fonctionnaliser les NPs avec Ecoil seul. Après expérimentation, nous avons finalement choisi de ne pas poursuivre dans cette voie. En effet, utiliser Ecoil plutôt que CEE implique :

1. la **diminution de la sensibilité de la méthode de quantification**. Le peptide Ecoil utilisé compte 38 résidus (séquence : (EVSALEK)₅GGC), tandis que CEE en compte 119. Dès lors, notre méthode de quantification est moins sensible à la présence de Ecoil que de CEE. Pour les NPs de PLA-*b*-PEG utilisées dans ce travail ($D_H = 115 \pm 2$ nm), la limite de détection est de ~ 106 Ecoil/NP (figure 7.1A) ;
2. la **diminution des rendements de greffage** due à l'oxydation des cystéines *N*-terminales, particulièrement prononcée chez les peptides Ecoil. Nous pensons que cette oxydation élevée est causée par la tendance des peptides Ecoil à homodimériser en solution (phénomène rapporté et caractérisé pour un analogue du peptide Kcoil par Gerling-Driessen *et al.* [501]), ce qui facilite l'interaction entre deux cystéines voisines et provoque la formation de ponts disulfure. Bien que nous utilisions l'agent réducteur TCEP lors du

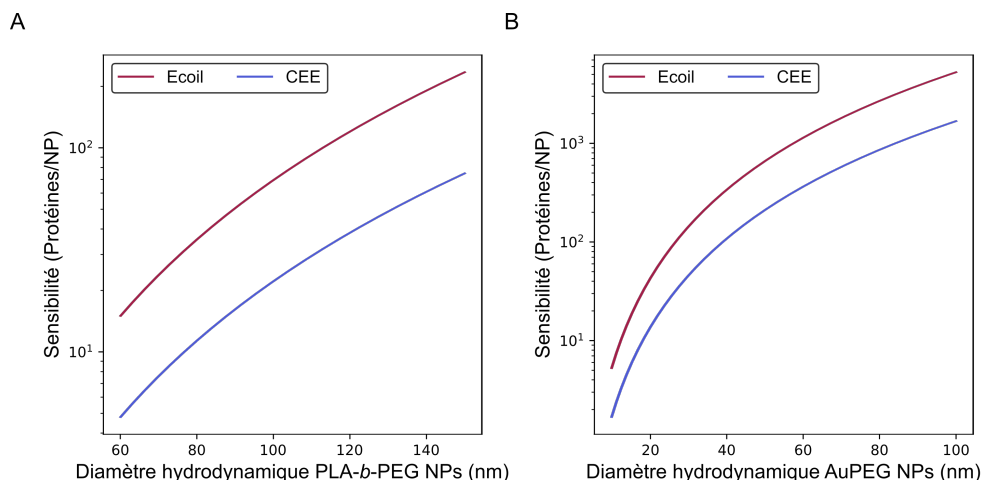


FIGURE 7.1 Sensibilité (nombre minimal de protéines/NP détectables) de la méthode de quantification pour la détection de Ecoil et de CEE en surface de NPs (A) de PLA-*b*-PEG (B) et de AuPEG. Figures obtenues à partir de l'équation 4.6.

couplage, cela ne suffit pas à obtenir une fonctionnalisation satisfaisante. Nous faisons l'hypothèse que les ponts disulfure se ré-oxydent rapidement après réduction par le TCEP, en raison de la proximité des cystéines.

La **disponibilité des réactifs** a également été un aspect déterminant. En théorie, notre méthode de quantification permet de détecter ~ 106 Ecoil/NP sur les NPs de PLA-*b*-PEG. Cependant, pour atteindre ce seuil de détection, il faut maximiser la masse de NPs – et donc, la quantité d'échantillon – allouée à la seule quantification (tableau 4.3).

Enfin, l'un des objectifs de ce travail de recherche était d'étudier l'**influence de la valence des protéines et NPs étiquetées avec Ecoil sur l'interaction avec des hydrogels de dextrane macroporeux fonctionnalisés avec Kcoil**. Dès lors, fonctionnaliser les NPs avec CEE plutôt que Ecoil seul nous permet une plus grande marge de manœuvre, car les taux de fonctionnalisation obtenus expérimentalement sont largement supérieurs à la limite de sensibilité.

Le choix de privilégier la fonctionnalisation des NPs avec CEE plutôt que Ecoil seul modifie le champ d'applications potentielles des NPs pour la biofonctionnalisation d'hydrogels de dextrane macroporeux : cet aspect sera discuté dans la section 7.2.

7.2 Utilisation de la superhélice E/K pour la capture et la relâche d'objets étiquetés avec le peptide Ecoil par des hydrogels de dextrane macroporeux

Dans le chapitre 5, nous avons fonctionnalisé des hydrogels de dextrane macroporeux avec le peptide Kcoil. Nous avons ensuite étudié la capture et la relâche de Ecoil-EGF et de Ecoil-

VEGF par ces hydrogels dans différentes conditions. Ces travaux s'inscrivaient dans l'objectif de recherche suivant :

– Objectif n°2 –

Démontrer que la superhélice E/K est un outil très modulable qui permet la capture et la relâche contrôlées d'objets portant une étiquette Ecoil.

7.2.1 Leviers de contrôle additionnels

Dans le chapitre 5, nous avons caractérisé quatre paramètres permettant de réguler la capture et la relâche par les hydrogels. Parmi eux, deux sont des **paramètres macroscopiques** : (i) les quantités relatives de Ecoil et Kcoil et (ii) la taille des macropores. Les deux autres sont des **paramètres microscopiques** qui **mettent directement en jeu le comportement des superhélices E/K** : (iii) la valence des facteurs de croissance (nombre d'étiquettes Ecoil) et (iv) l'affinité de la superhélice (K_D).

En particulier, nous avons comparé deux facteurs de croissance de valences différentes, Ecoil-EGF (une étiquette Ecoil) et Ecoil-VEGF (deux étiquettes Ecoil). Cette comparaison est cependant biaisée par le fait que EGF et VEGF sont des protéines différentes. Nous ne pouvons donc pas affirmer que les différences observées sont uniquement causées par le changement de valence. Nous avons donc souhaité étudier la capture et la relâche d'une unique protéine sur laquelle nous pouvions faire varier le nombre d'étiquettes Ecoil. Ainsi, dans les travaux de Baniahmad *et al.* [352], nous avons conçu des anticorps monoclonaux portant des étiquettes Ecoil (i) sur leur chaînes lourdes ("heavy chain", HC), (ii) sur leur chaînes légères ("light chain", LC) ou (iii) sur leurs chaînes lourdes et leurs chaînes légères (figure 7.2). Nous avons ensuite reproduit les expériences du chapitre 5 : capture et relâche par des hydrogels macroporeux de dextrane fonctionnalisés avec Kcoil ($10X \rightarrow 1\,000X$).

De façon intéressante, nous n'avons pas observé de différence significative entre les anticorps portant deux (HC5-LC, HC-LC5) ou quatre (HC5-LC5) étiquettes Ecoil – cf. nomenclature définie figure 7.2 –, sauf quand les hydrogels sont fonctionnalisés avec la quantité de Kcoil maximale (condition 1 000X, cf. chapitre 5). Dans ce cas, la relâche de HC5-LC5 était légèrement plus faible que celles de HC5-LC et HC-LC5 [352]. De plus, pour les trois anticorps (deux ou quatre étiquettes Ecoil) et quelles que soient les conditions d'incubation, nous avons observé des niveaux de capture plus faibles et une relâche plus importante que pour Ecoil-EGF (une étiquette Ecoil) et Ecoil-VEGF (deux étiquettes Ecoil) (chapitre 4 et référence [352]).

Pour tenter d'expliquer ces résultats *a priori* inattendus, nous avons mesuré les constantes cinétiques de dissociation apparentes $k_{off,app}$ entre les anticorps étiquetés avec Ecoil et une

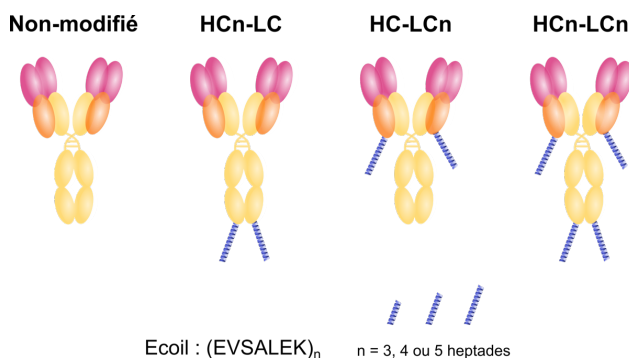


FIGURE 7.2 Nomenclature des anticorps monoclonaux étiquetés avec le peptide Ecoil. Les étiquettes Ecoil sont situées à l'extrémité *C*-terminale des chaînes lourdes (HCn-LC), des chaînes légères (HC-LCn) ou des chaînes lourdes et légères (HCn-LCn). Les peptides Ecoil sont composés de $n = 3, 4$ ou 5 heptades. Figure adaptée de la référence [352].

surface Kcoil. Nous avons comparé ces données aux valeurs mesurées pour les interactions Ecoil-EGF/Kcoil et Ecoil-VEGF/Kcoil (tableau 7.1). Nous avons ainsi obtenu des $k_{off,app}$ similaires pour Ecoil-EGF (une étiquette Ecoil) et HC5-LC5 (quatre étiquettes Ecoil). Dans le cas de HC5-LC et de HC-LC5 (deux étiquettes Ecoil), $k_{off,app}$ est environ deux fois plus élevé, ce qui traduit une dissociation plus rapide. Enfin, dans le cas de l'interaction Ecoil-VEGF/Kcoil, la dissociation est trop faible pour être mesurée, ce qui indique une interaction extrêmement stable [350].

TABLEAU 7.1 Constantes cinétiques de dissociation apparentes $k_{off,app}$ pour l'interaction entre des protéines portant une ou plusieurs étiquettes Ecoil et une surface Kcoil. Tous les peptides Ecoil sont composés de 5 heptades. Les constantes cinétiques de dissociation sont mesurées à l'aide d'un biocapteur résonance plasmon de surface selon les protocoles décrits dans les références correspondantes.

	Ecoil-EGF/ Kcoil	Ecoil-VEGF/ Kcoil	HC5-LC/ Kcoil	HC-LC5/ Kcoil	HC5-LC5/ Kcoil
$k_{off,app}$ (s ⁻¹)	$3,3 \times 10^{-5}$ [349]	aucune dissociation mesurée [350]	$6,85 \times 10^{-5}$ [352]	$7,35 \times 10^{-5}$ [352]	$3,21 \times 10^{-5}$ [352]

Nous proposons deux hypothèses compatibles avec ces observations :

1. les anticorps ne peuvent être **impliqués que dans une superhélice E/K à la fois**. Si la superhélice se dissocie, la probabilité que l'anticorps se rattache au même Kcoil (par n'importe quel Ecoil) est semblable à celle qui serait mesurée si l'anticorps ne portait qu'un Ecoil. Cette hypothèse est plausible en raison de la masse moléculaire et du diamètre hydrodynamique élevés de l'anticorps (150-170 kDa, $D_H \sim 10$ nm [352]) :

- (i) les étiquettes Ecoil sont éloignées les unes des autres et (ii) la rigidité de l'anticorps peut empêcher l'interaction simultanée des étiquettes Ecoil avec la surface ;
2. les **superhélices** sont **mal formées**. Les anticorps ont été conçus avec un espaceur entre les chaînes lourdes et légères et l'étiquette Ecoil, dans le but de préserver la bioactivité des deux parties (anticorps et Ecoil). Cependant, cette précaution pourrait être insuffisante, notamment en raison de la grande différence de taille entre l'anticorps et l'étiquette Ecoil.

Une combinaison de ces deux facteurs est également envisageable.

Ces résultats nous permettent donc d'enrichir les conclusions de l'article présenté dans le chapitre 5 [410] : **la valence de la protéine étiquetée Ecoil n'est un paramètre déterminant que si l'augmentation de la valence d'une protéine entraîne l'augmentation de son affinité pour le substrat**. Pour compléter ces résultats et valider les hypothèses émises ci-dessus, nous pourrions envisager de répéter les expériences du chapitre 5 avec une variante de Ecoil-EGF portant deux étiquettes Ecoil au lieu d'une, et une variante de Ecoil-VEGF portant une étiquette Ecoil au lieu de deux.

Le deuxième paramètre microscopique permettant de réguler la capture et la relâche par les hydrogels est l'affinité de la superhélice, c'est-à-dire **la stabilité d'une superhélice E/K** qui conjugue une protéine à la surface des macropores. Dans le chapitre 5, nous avons fait varier cette affinité en introduisant une, deux ou trois substitutions leucine $\rightarrow$ alanine dans la séquence du peptide Kcoil (tableau 5.3). Dans les travaux de Baniahmad *et al.*, nous proposons une autre approche, qui est de faire varier le nombre d'heptades qui composent le peptide Ecoil (3, 4 ou 5 heptades, cf. figure 7.2). Diminuer le nombre d'heptades impliquées dans la formation de la superhélice diminue la stabilité de celle-ci, ce qui se traduit par une diminution des quantités capturées et une relâche plus importante [352]. Dans le cas de HC3-LC, HC-LC3 et HC3-LC3, nous n'observons plus aucune influence de la présence de Ecoil sur la capture et la relâche. Ces résultats sont confirmés par des essais sur biocapteur résonance plasmon de surface, qui montrent que l'affinité de ces anticorps pour une surface fonctionnalisée avec Kcoil est trop faible pour détecter l'interaction [352]. Ces résultats confirment qu'une diminution de l'affinité de la superhélice, qu'elle soit obtenue en introduisant des substitutions dans la séquence des peptides ou en diminuant le nombre d'heptades, entraîne une diminution de la capture et une augmentation de la relâche par les hydrogels.

7.2.2 Biofonctionnalisation d'hydrogels de dextrane avec des NPs portant des étiquettes Ecoil

L'un des sous-objectifs de ce travail de recherche était d'utiliser les gels de dextrane macroporeux pour la **capture et la relâche de NPs portant des étiquettes Ecoil**. Pour cela, nous avons biofonctionnalisé des AuPEG NPs de 18 ± 2 nm de diamètre avec la protéine Cys-Ecoil-EGF (CEE), selon le protocole décrit dans l'annexe D. En utilisant la méthode de quantification développée dans le chapitre 4, nous avons pu estimer un degré de biofonctionnalisation moyen de 16 ± 2 CEE/NP.

Nous avons ensuite incubé les AuPEG NPs avec les hydrogels, à une concentration équivalente à 10 nM de CEE. Cette concentration est cinq fois plus basse que la concentration en facteurs de croissance utilisée dans le chapitre 5. Nous avons fait ce choix pour limiter la taille des échantillons et la quantité de réactifs consommés, sachant que l'étape de quantification de CEE en surface des NPs consomme un grand volume d'échantillon. Le reste des paramètres expérimentaux est identique aux conditions décrites dans le chapitre 5. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 7.3, sous forme de photographies. Nous avons comparé des gels de dextrane non fonctionnalisés ("(-)") ou fonctionnalisés avec Kcoil ("Kcoil"), incubés avec des AuPEG NPs non fonctionnalisés ("(-)") ou fonctionnalisés avec CEE ("CEE").

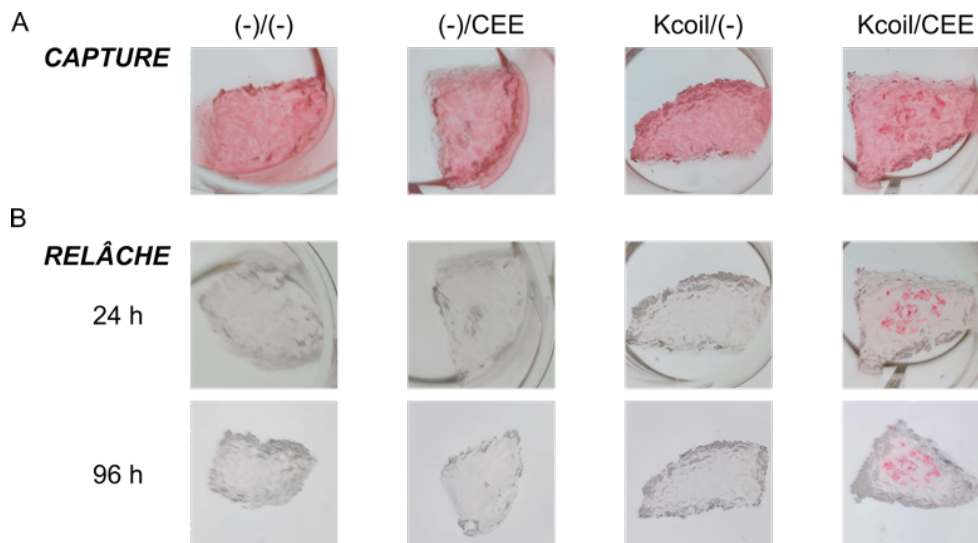


FIGURE 7.3 Fonctionnaliser des AuPEG NPs avec CEE permet la capture et la rétention des NPs dans des gels de dextrane macroporeux fonctionnalisés avec Kcoil. Photographies d'hydrogels, après retrait de la solution ou du tampon d'incubation, prises (A) immédiatement après l'incubation avec les NPs, (B) 24 h (trois rinçages) et 96 h (six rinçages) après le début de la relâche. Images représentatives de triplicatas d'échantillons.

Dès l'étape de capture, nous observons dans les gels Kcoil/CEE la **formation d'agrégats de NPs à l'intérieur de l'hydrogel** (figure 7.3A). Ces agrégats ne sont présents dans aucune des trois conditions contrôles. Des mesures d'absorbance à 524 nm, effectuées sur la solution entourant les hydrogels, n'ont montré aucune différence entre les quatre conditions. Nous n'avons donc pas pu établir des coefficients de partition comme ceux calculés dans le chapitre 5.

24 h et trois rinçages après le début de la phase de relâche, les hydrogels contrôles ont retrouvé leur transparence initiale, ce qui indique le bon rinçage des NPs qui sont contenues dans les macropores sans interagir avec l'hydrogel (figure 7.3B). Les hydrogels Kcoil/CEE, quant à eux, conservent une couleur rosée et présentent toujours des agrégats d'AuNPs. La couleur rosée reste présente, bien qu'estompée, après 96h et six rinçages. Il est important de noter que ces observations sont **qualitatives**. En effet, si la différence de couleur entre les hydrogels est visible à l'œil nu, elle n'est pas mesurable à l'aide d'un lecteur d'absorbance, car la couleur est localisée **dans les macropores** et non répartie de façon homogène dans toute l'épaisseur de l'hydrogel.

Nos **résultats préliminaires** semblent donc indiquer que la fonctionnalisation des macropores de l'hydrogel avec des NPs étiquetées avec Ecoil (via la présence de CEE) est possible. Cependant, plusieurs aspects expérimentaux nécessiteront des recherches complémentaires :

- nous avons choisi d'utiliser des AuPEG NPs en raison de leurs propriétés optiques, pour permettre leur quantification dans les hydrogels. Or, nous n'avons pas réussi à obtenir des mesures d'absorbance exploitables ;
- nous observons la présence d'agrégats de NPs dans les gels Kcoil/CEE. Ces agrégats sont répartis de façon aléatoire et non homogène dans les macropores, ce qui est inattendu compte tenu du fait que la distribution de Kcoil dans les hydrogels est *a priori* homogène (cf. section 7.3). Si la présence d'agrégats peut être exploitée pour des applications en génie tissulaire, notamment pour la **présentation en grappes** de facteurs de croissance – tels que CEE – en surface des NPs, ce phénomène reste incontrôlé et inexpliqué ;
- les performances de la superhélice E/K en termes d'amélioration de la capture des AuPEG NPs restent très inférieures à celles obtenues pour la capture et la relâche de facteurs de croissance (cf. chapitre 5).

7.3 Culture d'organoïdes vasculaires dans des hydrogels de dextrane macroporeux biofonctionnalisés grâce à la superhélice E/K

Dans le chapitre 6, nous avons fonctionnalisé des hydrogels de dextrane macroporeux avec le peptide Kcoil et le peptide adhésif RGD. Nous avons ensuite fonctionnalisé les hydrogels avec Ecoil-EGF et Ecoil-VEGF, pour y cultiver des organoïdes vasculaires composés d'HUVEC et d'AoSMC. Ces travaux s'inscrivaient dans l'objectif de recherche suivant :

– Objectif n°3 –

Observer l'adhésion cellulaire et la formation de structures vasculaires dans des hydrogels de dextrane macroporeux multifonctionnalisés ensemencés avec des organoïdes vasculaires.

7.3.1 Caractériser la croissance cellulaire dans des échafaudages de culture en 3D

La principale lacune des travaux présentés dans le chapitre 6 est l'absence de quantification des cellules et de la croissance cellulaire dans les hydrogels. Nous avons envisagé plusieurs stratégies, mais aucune n'a été applicable, en raison de limites que nous détaillons ci-dessous.

Utilisation du réactif Alamar Blue pour quantifier l'activité métabolique

Dans le chapitre 6, nous avons utilisé l'Alamar Blue pour comparer, 24 h après l'ensemencement, l'activité métabolique dans les hydrogels. Initialement, nous souhaitions également mesurer cette activité tout au long de la culture, afin d'évaluer de façon quantitative la colonisation de l'hydrogel et la croissance des cellules. Cependant, nous avons dû abandonner cette approche, qui était biaisée pour plusieurs raisons.

Le principal biais était causé par l'impossibilité d'éliminer entièrement l'Alamar Blue à la fin d'une mesure d'activité métabolique. En effet, le réactif était présent en trois endroits : (i) dans la solution entourant les hydrogels (puits d'une plaque de culture), (ii) dans les macropores et (iii) dans la matrice de dextrane. Pour éliminer le réactif contenu dans l'hydrogel (macropores et matrice), il aurait été nécessaire d'effectuer des rinçages longs et nombreux, ce qui interférerait avec le bon déroulement des expériences (i) en modifiant les apports en milieu de culture, (ii) en augmentant les contraintes de cisaillement sur les cellules, ce qui peut gêner leur adhésion, et (iii) en perturbant les équilibres d'affinité dans les hydrogels contenant Ecoil-EGF et/ou Ecoil-VEGF. Ainsi, le réactif piégé dans les hydrogels continuait de réagir une fois la mesure terminée. Il était donc **impossible de mesurer plusieurs fois l'activité métabolique dans un même hydrogel sans introduire un biais de mesure**. Nous

avons envisagé de contourner cette limite en mesurant l'activité de chaque hydrogel une seule fois, mais à différents moments. Cette approche ne permet cependant pas de normaliser les mesures par rapport au signal initial, et introduit donc également un biais.

De plus, le réseau de macropores de l'hydrogel étant ouvert, les cellulesensemencées pouvaient migrer hors de l'hydrogel et **coloniser le fond des puits des plaques de culture** (2D) lors de la période prolongée de culture. L'activité métabolique des cellules au fond des puits s'additionnait à celle des cellules dans les hydrogels, ce qui introduisait un nouveau biais de mesure. Il était alors possible d'obtenir un signal d'Alamar Blue élevé pour des hydrogels ne contenant pas de RGD, alors même que les cellules ne pouvaient ni adhérer ni survivre dans ces hydrogels.

En raison de ces biais, nous avons fait le choix de mesurer l'activité métabolique seulement à l'état initial (24 h après l'ensemencement) en prenant les précautions expérimentales suivantes :

1. utiliser un **support de culture dédié pour l'ensemencement** (boîte de Pétri). Pendant l'ensemencement, les hydrogels n'étaient pas immergés dans du milieu de culture. Ceci permettait de confiner les cellules dans les hydrogels pendant les trois heures de la période d'adhésion. Les hydrogels étaient ensuite transférés dans une plaque à puits, rincés pour éliminer les cellules susceptibles d'être tombées au fond des gels, puis incubés dans du milieu de culture ;
2. transférer les hydrogels dans une **nouvelle plaque à puits immédiatement avant le test Alamar Blue**, pour s'assurer de prendre en compte seulement les cellules physiquement présentes dans l'hydrogel lors de la mesure d'activité métabolique. Il est important de noter que la manipulation excessive des gels augmente les risques de dommages et de contamination : de tels transferts doivent donc être effectués avec parcimonie.

Cette mesure permettait de rendre compte de l'adhésion initiale des cellules et organoïdes dans les hydrogels, mais ne permettait pas de quantifier la colonisation ou la prolifération sur le long terme.

Utilisation de techniques d'imagerie pour quantifier la prolifération cellulaire

Dans le chapitre 6, nous avons observé les organoïdes à l'aide d'un microscope confocal. Nous avons envisagé, comme dans le chapitre 5, d'effectuer une quantification par analyse d'images représentatives des échantillons, mais appliquer cette approche pour des échantillons en 3D posait de nombreux défis expérimentaux et introduisait des biais de mesure.

Contrairement aux cellules en suspension qui peuvent êtreensemencées de façon relativement

homogène dans l’hydrogel, les organoïdes sont des amas de cellules **peu nombreux et dispersés dans l’hydrogel** (50 organoïdes par hydrogel lors de l’ensemencement). La microscopie confocale ne permet pas la capture d’images dans toute la profondeur des hydrogels : sa profondeur de champ maximale est de quelques centaines de micromètres [530], tandis que les hydrogels ont une épaisseur de plusieurs millimètres. Dès lors, nous ne pouvions observer qu’une partie des hydrogels, sans garantie que cette partie contienne suffisamment d’organoïdes pour extraire des images représentatives. De plus, la durée d’acquisition (~ 15 minutes par image) était trop longue pour (i) permettre de capturer suffisamment d’images pour une analyse quantitative en un temps raisonnable et (ii) permettre la comparaison non biaisée entre des conditions capturées à plusieurs heures d’intervalle.

Autres approches de quantification ?

Des solutions technologiques, notamment basées sur la microscopie, la spectroscopie ou l’utilisation de biocapteurs [531, 532], permettent le suivi quantitatif de cellules cultivées en 3D. Ainsi, plusieurs groupes de recherche ont proposé des méthodes expérimentales exploitant (i) la spectroscopie d’impédance électrochimique [533] ou (ii) la spectroscopie Raman [534, 535]. Ces méthodes étaient cependant inapplicables dans notre cas, car nous ne disposions ni de l’équipement ni de l’expertise technique nécessaires. Ces méthodes sont encore peu appliquées à grande échelle : la majorité des études recensées dans le cadre de la revue de littérature du chapitre 2 n’incluent pas ou peu de quantification. Parmi les études qui rapportent un suivi (semi-)quantitatif, la majorité sont basées sur de l’analyse d’images obtenues par microscopie, approche dont nous avons déjà mentionné les limites et les biais expérimentaux pour notre cas d’application.

Suivre des cellules cultivées en 3D est une **tâche non triviale**, pour laquelle il n’existe pas de solution facilement adaptable depuis les modèles de culture en 2D. Nous devons néanmoins poursuivre nos efforts en ce sens. La mise en place d’une stratégie quantitative ou semi-quantitative de suivi de cultures dans des hydrogels de dextrane macroporeux fait partie des objectifs des futurs travaux de notre groupe de recherche.

7.3.2 Applications et pistes d’amélioration

Les travaux présentés dans le chapitre 6 sont une preuve de concept : ils établissent la possibilité d’utiliser des hydrogels macroporeux à base de dextrane, biofonctionnalisés grâce à la superhélice E/K, comme support pour la culture de cellules en 3D. Dans cette section, nous présentons plusieurs pistes qui pourront être explorées dans le futur, pour améliorer cette plateforme et élargir son champ d’application.

Fabrication des hydrogels

Les hydrogels de dextrane macroporeux que nous utilisons dans les chapitres 5 et 6 ont été produits par modelage sacrificiel à partir d'échafaudages macroporeux de PLA, eux-mêmes produits à partir de mélanges polymériques co-continus de PLA et de PS (cf. sections 5.6.1 et 6.6.2). Cette approche nous a permis d'obtenir des hydrogels de dextrane présentant un réseau de macropores homogène et continu. La taille des macropores des échafaudages de PLA et des hydrogels de dextrane était alors directement corrélée au temps de recuit des mélanges co-continus.

Cette stratégie présente cependant certains inconvénients :

- les échafaudages homogènes ne sont pas toujours adaptés : certains tissus requièrent un support de croissance anisotrope (cf. section 2.1). Pouvoir contrôler l'**orientation des macropores** ou introduire de l'**anisotropie** serait un avantage ;
- notre protocole expérimental nécessite l'utilisation de deux solvants organiques, le cyclohexane et le chloroforme, pour les extractions successives du PS et du PLA. Utiliser des **solutions aqueuses** ou des solvants plus doux serait préférable.

Des travaux en cours de notre groupe de recherche, pas encore publiés, se concentrent sur ces deux aspects.

Fonctionnalisation et biofonctionnalisation

Dans les travaux de Baniahmad *et al.*, nous nous sommes intéressés à la répartition de Kcoil et des superhélices E/K dans les hydrogels de dextrane macroporeux [352]. Pour cela, nous avons utilisé des peptides Ecoil et Kcoil portant des marqueurs fluorescents : la 5-carboxytetraméthylrhodamine (TAMRA) dans le cas de Ecoil (Ecoil-TAMRA) et la 5-carboxyfluorescéine (FAM) dans le cas de Kcoil (Kcoil-FAM). Les méthodes de synthèse de ces peptides sont présentées dans l'annexe D.

Dans un premier temps, nous avons fonctionnalisé les hydrogels de dextrane avec le peptide Kcoil-FAM comme décrit dans les sections 5.6.3 et 6.6.2 et dans l'annexe D. Nous avons ensuite observé ces hydrogels en microscopie confocale (figure 7.4A, "GPE(+)/Kcoil-FAM"). Ces observations nous ont permis de confirmer la répartition homogène du Kcoil-FAM dans les hydrogels, et de vérifier que le peptide était greffé de manière covalente à la matrice de dextrane. En effet, en effectuant la même réaction sur des gels de dextrane n'ayant pas été fonctionnalisés avec du GPE ("GPE(-)/Kcoil-FAM"), et ne présentant donc pas de groupes fonctionnels alcyne, aucun signal fluorescent n'est observé dans les hydrogels – hormis quelques points dispersés pouvant correspondre à des agrégats de Kcoil-FAM piégés dans la matrice

de dextrane.

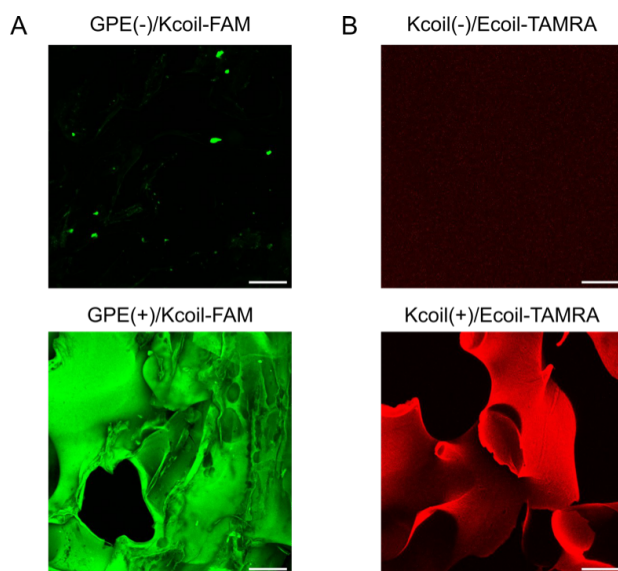


FIGURE 7.4 Images de microscopie confocale montrant la répartition de (A) Kcoil-FAM, en vert et (B) Ecoil-TAMRA, en rouge, dans des hydrogels de dextrane macroporeux. Les images mettent en évidence l'omniprésence des peptides Kcoil (greffé) et Ecoil (capturé) à la surface des macropores. Projections de sections de 500 μm d'épaisseur (100 images, pas : 5 μm), barres d'échelle : 200 μm . Adapté de [352].

Nous avons ensuite utilisé des hydrogels de dextrane fonctionnalisés avec le peptide Kcoil, que nous avons incubés avec Ecoil-TAMRA pendant 72 h puis rincés, comme décrit dans l'annexe D. Nous avons ensuite observé ces hydrogels en microscopie confocale (figure 7.4B, "Kcoil(+)/Ecoil-TAMRA"). Nous avons ainsi pu confirmer la répartition homogène des superhélices E/K dans l'hydrogel. En effet, aucun signal fluorescent n'est observé dans des hydrogels de dextrane non fonctionnalisés incubés avec Ecoil-TAMRA ("Kcoil(-)/Ecoil-TAMRA"), ce qui confirme que Ecoil-TAMRA est retenu dans les hydrogels par des interactions E/K.

L'introduction de motifs de biofonctionnalisation, tels que des **gradients de densité des facteurs de croissance**, est une piste intéressante pour des applications en génie tissulaire. Elle permet la polarisation des échafaudages, ce qui est représentatif de nombreux phénomènes se déroulant dans le microenvironnement cellulaire natif. Introduire des motifs de fonctionnalisation peut par exemple se faire à l'aide de techniques de masquage. Si nous souhaitons appliquer une telle approche à la fonctionnalisation de nos hydrogels de dextrane, nous pourrions (i) changer la chimie de fonctionnalisation (greffage du RGD et du Kcoil) pour la remplacer par une chimie photo-activée, comme certaines réactions thiol-ène (cf. section 2.4.2) ou (ii) utiliser des photo-cages qui protègent certains groupes fonctionnels et empêchent leur

réaction tant qu'ils ne sont pas exposés à un rayonnement lumineux.

Choix des types et lignées cellulaires

Dans le chapitre 6, nous avons utilisé les hydrogels de dextrane macroporeux pour la culture de cellules et d'organoïdes vasculaires. Ce choix s'inscrivait dans le cadre du cahier des charges présenté dans la section 1.2. En effet, la présence d'une vasculature fonctionnelle permettant l'apport d'oxygène et de nutriments aux tissus, ainsi que l'élimination du CO_2 et des déchets métaboliques, sont des pré-requis pour le développement de tissus dont l'épaisseur est supérieure à $\sim 200\mu\text{m}$ [21, 22].

Pour élargir les applications potentielles de notre plateforme, nous pouvons envisager la co-culture des cellules vasculaires avec d'autres types cellulaires :

- soit par la co-culture d'organoïdes vasculaires avec d'autres sphéroïdes ;
- soit en remplaçant nos organoïdes vasculaires par des modèles plus complexes, comme des organoïdes pré-vascularisés, obtenus par le pré-assemblage de cellules du tissu d'intérêt et de cellules vasculaires.

Ainsi, de nombreux tissus et organes, comme les poumons, le foie, le cœur, le cerveau ou le pancréas, peuvent être modélisés par des sphéroïdes ou des organoïdes [13, 195, 393], ce qui ouvre la voie à l'utilisation de notre plateforme pour de nombreuses applications en génie tissulaire.

Quelle que soit l'option choisie, les travaux de recherche devront se concentrer sur l'adaptation de la plateforme au nouvel environnement cellulaire à imiter :

- en adaptant, si nécessaire, les propriétés physiques – notamment la taille des macropores – et mécaniques des hydrogels ;
- en incorporant, grâce à la superhélice E/K, la combinaison de facteurs de croissance appropriée.

CHAPITRE 8 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Dans ce travail, nous présentons l'utilisation d'hydrogels de dextrane macroporeux biofonctionnalisés grâce à un système d'affinité, la superhélice E/K, pour des applications en génie tissulaire. L'objectif général de ce travail de recherche, tel qu'établi dans la section 1.3, était de **concevoir une plateforme modulable pour la culture cellulaire en 3D, conforme au cahier des charges** établi dans la section 1.2. En accord avec cet objectif général, nos hydrogels biofonctionnalisés respectent les principes suivants :

- la **conception selon un processus ascendant**. Avant biofonctionnalisation, les hydrogels de dextrane sont inertes et ne permettent pas l'adhésion des cellules. Notre approche de biofonctionnalisation garantit donc une bonne définition des hydrogels ainsi que l'absence de propriétés non désirées ou non contrôlées ;
- la **fonctionnalisation polyvalente**, grâce à l'utilisation de la superhélice E/K qui permet d'incorporer des objets étiquetés avec le peptide Ecoil ;
- l'incorporation de **cellules vasculaires**, par l'utilisation d'organoïdes vasculaires – composés de cellules endothéliales (HUVECs) et de cellules musculaires lisses vasculaires (AoSMCs) et capables de bourgeonner dans les hydrogels.

Nous avons divisé ce travail de recherche en trois objectifs spécifiques :

1. le **développement d'une méthode permettant la quantification de protéines en surface de NPs**. Nous proposons d'utiliser cette méthode pour caractériser des NPs avant de les incorporer dans des hydrogels de dextrane par des interactions E/K. **Cet objectif de recherche a été rempli**. Dans le chapitre 4, nous présentons une méthode de quantification reposant sur les principes suivants :
 - (i) l'**hydrolyse des liens peptidiques** et la **dégradation des NPs**, qui se déroule simultanément à haute température et en conditions acides. Cette étape remplit le double objectif de former des amines libres dans l'échantillon et de déstabiliser la solution colloïdale ;
 - (ii) l'**incubation avec du TNBS**, qui réagit avec les amines libres pour former un composé coloré ;
 - (iii) la **mesure de l'absorbance de la solution**, proportionnelle à la concentration d'amines libres. Cette mesure est possible car les NPs ont été dégradées et ne contribuent pas à l'absorbance de l'échantillon ;
2. l'**utilisation de la superhélice E/K pour la capture et la relâche contrôlée d'objets étiquetés avec Ecoil par des hydrogels de dextrane**. Nous souhaitons ainsi rendre possible

la multifonctionnalisation des hydrogels avec des facteurs de croissance, des NPs ou n'importe quel objet portant une étiquette Ecoil. **Cet objectif de recherche a été en grande partie rempli.** Dans le chapitre 5, nous caractérisons la capture et la relâche de Ecoil-EGF et de Ecoil-VEGF par les hydrogels et introduisons plusieurs paramètres de contrôle. Dans le chapitre 7, nous présentons des résultats complémentaires, notamment des travaux préliminaires pour la capture et la relâche de AuPEG NPs. Ces résultats devront être consolidés et validés ;

3. **l'utilisation des hydrogels de dextrane macroporeux biofonctionnalisés comme support de culture pour des organoïdes vasculaires.** Nous souhaitons notamment rendre possible la culture de ces cellules dans du milieu de culture appauvri. **Cet objectif de recherche a été rempli.** Dans le chapitre 6, nous fonctionnalisons des hydrogels de dextrane avec les peptides RGD et Kcoil, puis nous y incorporons Ecoil-EGF et/ou Ecoil-VEGF. Nous montrons que les hydrogels ainsi fonctionnalisés permettent le bourgeonnement d'organoïdes vasculaires dans du milieu appauvri, ce qui n'est pas le cas d'hydrogels seulement fonctionnalisés avec le peptide RGD.

Certains aspects initialement envisagés ont présenté d'importants défis et devront faire l'objet de travaux complémentaires :

- **l'incorporation de NPs dans les hydrogels** pour la relâche contrôlée de principe actifs ou la présentation en grappe de facteurs de croissance. Nos résultats préliminaires montrent que des hydrogels fonctionnalisés avec Kcoil peuvent capturer et retenir des AuPEG NPs biofonctionnalisées avec Ecoil-EGF. Cependant, plusieurs difficultés expérimentales restent à résoudre avant de pouvoir intégrer ces NPs dans les hydrogels pour des applications en génie tissulaire ;
- **la caractérisation de la prolifération cellulaire dans les hydrogels.** Nous n'avons pas été en mesure d'établir un suivi quantitatif de la colonisation des hydrogels par les cellules. Ce défi est cependant intrinsèque à l'utilisation d'échafaudages comme supports de culture en 3D et n'a pas de solution triviale.

Ce travail de recherche s'inscrit dans la perspective plus large de la conception de plateformes de culture cellulaire en 3D pour des applications en génie tissulaire. Sur la base des travaux effectués et des résultats obtenus dans le cadre de ce projet, nous proposons les pistes d'exploration suivantes pour les travaux futurs de notre groupe de recherche :

- **améliorer et/ou diversifier les propriétés adhésives** de la plateforme en incorporant d'autres peptides d'adhésion, en complément ou en remplacement du peptide RGD selon l'effet biologique souhaité. Nous proposons par exemple de combiner RGD et sa séquence synergique PHSRN pour faciliter l'adhésion des cellules via l'activation des

intégrines ;

- **continuer d’enrichir notre librairie de facteurs de croissance étiquetés avec Ecoil**, pour rendre possible l’utilisation de notre plateforme pour de nouveaux types de tissus. Les facteurs de croissance actuellement disponibles sont Ecoil-EGF, Ecoil-VEGF et Ecoil-bFGF. Parmi les potentiels candidats, nous pouvons envisager les membres des familles TGF- β ou BMP, qui sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires (cf. section 2.1.3) ;
- **poursuivre les efforts pour l’incorporation de NPs dans les hydrogels**. En particulier, utiliser des NPs de PLA-*b*-PEG permettrait l’encapsulation et la libération progressive dans l’hydrogel de principes actifs hydrophobes. Nous proposons par exemple l’utilisation d’acide rétinoïque, qui est une molécule morphogène impliquée dans les mécanismes du développement embryonnaire. L’utilisation d’une telle molécule rendrait possible l’utilisation de la plateforme pour la culture et la différenciation de **cellules souches** ;
- **adapter et valider la plateforme** dans la perspective d’applications *in vivo*. Notamment, des tests d’immunogénicité devront être menés. Nous devons également repenser le flux expérimental dans le but de se rapprocher des standards de qualité pour la conception de produits biopharmaceutiques, afin de maximiser le potentiel translationnel de notre plateforme.

RÉFÉRENCES

- [1] Organisation Mondiale de la Santé, “Les dix principales causes de mortalité,” <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>, 2020, [En ligne ; consulté le 10 juillet 2023].
- [2] C. P. Sharma, T. Chandy, V. Thomas, and F. G. Thankam, Eds., *Tissue Engineering : Current Status and Challenges*. Academic Press, 2022.
- [3] C. A. Vacanti, “The history of tissue engineering,” *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2006.
- [4] R. Langer and J. P. Vacanti, “Tissue engineering,” *Science*, vol. 260, no. 5110, pp. 920–926, 1993.
- [5] Canadian Institute for Health Information, “Summary statistics on organ transplants, wait-lists and donors for the year 2022,” <https://www.cihi.ca/en/summary-statistics-on-organ-transplants-wait-lists-and-donors>, 2023, [En ligne ; consulté le 10 juillet 2023].
- [6] Organ Procurement and Transplantation Network, “Current U.S. waiting list, national data,” <https://optn.transplant.hrsa.gov/data/view-data-reports/national-data/>, 2023, [En ligne ; consulté le 10 juillet 2023].
- [7] D. J. Mooney and H. Vandenburgh, “Cell delivery mechanisms for tissue repair,” *Cell Stem Cell*, vol. 2, no. 3, pp. 205–213, 2008.
- [8] H. Yuan, C. Chen, Y. Liu, T. Lu, and Z. Wu, “Strategies in cell-free tissue-engineered vascular grafts,” *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 108, no. 3, pp. 426–445, 2020.
- [9] C. Jensen and Y. Teng, “Is it time to start transitioning from 2D to 3D cell culture?” *Frontiers in Molecular Biosciences*, vol. 7, p. 33, 2020.
- [10] M. Ravi, V. Paramesh, S. Kaviya, E. Anuradha, and F. P. Solomon, “3D cell culture systems : advantages and applications,” *Journal of Cellular Physiology*, vol. 230, no. 1, pp. 16–26, 2015.
- [11] A. G. Shard and P. E. Tomlins, “Biocompatibility and the efficacy of medical implants,” *Regenerative Medicine*, vol. 1, no. 6, pp. 789–800, 2006.
- [12] M. Kasravi, A. Ahmadi, A. Babajani, R. Mazloomnejad, M. R. Hatamnejad, S. Shariat-zadeh, S. Bahrami, and H. Niknejad, “Immunogenicity of decellularized extracellular matrix scaffolds : a bottleneck in tissue engineering and regenerative medicine,” *Bio-materials Research*, vol. 27, no. 1, pp. 1–24, 2023.

- [13] M. T. Kozlowski, C. J. Crook, and H. T. Ku, "Towards organoid culture without Matrigel," *Communications Biology*, vol. 4, no. 1, p. 1387, 2021.
- [14] C. Frantz, K. M. Stewart, and V. M. Weaver, "The extracellular matrix at a glance," *Journal of Cell Science*, vol. 123, no. 24, pp. 4195–4200, 2010.
- [15] Y. Ma, X. Wang, T. Su, F. Lu, Q. Chang, and J. Gao, "Recent advances in macroporous hydrogels for cell behavior and tissue engineering," *Gels*, vol. 8, no. 10, p. 606, 2022.
- [16] R. J. Pelham Jr and Y.-l. Wang, "Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, no. 25, pp. 13 661–13 665, 1997.
- [17] S. Nemir and J. L. West, "Synthetic materials in the study of cell response to substrate rigidity," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 38, no. 1, pp. 2–20, 2010.
- [18] W.-C. Yeh, P.-C. Li, Y.-M. Jeng, H.-C. Hsu, P.-L. Kuo, M.-L. Li, P.-M. Yang, and P. H. Lee, "Elastic modulus measurements of human liver and correlation with pathology," *Ultrasound in Medicine & Biology*, vol. 28, no. 4, pp. 467–474, 2002.
- [19] J. Lou and D. J. Mooney, "Chemical strategies to engineer hydrogels for cell culture," *Nature Reviews Chemistry*, vol. 6, no. 10, pp. 726–744, 2022.
- [20] F. H. Silver, Y. P. Kato, M. Ohno, and A. J. Wasserman, "Analysis of mammalian connective tissue : relationship between hierarchical structures and mechanical properties." *Journal of Long-term Effects of Medical Implants*, vol. 2, no. 2-3, pp. 165–198, 1992.
- [21] E. C. Novosel, C. Kleinhans, and P. J. Kluger, "Vascularization is the key challenge in tissue engineering," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, no. 4-5, pp. 300–311, 2011.
- [22] R. Gianni-Barrera, N. Di Maggio, L. Melly, M. G. Burger, E. Mujagic, L. Gürke, D. J. Schaefer, and A. Banfi, "Therapeutic vascularization in regenerative medicine," *Stem Cells Translational Medicine*, vol. 9, no. 4, pp. 433–444, 2020.
- [23] E. A. Phelps and A. J. García, "Engineering more than a cell : vascularization strategies in tissue engineering," *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 21, no. 5, pp. 704–709, 2010.
- [24] E. Quinlan, A. López-Noriega, E. Thompson, H. M. Kelly, S. A. Cryan, and F. J. O'Brien, "Development of collagen-hydroxyapatite scaffolds incorporating PLGA and alginate microparticles for the controlled delivery of rhBMP-2 for bone tissue engineering," *Journal of Controlled Release*, vol. 198, pp. 71–79, 2015.

- [25] J. Barthes, H. Özçelik, M. Hindié, A. Ndreu-Halili, A. Hasan, and N. E. Vrana, “Cell microenvironment engineering and monitoring for tissue engineering and regenerative medicine : The recent advances,” *BioMed Research International*, vol. 2014, p. 921905, 2014.
- [26] E. Armingol, A. Officer, O. Harismendy, and N. E. Lewis, “Deciphering cell–cell interactions and communication from gene expression,” *Nature Reviews Genetics*, vol. 22, no. 2, pp. 71–88, 2021.
- [27] B. Belardi, S. Son, J. H. Felce, M. L. Dustin, and D. A. Fletcher, “Cell–cell interfaces as specialized compartments directing cell function,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 21, no. 12, pp. 750–764, 2020.
- [28] D. He and H. Li, “Biomaterials affect cell-cell interactions in vitro in tissue engineering,” *Journal of Materials Science & Technology*, vol. 63, pp. 62–72, 2021.
- [29] G. I. Bell, “Models for the specific adhesion of cells to cells : a theoretical framework for adhesion mediated by reversible bonds between cell surface molecules.” *Science*, vol. 200, no. 4342, pp. 618–627, 1978.
- [30] M. L. Dustin, L. M. Ferguson, P. Y. Chan, T. A. Springer, and D. E. Golan, “Visualization of CD2 interaction with LFA-3 and determination of the two-dimensional dissociation constant for adhesion receptors in a contact area.” *The Journal of Cell Biology*, vol. 132, no. 3, pp. 465–474, 1996.
- [31] R. M. Pielak, G. P. O’Donoghue, J. J. Lin, K. N. Alfieri, N. C. Fay, S. T. Low-Nam, and J. T. Groves, “Early T cell receptor signals globally modulate ligand : receptor affinities during antigen discrimination,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 114, no. 46, pp. 12 190–12 195, 2017.
- [32] M. A. Basson, “Signaling in cell differentiation and morphogenesis,” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 4, no. 6, p. a008151, 2012.
- [33] M. Qu, X. Jiang, X. Zhou, C. Wang, Q. Wu, L. Ren, J. Zhu, S. Zhu, P. Tebon, W. Sun *et al.*, “Stimuli-responsive delivery of growth factors for tissue engineering,” *Advanced Healthcare Materials*, vol. 9, no. 7, p. 1901714, 2020.
- [34] H. M. El-Husseiny, E. A. Mady, L. Hamabe, A. Abugomaa, K. Shimada, T. Yoshida, T. Tanaka, A. Yokoi, M. Elbadawy, and R. Tanaka, “Smart/stimuli-responsive hydrogels : Cutting-edge platforms for tissue engineering and other biomedical applications,” *Materials Today Bio*, vol. 13, p. 100186, 2022.
- [35] S. Municoy, M. I. Álvarez Echazú, P. E. Antezana, J. M. Galdopórpóra, C. Olivetti, A. M. Mebert, M. L. Foglia, M. V. Tuttolomondo, G. S. Alvarez, J. G. Hardy *et al.*,

- “Stimuli-responsive materials for tissue engineering and drug delivery,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 21, no. 13, 2020.
- [36] R. O. Hynes and A. Naba, “Overview of the matrisome—an inventory of extracellular matrix constituents and functions,” *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, vol. 4, no. 1, p. a004903, 2012.
 - [37] N. K. Karamanos, A. D. Theocharis, Z. Piperigkou, D. Manou, A. Passi, S. S. Skandalis, D. H. Vynios, V. Orian-Rousseau, S. Ricard-Blum, C. E. Schmelzer *et al.*, “A guide to the composition and functions of the extracellular matrix,” *The FEBS journal*, vol. 288, no. 24, pp. 6850–6912, 2021.
 - [38] A. D. Theocharis, S. S. Skandalis, C. Gialeli, and N. K. Karamanos, “Extracellular matrix structure,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 97, pp. 4–27, 2016.
 - [39] K. E. Kadler, C. Baldock, J. Bella, and R. P. Boot-Handford, “Collagens at a glance,” *Journal of Cell Science*, vol. 120, no. 12, pp. 1955–1958, 2007.
 - [40] C. Zeltz and D. Gullberg, “The integrin–collagen connection – a glue for tissue repair ?” *Journal of Cell Science*, vol. 129, no. 4, pp. 653–664, 2016.
 - [41] B. A. Kozel and R. P. Mecham, “Elastic fiber ultrastructure and assembly,” *Matrix Biology*, vol. 84, pp. 31–40, 2019.
 - [42] A. Le Page, A. Khalil, P. Vermette, E. H. Frost, A. Larbi, J. M. Witkowski, and T. Fulop, “The role of elastin-derived peptides in human physiology and diseases,” *Matrix Biology*, vol. 84, pp. 81–96, 2019.
 - [43] A. Wahart, T. Hocine, C. Albrecht, A. Henry, T. Sarazin, L. Martiny, H. El Btaouri, P. Maurice, A. Bennisroune, B. Romier-Crouzet *et al.*, “Role of elastin peptides and elastin receptor complex in metabolic and cardiovascular diseases,” *The FEBS journal*, vol. 286, no. 15, pp. 2980–2993, 2019.
 - [44] J. Z. Kechagia, J. Ivaska, and P. Roca-Cusachs, “Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 20, no. 8, pp. 457–473, 2019.
 - [45] S. Aota, M. Nomizu, and K. Yamada, “The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function.” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 40, pp. 24 756–24 761, 1994.
 - [46] M. Bachmann, S. Kukkurainen, V. P. Hytönen, and B. Wehrle-Haller, “Cell adhesion by integrins,” *Physiological Reviews*, vol. 99, no. 4, pp. 1655–1699, 2019.
 - [47] H. Kresse and E. Schönherr, “Proteoglycans of the extracellular matrix and growth control,” *Journal of Cellular Physiology*, vol. 189, no. 3, pp. 266–274, 2001.

- [48] R. Merline, R. M. Schaefer, and L. Schaefer, "The matricellular functions of small leucine-rich proteoglycans (SLRPs)," *Journal of Cell Communication and Signaling*, vol. 3, pp. 323–335, 2009.
- [49] L. Schaefer and R. M. Schaefer, "Proteoglycans : from structural compounds to signaling molecules," *Cell and Tissue Research*, vol. 339, no. 1, pp. 237–246, 2010.
- [50] E. Pimentel, Q. Emmy, and G. Pimentel, *Handbook of Growth Factors : Volume 1*. CRC Press, 1994.
- [51] Y. Ito, "Growth factors on biomaterial scaffolds," in *Biological Interactions on Materials Surfaces : Understanding and Controlling Protein, Cell, and Tissue Responses*. Springer, 2009, pp. 173–197.
- [52] M. Czech, K. Clairmont, K. Yagaloff, and S. Corvera, "Properties and regulation of receptors for growth factors," in *Peptide Growth Factors and Their Receptors I*. Springer, 2012, pp. 37–65.
- [53] D. A. Fisher, E. Salido, and L. Barajas, "Epidermal growth factor and the kidney," *Annual Review of Physiology*, vol. 51, no. 1, pp. 67–80, 1989.
- [54] G. Carpenter and S. Cohen, "Epidermal growth factor," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, no. 14, pp. 7709–7712, 1990.
- [55] F. Zeng and R. C. Harris, "Epidermal growth factor, from gene organization to bedside," *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 28, pp. 2–11, 2014.
- [56] Z. Wei, K.-W. Park, B. N. Day, and R. S. Prather, "Effect of epidermal growth factor on preimplantation development and its receptor expression in porcine embryos," *Molecular Reproduction and Development : Incorporating Gamete Research*, vol. 60, no. 4, pp. 457–462, 2001.
- [57] G. Schultz and S. Heyner, "Growth factors in preimplantation mammalian embryos." *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, vol. 15, pp. 43–81, 1993.
- [58] Q. Kong, R. J. Majeska, and M. Vazquez, "Migration of connective tissue-derived cells is mediated by ultra-low concentration gradient fields of EGF," *Experimental Cell Research*, vol. 317, no. 11, pp. 1491–1502, 2011.
- [59] R. Zeineldin and L. G. Hudson, "Epithelial cell migration in response to epidermal growth factor," *Epidermal Growth Factor : Methods and Protocols*, pp. 147–158, 2006.
- [60] K. Tamama, H. Kawasaki, and A. Wells, "Epidermal growth factor (EGF) treatment on multipotential stromal cells (MSCs). possible enhancement of therapeutic potential of MSC," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, vol. 2010, 2010.

- [61] P. R. Kuhl and L. G. Griffith-Cima, "Tethered epidermal growth factor as a paradigm for growth factor - induced stimulation from the solid phase," *Nature Medicine*, vol. 2, no. 9, pp. 1022–1027, 1996.
- [62] V. H. Fan, A. Au, K. Tamama, R. Littrell, L. B. Richardson, J. W. Wright, A. Wells, and L. G. Griffith, "Tethered epidermal growth factor provides a survival advantage to mesenchymal stem cells," *Stem Cells*, vol. 25, no. 5, pp. 1241–1251, 2007.
- [63] S. M. S. Kiliçaslan, Ş. C. Cevher, and E. G. G. Peker, "Ultrastructural changes in blood vessels in epidermal growth factor treated experimental cutaneous wound model," *Pathology-Research and Practice*, vol. 209, no. 11, pp. 710–715, 2013.
- [64] M. L. Uribe, I. Marrocco, and Y. Yarden, "EGFR in cancer : Signaling mechanisms, drugs, and acquired resistance," *Cancers*, vol. 13, no. 11, p. 2748, 2021.
- [65] R. A. Bradshaw and K. P. Cavanaugh, "Isolation and characterization of growth factors," in *Peptide Growth Factors and their Receptors I*. Springer Science & Business Media, 2012.
- [66] P. M. Brown, M. T. Debanne, S. Grothe, D. Bergsma, M. Caron, C. Kay, and M. D. O'Connor-Mccourt, "The extracellular domain of the epidermal growth factor receptor : Studies on the affinity and stoichiometry of binding, receptor dimerization and a binding-domain mutant," *European journal of biochemistry*, vol. 225, no. 1, pp. 223–233, 1994.
- [67] V. Kumar, S. Bustin, and I. McKay, "Transforming growth factor alpha," *Cell Biology International*, vol. 19, no. 5, pp. 373–388, 1995.
- [68] J. Chen, F. Zeng, S. J. Forrester, S. Eguchi, M.-Z. Zhang, and R. C. Harris, "Expression and function of the epidermal growth factor receptor in physiology and disease," *Physiological Reviews*, vol. 96, no. 3, pp. 1025–1069, 2016.
- [69] K. Roepstorff, M. V. Grandal, L. Henriksen, S. L. J. Knudsen, M. Lerdrup, L. Grøvdal, B. M. Willumsen, and B. Van Deurs, "Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor," *Traffic*, vol. 10, no. 8, pp. 1115–1127, 2009.
- [70] R. Ebner and R. Derynck, "Epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha : differential intracellular routing and processing of ligand-receptor complexes," *Cell Regulation*, vol. 2, no. 8, pp. 599–612, 1991.
- [71] K. S. Richter, "The importance of growth factors for preimplantation embryo development and in-vitro culture," *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, vol. 20, no. 3, pp. 292–304, 2008.

- [72] Y. Li, J. Fan, M. Chen, W. Li, and D. T. Woodley, "Transforming growth factor- α : a major human serum factor that promotes human keratinocyte migration," *Journal of Investigative Dermatology*, vol. 126, no. 9, pp. 2096–2105, 2006.
- [73] A. Kramer, F.-C. Yang, P. Snodgrass, X. Li, T. E. Scammell, F. C. Davis, and C. J. Weitz, "Regulation of daily locomotor activity and sleep by hypothalamic EGF receptor signaling," *Science*, vol. 294, no. 5551, pp. 2511–2515, 2001.
- [74] L. Kubickova, L. Sedlarikova, R. Hajek, and S. Sevcikova, "TGF- β —an excellent servant but a bad master," *Journal of Translational Medicine*, vol. 10, pp. 1–24, 2012.
- [75] S. Cheifetz, J. A. Weatherbee, M. L.-S. Tsang, J. K. Anderson, J. E. Mole, R. Lucas, and J. Massagué, "The transforming growth factor- β system, a complex pattern of cross-reactive ligands and receptors," *Cell*, vol. 48, no. 3, pp. 409–415, 1987.
- [76] J. Massagué, S. W. Blain, and R. S. Lo, "TGF β signaling in growth control, cancer, and heritable disorders," *Cell*, vol. 103, no. 2, pp. 295–309, 2000.
- [77] A. B. Roberts, M. A. Anzano, L. M. Wakefield, N. S. Roche, D. F. Stern, and M. B. Sporn, "Type beta transforming growth factor : a bifunctional regulator of cellular growth." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 82, no. 1, pp. 119–123, 1985.
- [78] F. López-Casillas, J. L. Wrana, and J. Massagué, "Betaglycan presents ligand to the TGF β signaling receptor," *Cell*, vol. 73, no. 7, pp. 1435–1444, 1993.
- [79] L. Levy and C. S. Hill, "Alterations in components of the $\text{tgf-}\beta$ superfamily signaling pathways in human cancer," *Cytokine & Growth Factor Reviews*, vol. 17, no. 1-2, pp. 41–58, 2006.
- [80] J. Massagué, "TGF β in cancer," *Cell*, vol. 134, no. 2, pp. 215–230, 2008.
- [81] C. Larson, B. Oronsky, C. A. Carter, A. Oronsky, S. J. Knox, D. Sher, and T. R. Reid, "TGF-beta : a master immune regulator," *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, vol. 24, no. 5, pp. 427–438, 2020.
- [82] R. Derynck, R. J. Akhurst, and A. Balmain, "TGF- β signaling in tumor suppression and cancer progression," *Nature Genetics*, vol. 29, no. 2, pp. 117–129, 2001.
- [83] P. Carmeliet and R. K. Jain, "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis," *Nature*, vol. 473, no. 7347, pp. 298–307, 2011.
- [84] S. Koch, S. Tugues, X. Li, L. Gualandi, and L. Claesson-Welsh, "Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors," *Biochemical Journal*, vol. 437, no. 2, pp. 169–183, 2011.

- [85] N. Ferrara, H.-P. Gerber, and J. LeCouter, “The biology of VEGF and its receptors,” *Nature Medicine*, vol. 9, no. 6, pp. 669–676, 2003.
- [86] M. Simons, “An inside view : VEGF receptor trafficking and signaling,” *Physiology*, vol. 27, no. 4, pp. 213–222, 2012.
- [87] M. Simons, E. Gordon, and L. Claesson-Welsh, “Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling,” *Nature Reviews Molecular Cell biology*, vol. 17, no. 10, pp. 611–625, 2016.
- [88] N. Ferrara, “Binding to the extracellular matrix and proteolytic processing : two key mechanisms regulating vascular endothelial growth factor action,” *Molecular Biology of the Cell*, vol. 21, no. 5, pp. 687–690, 2010.
- [89] M. Kazemi, A. Carrer, S. Moimas, L. Zandonà, R. Bussani, B. Casagrande, S. Palmisano, P. Prelazzi, M. Giacca, L. Zentilin *et al.*, “VEGF121 and VEGF165 differentially promote vessel maturation and tumor growth in mice and humans,” *Cancer Gene Therapy*, vol. 23, no. 5, pp. 125–132, 2016.
- [90] C. Ruhrberg, H. Gerhardt, M. Golding, R. Watson, S. Ioannidou, H. Fujisawa, C. Betsholtz, and D. T. Shima, “Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis,” *Genes & Development*, vol. 16, no. 20, pp. 2684–2698, 2002.
- [91] J. E. Park, G.-A. Keller, and N. Ferrara, “The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms : differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF.” *Molecular Biology of the Cell*, vol. 4, no. 12, pp. 1317–1326, 1993.
- [92] H.-P. Gerber, A. McMurtrey, J. Kowalski, M. Yan, B. A. Keyt, V. Dixit, and N. Ferrara, “Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway : requirement for Flk-1/KDR activation,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 46, pp. 30 336–30 343, 1998.
- [93] H. Naito, T. Iba, and N. Takakura, “Mechanisms of new blood-vessel formation and proliferative heterogeneity of endothelial cells,” *International Immunology*, vol. 32, no. 5, pp. 295–305, 2020.
- [94] S. Sorrentino and H. Haller, “Tissue engineering of blood vessels : how to make a graft,” in *Tissue Engineering : From Lab to Clinic*. Springer, 2010, pp. 263–278.
- [95] A. C. Dudley and A. W. Griffioen, “Pathological angiogenesis : mechanisms and therapeutic strategies,” *Angiogenesis*, vol. 26, no. 3, pp. 313–347, 2023.

- [96] W. Risau and I. Flamme, "Vasculogenesis," *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, vol. 11, no. 1, pp. 73–91, 1995.
- [97] S. P. Herbert and D. Y. Stainier, "Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis," *Nature Reviews Molecular Cell biology*, vol. 12, no. 9, pp. 551–564, 2011.
- [98] W. Risau, "Mechanisms of angiogenesis," *Nature*, vol. 386, no. 6626, pp. 671–674, 1997.
- [99] K. L. Marcelo, L. C. Goldie, and K. K. Hirschi, "Regulation of endothelial cell differentiation and specification," *Circulation Research*, vol. 112, no. 9, pp. 1272–1287, 2013.
- [100] A. N. Makanya, R. Hlushchuk, and V. G. Djonov, "Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling," *Angiogenesis*, vol. 12, pp. 113–123, 2009.
- [101] L. Díaz-Flores, R. Gutiérrez, S. Gayoso, M. García, M. González-Gómez, L. Díaz-Flores Jr, R. Sánchez, J. Carrasco, and J. Madrid, "Intussusceptive angiogenesis and its counterpart intussusceptive lymphangiogenesis." *Histology and Histopathology*, vol. 35, no. 10, pp. 1083–1103, 2020.
- [102] H. Gerhardt, M. Golding, M. Fruttiger, C. Ruhrberg, A. Lundkvist, A. Abramsson, M. Jeltsch, C. Mitchell, K. Alitalo, D. Shima *et al.*, "VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia," *The Journal of Cell Biology*, vol. 161, no. 6, pp. 1163–1177, 2003.
- [103] R. Blanco and H. Gerhardt, "VEGF and Notch in tip and stalk cell selection," *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, vol. 3, no. 1, 2013.
- [104] A. Porzionato, E. Stocco, S. Barbon, F. Grandi, V. Macchi, and R. De Caro, "Tissue-engineered grafts from human decellularized extracellular matrices : a systematic review and future perspectives," *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 19, no. 12, p. 4117, 2018.
- [105] A. D. McInnes, M. A. Moser, and X. Chen, "Preparation and use of decellularized extracellular matrix for tissue engineering," *Journal of Functional Biomaterials*, vol. 13, no. 4, p. 240, 2022.
- [106] A. J. Allman, T. B. McPherson, S. F. Badylak, L. C. Merrill, B. Kallakury, C. Sheehan, R. H. Raeder, and D. W. Metzger, "Xenogeneic extracellular matrix grafts elicit a TH2-restricted immune response1," *Transplantation*, vol. 71, no. 11, pp. 1631–1640, 2001.
- [107] U. Boeer, F. F. Buettner, M. Klingenberg, G. C. Antonopoulos, H. Meyer, A. Haverich, and M. Wilhelmi, "Immunogenicity of intensively decellularized equine carotid arteries

- is conferred by the extracellular matrix protein collagen type VI,” *PLoS One*, vol. 9, no. 8, p. e105964, 2014.
- [108] M. S. Massaro, R. Palek, J. Rosendorf, L. Červenková, V. Liška, and V. Moulisova, “Decellularized xenogeneic scaffolds in transplantation and tissue engineering : Immunogenicity versus positive cell stimulation,” *Materials Science and Engineering : C*, vol. 127, p. 112203, 2021.
 - [109] M. L. Wong and L. G. Griffiths, “Immunogenicity in xenogeneic scaffold generation : antigen removal vs. decellularization,” *Acta Biomaterialia*, vol. 10, no. 5, pp. 1806–1816, 2014.
 - [110] A. Rüffer, A. Purbojo, I. Cicha, M. Glöckler, S. Potapov, S. Dittrich, and R. A. Cesnjevar, “Early failure of xenogenous de-cellularised pulmonary valve conduits—a word of caution !” *European Journal of Cardio-thoracic Surgery*, vol. 38, no. 1, pp. 78–85, 2010.
 - [111] T. J. Keane, I. T. Swinehart, and S. F. Badylak, “Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance,” *Methods*, vol. 84, pp. 25–34, 2015.
 - [112] M. T. Spang and K. L. Christman, “Extracellular matrix hydrogel therapies : In vivo applications and development,” *Acta Biomaterialia*, vol. 68, pp. 1–14, 2018.
 - [113] M. Zhe, X. Wu, P. Yu, J. Xu, M. Liu, G. Yang, Z. Xiang, F. Xing, and U. Ritz, “Recent advances in decellularized extracellular matrix-based bioinks for 3d bioprinting in tissue engineering,” *Materials*, vol. 16, no. 8, p. 3197, 2023.
 - [114] M. Parmaksiz, A. Dogan, S. Odabas, A. E. Elçin, and Y. M. Elçin, “Clinical applications of decellularized extracellular matrices for tissue engineering and regenerative medicine,” *Biomedical Materials*, vol. 11, no. 2, p. 022003, 2016.
 - [115] L. H. Cohn, J. J. Collins Jr, V. J. DiSesa, G. S. Couper, P. S. Peigh, W. Kowalker, and E. Allred, “Fifteen-year experience with 1678 Hancock porcine bioprosthetic heart valve replacements.” *Annals of Surgery*, vol. 210, no. 4, p. 435, 1989.
 - [116] X. Hong, Y. Yuan, X. Sun, M. Zhou, G. Guo, Q. Zhang, J. Hescheler, and J. Xi, “Skeletal extracellular matrix supports cardiac differentiation of embryonic stem cells : a potential scaffold for engineered cardiac tissue,” *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 45, no. 1, pp. 319–331, 2018.
 - [117] S. Das, S.-W. Kim, Y.-J. Choi, S. Lee, S.-H. Lee, J.-S. Kong, H.-J. Park, D.-W. Cho, and J. Jang, “Decellularized extracellular matrix bioinks and the external stimuli to enhance cardiac tissue development in vitro,” *Acta Biomaterialia*, vol. 95, pp. 188–200, 2019.

- [118] J. M. Singelyn, J. A. DeQuach, S. B. Seif-Naraghi, R. B. Littlefield, P. J. Schup-Magoffin, and K. L. Christman, “Naturally derived myocardial matrix as an injectable scaffold for cardiac tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 30, no. 29, pp. 5409–5416, 2009.
- [119] M. Saheli, M. Sepantafar, B. Pournasr, Z. Farzaneh, M. Vosough, A. Piryaee, and H. Baharvand, “Three-dimensional liver-derived extracellular matrix hydrogel promotes liver organoids function,” *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 119, no. 6, pp. 4320–4333, 2018.
- [120] P. L. Lewis, J. Su, M. Yan, F. Meng, S. S. Glaser, G. D. Alpini, R. M. Green, B. Sosa-Pineda, and R. N. Shah, “Complex bile duct network formation within liver decellularized extracellular matrix hydrogels,” *Scientific Reports*, vol. 8, no. 1, p. 12220, 2018.
- [121] J. S. Lee, J. Shin, H.-M. Park, Y.-G. Kim, B.-G. Kim, J.-W. Oh, and S.-W. Cho, “Liver extracellular matrix providing dual functions of two-dimensional substrate coating and three-dimensional injectable hydrogel platform for liver tissue engineering,” *Biomacromolecules*, vol. 15, no. 1, pp. 206–218, 2014.
- [122] H. Lee, W. Han, H. Kim, D.-H. Ha, J. Jang, B. S. Kim, and D.-W. Cho, “Development of liver decellularized extracellular matrix bioink for three-dimensional cell printing-based liver tissue engineering,” *Biomacromolecules*, vol. 18, no. 4, pp. 1229–1237, 2017.
- [123] M. M. Smoak, K. J. Hogan, K. J. Grande-Allen, and A. G. Mikos, “Bioinspired electrosponed dECM scaffolds guide cell growth and control the formation of myotubes,” *Science Advances*, vol. 7, no. 20, p. eabg4123, 2021.
- [124] D. Chaimov, L. Baruch, S. Krishtul, I. Meivar-Levy, S. Ferber, and M. Machluf, “Innovative encapsulation platform based on pancreatic extracellular matrix achieve substantial insulin delivery,” *Journal of Controlled Release*, vol. 257, pp. 91–101, 2017.
- [125] J. Kim, I. K. Shim, D. G. Hwang, Y. N. Lee, M. Kim, H. Kim, S.-W. Kim, S. Lee, S. C. Kim, D.-W. Cho *et al.*, “3D cell printing of islet-laden pancreatic tissue-derived extracellular matrix bioink constructs for enhancing pancreatic functions,” *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 7, no. 10, pp. 1773–1781, 2019.
- [126] S. Shojaie, L. Ermini, C. Ackerley, J. Wang, S. Chin, B. Yeganeh, M. Bilodeau, M. Sami, I. Rogers, J. Rossant *et al.*, “Acellular lung scaffolds direct differentiation of endoderm to functional airway epithelial cells : requirement of matrix-bound HS proteoglycans,” *Stem Cell Reports*, vol. 4, no. 3, pp. 419–430, 2015.
- [127] R. Sobreiro-Almeida, D. R. Fonseca, and N. M. Neves, “Extracellular matrix electrosponed membranes for mimicking natural renal filtration barriers,” *Materials Science and Engineering : C*, vol. 103, p. 109866, 2019.

- [128] E. Rezvani Ghomi, N. Nourbakhsh, M. Akbari Kenari, M. Zare, and S. Ramakrishna, "Collagen-based biomaterials for biomedical applications," *Journal of Biomedical Materials Research Part B : Applied Biomaterials*, vol. 109, no. 12, pp. 1986–1999, 2021.
- [129] B. Gurumurthy and A. V. Janorkar, "Improvements in mechanical properties of collagen-based scaffolds for tissue engineering," *Current Opinion in Biomedical Engineering*, vol. 17, p. 100253, 2021.
- [130] T. Hu and A. C. Lo, "Collagen–alginate composite hydrogel : Application in tissue engineering and biomedical sciences," *Polymers*, vol. 13, no. 11, p. 1852, 2021.
- [131] Y. Li, Y. Liu, R. Li, H. Bai, Z. Zhu, L. Zhu, C. Zhu, Z. Che, H. Liu, J. Wang *et al.*, "Collagen-based biomaterials for bone tissue engineering," *Materials & Design*, vol. 210, p. 110049, 2021.
- [132] X. Yang, Z. Lu, H. Wu, W. Li, L. Zheng, and J. Zhao, "Collagen-alginate as bioink for three-dimensional (3D) cell printing based cartilage tissue engineering," *Materials Science and Engineering : C*, vol. 83, pp. 195–201, 2018.
- [133] D. Zhu, H. Wang, P. Trinh, S. C. Heilshorn, and F. Yang, "Elastin-like protein-hyaluronic acid (ELP-HA) hydrogels with decoupled mechanical and biochemical cues for cartilage regeneration," *Biomaterials*, vol. 127, pp. 132–140, 2017.
- [134] P. Das, M. D. DiVito, J. A. Wertheim, and L. P. Tan, "Collagen-I and fibronectin modified three-dimensional electrospun PLGA scaffolds for long-term in vitro maintenance of functional hepatocytes," *Materials Science and Engineering : C*, vol. 111, p. 110723, 2020.
- [135] Y. Wang, J.-H. Lee, H. Shirahama, J. Seo, J. S. Glenn, and N.-J. Cho, "Extracellular matrix functionalization and Huh-7.5 cell coculture promote the hepatic differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells in a 3D ICC hydrogel scaffold," *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 2, no. 12, pp. 2255–2265, 2016.
- [136] S. Minardi, F. Taraballi, X. Wang, F. J. Cabrera, J. L. Van Eps, A. B. Robbins, M. Sandri, M. R. Moreno, B. K. Weiner, and E. Tasciotti, "Biomimetic collagen/elastin meshes for ventral hernia repair in a rat model," *Acta Biomaterialia*, vol. 50, pp. 165–177, 2017.
- [137] M. A. Kafi, M. K. Aktar, Y. Phanny, and M. Todo, "Adhesion, proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cell on chitosan/collagen composite scaffold," *Journal of Materials Science : Materials in Medicine*, vol. 30, pp. 1–12, 2019.
- [138] Y. Shen, L. Dai, X. Li, R. Liang, G. Guan, Z. Zhang, W. Cao, Z. Liu, S. Mei, W. Liang *et al.*, "Epidermal stem cells cultured on collagen-modified chitin membrane induce in

- situ tissue regeneration of full-thickness skin defects in mice,” *PloS One*, vol. 9, no. 2, p. e87557, 2014.
- [139] M. Albanna, K. W. Binder, S. V. Murphy, J. Kim, S. A. Qasem, W. Zhao, J. Tan, I. B. El-Amin, D. D. Dice, J. Marco *et al.*, “In situ bioprinting of autologous skin cells accelerates wound healing of extensive excisional full-thickness wounds,” *Scientific Reports*, vol. 9, no. 1, p. 1856, 2019.
 - [140] H. Yoon, J.-S. Lee, H. Yim, G. Kim, and W. Chun, “Development of cell-laden 3D scaffolds for efficient engineered skin substitutes by collagen gelation,” *RSC Advances*, vol. 6, no. 26, pp. 21 439–21 447, 2016.
 - [141] M. S. B. Reddy, D. Ponnammam, R. Choudhary, and K. K. Sadasivuni, “A comparative review of natural and synthetic biopolymer composite scaffolds,” *Polymers*, vol. 13, no. 7, p. 1105, 2021.
 - [142] S. Stratton, N. B. Shelke, K. Hoshino, S. Rudraiah, and S. G. Kumbar, “Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering,” *Bioactive Materials*, vol. 1, no. 2, pp. 93–108, 2016.
 - [143] E. Malikmammadov, T. E. Tanir, A. Kiziltay, V. Hasirci, and N. Hasirci, “PCL and PCL-based materials in biomedical applications,” *Journal of Biomaterials science, Polymer edition*, vol. 29, no. 7-9, pp. 863–893, 2018.
 - [144] D. Mondal, M. Griffith, and S. S. Venkatraman, “Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery : Current scenario and challenges,” *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, vol. 65, no. 5, pp. 255–265, 2016.
 - [145] M. F. Maitz, “Applications of synthetic polymers in clinical medicine,” *Biosurface and Biotribology*, vol. 1, no. 3, pp. 161–176, 2015.
 - [146] S. Liu, S. Qin, M. He, D. Zhou, Q. Qin, and H. Wang, “Current applications of poly (lactic acid) composites in tissue engineering and drug delivery,” *Composites Part B : Engineering*, vol. 199, p. 108238, 2020.
 - [147] Y. J. Low, A. Andriyana, B. C. Ang, and N. I. Zainal Abidin, “Bioresorbable and degradable behaviors of PGA : Current state and future prospects,” *Polymer Engineering & Science*, vol. 60, no. 11, pp. 2657–2675, 2020.
 - [148] J. K. Tessmar and A. M. Göpferich, “Customized PEG-derived copolymers for tissue-engineering applications,” *Macromolecular Bioscience*, vol. 7, no. 1, pp. 23–39, 2007.
 - [149] E. M. Ovadia, D. W. Colby, and A. M. Kloxin, “Designing well-defined photopolymerized synthetic matrices for three-dimensional culture and differentiation of induced pluripotent stem cells,” *Biomaterials Science*, vol. 6, no. 6, pp. 1358–1370, 2018.

- [150] Y. I. Cho, J. S. Choi, S. Y. Jeong, and H. S. Yoo, “Nerve growth factor (NGF)-conjugated electrospun nanostructures with topographical cues for neuronal differentiation of mesenchymal stem cells,” *Acta Biomaterialia*, vol. 6, no. 12, pp. 4725–4733, 2010.
- [151] D. Qi, S. Wu, H. Lin, M. A. Kuss, Y. Lei, A. Krasnoslobodtsev, S. Ahmed, C. Zhang, H. J. Kim, P. Jiang *et al.*, “Establishment of a human iPSC-and nanofiber-based microphysiological blood–brain barrier system,” *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 10, no. 26, pp. 21 825–21 835, 2018.
- [152] W. Yeong, N. Sudarmadji, H. Yu, C. Chua, K. Leong, S. Venkatraman, Y. Boey, and L. Tan, “Porous polycaprolactone scaffold for cardiac tissue engineering fabricated by selective laser sintering,” *Acta Biomaterialia*, vol. 6, no. 6, pp. 2028–2034, 2010.
- [153] S. S. Ng, K. Saeb-Parsy, S. J. Blackford, J. M. Segal, M. P. Serra, M. Horcas-Lopez, S. Mastoridis, W. Jassem, C. W. Frank, N. J. Cho *et al.*, “Human iPS derived progenitors bioengineered into liver organoids using an inverted colloidal crystal poly (ethylene glycol) scaffold,” *Biomaterials*, vol. 182, pp. 299–311, 2018.
- [154] J. W. Lee, Y.-J. Choi, W.-J. Yong, F. Pati, J.-H. Shim, K. S. Kang, I.-H. Kang, J. Park, and D.-W. Cho, “Development of a 3D cell printed construct considering angiogenesis for liver tissue engineering,” *Biofabrication*, vol. 8, no. 1, p. 015007, 2016.
- [155] R. Cruz-Acuña, M. Quirós, A. E. Farkas, P. H. Dedhia, S. Huang, D. Siuda, V. García-Hernández, A. J. Miller, J. R. Spence, A. Nusrat *et al.*, “Synthetic hydrogels for human intestinal organoid generation and colonic wound repair,” *Nature Cell Biology*, vol. 19, no. 11, pp. 1326–1335, 2017.
- [156] E. Saito, D. Suarez-Gonzalez, W. L. Murphy, and S. J. Hollister, “Biomaterial coating increases bone formation by ex vivo BMP-7 gene therapy in rapid prototyped poly (L-lactic acid)(PLLA) and poly (ϵ -caprolactone)(PCL) porous scaffolds,” *Advanced Healthcare Materials*, vol. 4, no. 4, pp. 621–632, 2015.
- [157] A. Sadiasa, T. H. Nguyen, and B.-T. Lee, “In vitro and in vivo evaluation of porous PCL-PLLA 3D polymer scaffolds fabricated via salt leaching method for bone tissue engineering applications,” *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 25, no. 2, pp. 150–167, 2014.
- [158] V. Guarino, F. Causa, P. Taddei, M. Di Foggia, G. Ciapetti, D. Martini, C. Fagnano, N. Baldini, and L. Ambrosio, “Polylactic acid fibre-reinforced polycaprolactone scaffolds for bone tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 27, pp. 3662–3670, 2008.

- [159] U. S. Madduma-Bandarage and S. V. Madihally, “Synthetic hydrogels : Synthesis, novel trends, and applications,” *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 138, no. 19, p. 50376, 2021.
- [160] M. Keshvardoostchokami, S. S. Majidi, P. Huo, R. Ramachandran, M. Chen, and B. Liu, “Electrospun nanofibers of natural and synthetic polymers as artificial extracellular matrix for tissue engineering,” *Nanomaterials*, vol. 11, no. 1, p. 21, 2020.
- [161] J. Yu, S. A. Park, W. D. Kim, T. Ha, Y.-Z. Xin, J. Lee, and D. Lee, “Current advances in 3D bioprinting technology and its applications for tissue engineering,” *Polymers*, vol. 12, no. 12, p. 2958, 2020.
- [162] M. Jin, J. Shi, W. Zhu, H. Yao, and D.-A. Wang, “Polysaccharide-based biomaterials in tissue engineering : a review,” *Tissue Engineering Part B : Reviews*, vol. 27, no. 6, pp. 604–626, 2021.
- [163] Q. Yang, J. Peng, H. Xiao, X. Xu, and Z. Qian, “Polysaccharide hydrogels : Functionalization, construction and served as scaffold for tissue engineering,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 278, p. 118952, 2022.
- [164] J. N. BeMiller, “Polysaccharides,” *e LS*, 2014.
- [165] K. F. Almqvist, A. A. Dhollander, P. C. Verdonk, R. Forsyth, R. Verdonk, and G. Verbruggen, “Treatment of cartilage defects in the knee using alginate beads containing human mature allogenic chondrocytes,” *The American Journal of Sports Medicine*, vol. 37, no. 10, pp. 1920–1929, 2009.
- [166] L. Han, M. Wang, P. Li, D. Gan, L. Yan, J. Xu, K. Wang, L. Fang, C. W. Chan, H. Zhang *et al.*, “Mussel-inspired tissue-adhesive hydrogel based on the polydopamine–chondroitin sulfate complex for growth-factor-free cartilage regeneration,” *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 10, no. 33, pp. 28 015–28 026, 2018.
- [167] Q. Feng, S. Lin, K. Zhang, C. Dong, T. Wu, H. Huang, X. Yan, L. Zhang, G. Li, and L. Bian, “Sulfated hyaluronic acid hydrogels with retarded degradation and enhanced growth factor retention promote hMSC chondrogenesis and articular cartilage integrity with reduced hypertrophy,” *Acta Biomaterialia*, vol. 53, pp. 329–342, 2017.
- [168] Z. Huang, P. Noeaid, B. Kohl, J. A. Roether, D. W. Schubert, C. Meier, A. R. Boccaccini, O. Godkin, W. Ertel, S. Arens *et al.*, “Chondrogenesis of human bone marrow mesenchymal stromal cells in highly porous alginate-foams supplemented with chondroitin sulfate,” *Materials Science and Engineering : C*, vol. 50, pp. 160–172, 2015.
- [169] S. Kandalam, L. Sindji, G. J.-R. Delcroix, F. Violet, X. Garric, E. M. André, P. C. Schiller, M.-C. Venier-Julienne, A. Des Rieux, J. Guicheux *et al.*, “Pharmacologically

- active microcarriers delivering BDNF within a hydrogel : novel strategy for human bone marrow-derived stem cells neural/neuronal differentiation guidance and therapeutic secretome enhancement,” *Acta Biomaterialia*, vol. 49, pp. 167–180, 2017.
- [170] S. K. Seidlits, Z. Z. Khaing, R. R. Petersen, J. D. Nickels, J. E. Vanscoy, J. B. Shear, and C. E. Schmidt, “The effects of hyaluronic acid hydrogels with tunable mechanical properties on neural progenitor cell differentiation,” *Biomaterials*, vol. 31, no. 14, pp. 3930–3940, 2010.
- [171] N. D. Leipzig, R. G. Wylie, H. Kim, and M. S. Shoichet, “Differentiation of neural stem cells in three-dimensional growth factor-immobilized chitosan hydrogel scaffolds,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 1, pp. 57–64, 2011.
- [172] R. Lozano, L. Stevens, B. C. Thompson, K. J. Gilmore, R. Gorkin III, E. M. Stewart, M. in het Panhuis, M. Romero-Ortega, and G. G. Wallace, “3D printing of layered brain-like structures using peptide modified gellan gum substrates,” *Biomaterials*, vol. 67, pp. 264–273, 2015.
- [173] J. T. Koivisto, T. Joki, J. E. Parraga, R. Pääkkönen, L. Ylä-Outinen, L. Salonen, I. Jönkkäri, M. Peltola, T. O. Ihalainen, S. Narkilahti *et al.*, “Bioamine-crosslinked gellan gum hydrogel for neural tissue engineering,” *Biomedical Materials*, vol. 12, no. 2, p. 025014, 2017.
- [174] V. Kuzmenko, T. Kalogeropoulos, J. Thunberg, S. Johannesson, D. Hägg, P. Enoksson, and P. Gatenholm, “Enhanced growth of neural networks on conductive cellulose-derived nanofibrous scaffolds,” *Materials Science and Engineering : C*, vol. 58, pp. 14–23, 2016.
- [175] M. Shachar, O. Tsur-Gang, T. Dvir, J. Leor, and S. Cohen, “The effect of immobilized RGD peptide in alginate scaffolds on cardiac tissue engineering,” *Acta Biomaterialia*, vol. 7, no. 1, pp. 152–162, 2011.
- [176] Y. Sapir, O. Kryukov, and S. Cohen, “Integration of multiple cell-matrix interactions into alginate scaffolds for promoting cardiac tissue regeneration,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 7, pp. 1838–1847, 2011.
- [177] J. Dahlmann, A. Krause, L. Möller, G. Kensah, M. Möwes, A. Diekmann, U. Martin, A. Kirschning, I. Gruh, and G. Dräger, “Fully defined in situ cross-linkable alginate and hyaluronic acid hydrogels for myocardial tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 4, pp. 940–951, 2013.
- [178] J. Li, Y. Shu, T. Hao, Y. Wang, Y. Qian, C. Duan, H. Sun, Q. Lin, and C. Wang, “A chitosan–glutathione based injectable hydrogel for suppression of oxidative stress damage in cardiomyocytes,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 36, pp. 9071–9081, 2013.

- [179] X. Chen, M. Zhang, X. Wang, Y. Chen, Y. Yan, L. Zhang, and L. Zhang, "Peptide-modified chitosan hydrogels promote skin wound healing by enhancing wound angiogenesis and inhibiting inflammation," *American Journal of Translational Research*, vol. 9, no. 5, p. 2352, 2017.
- [180] K. Y. Lee and D. J. Mooney, "Alginate : properties and biomedical applications," *Progress in Polymer Science*, vol. 37, no. 1, pp. 106–126, 2012.
- [181] J. R. E. Fraser, T. C. Laurent, and U. Laurent, "Hyaluronan : its nature, distribution, functions and turnover," *Journal of Internal Medicine*, vol. 242, no. 1, pp. 27–33, 1997.
- [182] A. Migliore and S. Procopio, "Effectiveness and utility of hyaluronic acid in osteoarthritis," *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, vol. 12, no. 1, p. 31, 2015.
- [183] N. Volpi, "Chondroitin sulfate safety and quality," *Molecules*, vol. 24, no. 8, p. 1447, 2019.
- [184] S. Ahmed, A. Ali, and J. Sheikh, "A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 116, pp. 849–862, 2018.
- [185] L. Zhao, P. K. Chu, Y. Zhang, and Z. Wu, "Antibacterial coatings on titanium implants," *Journal of Biomedical Materials Research Part B : Applied Biomaterials*, vol. 91, no. 1, pp. 470–480, 2009.
- [186] R. J. Hickey and A. E. Pelling, "Cellulose biomaterials for tissue engineering," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 7, p. 45, 2019.
- [187] S. F. Kabir, P. P. Sikdar, B. Haque, M. R. Bhuiyan, A. Ali, and M. Islam, "Cellulose-based hydrogel materials : Chemistry, properties and their prospective applications," *Progress in Biomaterials*, vol. 7, pp. 153–174, 2018.
- [188] S. Martwiset, A. E. Koh, and W. Chen, "Nonfouling characteristics of dextran-containing surfaces," *Langmuir*, vol. 22, no. 19, pp. 8192–8196, 2006.
- [189] S. Tiwari, R. Patil, and P. Bahadur, "Polysaccharide based scaffolds for soft tissue engineering applications," *Polymers*, vol. 11, no. 1, p. 1, 2018.
- [190] D. Machy, P. Carteron, and J. Jozefonvicz, "A new vascular polyester prosthesis impregnated with cross-linked dextran," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 13, no. 8, pp. 963–975, 2002.
- [191] K. H. Miao and K. B. Guthmiller, *Dextran*. StatPearls Publishing, 2020.
- [192] E. Carletti, A. Motta, and C. Migliaresi, "Scaffolds for tissue engineering and 3D cell culture," *3D Cell Culture : Methods and Protocols*, pp. 17–39, 2011.

- [193] A. K. Badekila, S. Kini, and A. K. Jaiswal, "Fabrication techniques of biomimetic scaffolds in three-dimensional cell culture : A review," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 236, no. 2, pp. 741–762, 2021.
- [194] P. Rider, Ž. P. Kačarević, S. Alkildani, S. Retnasingh, and M. Barbeck, "Bioprinting of tissue engineering scaffolds," *Journal of tissue engineering*, vol. 9, p. 2041731418802090, 2018.
- [195] A. Marchini and F. Gelain, "Synthetic scaffolds for 3D cell cultures and organoids : applications in regenerative medicine," *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 42, no. 3, pp. 468–486, 2022.
- [196] G. Jin, R. He, B. Sha, W. Li, H. Qing, R. Teng, and F. Xu, "Electrospun three-dimensional aligned nanofibrous scaffolds for tissue engineering," *Materials Science and Engineering : C*, vol. 92, pp. 995–1005, 2018.
- [197] G. Z. Tan and Y. Zhou, "Electrospinning of biomimetic fibrous scaffolds for tissue engineering : a review," *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, vol. 69, no. 15, pp. 947–960, 2020.
- [198] C. Karavasili and D. G. Fatouros, "Self-assembling peptides as vectors for local drug delivery and tissue engineering applications," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 174, pp. 387–405, 2021.
- [199] A. Koyyada and P. Orsu, "Recent advancements and associated challenges of scaffold fabrication techniques in tissue engineering applications," *Regenerative Engineering and Translational Medicine*, vol. 7, pp. 147–159, 2021.
- [200] J. Kopeček and J. Yang, "Hydrogels as smart biomaterials," *Polymer International*, vol. 56, no. 9, pp. 1078–1098, 2007.
- [201] A. S. Hoffman, "Hydrogels for biomedical applications," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, pp. 18–23, 2012.
- [202] J. Witten and K. Ribbeck, "The particle in the spider's web : transport through biological hydrogels," *Nanoscale*, vol. 9, no. 24, pp. 8080–8095, 2017.
- [203] J. Li and D. J. Mooney, "Designing hydrogels for controlled drug delivery," *Nature Reviews Materials*, vol. 1, no. 12, p. 16071, 2016.
- [204] P. J. Flory and J. Rehner Jr, "Statistical mechanics of cross-linked polymer networks. I. rubberlike elasticity," *The journal of chemical physics*, vol. 11, no. 11, pp. 512–520, 1943.
- [205] A. Kuijpers, G. Engbers, J. Feijen, S. De Smedt, T. Meyvis, J. Demeester, J. Krijgsveld, S. Zaat, and J. Dankert, "Characterization of the network structure of carbodiimide cross-linked gelatin gels," *Macromolecules*, vol. 32, no. 10, pp. 3325–3333, 1999.

- [206] K. J. De France, F. Xu, and T. Hoare, “Structured macroporous hydrogels : Progress, challenges, and opportunities,” *Advanced Healthcare Materials*, vol. 7, no. 1, p. 1700927, 2018.
- [207] M. Dadsetan, T. E. Hefferan, J. P. Szatkowski, P. K. Mishra, S. I. Macura, L. Lu, and M. J. Yaszemski, “Effect of hydrogel porosity on marrow stromal cell phenotypic expression,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 14, pp. 2193–2202, 2008.
- [208] N. Riahi, B. Liberelle, O. Henry, and G. De Crescenzo, “Impact of RGD amount in dextran-based hydrogels for cell delivery,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 161, pp. 219–227, 2017.
- [209] S. B. Lee, Y. H. Kim, M. S. Chong, S. H. Hong, and Y. M. Lee, “Study of gelatin-containing artificial skin V : fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 14, pp. 1961–1968, 2005.
- [210] A. Sergeeva, N. Feoktistova, V. Prokopovic, D. Gorin, and D. Volodkin, “Design of porous alginate hydrogels by sacrificial CaCO₃ templates : Pore formation mechanism,” *Advanced Materials Interfaces*, vol. 2, no. 18, p. 1500386, 2015.
- [211] J. Kim, M. J. Yaszemski, and L. Lu, “Three-dimensional porous biodegradable polymeric scaffolds fabricated with biodegradable hydrogel porogens,” *Tissue Engineering Part C : Methods*, vol. 15, no. 4, pp. 583–594, 2009.
- [212] J. T. Delaney, A. R. Liberski, J. Perelaer, and U. S. Schubert, “Reactive inkjet printing of calcium alginate hydrogel porogens—a new strategy to open-pore structured matrices with controlled geometry,” *Soft Matter*, vol. 6, no. 5, pp. 866–869, 2010.
- [213] C. M. Hwang, S. Sant, M. Masaeli, N. N. Kachouie, B. Zamanian, S.-H. Lee, and A. Khademhosseini, “Fabrication of three-dimensional porous cell-laden hydrogel for tissue engineering,” *Biofabrication*, vol. 2, no. 3, p. 035003, 2010.
- [214] H. Park, J. S. Temenoff, T. A. Holland, Y. Tabata, and A. G. Mikos, “Delivery of TGF- β 1 and chondrocytes via injectable, biodegradable hydrogels for cartilage tissue engineering applications,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 34, pp. 7095–7103, 2005.
- [215] N. Annabi, J. W. Nichol, X. Zhong, C. Ji, S. Koshy, A. Khademhosseini, and F. Dehghani, “Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering,” *Tissue Engineering Part B : Reviews*, vol. 16, no. 4, pp. 371–383, 2010.
- [216] T. K. Kim, J. J. Yoon, D. S. Lee, and T. G. Park, “Gas foamed open porous biodegradable polymeric microspheres,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 2, pp. 152–159, 2006.
- [217] A. Barbetta, A. Gumiero, R. Pecci, R. Bedini, and M. Dentini, “Gas-in-liquid foam templating as a method for the production of highly porous scaffolds,” *Biomacromolecules*, vol. 10, no. 12, pp. 3188–3192, 2009.

- [218] N. Annabi, S. M. Mithieux, A. S. Weiss, and F. Dehghani, "The fabrication of elastin-based hydrogels using high pressure CO₂," *Biomaterials*, vol. 30, no. 1, pp. 1–7, 2009.
- [219] C. Ji, N. Annabi, A. Khademhosseini, and F. Dehghani, "Fabrication of porous chitosan scaffolds for soft tissue engineering using dense gas co₂," *Acta Biomaterialia*, vol. 7, no. 4, pp. 1653–1664, 2011.
- [220] A. Kumar, R. Mishra, Y. Reinwald, and S. Bhat, "Cryogels : Freezing unveiled by thawing," *Materials Today*, vol. 13, no. 11, pp. 42–44, 2010.
- [221] R. Ricciardi, F. Auriemma, and C. De Rosa, "Structure and properties of poly (vinyl alcohol) hydrogels obtained by freeze/thaw techniques," *Macromolecular Symposia*, vol. 222, no. 1, pp. 49–64, 2005.
- [222] I. Inci, H. Kirsebom, I. Y. Galaev, B. Mattiasson, and E. Piskin, "Gelatin cryogels cross-linked with oxidized dextran and containing freshly formed hydroxyapatite as potential bone tissue-engineering scaffolds," *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 7, no. 7, pp. 584–588, 2013.
- [223] A. M. Thomas and L. D. Shea, "Cryotemplation for the rapid fabrication of porous, patternable photopolymerized hydrogels," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 2, no. 28, pp. 4521–4530, 2014.
- [224] H. Zhang and A. I. Cooper, "Synthesis and applications of emulsion-templated porous materials," *Soft Matter*, vol. 1, no. 2, pp. 107–113, 2005.
- [225] S. Zhou, A. Bismarck, and J. H. Steinke, "Ion-responsive alginate based macroporous injectable hydrogel scaffolds prepared by emulsion templating," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 1, no. 37, pp. 4736–4745, 2013.
- [226] M. Ovadia and M. S. Silverstein, "High porosity, responsive hydrogel copolymers from emulsion templating," *Polymer International*, vol. 65, no. 3, pp. 280–289, 2016.
- [227] S. G. Lévesque, R. M. Lim, and M. S. Shoichet, "Macroporous interconnected dextran scaffolds of controlled porosity for tissue-engineering applications," *Biomaterials*, vol. 26, no. 35, pp. 7436–7446, 2005.
- [228] I. T. Ozbolat and M. Hospodiuk, "Current advances and future perspectives in extrusion-based bioprinting," *Biomaterials*, vol. 76, pp. 321–343, 2016.
- [229] M. Saadi, A. Maguire, N. T. Pottackal, M. S. H. Thakur, M. M. Ikram, A. J. Hart, P. M. Ajayan, and M. M. Rahman, "Direct ink writing : a 3D printing technology for diverse materials," *Advanced Materials*, vol. 34, no. 28, p. 2108855, 2022.
- [230] L. Hockaday, K. Kang, N. Colangelo, P. Cheung, B. Duan, E. Malone, J. Wu, L. Girardi, L. Bonassar, H. Lipson *et al.*, "Rapid 3D printing of anatomically accurate and mecha-

- nically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds,” *Biofabrication*, vol. 4, no. 3, p. 035005, 2012.
- [231] M. Zhang, T. Wan, P. Fan, K. Shi, X. Chen, H. Yang, X. Liu, W. Xu, and Y. Zhou, “Photopolymerizable chitosan hydrogels with improved strength and 3D printability,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 193, pp. 109–116, 2021.
 - [232] K. Pataky, T. Braschler, A. Negro, P. Renaud, M. P. Lutolf, and J. Brugger, “Microdrop printing of hydrogel bioinks into 3D tissue-like geometries,” *Advanced Materials*, vol. 24, no. 3, pp. 391–396, 2012.
 - [233] J. Zhang, S. Yun, A. Karami, B. Jing, A. Zannettino, Y. Du, and H. Zhang, “3D printing of a thermosensitive hydrogel for skin tissue engineering : A proof of concept study,” *Bioprinting*, vol. 19, p. e00089, 2020.
 - [234] S. F. Saravanou, K. Ioannidis, A. Dimopoulos, A. Paxinou, F. Kounelaki, S. M. Varsami, C. Tsitsilianis, I. Papantoniou, and G. Pasparakis, “Dually crosslinked injectable alginate-based graft copolymer thermoresponsive hydrogels as 3D printing bioinks for cell spheroid growth and release,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 312, p. 120790, 2023.
 - [235] A. Accardo, M.-C. Blatché, R. Courson, I. Loubinoux, C. Thibault, L. Malaquin, and C. Vieu, “Multiphoton direct laser writing and 3D imaging of polymeric freestanding architectures for cell colonization,” *Small*, vol. 13, no. 27, p. 1700621, 2017.
 - [236] D. M. Zuev, A. K. Nguyen, V. I. Putlyaev, and R. J. Narayan, “3D printing and bioprinting using multiphoton lithography,” *Bioprinting*, vol. 20, p. e00090, 2020.
 - [237] B. Pan, L. Shao, J. Jiang, S. Zou, H. Kong, R. Hou, Y. Yao, J. Du, and Y. Jin, “3D printing sacrificial templates for manufacturing hydrogel constructs with channel networks,” *Materials & Design*, vol. 222, p. 111012, 2022.
 - [238] S. Liu, T. Wang, S. Li, and X. Wang, “Application status of sacrificial biomaterials in 3D bioprinting,” *Polymers*, vol. 14, no. 11, p. 2182, 2022.
 - [239] A.-L. Esquirol, P. Sarazin, and N. Virgilio, “Tunable porous hydrogels from cocontinuous polymer blends,” *Macromolecules*, vol. 47, no. 9, pp. 3068–3075, 2014.
 - [240] P. Sarazin and B. D. Favis, “Morphology control in co-continuous poly (L-lactide)/polystyrene blends : a route towards highly structured and interconnected porosity in poly (L-lactide) materials,” *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 6, pp. 1669–1679, 2003.
 - [241] A. G. Solano, J. Dupuy, H. Therriault, B. Liberelle, N. Faucheux, M.-A. Lauzon, N. Virgilio, and B. Paquette, “An alginate-based macroporous hydrogel matrix to trap cancer cells,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 266, p. 118115, 2021.

- [242] T. Gancheva and N. Virgilio, “Enhancing and tuning the response of environmentally sensitive hydrogels with embedded and interconnected pore networks,” *Macromolecules*, vol. 49, no. 16, pp. 5866–5876, 2016.
- [243] Y. Gong, K. Su, T. T. Lau, R. Zhou, and D.-A. Wang, “Microcavitary hydrogel-mediated phase transfer cell culture for cartilage tissue engineering,” *Tissue Engineering Part A*, vol. 16, no. 12, pp. 3611–3622, 2010.
- [244] C. Fan and D.-A. Wang, “Effects of permeability and living space on cell fate and neo-tissue development in hydrogel-based scaffolds : a study with cartilaginous model,” *Macromolecular Bioscience*, vol. 15, no. 4, pp. 535–545, 2015.
- [245] Ş. Şeker, A. E. Elçin, and Y. M. Elçin, “Macroporous elastic cryogels based on platelet lysate and oxidized dextran as tissue engineering scaffold : In vitro and in vivo evaluations,” *Materials Science and Engineering : C*, vol. 110, p. 110703, 2020.
- [246] S. G. Lévesque and M. S. Shoichet, “Synthesis of cell-adhesive dextran hydrogels and macroporous scaffolds,” *Biomaterials*, vol. 27, no. 30, pp. 5277–5285, 2006.
- [247] B. Newland, F. Ehret, F. Hoppe, D. Eigel, D. Pette, H. Newland, P. B. Welzel, G. Kempermann, and C. Werner, “Macroporous heparin-based microcarriers allow long-term 3D culture and differentiation of neural precursor cells,” *Biomaterials*, vol. 230, p. 119540, 2020.
- [248] T. T. Lau, L. W. Ho, and D.-A. Wang, “Hepatogenesis of murine induced pluripotent stem cells in 3D micro-cavitary hydrogel system for liver regeneration,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 28, pp. 6659–6669, 2013.
- [249] T. H. Qazi, D. J. Mooney, G. N. Duda, and S. Geissler, “Biomaterials that promote cell-cell interactions enhance the paracrine function of MSCs,” *Biomaterials*, vol. 140, pp. 103–114, 2017.
- [250] M. Bao, J. Xie, A. Piruska, and W. T. Huck, “3D microniches reveal the importance of cell size and shape,” *Nature Communications*, vol. 8, no. 1, p. 1962, 2017.
- [251] S. Liu, M. Jin, Y. Chen, H. Gao, X. Shi, W. Cheng, L. Ren, and Y. Wang, “High internal phase emulsions stabilised by supramolecular cellulose nanocrystals and their application as cell-adhesive macroporous hydrogel monoliths,” *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 5, no. 14, pp. 2671–2678, 2017.
- [252] D. Lu, Z. Zeng, Z. Geng, C. Guo, D. Pei, J. Zhang, and S. Yu, “Macroporous methacrylated hyaluronic acid hydrogel with different pore sizes for in vitro and in vivo evaluation of vascularization,” *Biomedical Materials*, vol. 17, no. 2, p. 025006, 2022.

- [253] Y. Liu, Q. Hu, W. Dong, S. Liu, H. Zhang, and Y. Gu, "Alginate/gelatin-based hydrogel with soy protein/peptide powder for 3D printing tissue-engineering scaffolds to promote angiogenesis," *Macromolecular Bioscience*, vol. 22, no. 4, p. 2100413, 2022.
- [254] N. Zhao, M. R. Battig, M. Xu, X. Wang, N. Xiong, and Y. Wang, "Development of a dual-functional hydrogel using RGD and anti-VEGF aptamer," *Macromolecular Bioscience*, vol. 17, no. 11, p. 1700201, 2017.
- [255] C. Fan and D.-A. Wang, "Macroporous hydrogel scaffolds for three-dimensional cell culture and tissue engineering," *Tissue Engineering Part B : Reviews*, vol. 23, no. 5, pp. 451–461, 2017.
- [256] O.-W. Merten, "Advances in cell culture : anchorage dependence," *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences*, vol. 370, no. 1661, p. 20140040, 2015.
- [257] A. Z. Unal and J. L. West, "Synthetic ECM : bioactive synthetic hydrogels for 3D tissue engineering," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 31, no. 10, pp. 2253–2271, 2020.
- [258] J. H. Collier and T. Segura, "Evolving the use of peptides as components of biomaterials," *Biomaterials*, vol. 32, no. 18, pp. 4198–4204, 2011.
- [259] Y. Feng and M. Mrksich, "The synergy peptide PHSRN and the adhesion peptide RGD mediate cell adhesion through a common mechanism," *Biochemistry*, vol. 43, no. 50, pp. 15 811–15 821, 2004.
- [260] M. Fittkau, P. Zilla, D. Bezuidenhout, M. Lutolf, P. Human, J. A. Hubbell, and N. Davies, "The selective modulation of endothelial cell mobility on RGD peptide containing surfaces by YIGSR peptides," *Biomaterials*, vol. 26, no. 2, pp. 167–174, 2005.
- [261] K. A. Kyburz and K. S. Anseth, "Three-dimensional hMSC motility within peptide-functionalized peg-based hydrogels of varying adhesivity and crosslinking density," *Acta Biomaterialia*, vol. 9, no. 5, pp. 6381–6392, 2013.
- [262] G. Maheshwari, G. Brown, D. A. Lauffenburger, A. Wells, and L. G. Griffith, "Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering," *Journal of Cell Science*, vol. 113, no. 10, pp. 1677–1686, 2000.
- [263] K. Y. Lee, E. Alsberg, S. Hsiong, W. Comisar, J. Linderman, R. Ziff, and D. Mooney, "Nanoscale adhesion ligand organization regulates osteoblast proliferation and differentiation," *Nano Letters*, vol. 4, no. 8, pp. 1501–1506, 2004.
- [264] Z. Wang, X. Zhu, and R. Zhang, "Characterization and analysis of collective cellular behaviors in 3D dextran hydrogels with homogenous and clustered RGD compositions," *Materials*, vol. 12, no. 20, p. 3391, 2019.

- [265] H. Thakar, S. M. Sebastian, S. Mandal, A. Pople, G. Agarwal, and A. Srivastava, "Biomolecule-conjugated macroporous hydrogels for biomedical applications," *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 5, no. 12, pp. 6320–6341, 2019.
- [266] A. S. Gobin and J. L. West, "Effects of epidermal growth factor on fibroblast migration through biomimetic hydrogels," *Biotechnology Progress*, vol. 19, no. 6, pp. 1781–1785, 2003.
- [267] T. Haddad, S. Noel, B. Liberelle, R. El Ayoubi, A. Ajji, and G. De Crescenzo, "Fabrication and surface modification of poly lactic acid (PLA) scaffolds with epidermal growth factor for neural tissue engineering," *Biomatter*, vol. 6, no. 1, p. e1231276, 2016.
- [268] M. Norouzi, I. Shabani, F. Atyabi, and M. Soleimani, "EGF-loaded nanofibrous scaffold for skin tissue engineering applications," *Fibers and Polymers*, vol. 16, pp. 782–787, 2015.
- [269] O. M. Wroblewski, E. E. Vega-Soto, M. H. Nguyen, P. S. Cederna, and L. M. Larkin, "Impact of human epidermal growth factor on tissue-engineered skeletal muscle structure and function," *Tissue Engineering Part A*, vol. 27, no. 17-18, pp. 1151–1159, 2021.
- [270] D. Dou, G. Zhou, H. Liu, J. Zhang, M. Liu, X. Xiao, J. Fei, X. Guan, and Y. Fan, "Sequential releasing of VEGF and BMP-2 in hydroxyapatite collagen scaffolds for bone tissue engineering : Design and characterization," *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 123, pp. 622–628, 2019.
- [271] G. Marchioli, A. D. Luca, E. de Koning, M. Engelse, C. A. Van Blitterswijk, M. Kaperien, A. A. Van Apeldoorn, and L. Moroni, "Hybrid polycaprolactone/alginate scaffolds functionalized with VEGF to promote de novo vessel formation for the transplantation of islets of langerhans," *Advanced Healthcare Materials*, vol. 5, no. 13, pp. 1606–1616, 2016.
- [272] J. Y. Park, J.-H. Shim, S.-A. Choi, J. Jang, M. Kim, S. H. Lee, and D.-W. Cho, "3D printing technology to control BMP-2 and VEGF delivery spatially and temporally to promote large-volume bone regeneration," *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 3, no. 27, pp. 5415–5425, 2015.
- [273] Y. Miyagi, L. L. Chiu, M. Cimini, R. D. Weisel, M. Radisic, and R.-K. Li, "Biodegradable collagen patch with covalently immobilized VEGF for myocardial repair," *Biomaterials*, vol. 32, no. 5, pp. 1280–1290, 2011.
- [274] S. P. Parthiban, D. Rana, E. Jabbari, N. Benkirane-Jessel, and M. Ramalingam, "Covalently immobilized VEGF-mimicking peptide with gelatin methacrylate enhances microvascularization of endothelial cells," *Acta Biomaterialia*, vol. 51, pp. 330–340, 2017.

- [275] B. K. Mann, R. H. Schmedlen, and J. L. West, "Tethered-TGF- β increases extracellular matrix production of vascular smooth muscle cells," *Biomaterials*, vol. 22, no. 5, pp. 439–444, 2001.
- [276] M. C. Schneider, S. Chu, M. A. Randolph, and S. J. Bryant, "An in vitro and in vivo comparison of cartilage growth in chondrocyte-laden matrix metalloproteinase-sensitive poly (ethylene glycol) hydrogels with localized transforming growth factor β 3," *Acta Biomaterialia*, vol. 93, pp. 97–110, 2019.
- [277] H. S. Nanda, S. Chen, Q. Zhang, N. Kawazoe, and G. Chen, "Collagen scaffolds with controlled insulin release and controlled pore structure for cartilage tissue engineering," *BioMed Research International*, vol. 2014, 2014.
- [278] L. Gong, J. Li, J. Zhang, Z. Pan, Y. Liu, F. Zhou, Y. Hong, Y. Hu, Y. Gu, H. Ouyang *et al.*, "An interleukin-4-loaded bi-layer 3D printed scaffold promotes osteochondral regeneration," *Acta Biomaterialia*, vol. 117, pp. 246–260, 2020.
- [279] G. Bozzuto and A. Molinari, "Liposomes as nanomedical devices," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 10, p. 975, 2015.
- [280] K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, and W. E. Rudzinski, "Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices," *Journal of Controlled Release*, vol. 70, no. 1-2, pp. 1–20, 2001.
- [281] K. S. Soni, S. S. Desale, and T. K. Bronich, "Nanogels : An overview of properties, biomedical applications and obstacles to clinical translation," *Journal of Controlled Release*, vol. 240, pp. 109–126, 2016.
- [282] A. Malik, J. M. Khan, A. S. Alhomida, M. S. Ola, M. A. Alshehri, and A. Ahmad, "Metal nanoparticles : Biomedical applications and their molecular mechanisms of toxicity," *Chemical Papers*, vol. 76, no. 10, pp. 6073–6095, 2022.
- [283] A. Bitar, N. M. Ahmad, H. Fessi, and A. Elaissari, "Silica-based nanoparticles for biomedical applications," *Drug Discovery Today*, vol. 17, no. 19-20, pp. 1147–1154, 2012.
- [284] M. Jiao, P. Zhang, J. Meng, Y. Li, C. Liu, X. Luo, and M. Gao, "Recent advancements in biocompatible inorganic nanoparticles towards biomedical applications," *Biomaterials Science*, vol. 6, no. 4, pp. 726–745, 2018.
- [285] F. J. Martinez-Veracoechea and M. E. Leunissen, "The entropic impact of tethering, multivalency and dynamic recruitment in systems with specific binding groups," *Soft Matter*, vol. 9, no. 12, pp. 3213–3219, 2013.
- [286] W. Wang, A. Voigt, M. W. Wolff, U. Reichl, and K. Sundmacher, "Binding kinetics and multi-bond : Finding correlations by synthesizing interactions between ligand-coated

- bionanoparticles and receptor surfaces,” *Analytical Biochemistry*, vol. 505, pp. 8–17, 2016.
- [287] T. Duruel, A. S. Çakmak, A. Akman, R. M. Nohutcu, and M. Gümüşderelioglu, “Sequential IGF-1 and BMP-6 releasing chitosan/alginate/PLGA hybrid scaffolds for periodontal regeneration,” *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 104, pp. 232–241, 2017.
- [288] K. L. Spiller, Y. Liu, J. L. Holloway, S. A. Maher, Y. Cao, W. Liu, G. Zhou, and A. M. Lowman, “A novel method for the direct fabrication of growth factor-loaded microspheres within porous nondegradable hydrogels : controlled release for cartilage tissue engineering,” *Journal of Controlled Release*, vol. 157, no. 1, pp. 39–45, 2012.
- [289] M. T. Poldervaart, H. Wang, J. van der Stok, H. Weinans, S. C. Leeuwenburgh, F. C. Öner, W. J. Dhert, and J. Alblas, “Sustained release of BMP-2 in bioprinted alginate for osteogenicity in mice and rats,” *PloS One*, vol. 8, no. 8, p. e72610, 2013.
- [290] D. Dems, R. Freeman, K. D. Riker, T. Coradin, S. I. Stupp, and C. Aimé, “Multivalent clustering of adhesion ligands in nanofiber-nanoparticle composites,” *Acta Biomaterialia*, vol. 119, pp. 303–311, 2021.
- [291] B. Wang, W. Wang, Y. Yu, Y. Zhang, J. Zhang, and Z. Yuan, “The study of angiogenesis stimulated by multivalent peptide ligand-modified alginate,” *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces*, vol. 154, pp. 383–390, 2017.
- [292] K. Zhu, S. R. Shin, T. van Kempen, Y.-C. Li, V. Ponraj, A. Nasajpour, S. Mandla, N. Hu, X. Liu, J. Leijten *et al.*, “Gold nanocomposite bioink for printing 3D cardiac constructs,” *Advanced Functional Materials*, vol. 27, no. 12, p. 1605352, 2017.
- [293] S. R. Shin, S. M. Jung, M. Zalabany, K. Kim, P. Zorlutuna, S. b. Kim, M. Nikkhah, M. Khabiry, M. Azize, J. Kong *et al.*, “Carbon-nanotube-embedded hydrogel sheets for engineering cardiac constructs and bioactuators,” *ACS Nano*, vol. 7, no. 3, pp. 2369–2380, 2013.
- [294] H. Xu, G. Zhang, K. Xu, L. Wang, L. Yu, M. M. Xing, and X. Qiu, “Mussel-inspired dual-functional PEG hydrogel inducing mineralization and inhibiting infection in maxillary bone reconstruction,” *Materials Science and Engineering : C*, vol. 90, pp. 379–386, 2018.
- [295] E. I. Alarcon, K. I. Udekwu, C. W. Noel, L. B.-P. Gagnon, P. K. Taylor, B. Vulesevic, M. J. Simpson, S. Gkotzis, M. M. Islam, C.-J. Lee *et al.*, “Safety and efficacy of composite collagen–silver nanoparticle hydrogels as tissue engineering scaffolds,” *Nanoscale*, vol. 7, no. 44, pp. 18 789–18 798, 2015.

- [296] S. A. Fisher, A. E. Baker, and M. S. Shoichet, "Designing peptide and protein modified hydrogels : selecting the optimal conjugation strategy," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 139, no. 22, pp. 7416–7427, 2017.
- [297] K. S. Masters, "Covalent growth factor immobilization strategies for tissue repair and regeneration," *Macromolecular bioscience*, vol. 11, no. 9, pp. 1149–1163, 2011.
- [298] C. E. Hoyle and C. N. Bowman, "Thiol–ene click chemistry," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 49, no. 9, pp. 1540–1573, 2010.
- [299] M. Uygun, M. A. Tasdelen, and Y. Yagci, "Influence of type of initiation on thiol–ene "click" chemistry," *Macromolecular Chemistry and Physics*, vol. 211, no. 1, pp. 103–110, 2010.
- [300] C. A. DeForest and K. S. Anseth, "Photoreversible patterning of biomolecules within click-based hydrogels," *Angewandte Chemie*, vol. 124, no. 8, pp. 1852–1855, 2012.
- [301] D. P. Nair, M. Podgorski, S. Chatani, T. Gong, W. Xi, C. R. Fenoli, and C. N. Bowman, "The thiol-michael addition click reaction : a powerful and widely used tool in materials chemistry," *Chemistry of Materials*, vol. 26, no. 1, pp. 724–744, 2014.
- [302] S. Noel, C. Fortier, F. Murschel, A. Belzil, G. Gaudet, M. Jolicœur, and G. De Crescenzo, "Co-immobilization of adhesive peptides and VEGF within a dextran-based coating for vascular applications," *Acta Biomaterialia*, vol. 37, pp. 69–82, 2016.
- [303] R. Y. Tam, M. J. Cooke, and M. S. Shoichet, "A covalently modified hydrogel blend of hyaluronan–methyl cellulose with peptides and growth factors influences neural stem/progenitor cell fate," *Journal of Materials Chemistry*, vol. 22, no. 37, pp. 19 402–19 411, 2012.
- [304] B. Colak, S. Di Cio, and J. E. Gautrot, "Biofunctionalized patterned polymer brushes via thiol–ene coupling for the control of cell adhesion and the formation of cell arrays," *Biomacromolecules*, vol. 19, no. 5, pp. 1445–1455, 2018.
- [305] S. I. Presolski, V. P. Hong, and M. Finn, "Copper-catalyzed azide–alkyne click chemistry for bioconjugation," *Current Protocols in Chemical Biology*, vol. 3, no. 4, pp. 153–162, 2011.
- [306] R. Poręba, A. de los Santos Pereira, R. Pola, S. Jiang, O. Pop-Georgievski, Z. Sedláková, and H. Schönherr, "“clickable” and antifouling block copolymer brushes as a versatile platform for peptide-specific cell attachment," *Macromolecular Bioscience*, vol. 20, no. 4, p. 1900354, 2020.
- [307] N. J. Agard, J. A. Prescher, and C. R. Bertozzi, "A strain-promoted [3+2] azide–alkyne cycloaddition for covalent modification of biomolecules in living systems," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 126, no. 46, pp. 15 046–15 047, 2004.

- [308] T. N. Gevrek and A. Sanyal, “Furan-containing polymeric materials : Harnessing the diels-alder chemistry for biomedical applications,” *European Polymer Journal*, vol. 153, p. 110514, 2021.
- [309] E. Cambria, K. Renggli, C. C. Ahrens, C. D. Cook, C. Kroll, A. T. Krueger, B. Imperiali, and L. G. Griffith, “Covalent modification of synthetic hydrogels with bioactive proteins via sortase-mediated ligation,” *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 8, pp. 2316–2326, 2015.
- [310] K. A. Mosiewicz, L. Kolb, A. J. Van Der Vlies, M. M. Martino, P. S. Lienemann, J. A. Hubbell, M. Ehrbar, and M. P. Lutolf, “In situ cell manipulation through enzymatic hydrogel photopatterning,” *Nature Materials*, vol. 12, no. 11, pp. 1072–1078, 2013.
- [311] L.-S. Wang, F. Lee, J. Lim, C. Du, A. C. Wan, S. S. Lee, and M. Kurisawa, “Enzymatic conjugation of a bioactive peptide into an injectable hyaluronic acid–tyramine hydrogel system to promote the formation of functional vasculature,” *Acta Biomaterialia*, vol. 10, no. 6, pp. 2539–2550, 2014.
- [312] L. Abune and Y. Wang, “Affinity hydrogels for protein delivery,” *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 42, no. 4, pp. 300–312, 2021.
- [313] M. M. Pakulska, S. Miersch, and M. S. Shoichet, “Designer protein delivery : From natural to engineered affinity-controlled release systems,” *Science*, vol. 351, no. 6279, p. aac4750, 2016.
- [314] C. He, H. Ji, Y. Qian, Q. Wang, X. Liu, W. Zhao, and C. Zhao, “Heparin-based and heparin-inspired hydrogels : size-effect, gelation and biomedical applications,” *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 7, no. 8, pp. 1186–1208, 2019.
- [315] M. Jia, Z. Shi, X. Yan, L. Xu, L. Dong, J. Li, Y. Wang, S. Yang, and F. Yuan, “Insulin and heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor synergistically promote astrocyte survival and proliferation in serum-free medium,” *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 307, pp. 240–247, 2018.
- [316] D. T. Dao, L. Anez-Bustillos, R. M. Adam, M. Puder, and D. R. Bielenberg, “Heparin-binding epidermal growth factor–like growth factor as a critical mediator of tissue repair and regeneration,” *The American Journal of Pathology*, vol. 188, no. 11, pp. 2446–2456, 2018.
- [317] S. Trujillo, C. Gonzalez-Garcia, P. Rico, A. Reid, J. Windmill, M. J. Dalby, and M. Salmeron-Sanchez, “Engineered 3d hydrogels with full-length fibronectin that sequester and present growth factors,” *Biomaterials*, vol. 252, p. 120104, 2020.
- [318] M. H. Hettiaratchi, C. Chou, N. Servies, J. M. Smeekens, A. Cheng, C. Esancy, R. Wu, T. C. McDevitt, R. E. Guldborg, and L. Krishnan, “Competitive protein binding in-

- fluences heparin-based modulation of spatial growth factor delivery for bone regeneration,” *Tissue Engineering Part A*, vol. 23, no. 13-14, pp. 683–695, 2017.
- [319] J. H. Lee, X. Luo, X. Ren, T. C. Tan, R. A. Smith, K. Swaminathan, S. Sekar, K. Bhakoo, V. Nurcombe, J. H. Hui *et al.*, “A heparan sulfate device for the regeneration of osteochondral defects,” *Tissue Engineering Part A*, vol. 25, no. 5-6, pp. 352–363, 2019.
- [320] R. G. Wylie, S. Ahsan, Y. Aizawa, K. L. Maxwell, C. M. Morshead, and M. S. Shoichet, “Spatially controlled simultaneous patterning of multiple growth factors in three-dimensional hydrogels,” *Nature Materials*, vol. 10, no. 10, pp. 799–806, 2011.
- [321] R. Y. Tam, S. A. Fisher, A. E. Baker, and M. S. Shoichet, “Transparent porous polysaccharide cryogels provide biochemically defined, biomimetic matrices for tunable 3D cell culture,” *Chemistry of Materials*, vol. 28, no. 11, pp. 3762–3770, 2016.
- [322] V. Huynh and R. G. Wylie, “Competitive affinity release for long-term delivery of antibodies from hydrogels,” *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 57, no. 13, pp. 3406–3410, 2018.
- [323] ———, “Displacement affinity release of antibodies from injectable hydrogels,” *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 11, no. 34, pp. 30 648–30 660, 2019.
- [324] C. Addi, F. Murschel, and G. De Crescenzo, “Design and use of chimeric proteins containing a collagen-binding domain for wound healing and bone regeneration,” *Tissue Engineering Part B : Reviews*, vol. 23, no. 2, pp. 163–182, 2017.
- [325] Y. Zhao, J. Zhang, X. Wang, B. Chen, Z. Xiao, C. Shi, Z. Wei, X. Hou, Q. Wang, and J. Dai, “The osteogenic effect of bone morphogenetic protein-2 on the collagen scaffold conjugated with antibodies,” *Journal of Controlled Release*, vol. 141, no. 1, pp. 30–37, 2010.
- [326] J. H. Choi, A. Park, W. Lee, J. Youn, M. A. Rim, W. Kim, N. Kim, J. E. Song, and G. Khang, “Preparation and characterization of an injectable dexamethasone-cyclodextrin complexes-loaded gellan gum hydrogel for cartilage tissue engineering,” *Journal of Controlled Release*, vol. 327, pp. 747–765, 2020.
- [327] J. B. Lee, J. E. Kim, D. A. Balikov, M. S. Bae, D. N. Heo, D. Lee, H. J. Rim, D.-W. Lee, H.-J. Sung, and I. K. Kwon, “Poly (L-lactic acid)/gelatin fibrous scaffold loaded with simvastatin/ β -cyclodextrin-modified hydroxyapatite inclusion complex for bone tissue regeneration,” *Macromolecular bioscience*, vol. 16, no. 7, pp. 1027–1038, 2016.
- [328] L. Abune, N. Zhao, J. Lai, B. Peterson, S. Szczesny, and Y. Wang, “Macroporous hydrogels for stable sequestration and sustained release of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor using nucleic acid aptamers,” *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 5, no. 5, pp. 2382–2390, 2019.

- [329] Z. Zhang, C. Liu, C. Yang, Y. Wu, F. Yu, Y. Chen, and J. Du, "Aptamer-patterned hydrogel films for spatiotemporally programmable capture and release of multiple proteins," *ACS Applied Materials & Interfaces*, vol. 10, no. 10, pp. 8546–8554, 2018.
- [330] N. K. Agrawal, P. Allen, Y. H. Song, R. A. Wachs, Y. Du, A. D. Ellington, and C. E. Schmidt, "Oligonucleotide-functionalized hydrogels for sustained release of small molecule (aptamer) therapeutics," *Acta Biomaterialia*, vol. 102, pp. 315–325, 2020.
- [331] K. Vulic and M. S. Shoichet, "Tunable growth factor delivery from injectable hydrogels for tissue engineering," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 134, no. 2, pp. 882–885, 2012.
- [332] M. M. Pakulska, K. Vulic, and M. S. Shoichet, "Affinity-based release of chondroitinase ABC from a modified methylcellulose hydrogel," *Journal of Controlled Release*, vol. 171, no. 1, pp. 11–16, 2013.
- [333] J. Parker, N. Mitrousis, and M. S. Shoichet, "Hydrogel for simultaneous tunable growth factor delivery and enhanced viability of encapsulated cells in vitro," *Biomacromolecules*, vol. 17, no. 2, pp. 476–484, 2016.
- [334] C.-C. Lin and K. S. Anseth, "Controlling affinity binding with peptide-functionalized poly (ethylene glycol) hydrogels," *Advanced Functional Materials*, vol. 19, no. 14, pp. 2325–2331, 2009.
- [335] D. N. Woolfson, "The design of coiled-coil structures and assemblies," in *Advances in Protein Chemistry*. Elsevier, 2005, vol. 70, pp. 79–112.
- [336] F. Crick, "The packing of α -helices : simple coiled-coils," *Acta Crystallographica*, vol. 6, no. 8-9, pp. 689–697, 1953.
- [337] V. N. Malashkevich, R. A. Kammerer, V. P. Efimov, T. Schulthess, and J. Engel, "The crystal structure of a five-stranded coiled coil in COMP : a prototype ion channel?" *Science*, vol. 274, no. 5288, pp. 761–765, 1996.
- [338] E. K. O'Shea, J. D. Klemm, P. S. Kim, and T. Alber, "X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil," *Science*, vol. 254, no. 5031, pp. 539–544, 1991.
- [339] D. A. Parry, R. B. Fraser, and J. M. Squire, "Fifty years of coiled-coils and α -helical bundles : A close relationship between sequence and structure," *Journal of Structural Biology*, vol. 163, no. 3, pp. 258–269, 2008.
- [340] G. De Crescenzo, J. R. Litowski, R. S. Hodges, and M. D. O'Connor-McCourt, "Real-time monitoring of the interactions of two-stranded de novo designed coiled-coils : effect of chain length on the kinetic and thermodynamic constants of binding," *Biochemistry*, vol. 42, no. 6, pp. 1754–1763, 2003.

- [341] A. Slovic, J. Lear, and W. DeGrado, “De novo design of a pentameric coiled-coil : decoding the motif for tetramer versus pentamer formation in water-soluble phospholamban,” *The Journal of Peptide Research*, vol. 65, no. 3, pp. 312–321, 2005.
- [342] B. Apostolovic, M. Danial, and H.-A. Klok, “Coiled coils : attractive protein folding motifs for the fabrication of self-assembled, responsive and bioactive materials,” *Chemical Society Reviews*, vol. 39, no. 9, pp. 3541–3575, 2010.
- [343] N. A. Schnarr and A. J. Kennan, “pH-triggered strand exchange in coiled-coil heterotrimers,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 125, no. 21, pp. 6364–6365, 2003.
- [344] R. A. Kammerer and M. O. Steinmetz, “De novo design of a two-stranded coiled-coil switch peptide,” *Journal of Structural Biology*, vol. 155, no. 2, pp. 146–153, 2006.
- [345] A. N. Lupas and M. Gruber, “The structure of α -helical coiled coils,” in *Advances in Protein Chemistry*. Elsevier, 2005, vol. 70, pp. 37–38.
- [346] H. Chao, M. E. Houston, S. Grothe, C. M. Kay, M. O’Connor-McCourt, R. T. Irvin, and R. S. Hodges, “Kinetic study on the formation of a de novo designed heterodimeric coiled-coil : use of surface plasmon resonance to monitor the association and dissociation of polypeptide chains,” *Biochemistry*, vol. 35, no. 37, pp. 12 175–12 185, 1996.
- [347] F. Murschel, C. Fortier, M. Jolicoeur, R. S. Hodges, and G. De Crescenzo, “Two complementary approaches for the controlled release of biomolecules immobilized via coiled-coil interactions : Peptide core mutations and multivalent presentation,” *Biomacromolecules*, vol. 18, no. 3, pp. 965–975, 2017.
- [348] H. Chao, D. L. Bautista, J. Litowski, R. T. Irvin, and R. S. Hodges, “Use of a heterodimeric coiled-coil system for biosensor application and affinity purification,” *Journal of Chromatography B : Biomedical Sciences and Applications*, vol. 715, no. 1, pp. 307–329, 1998.
- [349] C. Boucher, G. St-Laurent, M. Loignon, M. Jolicoeur, G. De Crescenzo, and Y. Durocher, “The bioactivity and receptor affinity of recombinant tagged EGF designed for tissue engineering applications is defined by the nature and position of the tags,” *Tissue Engineering Part A*, vol. 14, no. 12, pp. 2069–2077, 2008.
- [350] F. Murschel, B. Liberelle, G. St-Laurent, M. Jolicoeur, Y. Durocher, and G. De Crescenzo, “Coiled-coil-mediated grafting of bioactive vascular endothelial growth factor,” *Acta Biomaterialia*, vol. 9, no. 6, pp. 6806–13, 2013.
- [351] C. Addi, F. Murschel, B. Liberelle, N. Riahi, and G. De Crescenzo, “A highly versatile adaptor protein for the tethering of growth factors to gelatin-based biomaterials,” *Acta Biomaterialia*, vol. 50, pp. 198–206, 2017.

- [352] S. F. Baniahmad, R. Oliverio, I. Obregon-Gomez, A. Robert, A. E. Lenferink, E. Pazos, N. Virgilio, X. Banquy, G. De Crescenzo, and Y. Durocher, "Affinity-controlled capture and release of engineered monoclonal antibodies by macroporous dextran hydrogels using coiled-coil interactions," *MAbs*, vol. 15, no. 1, p. 2218951, 2023.
- [353] A. Roth, F. Murschel, P. L. Latreille, V. A. Martinez, B. Liberelle, X. Banquy, and G. De Crescenzo, "Coiled coil affinity-based systems for the controlled release of bio-functionalized gold nanoparticles from alginate hydrogels," *Biomacromolecules*, vol. 20, no. 5, pp. 1926–1936, 2019.
- [354] J. Robert, D. S. Chauhan, A. Cherraj, J. Buiel, G. De Crescenzo, and X. Banquy, "Coiled-coil peptide-based assembly of a plasmonic core-satellite polymer-metal nanocomposite as an efficient photothermal agent for drug delivery applications," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 641, pp. 929–941, 2023.
- [355] B. Liberelle, C. Boucher, J. Chen, M. Jolicoeur, Y. Durocher, and G. De Crescenzo, "Impact of epidermal growth factor tethering strategy on cellular response," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 21, no. 12, pp. 2257–2266, 2010.
- [356] P. Lequoy, F. Murschel, B. Liberelle, S. Lerouge, and G. De Crescenzo, "Controlled co-immobilization of EGF and VEGF to optimize vascular cell survival," *Acta Biomaterialia*, vol. 29, pp. 239–247, 2016.
- [357] G. Tallec, C. Loh, B. Liberelle, A. Garcia-Ac, S. V. Duy, S. Sauve, X. Banquy, F. Murschel, and G. De Crescenzo, "Adequate reducing conditions enable conjugation of oxidized peptides to polymers by one-pot thiol click chemistry," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 29, no. 11, pp. 3866–3876, 2018.
- [358] M. Dégardin, B. Liberelle, R. Oliverio, S. F. Baniahmad, C. Darviot, I. Largillière, O. Henry, Y. Durocher, X. Banquy, M. Meunier *et al.*, "Coiled-coil-based biofunctionalization of 100 nm gold nanoparticles with the trastuzumab antibody for the detection of HER2-positive cancer cells," *Langmuir*, vol. 39, no. 34, pp. 12 235–12 247, 2023.
- [359] C. Boucher, G. St-Laurent, M. Jolicoeur, G. De Crescenzo, and Y. Durocher, "Protein detection by western blot via coiled-coil interactions," *Analytical Biochemistry*, vol. 399, no. 1, pp. 138–140, 2010.
- [360] B. Liberelle, L. Bartholin, C. Boucher, F. Murschel, M. Jolicoeur, Y. Durocher, A. Merzouki, and G. De Crescenzo, "New ELISA approach based on coiled-coil interactions," *Journal of Immunological Methods*, vol. 362, no. 1-2, pp. 161–167, 2010.
- [361] F. Cambay, O. Henry, Y. Durocher, and G. De Crescenzo, "Impact of N-glycosylation on Fcγ receptor / IgG interactions : unravelling differences with an enhanced

- surface plasmon resonance biosensor assay based on coiled-coil interactions,” *MAbs*, vol. 11, no. 3, pp. 435–452, 2019.
- [362] C. Aronsson, S. Dänmark, F. Zhou, P. Öberg, K. Enander, H. Su, and D. Aili, “Self-sorting heterodimeric coiled coil peptides with defined and tuneable self-assembly properties,” *Scientific Reports*, vol. 5, no. 1, pp. 1–10, 2015.
- [363] S. Danmark, C. Aronsson, and D. Aili, “Tailoring supramolecular peptide–poly (ethylene glycol) hydrogels by coiled coil self-assembly and self-sorting,” *Biomacromolecules*, vol. 17, no. 6, pp. 2260–2267, 2016.
- [364] C. Skyttner, R. Selegård, J. Larsson, C. Aronsson, K. Enander, and D. Aili, “Sequence and length optimization of membrane active coiled coils for triggered liposome release,” *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, vol. 1861, no. 2, pp. 449–456, 2019.
- [365] S. V. Lopes, M. N. Collins, R. L. Reis, J. M. Oliveira, and J. Silva-Correia, “Vascularization approaches in tissue engineering : Recent developments on evaluation tests and modulation,” *ACS Applied Bio Materials*, vol. 4, no. 4, pp. 2941–2956, 2021.
- [366] S. Shafiee, S. Shariatzadeh, A. Zafari, A. Majd, and H. Niknejad, “Recent advances on cell-based co-culture strategies for prevascularization in tissue engineering,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 9, p. 745314, 2021.
- [367] R. J. Lee, M. L. Springer, W. E. Blanco-Bose, R. Shaw, P. C. Ursell, and H. M. Blau, “VEGF gene delivery to myocardium : deleterious effects of unregulated expression,” *Circulation*, vol. 102, no. 8, pp. 898–901, 2000.
- [368] A. Krüger-Genge, A. Blocki, R.-P. Franke, and F. Jung, “Vascular endothelial cell biology : an update,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 20, no. 18, p. 4411, 2019.
- [369] R. Sun, J. Huang, and B. Sun, “Mobilization of endothelial progenitor cells in sepsis,” *Inflammation Research*, vol. 69, pp. 1–9, 2020.
- [370] S. L. Natividad-Diaz, S. Browne, A. K. Jha, Z. Ma, S. Hossainy, Y. K. Kurokawa, S. C. George, and K. E. Healy, “A combined hiPSC-derived endothelial cell and in vitro microfluidic platform for assessing biomaterial-based angiogenesis,” *Biomaterials*, vol. 194, pp. 73–83, 2019.
- [371] K.-S. Choi, H.-J. Choi, J.-K. Lee, S. Im, H. Zhang, Y. Jeong, J. A. Park, I.-K. Lee, Y.-M. Kim, and Y.-G. Kwon, “The endothelial E3 ligase HECW2 promotes endothelial cell junctions by increasing AMOTL1 protein stability via K63-linked ubiquitination,” *Cellular Signalling*, vol. 28, no. 11, pp. 1642–1651, 2016.
- [372] S. Li, L. R. Nih, H. Bachman, P. Fei, Y. Li, E. Nam, R. Dimatteo, S. T. Carmichael, T. H. Barker, and T. Segura, “Hydrogels with precisely controlled integrin activation

- dictate vascular patterning and permeability,” *Nature Materials*, vol. 16, no. 9, pp. 953–961, 2017.
- [373] X. Li, J. Xia, C. T. Niolescu, M. W. Massidda, T. J. Ryan, and J. Tien, “Engineering of microscale vascularized fat that responds to perfusion with liposensitive hormones,” *Biofabrication*, vol. 11, no. 1, p. 014101, 2018.
- [374] J. Liu, H. Long, D. Zeuschner, A. F. Räder, W. J. Polacheck, H. Kessler, L. Sorokin, and B. Trappmann, “Synthetic extracellular matrices with tailored adhesiveness and degradability support lumen formation during angiogenic sprouting,” *Nature Communications*, vol. 12, no. 1, p. 3402, 2021.
- [375] D. B. Kolesky, R. L. Truby, A. S. Gladman, T. A. Busbee, K. A. Homan, and J. A. Lewis, “3D bioprinting of vascularized, heterogeneous cell-laden tissue constructs,” *Advanced Materials*, vol. 26, no. 19, pp. 3124–3130, 2014.
- [376] R. Xie, W. Zheng, L. Guan, Y. Ai, and Q. Liang, “Engineering of hydrogel materials with perfusable microchannels for building vascularized tissues,” *Small*, vol. 16, no. 15, p. 1902838, 2020.
- [377] L. Perry, S. Ben-Shaul, S. Landau, and S. Levenberg, “Co-culture systems for vasculogenesis,” in *Vascularization for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Springer, 2021, pp. 385–413.
- [378] R. Montesano, M. S. Pepper, and L. Orci, “Paracrine induction of angiogenesis in vitro by swiss 3T3 fibroblasts,” *Journal of Cell Science*, vol. 105, no. 4, pp. 1013–1024, 1993.
- [379] S. Landau, S. Ben-Shaul, and S. Levenberg, “Oscillatory strain promotes vessel stabilization and alignment through fibroblast YAP-mediated mechanosensitivity,” *Advanced Science*, vol. 5, no. 9, p. 1800506, 2018.
- [380] S. Heydarkhan-Hagvall, G. Helenius, B. R. Johansson, J. Y. Li, E. Mattsson, and B. Risberg, “Co-culture of endothelial cells and smooth muscle cells affects gene expression of angiogenic factors,” *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 89, no. 6, pp. 1250–1259, 2003.
- [381] A. Orlidge and P. A. D’Amore, “Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells,” *The Journal of Cell Biology*, vol. 105, no. 3, pp. 1455–1462, 1987.
- [382] X. Chen, A. S. Aledia, C. M. Ghajar, C. K. Griffith, A. J. Putnam, C. C. Hughes, and S. C. George, “Prevascularization of a fibrin-based tissue construct accelerates the formation of functional anastomosis with host vasculature,” *Tissue Engineering Part A*, vol. 15, no. 6, pp. 1363–1371, 2009.

- [383] X. Chen, A. S. Aledia, S. A. Popson, L. Him, C. C. Hughes, and S. C. George, "Rapid anastomosis of endothelial progenitor cell-derived vessels with host vasculature is promoted by a high density of cotransplanted fibroblasts," *Tissue Engineering Part A*, vol. 16, no. 2, pp. 585–594, 2010.
- [384] A. Freiman, Y. Shandalov, D. Rozenfeld, E. Shor, S. Segal, D. Ben-David, S. Meretzki, D. Egozi, and S. Levenberg, "Adipose-derived endothelial and mesenchymal stem cells enhance vascular network formation on three-dimensional constructs in vitro," *Stem Cell Research & Therapy*, vol. 7, no. 1, pp. 1–12, 2016.
- [385] K. Duan, B. C. Dash, D. C. Sasson, S. Islam, J. Parker, and H. C. Hsia, "Human iPSC-derived vascular smooth muscle cells in a fibronectin functionalized collagen hydrogel augment endothelial cell morphogenesis," *Bioengineering*, vol. 8, no. 12, p. 223, 2021.
- [386] E. B. Peters, N. Christoforou, K. W. Leong, G. A. Truskey, and J. L. West, "Poly (ethylene glycol) hydrogel scaffolds containing cell-adhesive and protease-sensitive peptides support microvessel formation by endothelial progenitor cells," *Cellular and Molecular Bioengineering*, vol. 9, pp. 38–54, 2016.
- [387] Y. Zheng, J. Chen, M. Craven, N. W. Choi, S. Totorica, A. Diaz-Santana, P. Kermani, B. Hempstead, C. Fischbach-Teschl, J. A. López *et al.*, "In vitro microvessels for the study of angiogenesis and thrombosis," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 109, no. 24, pp. 9342–9347, 2012.
- [388] M. W. Laschke and M. D. Menger, "Prevascularization in tissue engineering : current concepts and future directions," *Biotechnology Advances*, vol. 34, no. 2, pp. 112–121, 2016.
- [389] S. Masuda, K. Matsuura, M. Anazawa, T. Iwamiya, T. Shimizu, and T. Okano, "Formation of vascular network structures within cardiac cell sheets from mouse embryonic stem cells," *Regenerative Therapy*, vol. 2, pp. 6–16, 2015.
- [390] H. Sekine, T. Shimizu, K. Sakaguchi, I. Dobashi, M. Wada, M. Yamato, E. Kobayashi, M. Umez, and T. Okano, "In vitro fabrication of functional three-dimensional tissues with perfusable blood vessels," *Nature Communications*, vol. 4, no. 1, p. 1399, 2013.
- [391] L. F. Mendes, R. P. Pirraco, W. Szymczyk, A. M. Frias, T. C. Santos, R. L. Reis, and A. P. Marques, "Perivascular-like cells contribute to the stability of the vascular network of osteogenic tissue formed from cell sheet-based constructs," *PloS One*, vol. 7, no. 7, p. e41051, 2012.
- [392] L. Ren, D. Ma, B. Liu, J. Li, J. Chen, D. Yang, and P. Gao, "Preparation of three-dimensional vascularized MSC cell sheet constructs for tissue regeneration," *BioMed Research International*, vol. 2014, 2014.

- [393] M. E. Sakalem, M. T. De Sibio, F. A. d. S. da Costa, and M. de Oliveira, “Historical evolution of spheroids and organoids, and possibilities of use in life sciences and medicine,” *Biotechnology Journal*, vol. 16, no. 5, p. 2000463, 2021.
- [394] H. A. Strobel, S. M. Moss, and J. B. Hoying, “Vascularized tissue organoids,” *Bioengineering*, vol. 10, no. 2, p. 124, 2023.
- [395] K. Salewski and J. M. Penninger, “Blood vessel organoids for development and disease,” *Circulation Research*, vol. 132, no. 4, pp. 498–510, 2023.
- [396] R. A. Wimmer, A. Leopoldi, M. Aichinger, D. Kerjaschki, and J. M. Penninger, “Generation of blood vessel organoids from human pluripotent stem cells,” *Nature Protocols*, vol. 14, no. 11, pp. 3082–3100, 2019.
- [397] M. Markou, D. Kouroupis, F. Badounas, A. Katsouras, A. Kyrkou, T. Fotsis, C. Murphy, and E. Bagli, “Tissue engineering using vascular organoids from human pluripotent stem cell derived mural cell phenotypes,” *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 8, p. 278, 2020.
- [398] C. S. Ong, T. Fukunishi, H. Zhang, C. Y. Huang, A. Nashed, A. Blazeski, D. DiSilvestre, L. Vricella, J. Conte, L. Tung *et al.*, “Biomaterial-free three-dimensional bioprinting of cardiac tissue using human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes,” *Scientific Reports*, vol. 7, no. 1, p. 4566, 2017.
- [399] G. A. Figtree, K. J. Bubb, O. Tang, E. Kizana, and C. Gentile, “Vascularized cardiac spheroids as novel 3D in vitro models to study cardiac fibrosis,” *Cells Tissues Organs*, vol. 204, no. 3-4, pp. 191–198, 2017.
- [400] M. A. Kuss, S. Wu, Y. Wang, J. B. Untrauer, W. Li, J. Y. Lim, and B. Duan, “Prevascularization of 3D printed bone scaffolds by bioactive hydrogels and cell co-culture,” *Journal of Biomedical Materials Research Part B : Applied Biomaterials*, vol. 106, no. 5, pp. 1788–1798, 2018.
- [401] L. Benmeridja, L. De Moor, E. De Maere, F. Vanlauwe, M. Ryx, L. Tytgat, C. Vercruysse, P. Dubruel, S. Van Vlierberghe, P. Blondeel *et al.*, “High-throughput fabrication of vascularized adipose microtissues for 3D bioprinting,” *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 14, no. 6, pp. 840–854, 2020.
- [402] R. Walser, W. Metzger, A. Görg, T. Pohlemann, M. Menger, and M. Laschke, “Generation of co-culture spheroids as vascularisation units for bone tissue engineering,” *European Cells and Materials*, vol. 26, pp. 222–233, 2013.
- [403] M. Inamori, H. Mizumoto, and T. Kajiwarra, “An approach for formation of vascularized liver tissue by endothelial cell-covered hepatocyte spheroid integration,” *Tissue Engineering Part A*, vol. 15, no. 8, pp. 2029–2037, 2009.

- [404] B. M. Roux, B. Akar, W. Zhou, K. Stojkova, B. Barrera, J. Brankov, and E. M. Brey, "Preformed vascular networks survive and enhance vascularization in critical sized cranial defects," *Tissue Engineering Part A*, vol. 24, no. 21-22, pp. 1603–1615, 2018.
- [405] B. M. Roux, M. K. Vaicik, B. Shrestha, S. Montelongo, K. Stojkova, F. Yang, T. Guda, A. Cinar, and E. M. Brey, "Induced pluripotent stem cell-derived endothelial networks accelerate vascularization but not bone regeneration," *Tissue Engineering Part A*, vol. 27, no. 13-14, pp. 940–961, 2021.
- [406] D. N. Heo, M. Hospodiuk, and I. T. Ozbolat, "Synergistic interplay between human MSCs and HUVECs in 3D spheroids laden in collagen/fibrin hydrogels for bone tissue engineering," *Acta Biomaterialia*, vol. 95, pp. 348–356, 2019.
- [407] L. De Moor, J. Smet, M. Plovyt, B. Bekaert, C. Vercruysse, M. Asadian, N. De Geyter, S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, and H. Declercq, "Engineering microvasculature by 3D bioprinting of prevascularized spheroids in photo-crosslinkable gelatin," *Biofabrication*, vol. 13, no. 4, p. 045021, 2021.
- [408] J. S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, and L. M. Ensign, "PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 99, pp. 28–51, 2016.
- [409] R. Oliverio, B. Liberelle, F. Murschel, A. Garcia-Ac, X. Banquy, and G. De Crescenzo, "Versatile and high-throughput strategy for the quantification of proteins bound to nanoparticles," *ACS Applied Nano Materials*, vol. 3, no. 10, pp. 10 497–10 507, 2020.
- [410] R. Oliverio, V. Patenaude, B. Liberelle, N. Virgilio, X. Banquy, and G. De Crescenzo, "Macroporous dextran hydrogels for controlled growth factor capture and delivery using coiled-coil interactions," *Acta Biomaterialia*, 2022.
- [411] J. Wang, S. Tian, R. A. Petros, M. E. Napier, and J. M. DeSimone, "The complex role of multivalency in nanoparticles targeting the transferrin receptor for cancer therapies," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 132, no. 32, pp. 11 306–11 313, 2010.
- [412] S. Tenzer, D. Docter, J. Kuharev, A. Musyanovych, V. Fetz, R. Hecht, F. Schlenk, D. Fischer, K. Kiouptsi, and C. Reinhardt, "Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology," *Nature Nanotechnology*, vol. 8, no. 10, p. 772, 2013.
- [413] N. A. Belsey, A. G. Shard, and C. Minelli, "Analysis of protein coatings on gold nanoparticles by XPS and liquid-based particle sizing techniques," *Biointerphases*, vol. 10, no. 1, p. 019012, 2015.

- [414] A. E. James and J. D. Driskell, “Monitoring gold nanoparticle conjugation and analysis of biomolecular binding with nanoparticle tracking analysis (NTA) and dynamic light scattering (DLS),” *Analyst*, vol. 138, no. 4, pp. 1212–1218, 2013.
- [415] R. Wang, L. Chen, D. Li, R. Liu, and G. Ge, “Concurrent detection of protein adsorption on mixed nanoparticles by differential centrifugal sedimentation,” *Particle & Particle Systems Characterization*, vol. 34, no. 12, p. 1700134, 2017.
- [416] A. M. Davidson, M. Brust, D. L. Cooper, and M. Volk, “Sensitive analysis of protein adsorption to colloidal gold by differential centrifugal sedimentation,” *Analytical Chemistry*, vol. 89, no. 12, pp. 6807–6814, 2017.
- [417] G. J. Worsley, N. Kumarswami, C. Minelli, and J. E. Noble, “Characterisation of antibody conjugated particles and their influence on diagnostic assay response,” *Analytical Methods*, vol. 7, no. 22, pp. 9596–9603, 2015.
- [418] A. Bekdemir and F. Stellacci, “A centrifugation-based physicochemical characterization method for the interaction between proteins and nanoparticles,” *Nature Communications*, vol. 7, no. 1, pp. 1–8, 2016.
- [419] M. Bouchoucha, E. Béliveau, F. Kleitz, F. Calon, and M.-A. Fortin, “Antibody-conjugated mesoporous silica nanoparticles for brain microvessel endothelial cell targeting,” *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 5, no. 37, pp. 7721–7735, 2017.
- [420] U. S. Toti, B. R. Guru, A. E. Grill, and J. Panyam, “Interfacial activity assisted surface functionalization : a novel approach to incorporate maleimide functional groups and cRGD peptide on polymeric nanoparticles for targeted drug delivery,” *Molecular Pharmaceutics*, vol. 7, no. 4, pp. 1108–1117, 2010.
- [421] N. Fernández-Iglesias and J. Bettmer, “Complementary mass spectrometric techniques for the quantification of the protein corona : a case study on gold nanoparticles and human serum proteins,” *Nanoscale*, vol. 7, no. 34, pp. 14 324–14 331, 2015.
- [422] L. Shang and G. U. Nienhaus, “In situ characterization of protein adsorption onto nanoparticles by fluorescence correlation spectroscopy,” *Accounts of Chemical Research*, vol. 50, no. 2, pp. 387–395, 2017.
- [423] K. Kristensen, A. J. Urquhart, E. Thormann, and T. L. Andresen, “Binding of human serum albumin to PEGylated liposomes : insights into binding numbers and dynamics by fluorescence correlation spectroscopy,” *Nanoscale*, vol. 8, no. 47, pp. 19 726–19 736, 2016.
- [424] P. Maffre, K. Nienhaus, F. Amin, W. J. Parak, and G. U. Nienhaus, “Characterization of protein adsorption onto FePt nanoparticles using dual-focus fluorescence correlation spectroscopy,” *Beilstein Journal of Nanotechnology*, vol. 2, no. 1, pp. 374–383, 2011.

- [425] C. Röcker, M. Pötzl, F. Zhang, W. J. Parak, and G. U. Nienhaus, “A quantitative fluorescence study of protein monolayer formation on colloidal nanoparticles,” *Nature Nanotechnology*, vol. 4, no. 9, pp. 577–580, 2009.
- [426] M. Horáček, D. J. Engels, and P. Zijlstra, “Dynamic single-molecule counting for the quantification and optimization of nanoparticle functionalization protocols,” *Nanoscale*, vol. 12, no. 6, pp. 4128–4136, 2020.
- [427] D. Casanova, D. Giaume, M. Moreau, J.-L. Martin, T. Gacoin, J.-P. Boilot, and A. Alexandrou, “Counting the number of proteins coupled to single nanoparticles,” *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, no. 42, pp. 12 592–12 593, 2007.
- [428] H. Zhang and P. Guo, “Single molecule photobleaching (SMPB) technology for counting of RNA, DNA, protein and other molecules in nanoparticles and biological complexes by TIRF instrumentation,” *Methods*, vol. 67, no. 2, pp. 169–176, 2014.
- [429] A. Chen, D. Kozak, B. J. Battersby, and M. Trau, “Particle-by-particle quantification of protein adsorption onto poly (ethylene glycol) grafted surfaces,” *Biofouling*, vol. 24, no. 4, pp. 267–273, 2008.
- [430] S. W. Graves, T. A. Woods, H. Kim, and J. P. Nolan, “Direct fluorescent staining and analysis of proteins on microspheres using CBQCA,” *Cytometry Part A : The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, vol. 65, no. 1, pp. 50–58, 2005.
- [431] L. Zhang, D. Hu, M. Salmain, B. Liedberg, and S. Boujday, “Direct quantification of surface coverage of antibody in IgG-gold nanoparticles conjugates,” *Talanta*, vol. 204, pp. 875–881, 2019.
- [432] P. D. Quevedo, T. Behnke, and U. Resch-Genger, “Streptavidin conjugation and quantification—a method evaluation for nanoparticles,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 408, no. 15, pp. 4133–4149, 2016.
- [433] M. J. Oviedo, K. Quester, G. A. Hirata, and R. Vazquez-Duhalt, “Determination of conjugated protein on nanoparticles by an adaptation of the coomassie blue dye method,” *MethodsX*, vol. 6, pp. 2134–2140, 2019.
- [434] N. E. Pollok, C. Rabin, L. Smith, and R. M. Crooks, “Orientation-controlled bioconjugation of antibodies to silver nanoparticles,” *Bioconjugate Chemistry*, vol. 30, no. 12, pp. 3078–3086, 2019.
- [435] D. Lizoňová, M. Majerská, V. Král, M. Pechar, R. Pola, M. Kovář, and F. Štěpánek, “Antibody-pHPMA functionalised fluorescent silica nanoparticles for colorectal carcinoma targeting,” *RSC Advances*, vol. 8, no. 39, pp. 21 679–21 689, 2018.

- [436] S. Liu, J. Horak, M. Höldrich, and M. Lämmerhofer, “Accurate and reliable quantification of the protein surface coverage on protein-functionalized nanoparticles,” *Analytica Chimica Acta*, vol. 989, pp. 29–37, 2017.
- [437] J. E. Noble and M. J. Bailey, *Quantitation of protein*. Elsevier, 2009, vol. 463, pp. 73–95.
- [438] J. M. Walker, *The Protein Protocols Handbook*. Springer Science & Business Media, 1996, vol. 1996.
- [439] A. Aitken and M. P. Learmonth, “Protein determination by UV absorption,” in *The Protein Protocols Handbook*. Springer, 2009, pp. 3–6.
- [440] J. M. Walker, *The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation*. Springer, 2009, pp. 11–15.
- [441] N. J. Kruger, *The Bradford method for protein quantitation*. Springer, 2009, pp. 17–24.
- [442] R. M. Lequin, “Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),” *Clinical Chemistry*, vol. 51, no. 12, pp. 2415–2418, 2005.
- [443] R. Fields, *The rapid determination of amino groups with TNBS*. Elsevier, 1972, vol. 25, pp. 464–468.
- [444] S. Udenfriend, S. Stein, P. Boehlen, W. Dairman, W. Leimgruber, and M. Weigele, “Fluorescamine : a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins, and primary amines in the picomole range,” *Science*, vol. 178, no. 4063, pp. 871–872, 1972.
- [445] W. W. You, R. P. Haugland, D. K. Ryan, and R. P. Haugland, “3-(4-carboxybenzoyl) quinoline-2-carboxaldehyde, a reagent with broad dynamic range for the assay of proteins and lipoproteins in solution,” *Analytical Biochemistry*, vol. 244, no. 2, pp. 277–282, 1997.
- [446] I. Davidson, *Hydrolysis of samples for amino acid analysis*. Springer, 1997, pp. 119–129.
- [447] P. Hunziker and M. A. Alterman, *Amino Acid Analysis : Methods and Protocols*. Springer Verlag, 2011.
- [448] B. Tyler, D. Gullotti, A. Mangraviti, T. Utsuki, and H. Brem, “Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 107, pp. 163–175, 2016.
- [449] R. Z. Xiao, Z. W. Zeng, G. L. Zhou, J. J. Wang, F. Z. Li, and A. M. Wang, “Recent advances in PEG–PLA block copolymer nanoparticles,” *International Journal of Nanomedicine*, vol. 5, p. 1057, 2010.

- [450] P. Ghosh, G. Han, M. De, C. K. Kim, and V. M. Rotello, "Gold nanoparticles in delivery applications," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, no. 11, pp. 1307–1315, 2008.
- [451] R. A. Sperling, P. R. Gil, F. Zhang, M. Zanella, and W. J. Parak, "Biological applications of gold nanoparticles," *Chemical Society Reviews*, vol. 37, no. 9, pp. 1896–1908, 2008.
- [452] L. Wang, W. Zhao, and W. Tan, "Bioconjugated silica nanoparticles : development and applications," *Nano Research*, vol. 1, no. 2, pp. 99–115, 2008.
- [453] H. Shi, H. Bi, B. Yao, and L. Zhang, "Dissolution of Au nanoparticles in hydrochloric acid solution as studied by optical absorption," *Applied Surface Science*, vol. 161, no. 1, pp. 276–278, 2000.
- [454] M. Damm, M. Holzer, G. Radspieler, G. Marsche, and C. O. Kappe, "Microwave-assisted high-throughput acid hydrolysis in silicon carbide microtiter platforms — a rapid and low volume sample preparation technique for total amino acid analysis in proteins and peptides," *Journal of Chromatography A*, vol. 1217, no. 50, pp. 7826–7832, 2010.
- [455] N. Riahi, F. Murschel, S. Lerouge, Y. Durocher, O. Henry, and G. De Crescenzo, "Bioavailability of immobilized epidermal growth factor : Covalent versus noncovalent grafting," *Biointerphases*, vol. 12, no. 1, p. 010501, 2017.
- [456] T. Rode García, A. García Ac, A. Lalloz, F.-X. Lacasse, P. Hildgen, J.-M. Rabanel, and X. Banquy, "Unified scaling of the structure and loading of nanoparticles formed by diffusion-limited coalescence," *Langmuir*, vol. 34, no. 20, pp. 5772–5780, 2018.
- [457] A. Lalloz, M.-A. Bolzinger, S. Briançon, J. Faivre, J.-M. Rabanel, A. G. Ac, P. Hildgen, and X. Banquy, "Subtle and unexpected role of peg in tuning the penetration mechanisms of PLA-based nano-formulations into intact and impaired skin," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 563, pp. 79–90, 2019.
- [458] J. Han, Z. Zhu, H. Qian, A. R. Wohl, C. J. Beaman, T. R. Hoyer, and C. W. Macosko, "A simple confined impingement jets mixer for flash nanoprecipitation," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 101, no. 10, pp. 4018–4023, 2012.
- [459] S. Kumar, J. Aaron, and K. Sokolov, "Directional conjugation of antibodies to nanoparticles for synthesis of multiplexed optical contrast agents with both delivery and targeting moieties," *Nature Protocols*, vol. 3, no. 2, p. 314, 2008.
- [460] A. S. A. Habeeb, "Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzene-sulfonic acid," *Analytical Biochemistry*, vol. 14, no. 3, pp. 328–336, 1966.
- [461] J. Andrade and M. Estévez-Pérez, "Statistical comparison of the slopes of two regression lines : A tutorial," *Analytica Chimica Acta*, vol. 838, pp. 1–12, 2014.

- [462] K. A. Majorek, P. J. Porebski, A. Dayal, M. D. Zimmerman, K. Jablonska, A. J. Stewart, M. Chruszcz, and W. Minor, "Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins," *Molecular Immunology*, vol. 52, no. 3, pp. 174–182, 2012.
- [463] Drugbank, "Trastuzumab," <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00072>, 2005, [En ligne; consulté le 25 juin 2020].
- [464] S. Hunt, *Degradation of amino acids accompanying in vitro protein hydrolysis*. Springer, 1985, pp. 376–398.
- [465] S. L. Filbrun and J. D. Driskell, "A fluorescence-based method to directly quantify antibodies immobilized on gold nanoparticles," *Analyst*, vol. 141, no. 12, pp. 3851–3857, 2016.
- [466] R. Kozlowski, A. Ragupathi, and R. B. Dyer, "Characterizing the surface coverage of protein–gold nanoparticle bioconjugates," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 29, no. 8, pp. 2691–2700, 2018.
- [467] K. Lee, E. A. Silva, and D. J. Mooney, "Growth factor delivery-based tissue engineering : general approaches and a review of recent developments," *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 8, no. 55, pp. 153–170, 2011.
- [468] L. M. C. Aguilar, S. M. Silva, and S. E. Moulton, "Growth factor delivery : Defining the next generation platforms for tissue engineering," *Journal of controlled Release*, vol. 306, pp. 40–58, 2019.
- [469] S. Toosi and J. Behravan, "Osteogenesis and bone remodeling : A focus on growth factors and bioactive peptides," *Biofactors*, vol. 46, no. 3, pp. 326–340, 2020.
- [470] J. W. Park, S. R. Hwang, and I.-S. Yoon, "Advanced growth factor delivery systems in wound management and skin regeneration," *Molecules*, vol. 22, no. 8, p. 1259, 2017.
- [471] S. Madduri and B. Gander, "Growth factor delivery systems and repair strategies for damaged peripheral nerves," *Journal of Controlled Release*, vol. 161, no. 2, pp. 274–282, 2012.
- [472] R. Subbiah and R. E. Guldborg, "Materials science and design principles of growth factor delivery systems in tissue engineering and regenerative medicine," *Advanced Healthcare Materials*, vol. 8, no. 1, p. 1801000, 2019.
- [473] M. V. Dinu and E. S. Dragan, *Macroporous Hydrogels : Preparation, Properties, and Applications*. Singapore : Springer Singapore, 2018, pp. 51–85.
- [474] J. Tao, X. Xu, H. Liu, X. Jiang, J. Mao, and M. Gou, "A nanoparticle-functionalized wound dressing device for toxin neutralization," *Materials & Design*, vol. 188, p. 108431, 2020.

- [475] M. H. Hettiaratchi and M. S. Shoichet, “Modulated protein delivery to engineer tissue repair,” *Tissue Engineering Part A*, vol. 25, no. 13-14, pp. 925–930, 2019.
- [476] M. R. Battig, Y. Huang, N. Chen, and Y. Wang, “Aptamer-functionalized superporous hydrogels for sequestration and release of growth factors regulated via molecular recognition,” *Biomaterials*, vol. 35, no. 27, pp. 8040–8048, 2014.
- [477] J. Wang, R. Youngblood, L. Cassinotti, M. Skoumal, G. Corfas, and L. Shea, “An injectable PEG hydrogel controlling neurotrophin-3 release by affinity peptides,” *Journal of Controlled Release*, vol. 330, pp. 575–586, 2021.
- [478] J. Utterström, S. Naeimipour, R. Selegård, and D. Aili, “Coiled coil-based therapeutics and drug delivery systems,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2020.
- [479] Y. Assal, Y. Mizuguchi, M. Mie, and E. Kobatake, “Growth factor tethering to protein nanoparticles via coiled-coil formation for targeted drug delivery,” *Bioconjugate Chemistry*, vol. 26, no. 8, pp. 1672–1677, 2015.
- [480] Y. Assal, M. Mie, and E. Kobatake, “The promotion of angiogenesis by growth factors integrated with ECM proteins through coiled-coil structures,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 13, pp. 3315–3323, 2013.
- [481] M. G. Grewal, V. P. Gray, R. A. Letteri, and C. B. Highley, “User-defined, temporal presentation of bioactive molecules on hydrogel substrates using supramolecular coiled coil complexes,” *Biomaterials Science*, vol. 9, no. 12, pp. 4374–4387, 2021.
- [482] P. Lequoy, B. Liberelle, G. De Crescenzo, and S. Lerouge, “Additive benefits of chondroitin sulfate and oriented tethered epidermal growth factor for vascular smooth muscle cell survival,” *Macromolecular Bioscience*, vol. 14, no. 5, pp. 720–730, 2014.
- [483] P. Lequoy, H. Savoji, B. Saoudi, A. Bertrand-Grenier, M. R. Wertheimer, G. De Crescenzo, G. Soulez, and S. Lerouge, “In vitro and pilot in vivo evaluation of a bioactive coating for stent grafts based on chondroitin sulfate and epidermal growth factor,” *Journal of Vascular and Interventional Radiology*, vol. 27, no. 5, pp. 753–760, 2016.
- [484] C. Fortier, G. De Crescenzo, and Y. Durocher, “A versatile coiled-coil tethering system for the oriented display of ligands on nanocarriers for targeted gene delivery,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 4, pp. 1344–1353, 2013.
- [485] D. L’Abbé, L. Bisson, C. Gervais, E. Grazzini, and Y. Durocher, “Transient gene expression in suspension HEK293-EBNA1 cells,” in *Recombinant Protein Expression in Mammalian Cells*. Springer, 2018, pp. 1–16.
- [486] P. Pham, S. Perret, B. Cass, E. Carpentier, G. St-Laurent, L. Bisson, A. Kamen, and Y. Durocher, “Transient gene expression in HEK293 cells : peptone addition posttrans-

- fection improves recombinant protein synthesis,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 90, no. 3, pp. 332–344, 2005.
- [487] C. T. Rueden, J. Schindelin, M. C. Hiner, B. E. DeZonia, A. E. Walter, E. T. Arena, and K. W. Eliceiri, “ImageJ2 : ImageJ for the next generation of scientific image data,” *BMC Bioinformatics*, vol. 18, no. 1, p. 529, 2017.
- [488] T. Heinze, T. Liebert, B. Heublein, and S. Hornig, “Functional polymers based on dextran,” *Polysaccharides II*, pp. 199–291, 2006.
- [489] T. T. Nielsen, V. Wintgens, C. Amiel, R. Wimmer, and K. L. Larsen, “Facile synthesis of β -cyclodextrin-dextran polymers by “click” chemistry,” *Biomacromolecules*, vol. 11, no. 7, pp. 1710–1715, 2010.
- [490] D. L. Whalen, “Mechanisms of hydrolysis and rearrangements of epoxides,” *Advances in Physical Organic Chemistry*, vol. 40, p. 247, 2005.
- [491] R. Huisgen, “Kinetics and mechanism of 1, 3-dipolar cycloadditions,” *Angewandte Chemie International Edition in English*, vol. 2, no. 11, pp. 633–645, 1963.
- [492] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, and K. B. Sharpless, “A stepwise huisgen cycloaddition process : copper (I)-catalyzed regioselective “ligation” of azides and terminal alkynes,” *Angewandte Chemie*, vol. 114, no. 14, pp. 2708–2711, 2002.
- [493] A. Pötgens, N. H. Lubsen, M. Van Altena, R. Vermeulen, A. Bakker, J. Schoenmakers, D. J. Ruiter, and R. De Waal, “Covalent dimerization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor is essential for its biological activity. Evidence from Cys to Ser mutations,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, no. 52, pp. 32 879–32 885, 1994.
- [494] B. Tripet, K. Wagschal, P. Lavigne, C. T. Mant, and R. S. Hodges, “Effects of side-chain characteristics on stability and oligomerization state of a de novo-designed model coiled-coil : 20 amino acid substitutions in position “d,”” *Journal of Molecular Biology*, vol. 300, no. 2, pp. 377–402, 2000.
- [495] B. Schreier, M. Gekle, and C. Grossmann, “Role of epidermal growth factor receptor in vascular structure and function,” *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, vol. 23, no. 2, 2014.
- [496] B. C. Berk, “Vascular smooth muscle growth : autocrine growth mechanisms,” *Physiological Reviews*, vol. 81, no. 3, pp. 999–1030, 2001.
- [497] R. N. Jorissen, F. Walker, N. Pouliot, T. P. J. Garrett, C. W. Ward, and A. W. Burgess, *Epidermal growth factor receptor : Mechanisms of activation and signalling*. Burlington : Academic Press, 2003, pp. 33–55.

- [498] G. J. Song, K. L. Leslie, S. Barrick, S. Bougoin, J. M. Taboas, and A. Bisello, “EBP50 promotes focal adhesion turnover and vascular smooth muscle cells migration,” *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 53, no. 6, pp. 809–819, 2012.
- [499] H. Xie, M. A. Pallero, K. Gupta, P. Chang, M. F. Ware, W. Witke, D. J. Kwiatkowski, D. A. Lauffenburger, J. E. Murphy-Ullrich, and A. Wells, “EGF receptor regulation of cell motility : EGF induces disassembly of focal adhesions independently of the motility-associated plcgamma signaling pathway,” *Journal of Cell Science*, vol. 111, no. 5, pp. 615–624, 1998.
- [500] Y. Yamanaka, K. Hayashi, T. Komurasaki, S. Morimoto, T. Ogihara, and K. Sobue, “EGF family ligand-dependent phenotypic modulation of smooth muscle cells through EGF receptor,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 281, no. 2, pp. 373–377, 2001.
- [501] U. I. Gerling-Driessen, N. Mujkic-Ninnemann, D. Ponader, D. Schöne, L. Hartmann, and B. Kokschi, “Exploiting oligo (amido amine) backbones for the multivalent presentation of coiled-coil peptides,” *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 8, pp. 2394–2402, 2015.
- [502] L. S. Carasso, I. Benhar, and T. Dvir, “Universal biofactor-releasing scaffold enabling in vivo reloading,” *Nano Letters*, vol. 19, no. 3, pp. 1838–1843, 2019.
- [503] J. Van Brakel and P. Heertjes, “Analysis of diffusion in macroporous media in terms of a porosity, a tortuosity and a constrictivity factor,” *International Journal of Heat and Mass Transfer*, vol. 17, no. 9, pp. 1093–1103, 1974.
- [504] C. Fortier, E. Louvier, Y. Durocher, and G. De Crescenzo, “Tailoring the surface of a gene delivery vector with carboxymethylated dextran : A systematic analysis,” *Biomacromolecules*, vol. 16, no. 6, pp. 1671–1681, 2015.
- [505] G. Camci-Unal, D. Cuttica, N. Annabi, D. Demarchi, and A. Khademhosseini, “Synthesis and characterization of hybrid hyaluronic acid-gelatin hydrogels,” *Biomacromolecules*, vol. 14, no. 4, pp. 1085–1092, 2013.
- [506] Y. H. Choi, S.-H. Kim, I.-S. Kim, K. Kim, S. K. Kwon, and N. S. Hwang, “Gelatin-based micro-hydrogel carrying genetically engineered human endothelial cells for neovascularization,” *Acta Biomaterialia*, vol. 95, pp. 285–296, 2019.
- [507] A. Krüger-Genge, S. Hauser, A. T. Neffe, Y. Liu, A. Lendlein, J. Pietzsch, and F. Jung, “Response of endothelial cells to gelatin-based hydrogels,” *ACS Biomaterials Science & Engineering*, vol. 7, no. 2, pp. 527–540, 2021.
- [508] S. Afewerki, A. Sheikhi, S. Kannan, S. Ahadian, and A. Khademhosseini, “Gelatin-polysaccharide composite scaffolds for 3D cell culture and tissue engineering : Towards

- natural therapeutics,” *Bioengineering & Translational Medicine*, vol. 4, no. 1, pp. 96–115, 2019.
- [509] A. Tchobanian, H. Van Oosterwyck, and P. Fardim, “Polysaccharides for tissue engineering : Current landscape and future prospects,” *Carbohydrate Polymers*, vol. 205, pp. 601–625, 2019.
 - [510] S. P. Massia, J. Stark, and D. S. Letbetter, “Surface-immobilized dextran limits cell adhesion and spreading,” *Biomaterials*, vol. 21, no. 22, pp. 2253–2261, 2000.
 - [511] C. O. Crosby and J. Zoldan, “Mimicking the physical cues of the ecm in angiogenic biomaterials,” *Regenerative Biomaterials*, vol. 6, no. 2, pp. 61–73, 2019.
 - [512] M. Lovett, K. Lee, A. Edwards, and D. L. Kaplan, “Vascularization strategies for tissue engineering,” *Tissue Engineering Part B : Reviews*, vol. 15, no. 3, pp. 353–370, 2009.
 - [513] M. Markou, D. Kouroupis, T. Fotsis, E. Bagli, and C. Murphy, *Vascularization in 3D Cell Culture*. Springer, 2021, pp. 125–145.
 - [514] E. Ruoslahti, “RGD and other recognition sequences for integrins,” *Annual review of Cell and Developmental Biology*, vol. 12, no. 1, pp. 697–715, 1996.
 - [515] N. Ferrara, “Vascular endothelial growth factor,” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 29, no. 6, pp. 789–791, 2009.
 - [516] E. A. Phelps, N. Landázuri, P. M. Thulé, W. R. Taylor, and A. J. García, “Bioartificial matrices for therapeutic vascularization,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107, no. 8, pp. 3323–3328, 2010.
 - [517] J. Boonstra, P. Rijken, B. Humbel, F. Cremers, A. Verkleij, and P. v. B. en Henegouwen, “The epidermal growth factor,” *Cell biology international*, vol. 19, no. 5, pp. 413–430, 1995.
 - [518] N. K. Karamanos, Z. Piperigkou, A. D. Theocharis, H. Watanabe, M. Franchi, S. Baud, S. Brézillon, M. Götte, A. Passi, D. Vigetti *et al.*, “Proteoglycan chemical diversity drives multifunctional cell regulation and therapeutics,” *Chemical Reviews*, vol. 118, no. 18, pp. 9152–9232, 2018.
 - [519] C. Boucher, B. Liberelle, M. Jolicœur, Y. Durocher, and G. De Crescenzo, “Epidermal growth factor tethered through coiled-coil interactions induces cell surface receptor phosphorylation,” *Bioconjugate chemistry*, vol. 20, no. 8, pp. 1569–1577, 2009.
 - [520] F. Bonnier, M. E. Keating, T. P. Wróbel, K. Majzner, M. Baranska, A. Garcia-Munoz, A. Blanco, and H. J. Byrne, “Cell viability assessment using the alamar blue assay : A comparison of 2D and 3D cell culture models,” *Toxicology in Vitro*, vol. 29, no. 1, pp. 124–131, 2015.

- [521] K. W. Ng, D. T. Leong, and D. W. Hutmacher, “The challenge to measure cell proliferation in two and three dimensions,” *Tissue Engineering*, vol. 11, no. 1-2, pp. 182–191, 2005.
- [522] J.-D. Malcor, E. J. Hunter, N. Davidenko, D. V. Bax, R. Cameron, S. Best, S. Sinha, and R. W. Farndale, “Collagen scaffolds functionalized with triple-helical peptides support 3D HUVEC culture,” *Regenerative Biomaterials*, vol. 7, no. 5, pp. 471–482, 2020.
- [523] Q.-K. Lin, Y. Hou, K.-F. Ren, and J. Ji, “Selective endothelial cells adhesion to arg-glu-asn-val peptide functionalized polysaccharide multilayer,” *Thin Solid Films*, vol. 520, no. 15, pp. 4971–4978, 2012.
- [524] M. Khan, J. Yang, C. Shi, J. Lv, Y. Feng, and W. Zhang, “Surface tailoring for selective endothelialization and platelet inhibition via a combination of SI-ATRP and click chemistry using Cys-Ala-Gly-peptide,” *Acta Biomaterialia*, vol. 20, pp. 69–81, 2015.
- [525] Z. Söderlund, A. Ibáñez-Fonseca, S. Hajizadeh, J. Rodríguez-Cabello, J. Liu, L. Ye, E. Tykesson, L. Elowsson, and G. Westergren-Thorsson, “Controlled release of growth factors using synthetic glycosaminoglycans in a modular macroporous scaffold for tissue regeneration,” *Communications Biology*, vol. 5, no. 1, p. 1349, 2022.
- [526] W. Dong, W. Ma, S. Zhao, X. Zhou, Y. Wang, Z. Liu, D. Sun, M. Zhang, and Z. Jiang, “Multifunctional 3D sponge-like macroporous cryogel-modified long carbon fiber reinforced polyetheretherketone implants with enhanced vascularization and osseointegration,” *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 10, no. 28, pp. 5473–5486, 2022.
- [527] K. Saha, A. J. Keung, E. F. Irwin, Y. Li, L. Little, D. V. Schaffer, and K. E. Healy, “Substrate modulus directs neural stem cell behavior,” *Biophysical Journal*, vol. 95, no. 9, pp. 4426–4438, 2008.
- [528] A. S. Rowlands, P. A. George, and J. J. Cooper-White, “Directing osteogenic and myogenic differentiation of MSCs : interplay of stiffness and adhesive ligand presentation,” *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 295, no. 4, pp. C1037–C1044, 2008.
- [529] J. G. Jacot, A. D. McCulloch, and J. H. Omens, “Substrate stiffness affects the functional maturation of neonatal rat ventricular myocytes,” *Biophysical Journal*, vol. 95, no. 7, pp. 3479–3487, 2008.
- [530] A. D. Elliott, “Confocal microscopy : principles and modern practices,” *Current Protocols in Cytometry*, vol. 92, no. 1, p. e68, 2020.
- [531] W. Mao, H.-T. D. Bui, W. Cho, and H. S. Yoo, “Spectroscopic techniques for monitoring stem cell and organoid proliferation in 3D environments for therapeutic development,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, p. 115074, 2023.

- [532] A. Fedi, C. Vitale, P. Giannoni, G. Caluori, and A. Marrella, “Biosensors to monitor cell activity in 3D hydrogel-based tissue models,” *Sensors*, vol. 22, no. 4, p. 1517, 2022.
- [533] S. E. De León, A. Pupovac, and S. L. McArthur, “Three-dimensional (3D) cell culture monitoring : Opportunities and challenges for impedance spectroscopy,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 117, no. 4, pp. 1230–1240, 2020.
- [534] V. Charwat, K. Schütze, W. Holnthoner, A. Lavrentieva, R. Gangnus, P. Hofbauer, C. Hoffmann, B. Angres, and C. Kasper, “Potential and limitations of microscopy and raman spectroscopy for live-cell analysis of 3D cell cultures,” *Journal of Biotechnology*, vol. 205, pp. 70–81, 2015.
- [535] H. K. Yosef and K. Schütze, “Non-destructive and label-free monitoring of 3D cell constructs,” in *Basic Concepts on 3D Cell Culture*. Springer, 2021, pp. 233–250.
- [536] R. Fischer, O. Mader, G. Jung, and R. Brock, “Extending the applicability of carboxyfluorescein in solid-phase synthesis,” *Bioconjugate Chemistry*, vol. 14, no. 3, pp. 653–660, 2003.

ANNEXE A SUPPLEMENTARY INFORMATION – VERSATILE AND HIGH-THROUGHPUT STRATEGY FOR THE QUANTIFICATION OF PROTEINS BOUND TO NANOPARTICLES

Heating Block for Sample Hydrolysis

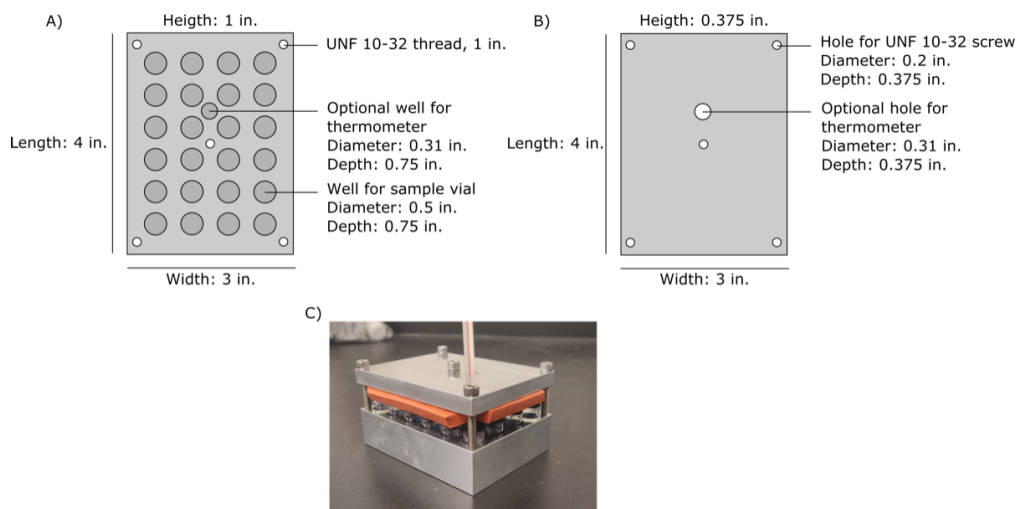


Figure A.1 Custom-made aluminium heating block with 24 wells designed to fit standard chromatography sampler vials. A) blueprint of the bottom part of the heating block with relevant dimensions and characteristics. B) blueprint of the lid of the heating block with relevant dimensions and characteristics. C) picture of the heating block containing 24 chromatography sampler vials. The lid is screwed to the block and the platform is kept sealed with a silicon gasket (in orange). A designated space allows to add a thermometer for temperature control.

Hydrolysis of PLA, AuPEG and SiO₂ NPs

Table A.1 DLS measurements of the hydrodynamic diameter (D_H) of the NPs, before and after hydrolysis (24 hours at 110 °C in 6 M HCl). After hydrolysis, no data (n/d) can be measured by DLS, indicating NP degradation

	PLA NPs	AuPEG NPs	SiO ₂ NPs
D_H before hydrolysis (nm)	130±4	18±2	22±2
D_H after hydrolysis (nm)	n/d	n/d	n/d

Hydrolysis of BSA and TZM

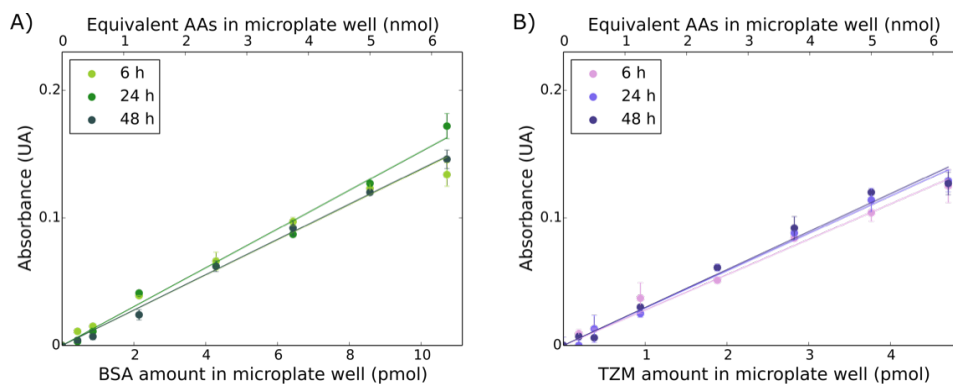


Figure A.2 Relative absorbance (blank subtracted) of A) BSA and B) TZM hydrolysates after derivatisation with TNBS, for three different hydrolysis durations. Bottom horizontal axes represent the A) BSA or B) TZM amounts in a microplate well, while the top horizontal axes represent the equivalent amount of amino acids (AAs). Lines are linear regressions (y -intercept=0), with for each line $R^2 > 0.99$. Each data point is the average of nine measurements from three independent experiments. Error bars show the standard deviation.

Line Comparisons

Table A.2 Absolute values of the t -statistics from the comparison between regression lines from figure 4.4 with the corresponding external calibration curve with proteins only. Two slopes are considered to be significantly different when $t > 2.98$ ($t < 0.01$).

	PLA NPs	AuPEG NPs	SiO ₂ NPs
CGGYIGSR	6.37	0.98	0.38
BSA	0.13	3.18	1.28
TZM	2.58	0.42	0.08

Table A.3 Absolute values of the relative gaps (%) between regression lines from figure 4.4 and the corresponding external calibration curve with proteins only.

	PLA NPs	AuPEG NPs	SiO ₂ NPs
CGGYIGSR	20.59	2.79	1.62
BSA	0.85	18.52	8.31
TZM	19.97	3.35	0.61

Fluorescence Assays at Low NP Concentrations

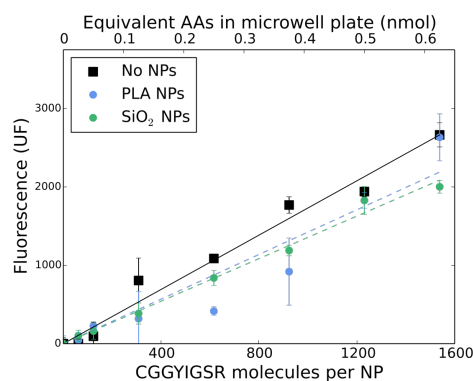


Figure A.3 Relative fluorescence (blank subtracted) of CGGYIGSR hydrolysates after derivatisation with CBQCA. Bottom horizontal axis represents the average number of peptides per NP in the mix, when using ten times less NPs as described in table 4.2 (0.1X) Lines are linear regressions (y-intercept=0), with for each line $0.92 < R^2 < 0.99$. Each data point is the average of nine measurements from three independent experiments. Error bars show the standard deviation.

ANNEXE B SUPPLEMENTARY INFORMATION – MACROPOROUS DEXTRAN HYDROGELS FOR CONTROLLED GROWTH FACTOR CAPTURE AND DELIVERY USING COILED-COIL INTERACTIONS

Scaffolding of the Gels: Schematic Procedure

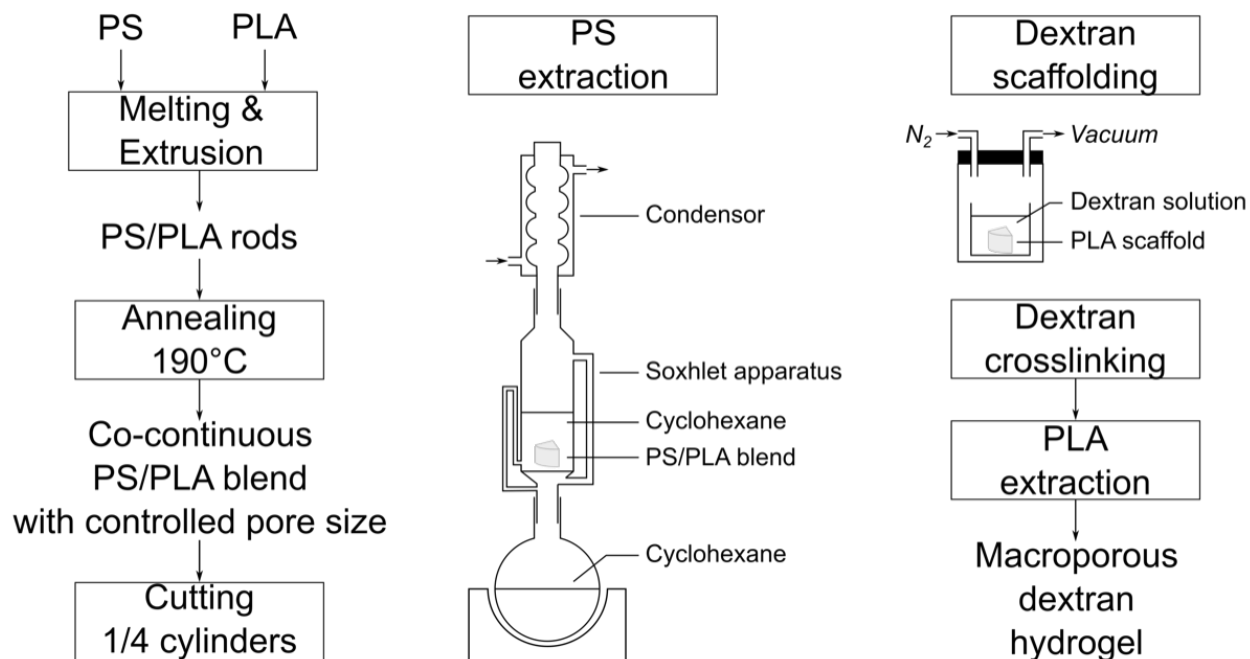


Figure B.1 Schematic procedure of the production of macroporous dextran hydrogels from polystyrene (PS) / polylactic acid (PLA) co-continuous blends.

Macroscopic Aspect and Microscopic Structure of 20-min PLA Scaffolds and Dextran Hydrogels

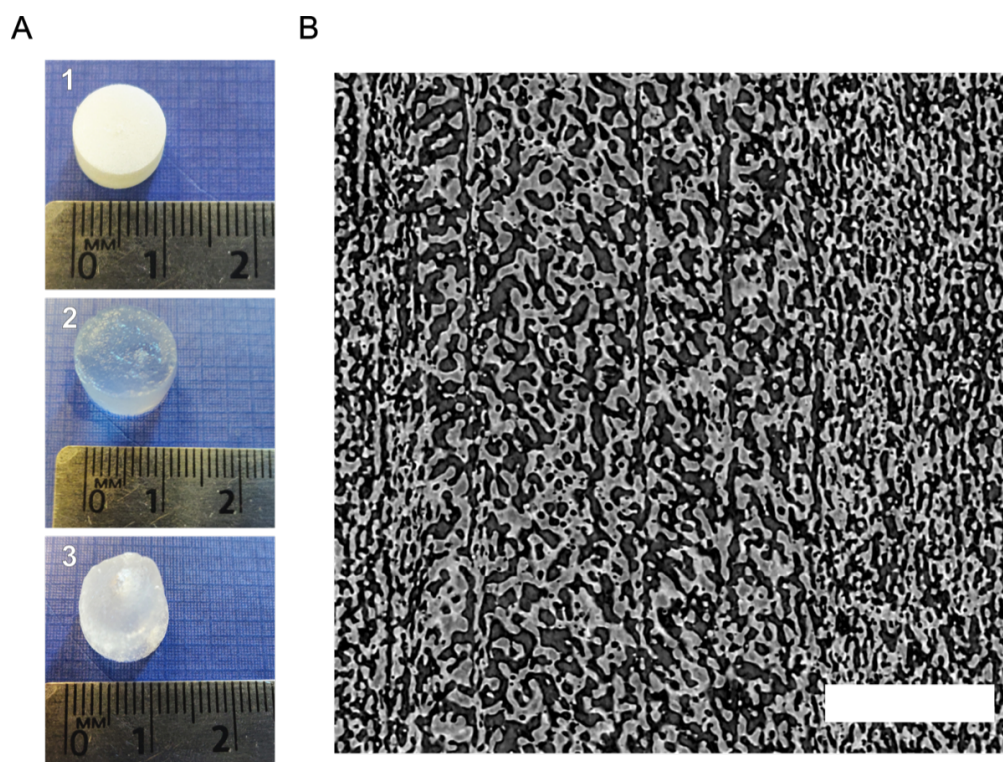


Figure B.2 Aspect and structure of 20-min PLA scaffolds and dextran hydrogels. (A) Macroscopic images of 1) a macroporous PLA scaffold — 20 min quiescent annealing — after extraction of the PS phase, 2) a macroporous dextran hydrogel, after molding on a 20-min PLA scaffold, crosslinking, dissolution of the PLA and swelling in PBS and 3) the same dextran hydrogel with emptied pores. (B) Representative μ CT image of a 20-min PLA scaffold. Light gray areas correspond to the PLA phase. The empty pores are in dark gray. For (C), the scale bar represents 150 μ m.

Evolution of Young's Moduli During the Functionalization of the Gels with Kcoil

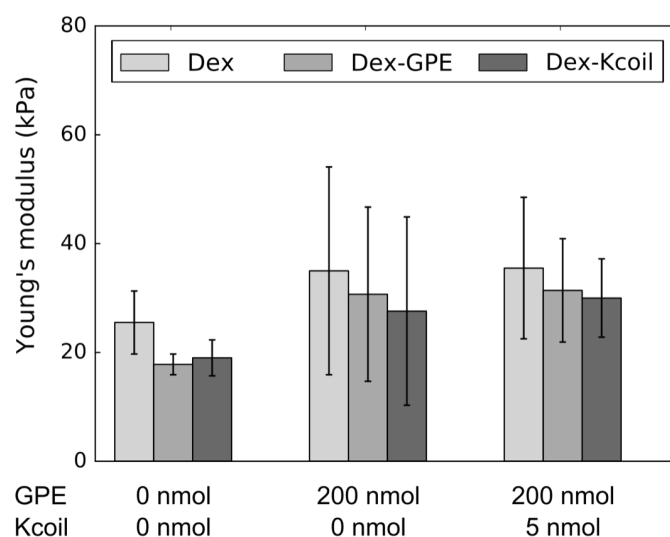


Figure B.3 Evolution of Young's moduli of 60-min macroporous dextran hydrogels during the different steps of gel functionalization with Kcoil. Three conditions are measured: (i) gels that are incubated without GPE or Kcoil, (ii) gels that are functionalized with GPE, but not Kcoil, and (iii) gels that undergo complete functionalization (200 nmol GPE and 5 nmol Kcoil). All gels undergo the pH, temperature and buffer changes that are required for the complete functionalization, regardless of the presence of GPE and Kcoil. Data is mean $\pm$ standard deviation, $n=6$ gels for each condition.

Measurements of the Pore Volumes are Highly Reproducible

Table B.1 Weighing the gels when the pores are full, then empty, is a reproducible way to measure pore volume. Data shown for 3 consecutive pore-emptying procedures, for $n=3$ 60-min macroporous dextran hydrogels.

	Measurement 1		Measurement 2		Measurement 3	
	Mass, pores full (mg)	Mass, pores empty (mg)	Mass, pores full (mg)	Mass, pores empty (mg)	Mass, pores full (mg)	Mass, pores empty (mg)
Gel 1	268	132	262	132	272	131
Gel 2	347	178	332	176	332	177
Gel 3	318	151	326	154	314	157
	V_{pores} (μL)			Mean $\pm$ standard	% Standard	
	Measur. 1	Measur. 2	Measur. 3	deviation (μL)	deviation	
Gel 1	136	130	141	136 ± 4	2.9%	
Gel 2	169	156	155	160 ± 6	3.8%	
Gel 3	167	172	157	165 ± 6	3.6%	

Coiled-coil Mediated Release of Ecoil-EGF: Determination of Hyperbolic Fits

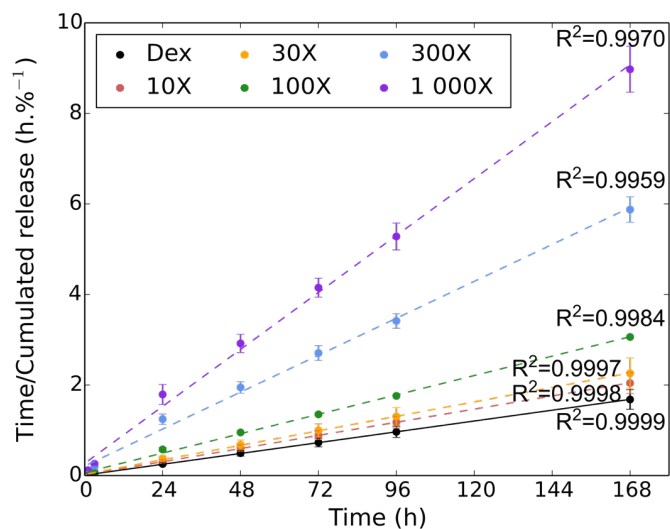


Figure B.4 Time divided by cumulated release evolves linearly as a function of time ($\frac{t}{R(t)} = a \cdot t + b$, $R^2 > 0.99$). We used the linear regression parameters a and b to draw the hyperbolic fits ($R(t) = \frac{1}{a} - \frac{b/a}{a \cdot t + b}$) displayed as guides for the eye in figure 5.4B.

Capture and Release are Mediated by Coiled-coil Interactions

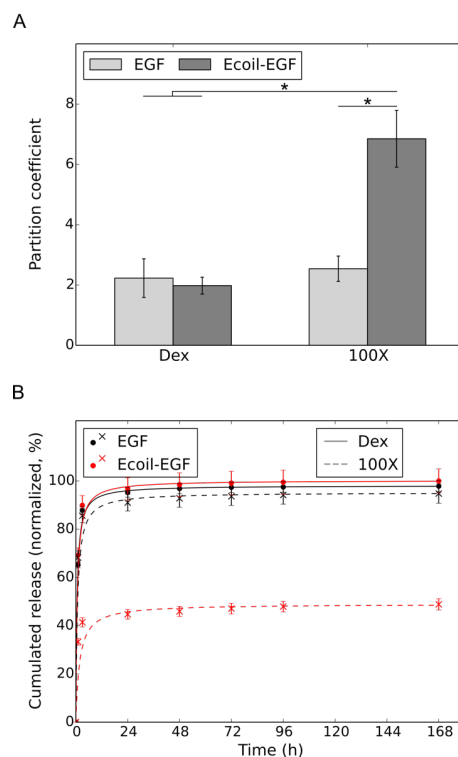


Figure B.5 Capture and release are mediated by coiled-coil interactions. Dextran macroporous hydrogels are functionalized with 5 nmol (100X) of Kcoil. “Dex” represents non-functionalized hydrogels. (A) Partition coefficients characterizing EGF and Ecoil-EGF distribution at equilibrium between the gels and the surrounding medium. (B) Cumulated release of EGF and Ecoil-EGF by dextran hydrogels. Cumulated release is expressed as a percentage of the amount initially loaded in the gels, and data is normalized to 100%. Curves are hyperbolic fits displayed as guides for the eye. Data is mean $\pm$ standard deviation, $n=6$ measurements from 2 independent experiments. * ($p < 0.05$) indicates statistically significant differences in pairwise comparisons (bilateral t -test).

Capture and Release are not Affected by Replacing PBS-T by AoSMC Starving Medium

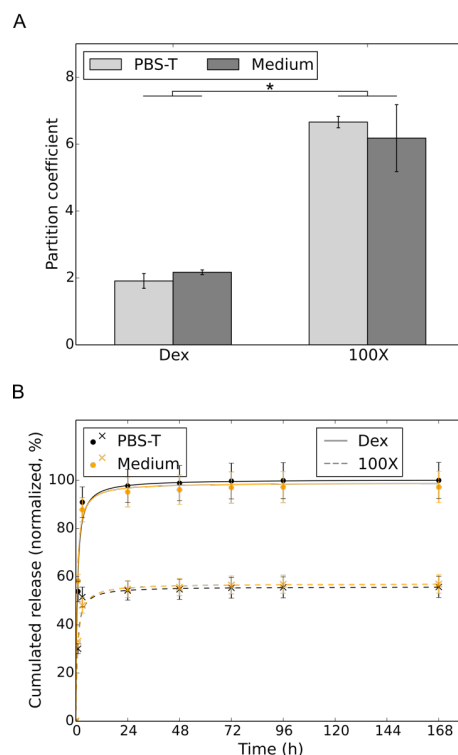


Figure B.6 Capture and release exhibit similar behavior in AoSMC starving medium and in PBS-T. Dextran macroporous hydrogels are functionalized with 5 nmol (100X) of Kcoil. “Dex” represents non-functionalized hydrogels. (A) Partition coefficients characterizing Ecoil-EGF distribution at equilibrium between the gels and the surrounding medium. (B) Cumulated release of Ecoil-EGF by dextran hydrogels. Cumulated release is expressed as a percentage of the amount initially loaded in the gels, and data is normalized to 100%. Curves are hyperbolic fits displayed as guides for the eye. Data is mean $\pm$ standard deviation, $n=6$ measurements from 2 independent experiments. * ($p < 0.05$) indicates statistically significant differences in pairwise comparisons (bilateral t -test).

Cell Proliferation Assay: Experimental Setup

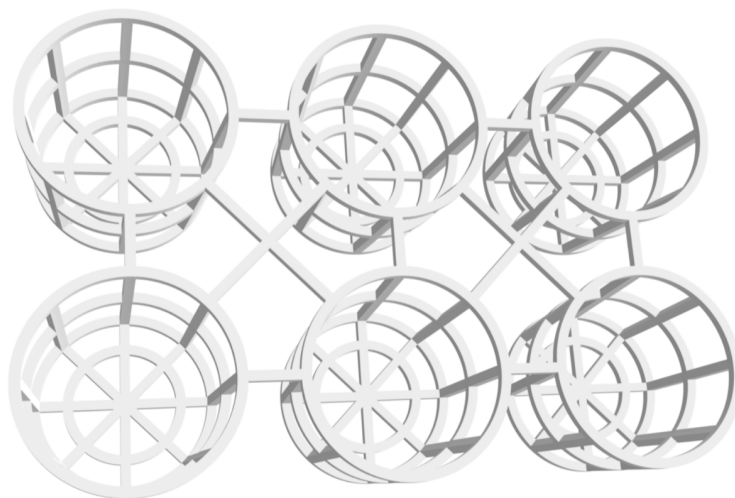


Figure B.7 3D representation of the hanging baskets used in cell proliferation assays. When placed in a multi-well plate, the baskets hang 1 mm above the bottom of the wells. Files for 3D printing are available upon request (.stl format).

**ANNEXE C SUPPLEMENTARY INFORMATION –
CO-FUNCTIONALIZATION OF MACROPOROUS DEXTRAN
HYDROGELS WITH ADHESIVE PEPTIDES AND GROWTH FACTORS
ENABLES VASCULAR ORGANOID SPROUTING**

Sterility Assay

After functionalization, in a sterile environment, macroporous dextran hydrogels were immersed in sterile Luria-Bertani (LB) broth (Sigma #71753) and incubated overnight at 37°C, 200 rpm. The medium was then collected, and its absorbance at 600 nm was measured using a Tecan 200 infinite plate reader. ‘(-)’ corresponds to a hydrogel incubated in LB broth supplemented with ampicillin (Sigma #A9393, 100 µg/ml). ‘(+)’ corresponds to a sample manipulated in a non-sterile environment.

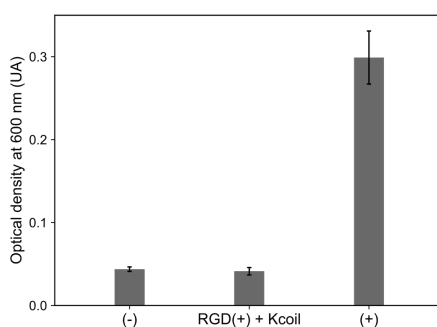


Figure C.1 Optical density (600 nm) of LB broth after incubation with functionalized (RGD(+) + Kcoil) macroporous dextran hydrogels. The obtained absorbance, in the range of that of LB broth incubated with macroporous dextran hydrogels in the presence of an antibiotic (-), confirms the absence of bacterial growth in the sample, and therefore the sterility of the functionalization process.

Supplementary ^1H NMR Data

Table C.1 Peak integral values obtained from ^1H NMR spectra ($n = 2$). *N.d.*: not determined (no observable peak).

	a	b	c	d	e
Dex	1.0000	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	0.021 ± 0.001	<i>n.d.</i>
Dex-GPE	1.0000	0.042 ± 0.01	<i>n.d.</i>	0.0222 ± 0.0003	<i>n.d.</i>
Dex-PEG	1.0000	0.024 ± 0.004	0.0084 ± 0.0007	2.9 ± 0.2	0.0183 ± 0.0004

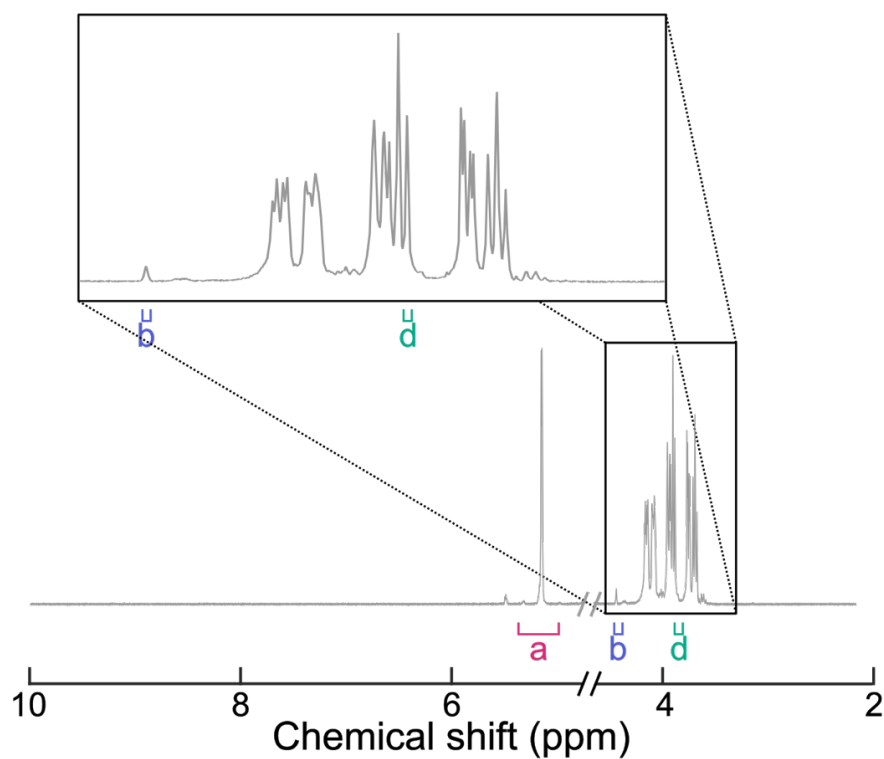


Figure C.2 ^1H NMR spectrum of dextran functionalized with the RGD and Kcoil peptides. The x-axis break corresponds to the peak of solvent (D_2O), that was removed to improve figure readability. See main manuscript (figure 6.3) for peak identification.

Immunostaining of HUVEC and AoSMC in 2D

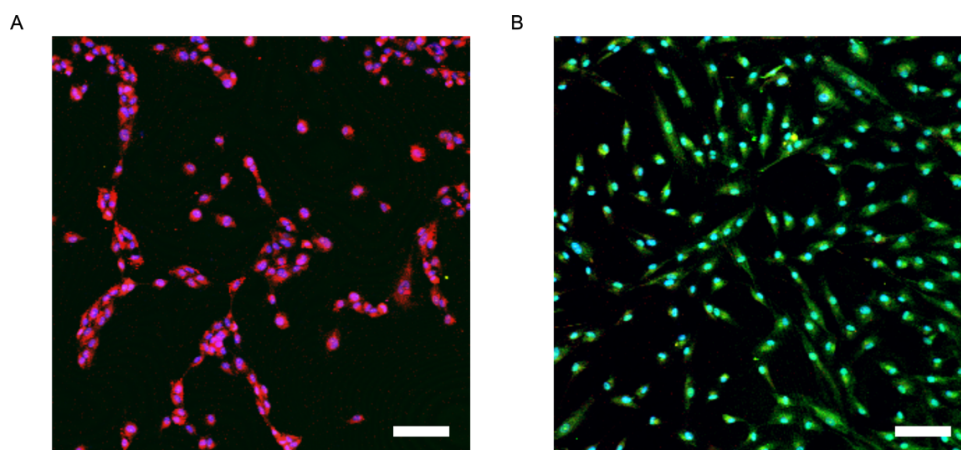


Figure C.3 Representative confocal microscopy images of (A) HUVECs and (B) AoSMCs in a cell culture plate. The specificity of the staining is confirmed: HUVECs express the Von Willebrand factor and do not express smooth muscle actin. AoSMCs do not express the Von Willebrand factor and express smooth muscle actin. Each image is a projection of 30 μm -thick section (30 slices, step: 1 μm). Immunostaining of fixed cells: Von Willebrand factor (red) and smooth muscle actin (green). Staining of nuclei: DAPI (blue). Scale bars: 100 μm .

Hydrogel Functionalization with Kcoil Only Does Not Enable Organoid Adhesion and Sprouting

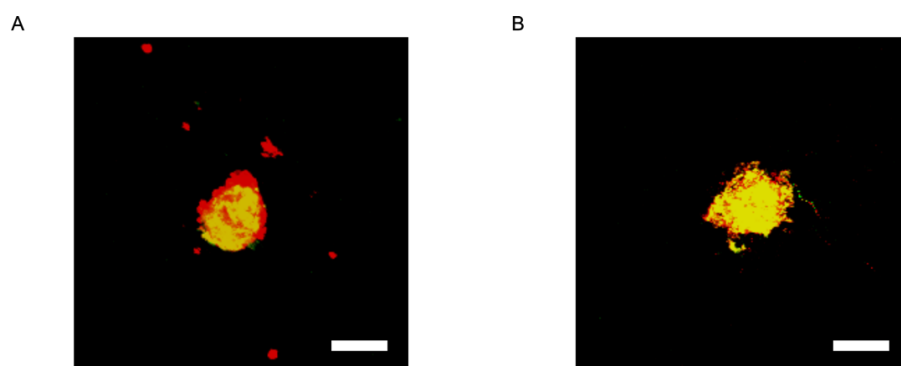


Figure C.4 Representative confocal microscopy images of vascular organoids in complete medium, in gels functionalized with 10 nmol of Kcoil, 24 h (A) and 96 h (B) post seeding. Each image is a projection of a 100 μm -thick section (100 slices, step: 1 μm). Live cell membrane staining: HUVECs in red, AoSMCs in green. Scale bar: 100 μm .

ANNEXE D MÉTHODES EXPÉRIMENTALES – COMPLÉMENTS

Synthèse d'AuPEG NPs fonctionnalisées avec Cys-Ecoil-EGF

Cys-Ecoil-EGF (CEE) a été produit et purifié comme décrit dans les sections 5.6.7, 6.6.1, et dans la référence [455].

Les NPs d'or ($D_H = 18 \pm 2$ nm, stabilisées dans du citrate) ont été synthétisées comme décrit dans la section 4.6.2. Les NPs ont ensuite été centrifugées (15 000 g, 20 min) puis resuspendues dans une solution de PEG (HS-PEG-Metoxyl, 0,4 μ M) et incubées pendant 16 h sur une plaque agitatrice. Elles ont ensuite été centrifugées, resuspendues (1 nM) dans une solution de CEE (500 nM dans du PBS-T soit 500:1 CEE:NPs), incubées pendant 24 h, puis purifiées par trois cycles de centrifugation. Les NPs ainsi obtenues ont été resuspendues (i) dans de l'eau ultrapure, pour la quantification du greffage de CEE selon le protocole établi dans le chapitre 4, et (ii) dans du PBS-T pour être incubées avec des hydrogels de dextrane macroporeux.

Synthèse de Kcoil-FAM et Ecoil-TAMRA (adapté de [352])

Les peptides Ecoil et Kcoil portant une étiquette fluorescente à l'extrémité *C*-terminale – Ac-(EVSALEK)₅GK-TAMRA et Ac-AhaGG(KVSALKE)₅GK-FAM – ont été synthétisés en phase solide, en utilisant la stratégie Fmoc/tBu. Pour chaque étape, un excès (4 équivalents) d'acide aminé était utilisé, en présence de l'agent activateur 2-[(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium] hexafluorophosphate (4 équivalents). Chaque acide aminé était activé pendant deux minutes dans du diméthylformamide (DMF) en présence de N,N-diisopropylethylamine (DIPEA, 6 équivalents), avant d'être injecté sur la résine (H-Rink amide ChemMatrix®) pour la réaction de couplage (30 min). Le groupe de protection Fmoc, présent sur le résidu *N*-terminal de la chaîne en cours d'assemblage, était retiré en incubant la résine avec une solution de 4-méthylpiperidine à 20% dans du DMF, pendant 20 minutes. Après répétition de l'étape de couplage, les séquences peptidiques obtenues étaient : Fmoc-(EVSALEK)₅GK(Alloc) et Fmoc-AhaGG(KVSALKE)₅GK(Alloc).

Une fois l'assemblage terminé, les peptides ont subi une acétylation *N*-terminale. Pour chaque peptide, la résine était traitée pendant 45 minutes avec un mélange de Ac₂O (10 équivalents) et de DIPEA/DMF (12 équivalents). Ensuite, la lysine K(Alloc) *C*-terminale était déprotégée en incubant la résine avec un mélange de Pd(OAc)₂ (0,3 équivalents), de PPh₃ (1,5

équivalents), de N-méthylmorpholine (10 équivalents) et de PhSiH_3 dans du dichlorométhane, pendant 16 h à température pièce. La résine était ensuite filtrée et rincée avec du dichlorométhane (2 fois 2 min), du DMF (2 fois 2 min), du N,N-diéthylthiocarbamate (5 mg/mL dans du DMF, 2 fois 5 min), du DMF (2 fois 2 min) et du dichlorométhane (2 fois 2 min).

Les fluorophores, 5-carboxytetramethylrhodamine (TAMRA) et 5-carboxyfluorescéine (FAM) ont ensuite été couplés sur les résines correspondantes. Le TAMRA (1,5 équivalents), était activé pendant 2 minutes avec du [bis(diméthylamino)méthylène]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]pyridinium 3-oxide hexafluorophosphate (1,5 équivalents) et du DIPEA (6 équivalents) dans du DMF avant d'être ajouté à la résine Ac-(EVSALEK)₅GK pour le couplage (1 h, température ambiante, à l'abri de la lumière). La résine était ensuite filtrée puis rincée avec du DMF (2 fois 2 min) et du dichlorométhane (2 fois 2 min). Le FAM a été couplé à la résine Ac-AhaGG(KVSALKE)₅GK, par une procédure de couplage anhydre adaptée de Fischer *et al.* [536]. Le FAM (4 équivalents), était activé pendant 15 minutes avec du 1-hydroxybenzotriazole (54 équivalents) et du N-N'-diisopropylcarbodiimide (4 équivalents) dans du DMF anhydre avant d'être ajouté à la résine pour le couplage (5 h, température ambiante, à l'abri de la lumière). La résine était filtrée puis rincée avec du DMF (3 fois 2 min) et du chloroforme (2 fois 2 minutes).

Pour cliver les peptides, les résines ont été incubées pendant 3 h avec un mélange d'acide trifluoroacétique, de triisopropylsilane et d'eau (95:2,5:2,5 v/v). Les résines étaient filtrées, et les peptides dissous dans l'acide trifluoroacétique étaient précipités dans du Et_2O froid puis centrifugés.

Les culots contenant les peptides ont ensuite été séchés sous argon, dissouts dans un mélange d'acétonitrile et d'eau (1:1) puis purifiés par HPLC en phase inverse semi-préparative, sur un appareil Agilent 1200 (colonne : Luna Omega PS C18, 3,5 μm , 100 Å pore size, 250 × 10 mm, Phenomenex). La purification a été effectuée à 60°C, en utilisant comme phases mobiles : (i) de l'acide trifluoroacétique à 0,1% dans de l'eau, et (ii) de l'acide trifluoroacétique à 0,1% dans de l'acétonitrile. Les fractions obtenues étaient alors lyophilisées.

La pureté des peptides obtenus a été vérifiée par HPLC en phase inverse - spectroscopie de masse, en utilisant un appareil UltiMate 3000 (Thermo Scientific) couplé à un détecteur à photodiodes et un spectromètre de masse MSQ Plus (Thermo Scientific), utilisé avec une colonne analytique (Aeris peptide XB-C18, 3,8 μm , 100 Å pore size, 150 × 2,1 mm, Phenomenex).

Imagerie des Hydrogels de Dextrane Macroporeux Fonctionnalisés avec les Peptides Ecoil et Kcoil Fluorescents (adapté de [352])

Pour analyser la distribution de Kcoil dans les hydrogels de dextrane macroporeux, les hydrogels ont été fonctionnalisés avec 10 μmol de GPE, puis avec 5 nmol (100X) de Aha-Kcoil-FAM, suivant les protocoles décrits dans les sections 5.6.3 et 6.6.2. Pour évaluer l'adsorption non spécifique de Kcoil sur le dextrane, 5 nmol de Aha-Kcoil-FAM ont été incubés avec des gels de dextrane non fonctionnalisés avec du GPE.

Pour étudier la distribution des complexes Ecoil/Kcoil dans les hydrogels, des gels fonctionnalisés avec 5 nmol de Aha-Kcoil ont été incubés dans 1 mL de E5-TAMRA (50 nM dans du PBS-T), puis rincés (3 fois 1 h, PBS-T). Pour évaluer l'adsorption non spécifique de Ecoil sur le dextrane, des gels de dextrane non fonctionnalisés ont été incubé avec E5-TAMRA dans les mêmes conditions.

Les hydrogels ont été imagés à l'aide d'un microscope confocal Olympus FV1 000, contrôlé par le logiciel FluoView 4.2. Chaque gel était imagé sur une profondeur de 500 μm (100 images, pas : 5 μm). La reconstitution des images et les projections ont été réalisées à l'aide du logiciel ImageJ Fiji.