

Titre:	Conception d'un hydrogel macroporeux de chitosane et d'alginate réticulé avec de la génipine pour la capture de cellules cancéreuses de glioblastome
Auteur:	Lauriane Pares
Author:	
Date:	2023
Type:	Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis
Référence:	Pares, L. (2023). Conception d'un hydrogel macroporeux de chitosane et d'alginate réticulé avec de la génipine pour la capture de cellules cancéreuses de glioblastome [Mémoire de maîtrise, Polytechnique Montréal]. PolyPublie. https://publications.polymtl.ca/57112/
Citation:	

Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/57112/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Nick Virgilio
Advisors:

Programme: Génie chimique
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Conception d'un hydrogel macroporeux de chitosane et d'alginate réticulé
avec de la génipine pour la capture de cellules cancéreuses de glioblastome**

LAURIANE PARES

Département de génie chimique

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

Génie chimique

Décembre 2023

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

Conception d'un hydrogel macroporeux de chitosane et d'alginate réticulé avec de la génipine pour la capture de cellules cancéreuses de glioblastome

présenté par **Lauriane PARES**

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

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

Basil FAVIS, président

Nick VIRGILIO, membre et directeur de recherche

Marie-Claude HEUZEY, membre

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire. Le voyage académique qui a conduit à ce travail n'aurait pas été possible sans leur soutien et leur encouragement.

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de maîtrise, Nick Virgilio, pour sa guidance experte, sa patience et sa confiance en moi tout au long de ce projet. Ses conseils éclairés et sa disponibilité ont été essentiels pour la réussite de cette recherche.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance envers Basil Favis, professeur du cours de « Mélanges de Polymères Multiphasés » qui m'a encouragé à engager une discussion avec Nick Virgilio concernant un sujet de recherche pour ma maîtrise.

Mes collègues de laboratoire et les équipes de Nick Virgilio et de Benoit Paquette méritent une mention spéciale pour leur soutien continu, leurs discussions stimulantes et leur aide dans les manipulations. Leurs idées ont été source d'inspiration et ont contribué à mon développement académique.

Je tiens également à exprimer mes remerciements envers Myrtile Kahn et Katia Fajerwerg pour avoir accepté de me superviser pendant mon stage au LCC-CNRS à Toulouse, ainsi qu'envers toute l'équipe F pour leur aide précieuse, qui a grandement contribué à mon intégration rapide au sein du laboratoire.

Je n'oublie pas de remercier ma famille, mes colocataires hors pairs et amis pour leur soutien inconditionnel et leur compréhension pendant toutes ces années d'études.

Enfin, je tiens à remercier tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à cette réalisation et au jury de maîtrise d'avoir accepté mon invitation. Vos encouragements et vos conseils ont été précieux.

Ce mémoire a été un voyage intellectuel stimulant, et je suis reconnaissant envers chacun d'entre vous pour avoir rendu ce voyage possible.

RÉSUMÉ

Le glioblastome multiforme (GBM) de stade IV est la forme la plus agressive du cancer du cerveau et touche 45 613 nouveaux patients aux États-Unis par an. Ce cancer se localise dans le cerveau ou dans la moelle épinière et sa gravité réside dans la capacité qu'ont les cellules tumorales de proliférer très rapidement à travers un vaste réseau de vaisseaux sanguins et d'envahir les tissus sains environnants. Malgré les traitements actuels combinant chirurgie et chimiothérapie / radiothérapie, ce cancer reste incurable car il est impossible de détruire la totalité des cellules cancéreuses résiduelles sans endommager les tissus sains du cerveau.

Un nouveau traitement, la Gliotrappe, est actuellement en phase de développement entre les équipes de Polytechnique Montréal et de l'Université de Sherbrooke afin de pouvoir détruire les cellules cancéreuses résiduelles. Le principe de ce projet est d'implanter un hydrogel macroporeux qui agit comme trappe à cellules cancéreuses dans la cavité résiduelle après résection de la tumeur. Pour ce faire, un chimio-attractant sera introduit dans le gel afin d'attirer et de retenir les cellules cancéreuses résiduelles. Une fois qu'elles auront migré au sein du gel, une dose de radiothérapie stéréotaxique sera appliquée localement pour les éliminer. Pour satisfaire aux exigences d'une telle application, les hydrogels doivent être biocompatibles, avoir la capacité de laisser entrer les cellules cancéreuses, avoir un module de compression proche de celui des tissus cérébraux, soit entre 1 et 10 kPa, et être stables dans le milieu physiologique.

Dans ce projet de maîtrise, une nouvelle formulation à base d'alginate de sodium (SA), de chitosane (CHI) et de génipine (GNP) a été développée pour préparer les hydrogels poreux. L'alginate a été choisi en raison de son caractère non immunogène et de ses propriétés mécaniques similaires à celles des tissus mous du corps humain, et le chitosane pour améliorer l'adhésion cellulaire. Aussi, la combinaison des deux polymères présente l'avantage d'accroître la stabilité des gels lorsqu'ils sont exposés à un environnement ionique, car des liaisons physiques s'établissent entre eux. Cependant, ces liaisons sont réversibles, ce qui implique une diminution progressive de la stabilité des gels lorsqu'ils sont soumis à un environnement ionique. Ainsi, **la contribution originale de ce projet de maîtrise** est une nouvelle chimie de gel qui augmente leur stabilité, d'une part par l'augmentation de leur concentration en CHI et de l'homogénéité des solutions alginate/chitosane à l'aide de bicarbonate de soude, et d'autre part par la réticulation chimique du chitosane à l'aide de la génipine.

Les agents de réticulation classiques du chitosane, tels que le glyoxal et le glutaraldéhyde, ne permettant pas d'obtenir des gels biocompatibles. Le choix s'est donc porté sur la génipine, composé naturel extrait du fruit du *Gardenia*. Cependant, il est difficile de préparer des gels alginate-chitosane homogènes à cause de leurs charges complémentaires (négatives pour l'alginate, positive pour le chitosane), menant à une précipitation non-contrôlée des biopolymères en solution due à la formation d'agrégats. Le mélange homogène a été rendu possible grâce à l'ajout de bicarbonate de soude en excès dans la solution de chitosane, avant son mélange avec l'alginate aux ratios SA/CHI suivants : 0.5/0.5, 1/0.25, 1/0.5, 1/0.75 and 1/1 % w/v. La génipine est ensuite ajoutée au mélange pour obtenir une concentration finale comprise entre 0.0125 et 0.1% w/v basée sur la concentration en chitosane, puis la solution est laissée à gélifier. Les gels obtenus sont bleus, couleur résultant de la réticulation chimique du chitosane par la génipine.

Une contribution originale de cette étude réside dans l'exploration de la réticulation du chitosane réalisée sur des gels pleins en utilisant des mesures d'absorbance et en suivant la colorimétrie des solutions. Ces tests ont montré que la réticulation covalente du CHI par la GNP est plus rapide avec l'augmentation de la température, passant de plus de 2 heures à 23 °C, à 7.5 min à 50 °C, pour des gels CHI 0.75% GNP 0.05% w/v. Une température de 37 °C a été choisie pour la suite, de manière à accélérer la réaction sans provoquer une synthèse excessive des gels. Les études d'absorbance et de rhéologie ont montré que plus la concentration en GNP est élevée, plus la résistance des gels augmente. Cependant, un ratio CHI/GNP trop faible entraîne un gel cassant est difficilement manipulable. Par soucis économique et pour que le gel reste assez souple pour résister aux contraintes de compression, le choix d'une concentration en GNP de 0.05% a été effectué pour le reste de l'étude.

Des gels poreux ont par la suite été préparés pour déterminer le ratio optimal SA/CHI afin que les hydrogels aient un module de compression compris entre 1-10 kPa, et gardent leur stabilité dans le milieu de culture. Pour cela, la solution gélifiante a été injectée dans des moules poreux en polylactide (PLA) (le moule PLA est ensuite extrait sélectivement au chloroforme pour obtenir les gels poreux), préalablement fabriqués à partir de l'extrusion d'un mélange co-continu de polystyrène (PS)/PLA. Différents temps de recuit ont été appliqués au mélange PS/PLA pour quantifier l'évolution de la taille de pores résultante – l'extraction sélective de la phase PS donnant les moules PLA poreux. Un recuit final de 30 minutes a été appliqué pour obtenir une taille

moyenne de pores de l'ordre de 200 microns, afin de permettre une bonne infiltration et rétention cellulaire.

Pour répondre aux exigences de l'application Gliotrappe, les gels ont été mécaniquement testés en compression (1) post-conception, (2) au cours du temps dans le PBS et le milieu de culture DMEM, et (3) post-irradiation. Les deux ratios choisis pour les tests cellulaires, soient SA 1% CHI 0.5% GNP 0.05% et SA 1% CHI 0.75% GNP 0.05% w/v, ont un module de compression respectif de 9.8 et 10.3 kPa post-conception, et de 3.5 et 4.3 kPa après 14 jours dans une solution de DMEM. La dose maximale d'irradiation de 30 Gy n'a quant à elle montré aucun impact sur la valeur du module de compression des gels.

Les tests mécaniques et cellulaires ont montré les avantages d'utiliser des gels présentant une concentration plus élevée en CHI, à savoir une amélioration de la stabilité des gels dans des environnements ioniques, mais aussi une plus grande accumulation de cellules, soit 1.4 fois plus grande dans les gels SA 1% GNP 0.05% CHI 0.75%. Cependant, la couleur bleue des gels interfère avec les mesures de fluorescence des cellules F98 mCherry, ce qui laisse suggérer une utilisation préférentielle des gels SA/CHI réticulés chimiquement, mais avec une chimie différente du GNP, pour les futurs tests chez le rat, afin de pouvoir quantifier la quantité de cellules qui auront migré dans le gel.

Finalement, lors d'un stage au Laboratoire de Chimie de Coordination - CNRS de Toulouse, des méthodes de synthèse de nanoparticules d'or (NPs) dans les gels poreux ont été étudiées pour voir l'impact de ces dernières sur la destruction des cellules sous irradiation. Ces tests préliminaires ont montré deux façons assez simples d'obtenir de l'or à la surface du gel : (1) par absorption d'une solution colloïdale de NPs d'or préformées, ou (2) directement par réduction de l'acide chloraurique (HAuCl_4) par le gel grâce au chitosane qu'il contient.

ABSTRACT

Stage IV of multiform Glioblastoma (GBM) is the most aggressive form of brain cancer, affecting 45 613 new patients in the United States each year. This cancer can be localized in the brain or spinal cord and is characterized by the ability of tumor cells to easily proliferate through an extensive network of blood vessels and invade the surrounding healthy tissues. Despite current treatments combining surgery and chemotherapy/radiotherapy, this cancer remains incurable because it is impossible to eliminate all residual cancer cells without damaging healthy brain tissue.

A new treatment, called the Gliotrap, is currently in development by both teams at Polytechnique Montréal and the University of Sherbrooke to target and kill residual cancer cells. The principle of this project involves implanting a macroporous hydrogel that acts as a cancer cells trap in the residual cavity after tumor resection. To achieve this, a chemoattractant will be introduced into the gel to attract and retain cancer cells. Once the cancer cells are retained into the gel, a dose of stereotactic radiotherapy will be applied locally to eliminate them.

To meet the requirements of such an application, the hydrogels must be biocompatible, must accumulate and retain the cancer cells, have a compression modulus similar to brain tissues, ranging from 1 to 10 kPa, and remain stable in the physiological environment. Therefore, in this master's project, a new formulation based on sodium alginate (SA), chitosan (CHI), and genipin (GNP) was developed to prepare porous hydrogels. Alginate was chosen for its non-immunogenicity and mechanical properties similar to human soft body tissues, while chitosan was selected to improve cell adhesion. The combination of these two polymers has the advantage of increasing gel stability in ionic environments, as physical bonds are formed between them. However, these bonds are reversible, which means that gel stability gradually decreases in those environments. **The original contribution of this project** is a new gel chemistry improving gel stability, by increasing the CHI concentration in the gels and the homogeneity of alginate/chitosan solutions with sodium bicarbonate, as well as by chemically cross-linking chitosan using genipin.

Traditional chitosan cross-linking agents, such as glyoxal and glutaraldehyde, do not yield biocompatible gels. Genipin, extracted from the *Gardenia* fruit, was chosen as the cross-linking agent. However, homogenous alginate-chitosan gels are typically challenging to prepare due to their complementary charges (negative for alginate, positive for chitosan), leading to uncontrolled precipitation of biopolymers in solution, forming aggregates rather than gels. Homogeneous

mixing was made possible by adding an excess of sodium bicarbonate into the chitosan solution prior to blending with alginate, resulting in homogeneous solutions with the following SA/CHI ratios: 0.5/0.5, 1/0.25, 1/0.5, 1/0.75, and 1/1% w/v. Genipin was then added to the mixture to achieve a final concentration ranging from 0.0125 to 0.1% w/v in the chitosan solution, and the solution was allowed to gel. The resulting gels are blue, a result of chitosan cross-linking by genipin.

An original contribution of this study lies in the exploration of the chitosan cross-linking reaction in bulk gels using absorbance measurements and the colorimetry of solutions. These tests showed that covalent cross-linking of CHI by GNP is faster at higher temperatures, decreasing from over 2 hours at 23 °C, to 7.5 minutes at 50 °C for CHI 0.75% GNP 0.05% w/v gels. A temperature of 37 °C was chosen to accelerate the reaction without an excessive gel syneresis. Absorbance and rheology studies showed that higher GNP concentrations result in more resistant gels. However, a too low CHI/GNP ratio leads to brittle ones. To ensure the gel's resistance to compression, a GNP concentration of 0.05% was subsequently chosen for the upcoming tests.

Porous gels were prepared with polylactide (PLA) molds to determine the optimal SA/CHI concentrations for hydrogels to have a compression modulus ranging between 1-10 kPa and maintain stability in culture medium. For this purpose, the gelling solution was injected into porous molds made of polylactide (PLA) (the PLA mold is then selectively extracted using chloroform to obtain porous gels), previously fabricated from the extrusion of a co-continuous blend of polystyrene (PS)/PLA. Different annealing times were applied to the PS/PLA blend to quantify the evolution of the resulting pore size – selective extraction of the PS phase yielding the porous PLA molds. A final annealing of 30 minutes was applied to achieve an average pore size of 200 microns, in order to allow an effective cell infiltration and retention.

To meet the requirements of the Gliotrap application, the gels were mechanically tested under compression (1) just after conception, (2) over time in PBS and DMEM culture media, and (3) post-irradiation. The two selected ratios for cellular testing, SA 1% CHI 0.5% GNP 0.05% and SA 1% CHI 0.75% GNP 0.05% w/v, had compression moduli respectively of 9.8 and 10.3 kPa post-conception, and 3.5 and 4.3 kPa after 14 days in a DMEM medium. Mechanical and cellular testing demonstrated the advantages of using gels with a higher CHI content: an improvement of gel

stability in ionic environments and a 1.4 times higher cell accumulation for 0.75% CHI gels. A radiation dose of 30 Gy had no impact on the gel mechanical properties.

The blue color of the gels interfered with the fluorescence measurements of F98 mCherry cells, suggesting a preference for using chemically cross-linked SA/CHI gels, but with a different chemistry than GNP for future *in vivo* tests in rats to quantify the number of cells that migrate into the gel.

Finally, during an internship in the Laboratory of Coordination Chemistry - CNRS in Toulouse, methods for synthesizing gold nanoparticles (NPs) in porous gels were studied to assess their impact on cell destruction under irradiation. These preliminary tests showed two relatively simple ways to obtain gold on the gel surface: (1) by absorbing a preformed colloidal solution of gold NPs or (2) directly by reducing chloroauric acid (HAuCl₄) thanks to the chitosan contained in the gel.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ.....	iv
ABSTRACT.....	viii
TABLE DES MATIÈRES	xii
LISTE DES TABLEAUX.....	xv
LISTE DES FIGURES	xvii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xxiv
LISTE DES ANNEXES.....	xxvii
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 La Gliotrappe.....	1
1.1.1 Contexte sur le glioblastome multiforme	1
1.1.2 Les nouvelles avancées thérapeutiques	3
1.1.3 Le cas de la Gliotrappe : conception et formulation	4
CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE	8
1.2 Morphologie co-continue et porosité	8
1.2.1 Formation de la morphologie co-continue	13
1.2.2 Paramètres influençant la zone de co-continuité.....	14
1.2.3 Un contrôle de la porosité	16
1.2.4 Vers une amélioration des échafaudages	16
1.3 Les hydrogels	26
1.3.1 Caractéristiques générales des hydrogels	26
1.3.2 Le chitosane.....	30
1.3.3 L'alginate	37

1.3.4	Hydrogels à base de mélanges de polymères	39
CHAPITRE 3	HYPOTHESE DE RECHERCHE – OBJECTIFS SPECIFIQUES	44
CHAPITRE 4	ARTICLE 1 : CAPTURE OF GLIOBLASTOMA CANCER CELLS WITH MACROPOROUS CHITOSAN/ALGINATE HYDROGELS CROSSLINKED WITH GENIPIN	45
4.1	INTRODUCTION.....	46
4.2	MATERIALS AND METHOD	51
1.3.5	Materials.....	51
1.3.6	Preparation of PLA macroporous molds	52
1.3.7	Preparation of alginate, chitosan and genipin stock solutions	52
1.3.8	Preparation of SA/CHI/GNP macroporous hydrogels	53
1.3.9	Gelation kinetics monitoring	54
1.3.10	Characterization of PLA molds and SA–CHI hydrogels	55
1.3.11	Cell culture	57
1.3.12	Statistical analysis	59
4.3	RESULTS.....	60
1.3.13	Kinetics of CHI crosslinking reaction with GNP.....	60
1.3.14	Mechanical properties in compression	70
1.3.15	Porous gel stability in aqueous medium.....	73
1.3.16	Impact of irradiation on macroporous gels compression modulus	75
1.3.17	Impact of hydrogel formulation on the fluorescent properties of mCherry expressed by the F98 cells	76
1.3.18	Accumulation and retention of F98 cells in hydrogels	77
1.3.19	Distribution of F98 cells within the hydrogels.....	78
4.4	DISCUSSION	80

4.5 CONCLUSION	81
CHAPITRE 5 DISCUSSION	82
CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	85
RÉFÉRENCES	88
ANNEXES	102

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 Avantages et inconvénients des techniques de fabrication d'hydrogels poreux (Gancheva & Virgilio, 2016)	5
Tableau 2.1 Méthodes de préparation d'échafaudages poreux et leurs caractéristiques. Reproduit partiellement à partir de Sarazin et al. (2004)	8
Tableau 2.2 Applications de la morphologie co-continue	12
Tableau 2.3 Taille de pore optimale pour la régénération tissulaire. Reproduit à partir de Sarazin et al. (2004)	17
Tableau 2.4 Propriétés mécaniques du PLLA à 60% poreux en fonction du temps de recuit. Reproduit à partir de Sarazin et al. (2004)	20
Tableau 2.5 Exemples de polymères utilisés dans les applications biomédicales. Reproduit partiellement à partir de Yang et al. (2022)	27
Tableau 2.6 Évolution du temps de gélification en fonction de la température pour une concentration en génipine de 0.25 M (GN1) et 0.5 M de la solution finale (GN2). Reproduit de Heimbuck et al. (2019)	36
Tableau 2.7 Évolution du temps de gélification et du module élastique de gels de chitosan à 1% w/v réticulé avec de la génipine à 0.1% w/v en fonction du pH de la solution. Reproduit de Delmar & Bianco-Peled (2015).....	36
Tableau 2.8 Masse de bicarbonate de soude ajoutée dans la solution de chitosane à 1% (diluée dans 14 mL d'une solution d'acide acétique à 0.1M + 10 mL d'eau). Reproduit de Komoto et al. (2019).	43
Table 4.1 Porous gel mechanical properties in compression: effect of genipin crosslinking before VS after crosslinking with CaCl_2 , ($N = 4$)	71
Table 4.2 Compression modulus of porous gels after exposure to increasing doses of gamma irradiation (SA/CHI/GNP 1%/0.75%/0.025% w/v, average pore size = 180 μm) ($N = 4$)... 76	76
Table 4.3 Representative distribution of F98 cells at 4 different levels (L1-L4) in 1% SA 0.75% CHI 0.05% GNP w/v, and 1% SA 0.5% CHI 0.05% GNP w/v hydrogels.	78

Tableau A.1 Fraction de GNP par rapport au CHI pour des gels CHI 0.75% w/v	99
Table A.2 GNP fraction of CHI for CHI 0.5% w/v	99
Table A.3 Extracted data from microCT analysis of the PS and PLA domains: volume fractions ϕ , average domain sizes d and specific interfacial area S	99
Table A.4 Bulk and porous hydrogels (180 μm average pore size) compression modulus as a function of SA and CHI contents, at 0.025% w/v GNP content	99
Table A.5 Compression modulus of porous gels (180 μm average pore size) as a function of GNP and CHI compositions	99

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 IRM d'un patient atteint d'un GBM (A) avant la chirurgie : la flèche pointe la tumeur, (B) post-chirurgie et radiothérapie : la flèche pointe la résection tumorale (C) 6 mois après la chirurgie, récurrence du cancer avec 2 nouvelles tumeurs présentes dans la cavité (D) post-résection des 2 nouvelles tumeurs (E) apparition d'une nouvelle tumeur 3 mois après la 2 ^e résection (Holland, 2000) Copyright © 2000, The National Academy of Sciences 2
Figure 1.2 Principe du projet Gliotrappe (Giraldo Solano et al., 2020) 4
Figure 1.3 Principe de synthèse d'un hydrogel macroporeux à partir de mélanges polymères co-continus. Inspiré de (Esquirol et al., 2014) 6
Figure 2.1 Schéma du procédé de lessivage particulaire. Tiré de Suamte et al. (2023). Copyright © 2022 Suamte et al. 9
Figure 2.2 Principe du moussage au gaz. Tiré de Suamte et al. (2023). Copyright © 2022 Suamte et al. 10
Figure 2.3 Montage d'électrofilage. Tiré de Suamte et al. (2023). Copyright © 2022 Suamte et al. 10
Figure 2.4 Principe de la stéréolithographie. Tiré de Suamte et al. (2023). Copyright © 2022 Suamte et al. 11
Figure 2.5 (a) Moule poreux en PLA d'1 cm ³ d'une taille moyenne de pores de 200 microns avant injection; (b) Gel poreux d'agar après extraction du PLA; (c) Image µCT de la structure du gel d'agar obtenu Tiré de Esquirol et al. (2014). Copyright © 2014 American Chemical Society 12
Figure 2.6 Représentation de l'évolution de la morphologie d'un mélange binaire de polymères immiscibles. Tiré de Ravati & Favis (2010). Copyright © 2010 Elsevier Ltd. 13
Figure 2.7 Évolution de la morphologie des phases d'un mélange PS/PLA à a)10/90 b) 20/80 c) 30/70 d) 40/60 % vol. Tiré de Gu et al. (2018). Copyright © 2017 Elsevier Ltd. 14
Figure 2.8 Évolution de la région de co-continuité pour les phases PS (en pointillé) et PCL (continue) en fonction de la température. Tiré de Sarazin & Favis (2005). Copyright © 2005 Elsevier Ltd. 16

Figure 2.9 Micrographies réalisées au MEB pour le mélange 45PCL/55PEO en % vol qui a subi un recuit à 160°C de 30 min, 1, 2 et 3h respectivement pour a, b, c, d; e) évolution du diamètre moyen des pores, en fonction du temps de recuit, pour des PCL poreux obtenus suite à l'extraction sélective du PEO. Tiré de Ghavidel Mehr et al. (2014) Copyright © 2014, Springer Science Business Media New York	18
Figure 2.10 a) Évolution de la taille des pores en fonction du temps de recuit du réseau en PLLA (Sarazin et al., 2004) et b) schéma explicatif du processus de grossissement des grains lors d'un recuit. Tiré de Yuan & Favis (2005). © 2004 American Institute of Chemical Engineers	19
Figure 2.11 Distribution des pores pour le mélange 45/55% vol PCL/PEO avant et après recuit. Tiré de Ghavidel Mehr et al. (2014). Copyright © 2014, Springer Science Business Media New York	20
Figure 2.12 Formation de la co-continuité pour un mélange PLA/PS (haut) et PLA/PS-OX (bas) et des % vol de gauche à droite 90/10, 80/20, 70/30 et 60/40. Tiré de Gu et al. (2018). Copyright © 2017 Elsevier Ltd.	21
Figure 2.13 Morphologie tri-continue du mélange 30/30/40 vol% PLA/PS-OX/LLDPE a) après trempe b) après 30 minutes de recuit et c) sous forme schématique. Tiré de Gu et al. (2018). Copyright © 2017 Elsevier Ltd.	23
Figure 2.14 Microscopie prise au MEB de la surface de fracture longitudinale (a) et transversale (b) d'un échafaudage en PCL avec des pores alignés. Tiré de Yin et al. (2017). Copyright © 2017 Elsevier Ltd.	24
Figure 2.15 Attachement de cellules souches de moelle osseuse (BMSCs) sur un échafaudage en PCL (a) et leur élongation (b) sur une structure poreuse alignée. Tiré de Yin et al. (2017). Copyright © 2017 Elsevier Ltd.	25
Figure 2.16 Ordre de grandeur du module d'Young des tissus humains. Tiré de Liu et al. (2015). Copyright © 2015 Liu et al.	29
Figure 2.17 Représentation de la chitine (a), d'une unité glucosamine (b) et de la chitosane (c)	30

Figure 2.18 Structure du chitosane dans un environnement acide. Tiré de Heimbuck et al. (2019). Copyright © 2019 American Chemical Society.....	31
Figure 2.19 Mécanisme réactionnel de formation d'une base de Schiff. Tiré de Guo et al. (1998). Copyright © 1998 Elsevier Science Ltd.....	33
Figure 2.20 Molécule de Génipine	33
Figure 2.21 Schéma des processus de réticulation de la chitosane par la génipine en pH acide et basique, respectivement 1. et 2. a) avec leurs mécanismes réactionnels associés b). Reproduit à partir de Dimida et al. (2015) et Ramos-de-la-Peña et al. (2016).	35
Figure 2.22 Structure de l'alginate et des différents types de block. Tiré de Davis et al. (2003). Copyright © 2003 Published by Elsevier Ltd.	37
Figure 2.23 Modèle de réticulation « Egg-box » avec des chaînes d'alginate. Tiré de Auriemma et al. (2020). Copyright © 2020 par Auriemma et al.	38
Figure 2.24 Les différents types de gel à base de plusieurs polymères. Tiré de Ramdhan et al. (2020). Copyright © 2020 Published by Elsevier Ltd.	40
Figure 2.25 Illustration du mécanisme de réticulation. Tiré de Komoto et al. (2019). Copyright © 2018 Elsevier B.V.	42
Figure 4.1 A) Chitosan (CHI) reaction with sodium bicarbonate, B) regeneration of primary amines when the pH decreases again, and C) interactions with sodium alginate (SA) chains once CHI recovers its amino groups (Komoto et al., 2019).....	49
Figure 4.2 Crosslinking reaction of CHI chains by GNP in acidic (A) or alkaline (B) media (Dimida et al., 2015)	50
Figure 4.3 Chitosan (CHI) crosslinking kinetics using genipin (GNP) as monitored by UV-Vis spectroscopy. A) Absorbance as a function of time t and temperature T , at $[CHI] = 0.75\% \text{ w/v}$ and $[GNP] = 0.05\% \text{ w/v}$; B) Absorbance as a function of GNP composition and reaction time, at $[CHI] = 0.75\% \text{ w/v}$ and 37°C ; C) Absorbance as function of CHI concentration at $[GNP] = 0.025\% \text{ w/v}$ and $T = 37^\circ\text{C}$. Three samples were tested per condition ($N = 3$), the dotted lines are guides for the eyes. After 22 h, the absorbance remained constant in all cases (data at longer times are not shown). Absorbance values (%) are normalized using the maximum	

value obtained for a given experiment. Pictures of well-plates containing CHI hydrogels at various conditions are displayed under the graphics..... 61

Figure 4.4 Kinetics of sodium alginate (SA)/chitosan (CHI) solutions crosslinked using genipin (GNP) and monitored by UV-vis spectroscopy. Absorbance as a function of GNP concentration and time, for both pure CHI (0.75% w/v), and 1% SA 0.75% CHI (w/v) starting solutions. For all experimental points, $N = 3$, and dotted lines are guides for the eyes. Some of the plate wells have been filled with water so the gels do not dry out. After 22 h, gels were fully formed, and data at longer times are not shown. 62

Figure 4.5 Rheological properties of SA/CHI/GNP gelling solutions: A) Storage (G') and loss (G'') moduli for pure CHI gels (0.75% w/v) crosslinked with GNP, at a composition ranging from 0.0125% to 0.05% w/v, at 37 °C; B) $\tan \delta (= G''/G')$ as a function of time, from data in (A), compared to a solution composed of SA (1% w/v), CHI (0.75% w/v) and GNP (0.05% w/v); C) Gelation time (t_{gel}), and storage modulus (G') after 5 h of reaction time, and at equilibrium at reaction completion, as a function of temperature, for SA/CHI/GNP (1%/0.75%/0.05% w/v); D) Gelation time (t_{gel}), storage modulus (G') after 5 h of reaction time, and at equilibrium at reaction completion, as a function of GNP concentration for SA/CHI 1%/0.75% w/v at 37 °C. 64

Figure 4.6 Impact of SA (1% w/v) addition on the crosslinking of CHI (0.75% w/v) with GNP (0.05%) at 37 °C. A) G' and G'' as a function of time, with and without the addition of SA; B) Impact of SA addition on t_{gel} and final G' value. 66

Figure 4.7 Cross-section of porous PLA molds obtained by microCT for A) 5, B) 10, C) 20, D) 30, E) 45 and F) 60 min of quiescent annealing time (PLA: white domains; Pores resulting from selective PS extraction: black domains). Note the difference between the scales of (A) and (B), compared to (C to F). 67

Figure 4.8 Extracted data from microCT analysis of the PS and PLA domains sizes (d_{PLA} and d_{PS}), and specific interfacial area (S) between the PS and PLA phases. The average domain sizes data represent the average size ± 1 standard deviation, from the domain size distributions provided in **Figure A.10**. 68

Figure 4.9 Injected mold (A) and resulting gel (B) with their 2D and 3D microscopic views respectively (C), (D) and (E), (F), and extracted microstructural data (G).....	70
Figure 4.10 Appearance (A) and compression modulus (B) of porous hydrogels. A) PLA molds filled with hydrogels (top) and resulting porous SA/CHI/GNP porous gels (bottom) after PLA extraction; B) Compression modulus as a function of pore size, for gels of 1% w/v SA, 0.75% w/v CHI, and 0.05% w/v GNP.....	72
Figure 4.11 Evolution of compression modulus of porous gels (average pore size of 180 μ m) in PBS medium: A) effect CHI composition at constant SA and GNP contents (1% and 0.025% w/v, respectively); B) effect of GNP composition at constant SA and CHI contents (1% and 0.75% w/v, respectively). C) Evolution of compression modulus in DMEM medium, for 1% w/v SA, (0.5% or 0.75% w/v) CHI, 0.025% w/v GNP. Tests were realized at 37 °C, and solutions were changed after each measurement.	74
Figure 4.12 Accumulation and retention of F98 mCherry cells in hydrogels formulated with 1% SA 0.75% CHI 0.05% GNP (w/v, in black), and in 1% SA 0.5% CHI and 0.05% GNP (w/v, in grey).	77
Figure 4.13 A) Number of cell clusters within levels L1 to L4 in hydrogels formulated with 1% SA 0.75% CHI 0.05% GNP, and in 1% SA 0.5% CHI and 0.05% GNP; B) Mean surface of cell clusters in levels L1 to L4, in hydrogels formulated with 1% SA 0.75% CHI 0.05% GNP, and in 1% SA 0.5% CHI and 0.05% GNP.	79
Figure A.1 Molecular structure of A) chitin B) chitosan and C) sodium alginate	103
Figure A.2 Absorbance master curve of CHI 0.75% GNP 0.05% w/v after 24h of gelation at 37°C in a plate well	103
Figure A.3 Chitosan (CHI) crosslinking kinetics using genipin (GNP) as monitored by UV-Vis spectroscopy. A) Absorbance as a function of time t and temperature T , at [CHI] = 0.5% w/v and [GNP] = 0.025% w/v; B) Absorbance as a function of time t and GNP composition, at [CHI] = 0.5% w/v and 37 °C and C) Storage (G') and loss (G'') moduli for pure CHI gels (0.5% w/v) crosslinked with GNP, at a composition ranging from 0.025% to 0.05% w/v, at 37 °C.....	104

Figure A.4 A) Storage (G') and loss (G'') modulus for pure CHI gels (0.5% w/v) crosslinked with GNP, at a composition ranging from 0.025% to 0.05% w/v, at 37 °C; B) Gelation time (t_{gel}), and storage modulus (G') at equilibrium at reaction completion, as a function of temperature, for CHI/GNP (0.5%/0.025% w/v) gels.	104
Figure A.5 Influence of CHI composition on t_{gel} and final G' values, at constant SA (1% w/v) content, and at GNP compositions of (A) 0.025% and (B) 0.05% w/v.	105
Figure A.6 Pore size distributions for different annealing times.	106
Figure A.7 Compression modulus of sodium alginate (SA) bulk and porous (pore size = 180 µm) gels as a function SA composition.	107
Figure A.8 SA 1% CHI 0.75% GNP 0.025% w/v (left) and SA1% CHI0.5% GNP0.025% w/v (right) after (A) 1 week in PBS and (B) 2 weeks in DMEM medium.	107
Figure A.9 Evolution of porous gels dimensions (1% w/v SA, 0.75% w/v CHI, 0.025% w/v GNP, average pore size = 180 µm) in a) PBS and b) DMEM medium, as a function of time, and compared to the initial PLA molds dimensions.	108
Figure A.10 F98 mCherry cells fluorescence intensity in 1% alginate hydrogels (A), 1% alginate 0.75% CHI hydrogels (B) vs 1% SA 0.75% CHI and 0.05% GNP w/v hydrogels (C).	109
Figure B.1 Morphologies TEM de nanoparticules d'or $[HAuCl_4] = 0.3\text{mM}$ + citrate sous argon selon la méthode de Turkevich. La grille TEM a été réalisée suite à la synthèse et a été laissée à sécher sous vide pendant une nuit.	112
Figure B.2 A) Montage de la synthèse de NPs, B) colorimétrie et C) caractérisations UV-Vis des solutions obtenues pour $[HAuCl_4] = 0.1 ; 0.3$ et 0.6 mM	112
Figure B.3 A) Photos des gels obtenus après trempe pendant une semaine dans 3 mL d'une solution de $[HAuCl_4] = 1.5\text{mM}$; B) clichés MEB pour des grossissements a) x10 000 ; b) x20 000 ; c) x50 000 et C) analyse DRX correspondante. Les gels ont été séchés sous vide secondaire pendant une nuit et ont été ensuite métallisés avec du platine.	114
Figure B.4 A) Gel plongé dans une solution de $[AuClPPh_3] = 4\text{ mM}$ (diluée dans du toluène) et maintenu à 40°C pendant 72h et clichés MEB correspondants grossi B) x1000 et C) x5000	115

Figure B.5 Morphologies observées au MEB sur des gels plongés dans 3mL d'une solution colloïdale de NPs à partir de $[\text{HAuCl}_4] = 0.6 \text{ mM}$ (dilué par 2) pendant 24h..... 116

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

La liste des sigles et abréviations présente, dans l'ordre alphabétique, les sigles et les abréviations utilisés dans le mémoire ou la thèse ainsi que leur signification. En voici quelques exemples :

ADN	Acide Désoxyribonucléique
BMSCs	Cellules souches de moelle osseuse
CHI	Chitosan
CXCL12	Protéine chimiokine, chimioattractant
d	diamètre du gel
d_{Gel}	Dimensions domaine du gel
d_{PLA}	Dimensions domaine PLA
d_{Pores}	Dimensions domaine poreux
d_{PS}	Dimensions domaine PS
DMEM	Milieu de Eagle modifié par Dulbecco
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
FDA	Agence fédérale américaine des produits alimentaires et médicamenteux
FLPS	Polystyrène marqué par fluorescence
g	Constante de pesanteur
G	Force appliquée
G'	Module de conservation (élastique)
G''	Module de perte (visqueux)
GBM	Glioblastome multiforme
GDL	δ -gluconolactone
GNP	Génipine

LD50	Dose Létale Médiane
LLDPE	Polyéthylène à basse densité linéaire
LVE	Plage viscoélastique linéaire
M	mol/L
M_w	Masse molaire en poids
M_n	Masse molaire en nombre
M/G	Ratio unités mannuronique / guluronique
MEB	Microscope électronique à balayage
NHS	N-hydroxysuccinimide
p	ratio de viscosité
PBS	Tampon phosphate salin
PCL	Polycaprolactone
PEO	Polyéthylène glycol
PGA	Acide Polyglycolique
PLGA	Poly (acide lactique-co-glycolique)
PLA/PLLA	Acide Polylactique
PVA	Alcool polyvinyle
PS	Polystyrène
PS-OX	Polystyrène fonctionnalisé avec des groupements oxazolidines
RGD	Peptides : Acide arginylglycylaspartique
S	Surface spécifique
SA	Alginate de sodium
SAN	Copolymère styrène-acrylonitrile
SEBS	Polystyrène Polyéthylène-butylène

T	Température
T_g	Température de transition vitreuse
T_m	Température de fusion
t_{gel}	Temps de gélification
TIPS	Séparation de phase induite par la température
γ	Tension interfaciale
ρ	Masse volumique
σ	Contrainte
Δh	Déplacement
h_0	Hauteur du gel
ε	Déformation
ϕ_{Gel}	Fraction volumique du domaine gel
ϕ_{PLA}	Fraction volumique du domaine PLA
ϕ_{Pores}	Fraction volumique du domaine poreux
ϕ_{PS}	Fraction volumique du domaine PS

LISTE DES ANNEXES

Annexe A Informations supplémentaires article	99
Annexe B Synthèse de nanoparticules d'or.....	107

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 La Gliotrappe

1.1.1 Contexte sur le glioblastome multiforme

Le glioblastome multiforme (GBM) de stade IV est un cancer agressif qui se développe rapidement dans le cerveau ou la moëlle épinière. Il caractérise le stade le plus avancé des gliomes, tumeurs cérébrales primitives, qui constituent 56.1% des cas d'après une étude réalisée entre 2010 et 2014 par le Registre central des tumeurs cérébrales des États-Unis (Ostrom et al., 2017). Le stade IV, soit le plus agressif, représente la quasi-totalité des GBM avec 98.7% des cas, soit 45 613 nouveaux patients par an. Son nom provient des cellules cérébrales, les « gliales », et « multiforme » représente le caractère très variable de ce dernier. En effet, il est particulièrement agressif car les cellules tumorales ont la capacité de proliférer très rapidement à travers un vaste réseau de vaisseaux sanguins et d'envahir les tissus sains aux alentours. Les plus touchés sont les personnes âgées. En effet, l'âge médian était de 65 ans en 2017 aux États-Unis. Cependant, certains cas se développent également chez les enfants.

Les symptômes qui en découlent sont multiples : il est accompagné d'une hausse de la pression intracrânienne due à la croissance tumorale qui exerce une pression sur les tissus voisins, bloquant parfois le passage du fluide céphalo-rachidien, ce qui peut occasionner des maux de tête, nausées, vomissements et troubles de la vision. À cela peuvent s'ajouter d'autres symptômes caractéristiques de la zone cérébrale où est localisée la tumeur, soit des difficultés de langage, de mouvement ou des différences de sensations.

Actuellement, les approches thérapeutiques adoptées consistent en une combinaison de procédures chirurgicales, de radiothérapie et de chimiothérapie. En effet, dans la plupart des cas, la chirurgie est indispensable pour l'élimination de la tumeur ou pour prélever un échantillon en vue d'établir un diagnostic précis. Cette intervention contribue à prolonger la durée de vie des patients tout en améliorant leur bien-être en atténuant les effets secondaires liés à la tumeur.

Cependant, il est important de noter que les cellules cancéreuses ont également la capacité de se disséminer dans les tissus sains environnants, ce qui rend leur élimination par chirurgie très risquée, car cela pourrait engendrer des dommages aux tissus sains. C'est pourquoi il devient nécessaire de recourir à la radiothérapie et à la chimiothérapie en complément de la chirurgie. Dans le cas des

enfants, la chimiothérapie est souvent privilégiée en raison de leur sensibilité aux fortes doses de radiothérapie.

Concernant la radiothérapie, une approche consiste à administrer une dose élevée de rayonnement, entre 8 et 20 Gray, de manière très ciblée sur les principales zones où les cellules cancéreuses se sont propagées. Pour cela, des techniques comme la radiothérapie stéréotaxique sont employées, permettant de concentrer l'irradiation sur des emplacements spécifiques. De plus, la radiothérapie à modulation d'intensité peut ajuster la forme du faisceau pour une précision accrue en suivant la configuration de la tumeur.

Cependant, malgré l'utilisation de ces traitements, il est important de reconnaître que la récurrence du cancer demeure inévitable, car les traitements ne peuvent pas éradiquer toutes les cellules tumorales (**Figure 1.1**). Par conséquent, la moyenne de survie s'étend généralement de 12 à 18 mois, avec des taux de survie plus faibles pour les personnes âgées. Les chiffres illustrent cette réalité, avec un taux de survie d'environ 39,7 % à un an, qui diminue à 5,5 % à cinq ans, et à 2,9 % à dix ans, tous groupes d'âge confondus.

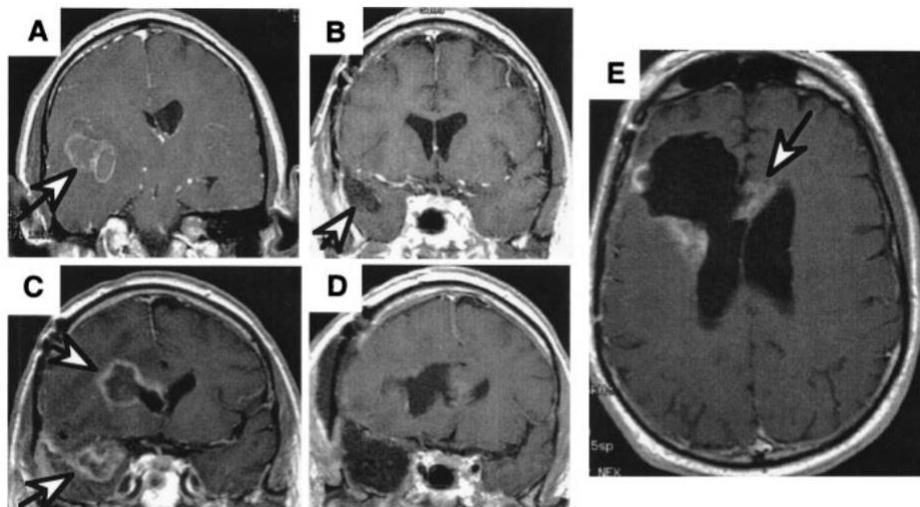


Figure 1.1 IRM d'un patient atteint d'un GBM (A) avant la chirurgie : la flèche pointe la tumeur, (B) post-chirurgie et radiothérapie : la flèche pointe la résection tumorale (C) 6 mois après la chirurgie, récurrence du cancer avec 2 nouvelles tumeurs présentes dans la cavité (D) post-résection des 2 nouvelles tumeurs (E) apparition d'une nouvelle tumeur 3 mois après la 2^e résection (Holland, 2000) Copyright © 2000, The National Academy of Sciences

1.1.2 Les nouvelles avancées thérapeutiques

Le taux de survie du glioblastome multiforme est lié à la migration des cellules cancéreuses résiduelles dans les tissus sains. Les cellules cancéreuses étant plus résistantes à l'irradiation que les tissus cérébraux sains, cela a comme conséquence que les traitements de radiothérapie ne sont pas assez forts pour éradiquer toutes les cellules - une récurrence du cancer est, par conséquent, fortement probable, voire inévitable.

En réponse à cette récurrence, des chercheurs de la société de biotechnologie américaine Guilford Pharmaceuticals ont développé un implant novateur appelé Gliadel Wafer, qui est placé dans la cavité résiduelle après la résection d'une tumeur. Ce dispositif biodégradable libère lentement de la carmustine, un agent chimiothérapeutique, directement dans la zone tumorale. (Westphal et al., 2003) Les résultats thérapeutiques pour les patients atteints de glioblastome (GBM) traités avec le Gliadel Wafer ont montré une amélioration, bien que les avantages restent modestes en raison de la faible activité tumoricide de la carmustine et de la résistance aux médicaments qui peut être facilement acquise. Étant donné la grande hétérogénéité des tumeurs GBM, la thérapie idéale serait probablement une combinaison de médicaments spécifique à chaque patient et à chaque tumeur, administrée à des taux de libération optimaux pour chaque médicament. Pour développer une telle thérapie interstitielle optimale, il faudrait utiliser différents polymères et formulations pour chaque médicament. (Pena et al., 2021)

Une équipe de recherche, comprenant les Professeurs Nick Virgilio¹, Benoît Paquette², Nathalie Faucheu et Marc-Antoine Lauzon³ basée entre l'Université de Sherbrooke et Polytechnique Montréal, travaille actuellement sur le développement d'un autre implant destiné à éliminer les cellules cancéreuses résiduelles. Son principe, illustré à la **Figure 1.2**, est le suivant : suite à la résection de la tumeur, cet implant novateur, appelé Gliotrappe, va être introduit dans la cavité résiduelle. La Gliotrappe, gel biocompatible macroporeux, aura pour fonction d'attirer, de piéger et de contenir les cellules cancéreuses à travers son réseau de pores interconnectés. L'attraction

¹ Centre de Recherche sur les Systèmes Polymères et Composites à Haute Performance (CREPEC), Département de Génie Chimique, Polytechnique Montréal, Montréal H3C 3A7, Québec, Canada

² Département de médecine nucléaire et radiobiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke J1H 5N4, Sherbrooke, Québec, Canada

³ Département de Génie Chimique et de Génie Biotechnologique, Faculté de Génie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke J1K 0A5, Sherbrooke, Québec,

dans le gel des cellules de GBM est permise grâce aux nanoparticules de CXCL12, protéines encapsulées dans le gel qui vont cibler et attirer spécifiquement les cellules cancéreuses GBM résiduelles. L'idée est d'ensuite utiliser la radiothérapie stéréotaxique localement, sur l'implant, ce qui permettrait de délivrer une dose d'irradiation plus élevée sans affecter les tissus sains environnents (Référence: Esquirol et al., 2014). Ce dispositif vise à améliorer l'efficacité du traitement en concentrant l'irradiation sur les cellules cancéreuses tout en minimisant les dommages aux tissus sains avoisinants. Les travaux de recherche se poursuivent afin de développer cette approche prometteuse pour le traitement du cancer.

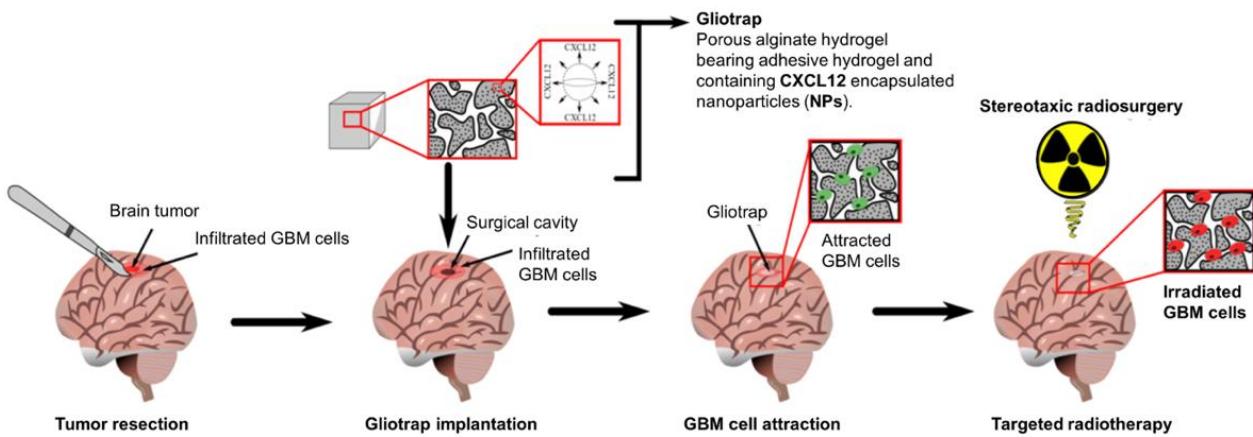


Figure 1.2 Principe du projet Gliotrappe (Giraldo Solano et al., 2020)

1.1.3 Le cas de la Gliotrappe : conception et formulation

Actuellement, plusieurs techniques permettent de fabriquer des gels avec des macropores interconnectés : le lessivage particulaire, la cryogéification, la fabrication additive ou par séparation de phase de polymères, **Tableau 1.1**. Les hydrogels utilisés dans le cadre de la libération contrôlée de médicaments ont une porosité de 100 nm et moins. Dans le cas d'applications nécessitant la pénétration de cellules dans l'hydrogel, des pores de plus grandes dimensions (supérieure à 50 microns) sont nécessaires. (Solano et al., 2021)

Le groupe du Prof. Virgilio utilise la morphologie co-continue obtenue à la suite du mélange par voie fondue de polymères immiscibles. A la différence de certaines techniques actuelles de

conception d'hydrogels, cette méthode permet d'avoir ultimement un contrôle sur la taille des pores dans le gel et une porosité interconnectée, afin d'optimiser la pénétration cellulaire.

Tableau 1.1 Avantages et inconvénients des techniques de fabrication d'hydrogels poreux (Gancheva & Virgilio, 2016)

Techniques de fabrication	Avantages	Limites
Lessivage particulaire	Contrôle de la taille, forme, nombre de pores	Utilisation de solvants, tend à créer des architectures de pores fermés
Cryogéification	Méthode respectueuse de l'environnement, adaptable à différents matériaux	Technique limitée par le contrôle de la nucléation des cristaux de glace et de la cinétique de congélation
Séparation de phase	Méthode simple	Utilisation de solvants, limitée par la distribution des pores
Gas foaming	N'utilise pas de solvant toxique	Contrôle difficile de la distribution et la taille de pores

Le principe, illustré **Figure 1.3**, repose sur l'injection de la solution gélifiante dans un moule poreux. La porosité est obtenue en dissolvant le moule. Les polymères actuellement employés pour réaliser ces moules sont le polystyrène (PS) et l'acide polylactide (PLA), mélangés en proportions égales dans une extrudeuse bi-vis. Dans cette proportion, on obtient la co-continuité du mélange, soit un réseau de deux phases immiscibles (une phase PS et une phase PLA) aux domaines interconnectés. A la suite de l'extrusion, une étape de recuit à haute température (190°C) est réalisée pour augmenter la taille du réseau formé. La dissolution du PS permet d'obtenir des moules poreux en PLA. La solution gélifiante est ensuite injectée dans le moule qui sera extrait à la fin de la gélification. En plus de générer une structure de pores interconnectés, cette méthode s'applique pour plusieurs chimies de gel.

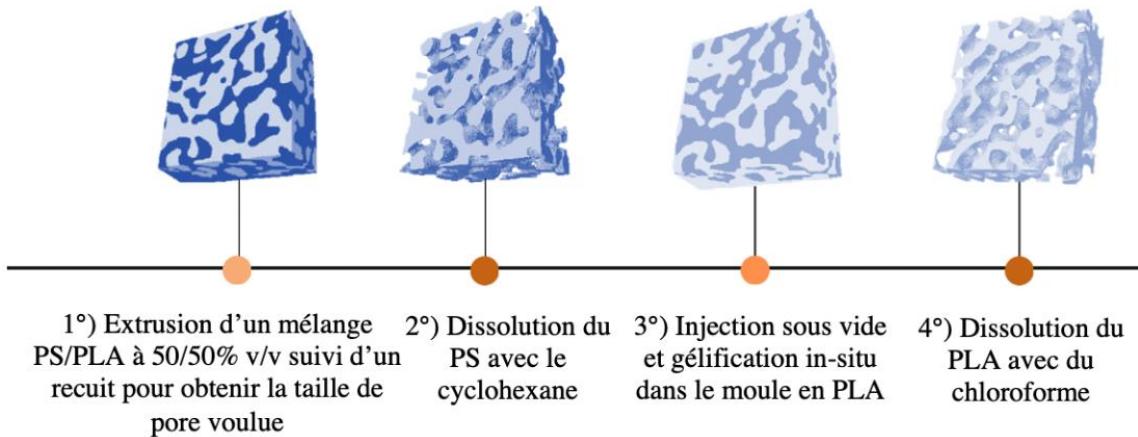


Figure 1.3 Principe de synthèse d'un hydrogel macroporeux à partir de mélanges polymères continus. Inspiré de (Esquirol et al., 2014)

Cette technique a été développée pour préparer des gels à base d'alginate et d'agarose dans un premier temps. (Esquirol et al., 2014) Cependant, les gels d'alginate manquent de stabilité dans le temps, la cause étant la réticulation physique des gels par le calcium. En effet, lorsqu'ils sont en contact avec le milieu physiologique, un échange ionique a lieu avec le milieu et certains ions Ca^{2+} qui permettent de réticuler l'alginate s'échappent du réseau. (Safi et al., 2022) ont montré que l'ajout de la chitosane à l'alginate permet d'améliorer la stabilité des gels dans les milieux salins et de culture cellulaire.

Ces derniers se sont servis du caractère cationique du chitosane et anionique de l'alginate pour former des gels complexes de concentration 1% w/v pour l'alginate et 0.02 ou 0.2% w/v pour le chitosane. Leur module de compression était de l'ordre de celui des tissus cérébraux, soit compris entre 1 et 10 kPa et permettait la bonne pénétration des cellules de glioblastomes F98.

La version la plus avancée de la Gliotrappe est par conséquent celle développée par (Safi et al., 2022), à base d'alginate 1% et de chitosan 0.2% w/v. Tandis que l'alginate apporte une tenue mécanique à l'hydrogel, son association avec le chitosane permet de ralentir sa dégradation dans le milieu de culture. Cependant, ces gels ne sont pas complètement homogènes car l'alginate est soluble à pH neutre ou basique, et le chitosane à pH acide. Pour réaliser ces gels, (Safi et al., 2022) ont réalisé des dispersions de chitosane à pH basique par ajout de NaOH. De plus, la stabilité en

milieu de culture n'est toujours pas optimale car on note une certaine dégradation de l'hydrogel après 15 jours.

L'objectif principal de ce projet de maîtrise est par conséquent de développer une chimie permettant d'obtenir des gels d'alginate et de chitosane homogènes, d'améliorer leur stabilité en milieu de culture tout en conservant les prérogatives initiales, soient une formulation biocompatible, un module de compression de l'ordre du kilopascal et une porosité permettant une bonne infiltration cellulaire.

CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

1.2 Morphologie co-continue et porosité

Les techniques conventionnelles de conception de matériaux polymères poreux, dits échafaudages en ingénierie tissulaire, sont multiples et reposent sur les différentes caractéristiques des polymères employés (**Tableau 2.1**). La taille, la forme, l'interconnectivité des pores ainsi que les propriétés mécaniques de l'échafaudage conditionnent le type d'application pour lequel le biomatériau pourra être employé.

Tableau 2.1 Méthodes de préparation d'échafaudages poreux et leurs caractéristiques. Reproduit partiellement à partir de Sarazin et al. (2004)

Techniques de fabrication	Pourcentage de porosité (%)	Taille de pores (µm)	Limites	Travaux récents
Coulée de solvant et lessivage particulaire	47-97	17-2200	Utilisation de solvants toxiques, particules résiduelles, pores de formes irrégulières	Régénération osseuse (Prasad et al., 2017)
Séparation de phase induite par la température (TIPS)	76-98	1-150	Utilisation de solvants toxiques, grande distribution en taille des pores	Ingénierie tissulaire, administration contrôlée de médicaments (Smith et al., 2009)
Électrofilage	65-97	2-500	Utilisation de solvants, faible stabilité structurale	Ingénierie tissulaire : cicatrisation de plaies (Pezeshki-Modaress et al., 2018)
Moussage au gaz	20-96	100-400	10-30% de pores interconnectés, principalement une surface non poreuse et une structure interne de pores fermés	Ingénierie tissulaire (Mooney et al., 1996)
Coulée en solution	40-50	5-15	Faible résistance mécanique, utilisation de solvants, peu de porosité à la surface, limité aux composants de faible épaisseur	Ingénierie tissulaire, Régénération osseuse (M. A. Khan et al., 2020)

Parmi les méthodes de conception de polymères poreux les plus utilisées, on retrouve le lessivage particulaire. Cette technique consiste à couler en solution un mélange de polymère et de porogènes

dans un moule, puis de lessiver les porogènes. Le principe est illustré à la **Figure 2.1**. Si cette technique permet assez facilement d'avoir un contrôle sur la porosité de la structure, on observe cependant du solvant ou/et des porogènes résiduels ainsi qu'un contrôle limité sur l'interconnectivité des pores.

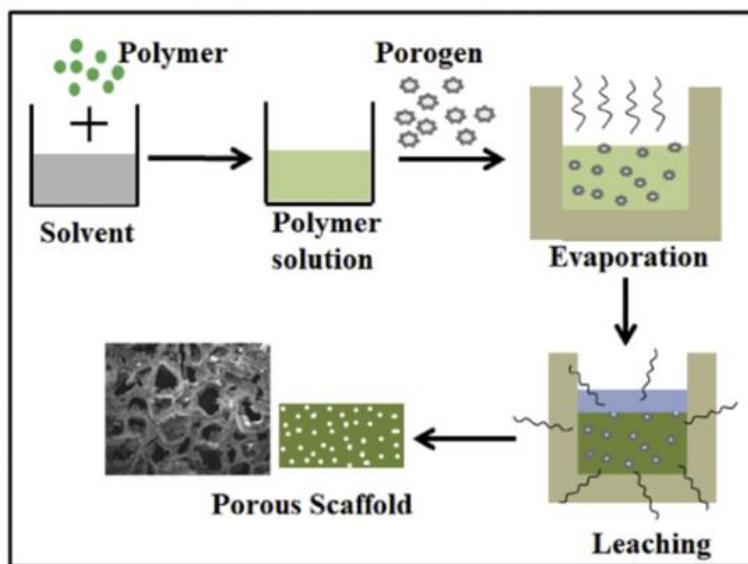


Figure 2.1 Schéma du procédé de lessivage particulaire. Tiré de Suamte et al. (2023). Copyright © 2022 Suamte et al.

De manière similaire, une approche expose un mélange de polymères à des températures et des concentrations favorisant une séparation des phases (*Thermally Induced Phase Separation* ou TIPS). Toutefois, il est important de noter que cette méthode fait usage de solvants, et dans le domaine biomédical, la FDA n'approuve que très peu de solvants en raison de leurs effets cytotoxiques.

C'est pourquoi la technique du moussage au gaz illustrée à la **Figure 2.2** est intéressante. En effet, elle repose sur le même principe de lessivage particulaire, mais permet de s'affranchir de l'utilisation de solvants potentiellement toxiques car elle repose sur l'application au mélange d'une pression élevée, pour que le porogène, ici le CO_2 , se volatilise. Cependant, il en résulte aussi des échafaudages avec une faible interconnectivité des pores.

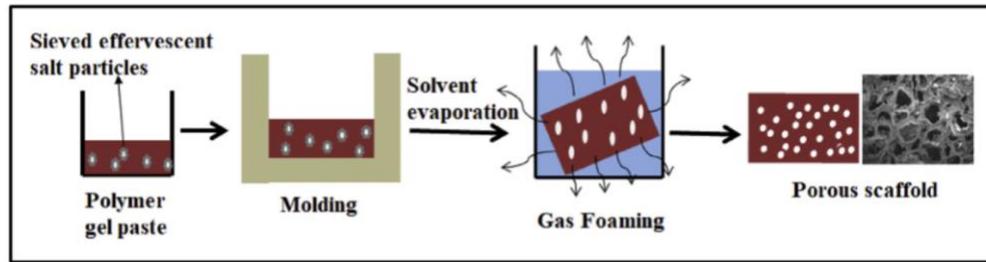


Figure 2.2 Principe du moussage au gaz. Tiré de Suamte et al. (2023). Copyright © 2022 Suamte et al.

En se penchant du côté de l'industrie textile, on retrouve l'électrofilage, technique qui permet de produire des fibres ultrafines à partir de solutions de polymères par application d'un champ électrique à haute tension (Figure 2.3). La porosité résultante (taille et morphologie) dépend des caractéristiques du polymère employé, c'est-à-dire de sa viscosité, son poids moléculaire et sa densité de charge ainsi que de la valeur de la haute tension appliquée. Néanmoins, cette technique présente encore des limites, notamment une petite taille de pores, leur répartition inhomogène dans le volume, ainsi que l'utilisation de solvants.

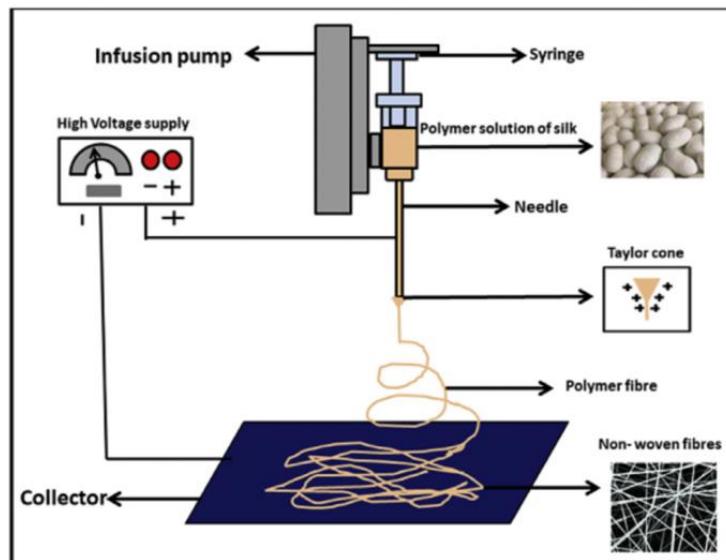


Figure 2.3 Montage d'électrofilage. Tiré de Suamte et al. (2023). Copyright © 2022 Suamte et al.

Pour finir, de nouvelles méthodes moins conventionnelles sont basées sur les techniques de fabrication additive. Ces techniques sont prometteuses car elles permettent de s'adapter aux applications en réalisant des échafaudages aux morphologies et design les plus complexes et donnent des tailles de pores allant de 10-1000 microns. C'est le cas par exemple de la stéréolithographie, qui utilise une résine (par exemple le poly-DL-lactide-co-ε-caprolactone ou de poly-D-lactate) dans le but de créer des échafaudages (**Figure 2.4**). Cependant, l'utilisation de résines photosensibles peut provoquer une irritation cutanée de la peau et montrer une cytotoxicité, d'où la recherche de nouvelles résines à base de vinyl esters et l'apparition de nouvelles méthodes améliorées telles que le traitement numérique de la lumière (DLP), la polymérisation à deux photons (TPP) et la micro-stéréolithographie.

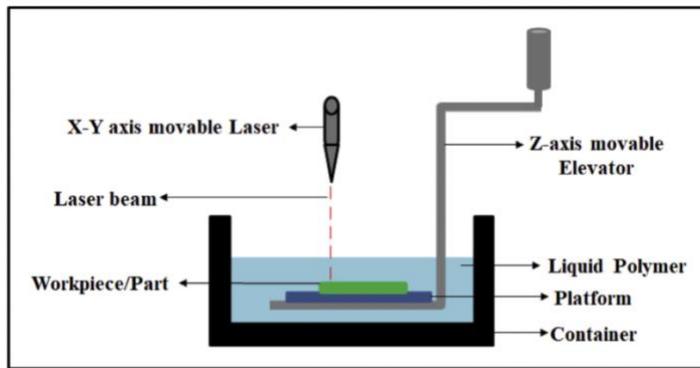


Figure 2.4 Principe de la stéréolithographie. Tiré de Suamte et al. (2023). Copyright © 2022 Suamte et al.

En fabrication additive, on retrouve aussi la bio-impression qui permet au biomatériau d'obtenir des fonctions ou activité biologique en imprimant des échafaudages 3D avec cellules ensemencées pour faciliter la transplantation (Keriquel et al., 2017).

Malgré leur potentiel, ses applications restent très spécifiques, et limitées aux polymères (encre) employés, et des colmatages fréquents de la buse et de la tête d'impression sont observés.

La technique de conception optimale dépend par conséquent des caractéristiques recherchées pour l'échafaudage. Dans le cas spécifique du projet Gliotrappe, il était important de s'affranchir au maximum de l'utilisation de solvants toxiques et d'obtenir un contrôle sur la taille et l'interconnectivité des pores. C'est pourquoi une technique de coulée en solution suivi d'un

lessivage a été utilisée pour concevoir les matrices poreuses. Cette méthode est basée sur la morphologie co-continue d'un mélange de polymères immiscibles. Cette dernière est obtenue en extrudant à l'état fondu un mélange de deux polymères non-miscibles à des concentrations garantissant une interconnexion totale des deux phases. La microstructure obtenue, qualifiée de morphologie co-continue, est figée par trempe. Très proche du principe du lessivage particulaire, une des deux phases est ensuite extraite par un solvant sélectif pour obtenir un moule, qui sera lui-même dissout après injection de la solution gélifiante (**Figure 2.5**). Il en résulte des échafaudages aux pores interconnectés.

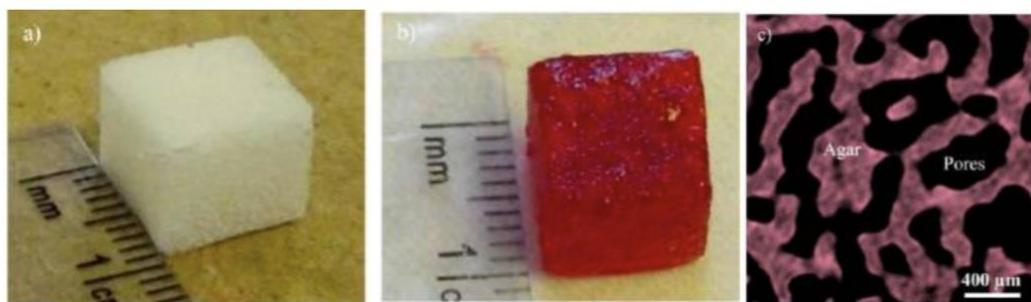


Figure 2.5 (a) Moule poreux en PLA d'1 cm^3 d'une taille moyenne de pores de 200 microns avant injection; (b) Gel poreux d'agar après extraction du PLA; (c) Image μ CT de la structure du gel d'agar obtenu Tiré de Esquirol et al. (2014). Copyright © 2014 American Chemical Society

De plus, une telle morphologie permet un contrôle sur la taille des pores et leur interconnectivité, d'où l'intérêt de l'utiliser dans les applications indiquées au **Tableau 2.2**. Cependant, une des limites actuelles de cette méthode est l'utilisation de solvants.

Tableau 2.2 Applications de la morphologie co-continue

Applications	Références
Industrie automobile	(Teyssandier, s. d.)
Emballage antimicrobien	(Khalil, s. d.)
Polymères conducteurs (capteurs, électrochimie, batterie, électronique)	(Strugova et al., 2022)
Libération contrôlée de médicaments	(Salehi et al., 2008)
Ingénierie tissulaire / implant médical	(Esquirol et al., 2014)

1.2.1 Formation de la morphologie co-continue

Dans un premier temps, il est nécessaire de s'intéresser à la formation de la morphologie co-continue et aux paramètres qui contrôlent son évolution. Lorsque deux polymères immiscibles sont mélangés, celui en plus faible proportion va typiquement adopter une morphologie de type gouttelettes dispersées dans la phase majoritaire, le second polymère. (Ravati & Favis, 2010) ont montré l'évolution de la morphologie du mélange en fonction de la fraction en phase minoritaire dans le mélange (**Figure 2.6**). L'augmentation de la fraction volumique de la phase minoritaire va entraîner une percolation de la phase dispersée, jusqu'à atteindre la région d'inversion de phase, où la structure co-continue est observée.

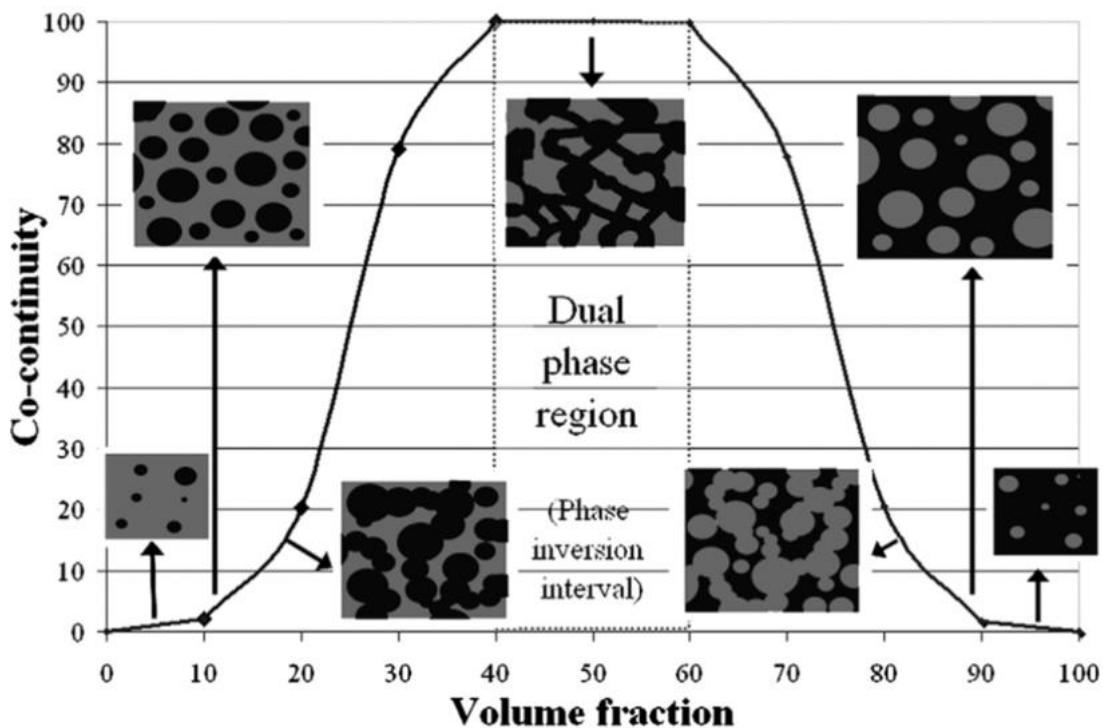


Figure 2.6 Représentation de l'évolution de la morphologie d'un mélange binaire de polymères immiscibles. Tiré de Ravati & Favis (2010). Copyright © 2010 Elsevier Ltd.

Gu et al. (2018) ont réalisé une étude morphologique sur le mélange PS/PLA à différentes fractions. Pour un mélange à 10/90 %vol de PS/PLA, la **Figure 2.7a** montre une phase majoritaire, une matrice de PLA et une phase minoritaire, le PS, dispersée sous forme de gouttelettes. Lorsque la

fraction en PS augmente, on observe tout d'abord des instabilités capillaires et une élongation des gouttelettes dispersées à la **Figure 2.7b**. La taille de la phase dispersée augmente avec l'augmentation de la fraction en PS, **Figure 2.7c**. Cela s'explique par le phénomène de coalescence, ou percolation, à partir duquel les particules sont assez proches pour se comporter comme si elles étaient connectées afin de minimiser leur aire interfaciale et ainsi diminuer leur énergie. Le mélange atteint la co-continuité pour une fraction volumique de 40% en PS, **Figure 2.7d**. Il en résulte une morphologie de deux phases de polymères sous forme de réseaux enchevêtrés, 100% continus. La zone de co-continuité, comme représentée à la **Figure 2.6**, s'étend sur une plage de fractions volumiques. Au-delà de cette fraction, il y aura un processus d'inversion de phase, le PLA devenant la phase dispersée et le PS la matrice.

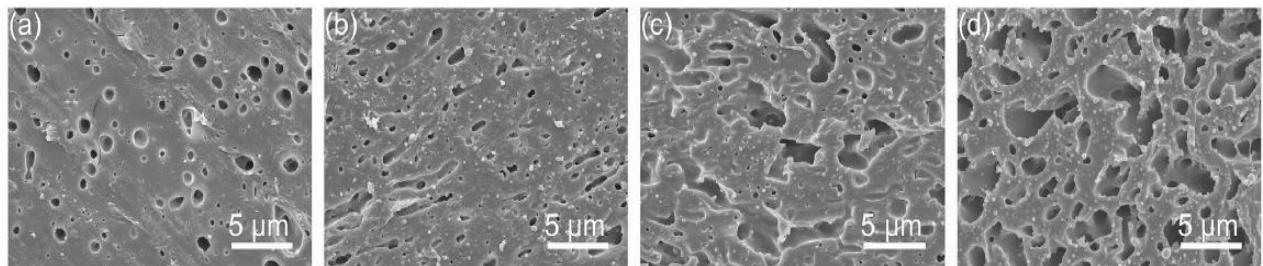


Figure 2.7 Évolution de la morphologie des phases d'un mélange PS/PLA à a)10/90 b) 20/80 c) 30/70 d) 40/60 % vol. Tiré de Gu et al. (2018). Copyright © 2017 Elsevier Ltd.

1.2.2 Paramètres influençant la zone de co-continuité

La fraction volumique des polymères n'est pas le seul paramètre dont dépend la morphologie co-continue, mais elle dépend aussi des conditions expérimentales (choix de l'appareil de mélange, température, taux de cisaillement) et du choix des polymères, via leurs propriétés interfaciales et viscoélastiques.

1.2.2.1 Les caractéristiques des polymères

Les caractéristiques propres des polymères ont aussi leurs impacts sur la morphologie du mélange. Ces derniers se caractérisent par leur masse molaire M_w , leurs propriétés viscoélastiques et leur tension interfaciale γ . (Bourry & Favis, 1998) ont montré que plusieurs modèles soutiennent que

la région d'inversion de phase est dictée par le ratio de viscosité qui s'exprime par $p = \frac{\eta_d}{\eta_m}$, avec le polymère de plus faible viscosité qui a tendance à entourer l'autre et à former la matrice du système, car il en résulte une plus faible dissipation d'énergie. Cependant, il a de même été souligné par Van Oene (Bourry & Favis, 1998) que la tension interfaciale en conditions dynamiques sera affectée par une contribution élastique. Il soutient que, lors du mélange, et pour des concentrations assez élevées, la phase la plus élastique aura tendance à encapsuler la phase moins élastique, donc à être la matrice, car la force élastique s'appliquant sur les gouttes diminue la tension interfaciale. Si l'étude indépendante de ces deux modèles a échoué quant à la prédiction précise de la zone de co-continuité, il est évident que les différences de viscosité et d'élasticité des polymères jouent des rôles importants dans son apparition.

1.2.2.2 Choix du dispositif et paramètres expérimentaux

Outre le choix des polymères employés, l'appareil de mise en forme du mélange aura aussi une incidence sur la zone d'inversion de phase. En effet, dans un mélangeur type *microblender*, le champ de déformation sera principalement du cisaillement alors que dans une extrudeuse bi-vis, la composante élongationnelle du champ sera plus grande que la composante en cisaillement. Une extrudeuse bi-vis aura davantage tendance à allonger les gouttelettes de la phase dispersée, qui auront un diamètre volumique moyen plus faible qu'en cisaillement pur pour un grand ratio de viscosité entre les deux polymères. (Favis & Therrien, 1991) ont aussi montré l'importance de prendre en compte la différence de morphologie entre le centre et les parois. En effet, lors de l'utilisation d'une extrudeuse bi-vis, à la surface du cylindre, le cisaillement est plus grand, donc il n'y aura pas de présence de gouttelettes, mais plutôt de fibres très allongées.

Les paramètres expérimentaux, tels que la température de mélange, ont aussi leur importance. Lorsque celle-ci augmente, la tension interfaciale diminue, de même que la viscosité et l'élasticité des phases (Wu, 1982). La différence de viscosité des polymères induite par le changement de température explique le décalage des courbes vers la droite observée sur la **Figure 2.8**. (Sarazin & Favis, 2005) ont montré que la zone de co-continuité est beaucoup moins étendue à haute température qu'à basse température pour un mélange PS/PCL. En effet, elle s'étend sur une plage de 50 à 65% v/v de PS à 230°C et sur une plage de 30 à 70% v/v de PS à 155°C. Cela s'explique

car pour de basses températures, la phase sous forme de gouttelettes n'est pas en totale fusion donc elle est plus visqueuse.

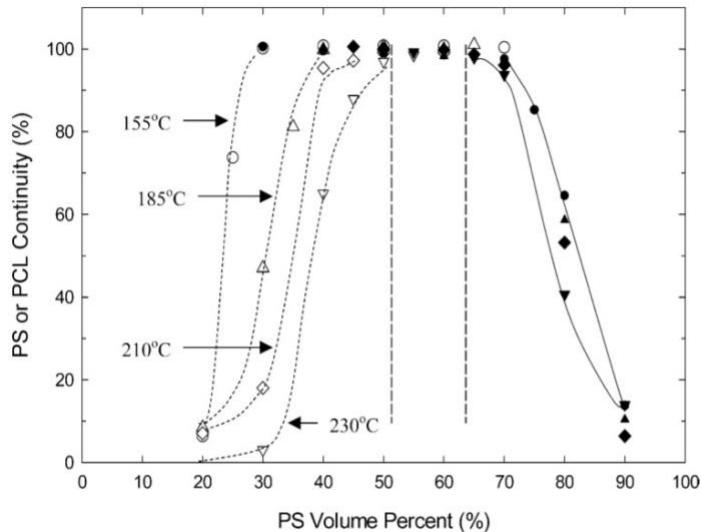


Figure 2.8 Évolution de la région de co-continuité pour les phases PS (en pointillé) et PCL (continue) en fonction de la température. Tiré de Sarazin & Favis (2005). Copyright © 2005 Elsevier Ltd.

Aussi, le phénomène de coalescence est plus marqué lorsque la viscosité de la matrice diminue. C'est pourquoi, la microstructure observée à haute température présentera un diamètre moyen de gouttelette plus élevé, car la viscosité des polymères sera plus faible. (Sarazin & Favis, 2005)

1.2.3 Un contrôle de la porosité

1.2.4 Vers une amélioration des échafaudages

1.2.4.1 Le recuit : un grossissement de la microstructure

Le succès des échafaudages en ingénierie tissulaire réside dans la capacité d'infiltration cellulaire, d'où l'importance d'avoir un contrôle sur la taille des pores et leur interconnectivité garantissant cette infiltration. Des pores trop petits inhiberont l'infiltration cellulaire, favorisant plutôt la formation d'agrégats cellulaires à la surface du biomatériau causés par les interactions cellules-cellules. A l'inverse, si les pores sont trop grands, il y aura une fragilisation du

biomatériaux due à un excès de vide (Ghavidel Mehr et al., 2014). Par conséquent, les pores doivent être de taille supérieure à celle des cellules tout en restant suffisamment petits pour permettre une surface spécifique poreuse élevée par rapport au volume. Plus généralement, selon l'étude menée par (Sarazin et al., 2004), la taille optimale des pores dépendra de l'application du biomatériaux. Quelques exemples sont donnés dans le **Tableau 2.3**.

Tableau 2.3 Taille de pore optimale pour la régénération tissulaire. Reproduit à partir de Sarazin et al. (2004)

Objectif visé	Taille de pore optimale (μm)
Croissance de fibroblastes	5-20
Croissance cellulaire	20-60
Régénération osseuse	75-400
Régénération de la peau	20-150
Néovascularisation	5

(Ghavidel Mehr et al., 2014) ont démontré qu'un recuit à haute température avant extraction de l'une des deux phases de polymères permet d'augmenter la taille des pores. Ce grossissement est induit par la tension interfaciale et ralenti par la viscosité des polymères. Des exemples de morphologies observées pour un mélange co-continu de 45/55 %vol du mélange PCL/PEO sont montrés **Figure 2.9 a) à d)**. Le recuit est réalisé à une température constante, au-dessus des points de fusion des polymères, mais inférieure aux températures de dégradation.

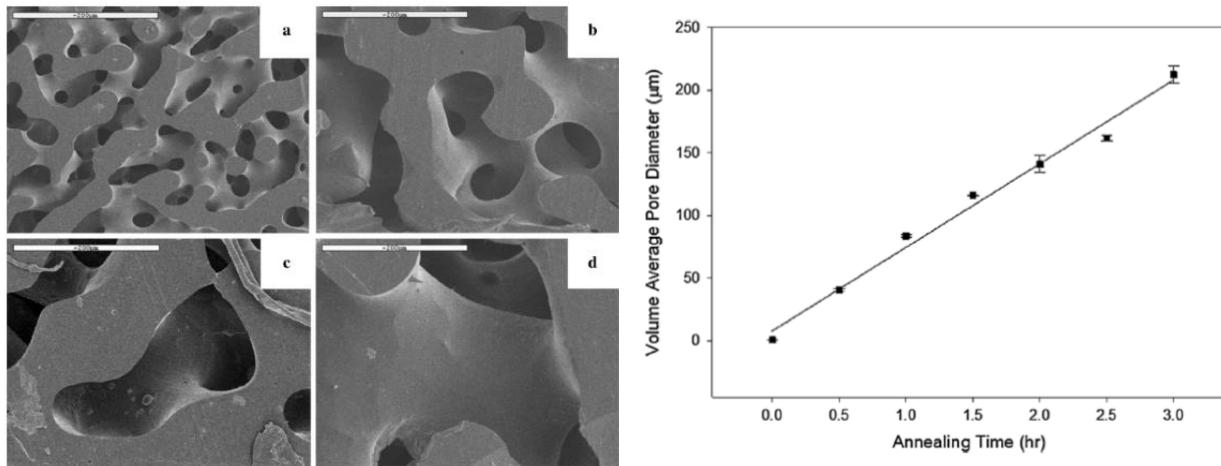


Figure 2.9 Microographies réalisées au MEB pour le mélange 45PCL/55PEO en %vol qui a subi un recuit à 160°C de 30 min, 1, 2 et 3h respectivement pour a, b, c, d; e) évolution du diamètre moyen des pores, en fonction du temps de recuit, pour des PCL poreux obtenus suite à l'extraction sélective du PEO. Tiré de Ghavidel Mehr et al. (2014) Copyright © 2014, Springer Science Business Media New York

(Yuan & Favis, 2005) ont montré qu'il existe une corrélation entre le diamètre moyen volumique des pores et le temps de recuit :

$$\frac{d}{2} = r = k \times t \quad (2.1)$$

avec r le rayon des pores, t le temps de recuit et k le taux de croissance des pores. En mesurant le rayon des pores obtenu en fonction de plusieurs temps de recuit, la vitesse de grossissement, soit $\frac{dr(t)}{dt}$, peut être déduite. Cette dernière correspond à la pente de la fonction linéaire montrée à la

Figure 2.9 e). Cependant, lorsque le polymère employé est biodégradable, un long recuit à haute température peut amener à une augmentation non linéaire de la taille des pores due à une dégradation du polymère. C'est ce qui est observable à la **Figure 2.10 a)** pour le mélange PLLA/PCL à partir de 3 ou 4 heures selon la fraction volumique du mélange.

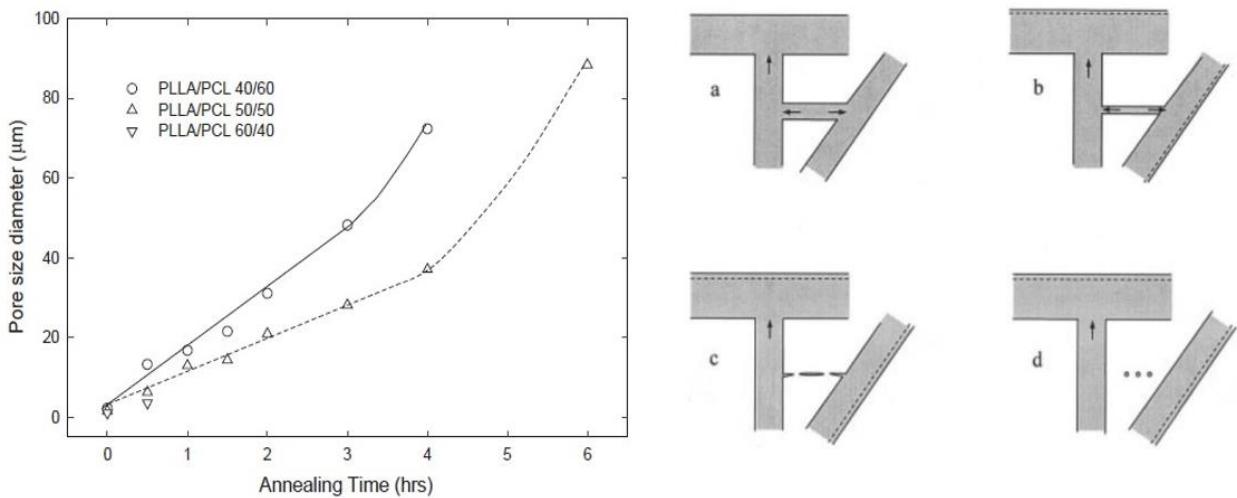


Figure 2.10 a) Évolution de la taille des pores en fonction du temps de recuit du réseau en PLLA (Sarazin et al., 2004) et b) schéma explicatif du processus de grossissement des grains lors d'un recuit. Tiré de Yuan & Favis (2005). © 2004 American Institute of Chemical Engineers

(Yuan & Favis, 2005) ont de même expliqué le phénomène de grossissement des phases lors du recuit d'un mélange présentant une morphologie co-continue : ce dernier résulte d'une différence de pression capillaire dans la structure impliquant que les fibres fines disparaissent au profit des plus grosses, qui s'épaissent (Figure 2.10 b). La pression capillaire est proportionnelle à la tension interfaciale et inversement proportionnelle au diamètre des fibres de la structure. En effet, une fibre qui a une grande section transversale à un certain endroit, aura une pression capillaire plus faible, comparativement à un endroit ayant une section plus faible. La viscosité des polymères a un impact aussi sur ce grossissement : plus elle est grande, moins le grossissement est rapide.

De plus, (Ghavidel Mehr et al., 2014) ont montré que le recuit permet d'uniformiser la distribution en taille des pores, alors qu'une distribution polymodale est obtenue pour des mélanges qui ne subissent pas de recuit. Ceci est représenté Figure 2.11 avec un unique pic pour le mélange qui a subi un recuit et l'obtention de deux pics pour le mélange sans recuit.

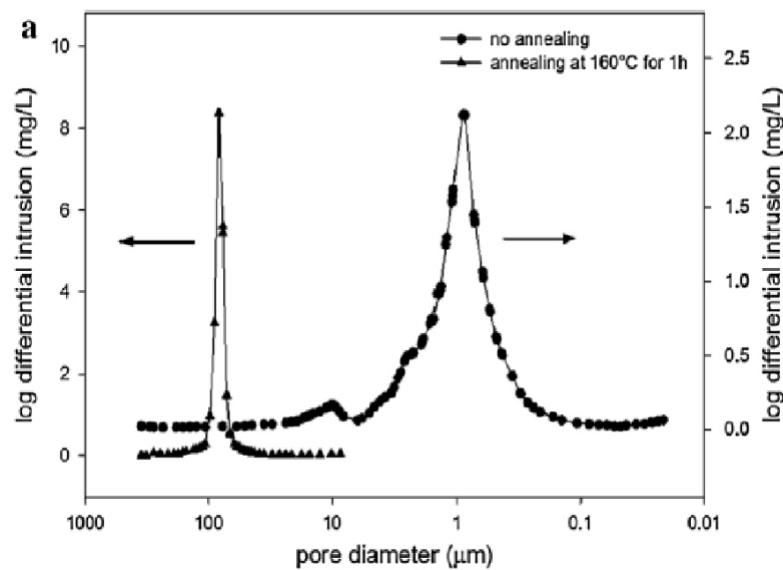


Figure 2.11 Distribution des pores pour le mélange 45/55%vol PCL/PEO avant et après recuit.

Tiré de Ghavidel Mehr et al. (2014). Copyright © 2014, Springer Science Business Media New York

Finalement, (Sarazin et al., 2004) ont montré qu'il existait un temps de recuit optimal pour l'obtention de meilleures propriétés mécaniques. Des tests de compression ont été réalisés sur du PLLA 60% poreux et les résultats obtenus sont présentés dans le **Tableau 2.4**. On note qu'un recuit de 1 heure permet l'obtention de meilleures propriétés mécaniques sur les temps de recuit étudiés. Ces résultats peuvent être expliqués par la compétition entre l'obtention d'une paroi de pore plus épaisse dans le matériau dû à une augmentation du diamètre des pores, ce qui entraîne la diminution de la surface interfaciale totale de la structure lors de l'augmentation du temps de recuit, et une augmentation de la dégradation du PLLA qui est un matériau biodégradable.

Tableau 2.4 Propriétés mécaniques du PLLA à 60% poreux en fonction du temps de recuit.
Reproduit à partir de Sarazin et al. (2004)

Temps de recuit (h)	Module d'Young (MPa)	Résistance en compression (MPa)
0.5	193.3	13.9
1	271.5	15.0
4	233.0	10.9

1.2.4.2 La compatibilisation du mélange : une diminution de la taille caractéristique de la microstructure

A l'inverse, la morphologie co-continue peut aussi donner lieu à des pores de faibles dimensions. Pour cela, il faudra ajouter un agent interfacial au mélange. (Bourry & Favis, 1998) ont montré que la compatibilisation du mélange, soit l'ajout d'un agent interfacial, permet d'augmenter le seuil de percolation en réduisant voire supprimant la coalescence. Cela entraîne une diminution du diamètre moyen de la phase dispersée, ce qui résulte après extraction de l'une des phases à des tailles de pores plus petites. Un mélange à base de PLA/PS a été étudié par (Gu et al., 2018) pour mettre en évidence cette diminution en taille des pores. Ce mélange a été comparé à un mélange où le PS a été fonctionnalisé avec des groupements oxazolidine PS-OX. Ces derniers vont réagir avec les groupements carboxyliques du PLA afin de créer un polymère greffé à l'interface des deux phases. L'évolution des tailles des gouttelettes est significative et est représentée à la **Figure 2.12**.

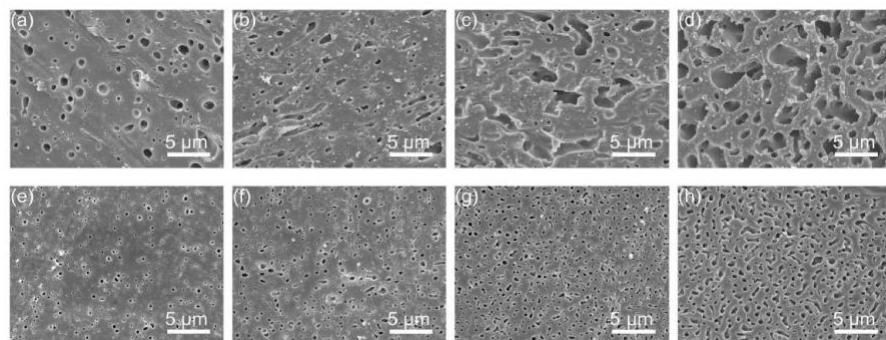


Figure 2.12 Formation de la co-continuité pour un mélange PLA/PS (haut) et PLA/PS-OX (bas) et des %vol de gauche à droite 90/10, 80/20, 70/30 et 60/40. Tiré de Gu et al. (2018). Copyright © 2017 Elsevier Ltd.

Ils ont noté dans ce travail que le temps de mélange a un impact sur la taille des pores obtenus, étant donné le temps de réaction nécessaire pour former le copolymère. A partir de 6 minutes de mélange, la morphologie ne change plus et le mélange a atteint son état stationnaire. Cependant, la réaction interfaciale atteint un état stationnaire au bout de 38 minutes. Ces constatations s'expliquent par le fait qu'au bout de 6 minutes, moins de copolymère sera formé à l'interface,

donc la taille des gouttelettes sera par conséquent plus grande qu'au bout de 38 minutes de mélange. Lorsque la réaction est terminée, soit l'état stationnaire de la réaction interfaciale atteint, le diamètre moyen des gouttelettes est donc plus faible que si un temps de mélange inférieur à 38 minutes avait été appliqué à ce dernier.

L'utilisation d'un agent interfacial peut aussi ralentir le phénomène de grossissement des phases observé lors d'un recuit à haute température. Les travaux menés par (Bell et al., 2010) sur les mélanges PS/PE, PS/PMMA et FLPS/SAN ont montré que les copolymères diblocs symétriques de poids moléculaire intermédiaire se sont révélés les plus efficaces pour arrêter le grossissement des phases. D'autres travaux réalisés par Galloway et al. (2005) ont de même montré que l'ajout du copolymère PS-PE de poids moléculaire intermédiaire, réduisait de manière significative la taille des phases et stabilisait la morphologie du mélange pendant le recuit alors que l'ajout de faibles quantités de ce même copolymère dans le mélange n'a pas réduit considérablement la taille des phases, mais ralenti le taux de grossissement pendant le recuit (Lyu et al., 2002).

De plus, l'architecture des copolymères, qu'ils soient linéaires ou étoilés, joue un rôle important dans le processus de recuit, les copolymères étoilés générant des domaines co-continus de taille plus faible par rapport à leurs homologues linéaires.

1.2.4.3 Les mélanges ternaires : obtention d'une structure hiérarchique en taille de pores

Les mélanges ternaires immiscibles offrent de nouvelles perspectives quant à la conception de matériaux poreux. En effet, il est possible d'obtenir une distribution bimodale en taille de pores. Une structure hiérarchiquement poreuse a l'avantage d'offrir à la fois une grande accessibilité aux pores et une surface spécifique élevée. Dans le cas de l'ingénierie tissulaire, une distribution bimodale pourrait permettre une pénétration cellulaire et une croissance tissulaire à travers les pores de plus grands diamètres, tout en favorisant l'expression des composants de la matrice extracellulaire et le stockage des facteurs de croissance pour la différenciation cellulaire grâce aux pores de plus faible dimension. (Gu et al., 2018) ont étudié le mélange ternaire PLA/PS-OX/LLDPE à 30/30/40 vol%. Les phases PS-OX et LLDPE ont été extraites avec du cyclohexane afin d'obtenir une structure bimodale en taille de pores. Tandis que la phase PS-OX donnent des

pores d'une taille comprise entre 0,5 et 2 microns, la phase LLDPE permet d'obtenir des pores de 5 à 20 microns. Cet ordre de grandeur de différence est visible sur la **Figure 2.13**.

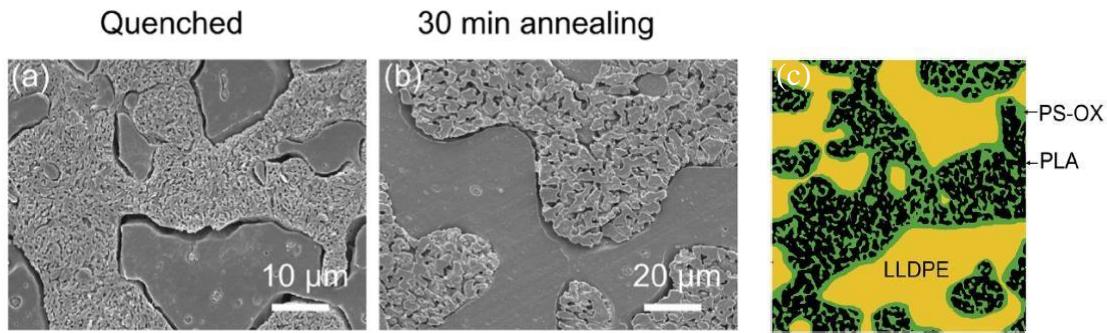


Figure 2.13 Morphologie tri-continue du mélange 30/30/40 vol% PLA/PS-OX/LLDPE a) après trempe b) après 30 minutes de recuit et c) sous forme schématique. Tiré de Gu et al. (2018).

Copyright © 2017 Elsevier Ltd.

La porosité primaire peut être ensuite contrôlée de deux façons : en ajoutant un copolymère à l'interface des phases LLDPE/PS-OX, par exemple le copolymère SEBS, ce qui entraînera une diminution de la taille des pores ou à l'inverse, en appliquant un recuit statique, entraînant une augmentation de la taille des pores.

(Guarino et al., 2011) ont combiné deux techniques pour obtenir une structure poreuse bimodale: le lessivage particulaire et le mélange de polymère à l'état fondu. Des particules de NaCl ont été ajoutés dans un mélange PCL/PEO, duquel la phase de PEO a été extraite. Pour un même niveau de porosité de 60%, les propriétés mécaniques de cet échafaudage ont été comparées aux échafaudages obtenus par lessivage particulaire des particules de sel. Le module d'Young obtenu pour le mélange PCL/PEO+NaCl est de 26 ± 6 MPa, soit supérieur de deux ordres de grandeur aux échafaudages usuels obtenus par seul lessivage particulaire qui est de $1,6 \pm 0,3$ MPa. Cette méthode semble améliorer l'intégrité mécanique de l'échafaudage, permettant d'approcher les propriétés structurales de la matrice extracellulaire des tissus durs.

1.2.4.4 Le post-traitement : modification de la morphologie des pores

En ingénierie tissulaire, l'étape préliminaire de régénération des tissus peut être compromise par une structure de pores isotropes car les caractéristiques morphologiques et mécaniques de l'échafaudage ne correspondent pas totalement à ceux du tissu sain natif.

C'est pourquoi, pour adapter la morphologie de l'échafaudage, (Yin et al., 2017) ont modifié la forme des pores en réalisant une extrusion du mélange avant l'extraction d'une des deux phases de polymère. L'extrusion est réalisée à travers une filière avant le point de fusion du mélange, soit en-dessous de la température de transition vitreuse pour les polymères amorphes et entre la température de transition vitreuse et la température de fusion pour les polymères semi-cristallins, à une vitesse assez lente pour permettre la déformation des particules. Selon le ratio d'extrusion imposé, soit le rapport de la surface de la section transversale des granules initiales de polymère, sur celle de l'extrudat final, des pores plus ou moins allongés seront obtenus.

A la différence des échafaudages isotropes pour lesquels les pores sont distribués aléatoirement et uniformément dans le matériau, cette étape d'extrusion permet d'obtenir un échafaudage stratifié avec des pores orientés; allongés dans la direction d'extrusion. Des pores ressemblant à des microtubules sont alignés parallèlement à la direction d'extrusion (**Figure 2.14 a**) tandis que des pores oblates apparaissent dans la section transversale (**Figure 2.14 b**) pour l'échafaudage en PCL.

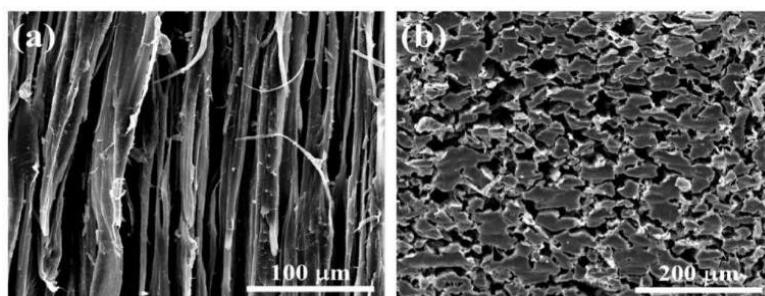


Figure 2.14 Microscopie prise au MEB de la surface de fracture longitudinale (a) et transversale (b) d'un échafaudage en PCL avec des pores alignés. Tiré de Yin et al. (2017). Copyright © 2017

Elsevier Ltd.

Il en résulte un échafaudage anisotrope biomimétique qui permet de se rapprocher de la structure organisée des tissus. En effet, l'orientation des pores permet un meilleur guidage de l'alignement et l'elongation cellulaire nécessaire à leur prolifération. Le remodelage du cytosquelette de la cellule est nécessaire pour avoir une différenciation cellulaire pour reformer le tissu. Le cas de l'elongation des cellules souches de moelle osseuse est montré à la **Figure 2.15**. Or, pour les échafaudages isotropes, les cellules adoptent une morphologie circulaire. Les échafaudages anisotropes en trois dimensions pourraient par conséquent servir de matrice extracellulaire temporaire pour la reformation de tissus.

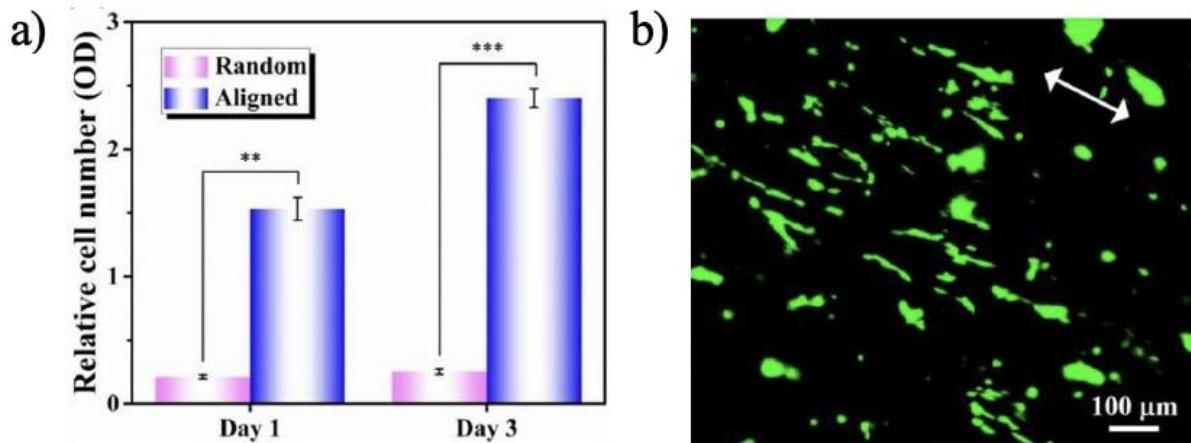


Figure 2.15 Attachement de cellules souches de moelle osseuse (BMSCs) sur un échafaudage en PCL (a) et leur élongation (b) sur une structure poreuse alignée. Tiré de Yin et al. (2017).

Copyright © 2017 Elsevier Ltd.

Les échafaudages résultants ont des propriétés mécaniques accrues dues à une disposition très ordonnée des fibres. De plus, la rugosité de surface des matériaux obtenus après extrusion favorise l'attachement cellulaire et la faible distribution en taille des pores contribue à la répartition homogène des cellules dans l'échafaudage. Cependant, le point limitant pour ce type d'échafaudage est une faible interconnectivité des pores.

En résumé, la méthode de morphologie co-continue offre la possibilité de créer des matrices poreuses biocompatibles avec une taille de pore aisément ajustable, permettant ainsi une

conception optimale des biomatériaux pour des applications spécifiques. De plus, la comparaison entre les échafaudages anisotropes obtenus par le mélange de polymères à l'état fondu et ceux obtenus par électrofilage démontre que les premiers présentent de meilleures propriétés mécaniques et une surface rugueuse propice à l'adhérence cellulaire, ce qui les rend plus attractifs pour les applications biomédicales.

1.3 Les hydrogels

1.3.1 Caractéristiques générales des hydrogels

Une matrice poreuse en polymère peut difficilement être employée pour des applications visant les tissus mous, entre autres les tendons, ligaments, nerfs, muscles, vaisseaux et la peau – la rigidité mécanique des polymères est trop élevée. C'est pourquoi plusieurs études se sont intéressées aux hydrogels. Ces derniers offrent une excellente biocompatibilité et ont une composition proche de celle de la matrice extra-cellulaire, ce qui facilite l'adhésion cellulaire et leur organisation en tissus. En effet, ces derniers sont composés de réseaux polymériques de macromolécules reliées entre elles par des liaisons chimiques ou physiques. Les liaisons sont covalentes pour les gels chimiques alors que les nœuds de réticulation des gels physiques dépendent de l'état thermodynamique et mécanique du gel. La réticulation des gels physiques est par conséquent réversible. Ces deux types de gels sont capables de contenir une grande proportion d'eau ou de fluides biologiques, ce qui fait d'eux de bons soutiens mécaniques et des milieux propices à la culture cellulaire réalisée en environnement stérile.

Pour une application biomédicale, le premier point à respecter est la biocompatibilité de l'hydrogel. Actuellement, la majorité des hydrogels sont réalisés à partir de polymères naturels ou synthétiques. Tandis que les polymères naturels ont une excellente biocompatibilité, biodégradabilité et une faible toxicité, ils souffrent d'une stabilité mécanique souvent limitée. Au contraire, les polymères synthétiques ont de bonnes propriétés mécaniques et de stabilité dans le temps, mais à l'instar des polymères naturels, ils ne sont pas nécessairement pourvus de biofonctionnalité et ils peuvent générer des produits toxiques dans le corps. Les plus employés sont répertoriés dans le **Tableau 2.5**.

Dans le processus de développement d'un hydrogel, il est important de s'intéresser à d'autres paramètres afin de l'adapter au maximum à l'application ciblée. L'intérêt se portera sur ses propriétés mécaniques, de dégradation dans le temps, sa taille de pores/perméabilité, et certaines fois à sa capacité de gonflement. (Yang et al., 2022)

Tableau 2.5 Exemples de polymères utilisés dans les applications biomédicales. Reproduit partiellement à partir de Yang et al. (2022)

	Nom du polymère	Exemples d'application
Polymères naturels	Acide Hyaluronique	Comblement cutané (Smyth et al., 2021) Médicaments transdermiques (Brown & Jones, 2005)
	Alginate	Pansement Kaltostat (Aderibigbe & Buyana, 2018)
	Chitosane	Implant liquide pour le traitement de l'arthrose du genou KioMedine (Van Overschelde et al., 2022)
	Gélatine	Libération contrôlée de médicaments (Su & Wang, 2015)
	Fibrine	Colle chirurgicale Quixil et Tisseel (Noori et al., 2017)
Polymères synthétiques	Polyéthylène glycol (PEG)	Colle chirurgicale CoSeal et DuraSeal (Tan et al., 2019)
	Alcool polyvinyle (PVA)	Implant de cartilage synthétique Cartiva (Smyth et al., 2021)

1.3.1.1 Propriété de gonflement

Le gonflement correspond à la tendance du gel à gagner en volume en absorbant un fluide. A l'instar des gels cationiques, l'habileté des gels anioniques à attirer de l'eau progresse avec l'augmentation du pH due à la présence accrue de fraction ionique, à savoir la concentration en groupements chargés négativement en solution. L'acide hyaluronique et l'alginate qui sont des exemples fréquemment utilisés dans la libération contrôlée de médicaments, et ont des pKa situés autour de 3-3.5 (Yang et al., 2022).

Certains polymères sont sensibles à des différences de température, ils sont dits thermosensibles; c'est le cas des copolymères triblock poloxamères et PLGA-PEG-PLGA (Chan et al., 2019). L'utilisation de cette propriété peut être une solution pour contrôler le gonflement des gels. En effet, ces derniers adoptent une conformation de pelote statistique expansée, permettant au polymère d'absorber une plus grande quantité d'eau. Lorsque la température est proche de celle de séparation de phase avec le milieu, la pelote va s'effondrer et les chaînes vont se compacter, ne laissant plus le fluide circuler.

1.3.1.2 Porosité des gels

La taille des pores est de même très importante lors du design d'un échafaudage, car selon l'application celle-ci doit pouvoir permettre un transport de masse, la diffusion de biomolécules et/ou la rétention cellulaire. (B.-H. Lee et al., 2012) ont montré que la microstructure du gel, ici des billes d'alginate, régule la prolifération et la différenciation des cellules ostéoblastiques encapsulées. Tandis que des tailles de pores supérieures à 16 nm favorisent la prolifération cellulaire, soit la multiplication des cellules, ceux de moins de 9 nm promeuvent la différenciation cellulaire, soit l'acquisition d'une fonctionnalité particulière par la cellule, nécessaire à son bon fonctionnement. (B.-H. Lee et al., 2012) Ces tailles sont spécifique à cette application, car il est important de souligner que ces valeurs peuvent varier en fonction de l'application, polymère(s) employé(s), mode de conception utilisé (rugosité de surface, forme de la porosité, interconnectivité des pores) ...

1.3.1.3 Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques en termes de module d'Young sont différentes selon les applications ciblées (**Figure 2.16**). En effet, les tissus mous ont un module de l'ordre du kPa (muscle, nerfs, vaisseaux) alors qu'un module de plusieurs MPa voire GPa peut être atteint pour les tissus durs (os) (Liu et al., 2015).

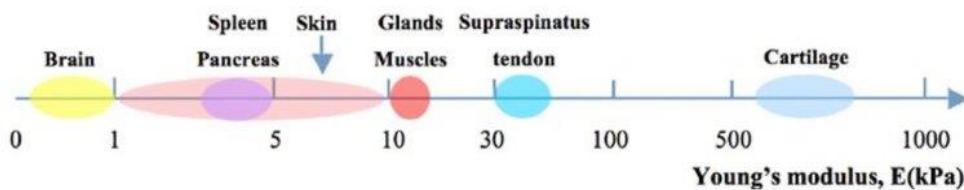


Figure 2.16 Ordre de grandeur du module d'Young des tissus humains. Tiré de Liu et al. (2015).
Copyright © 2015 Liu et al.

Les hydrogels présentent généralement un comportement qui n'est pas purement élastique en raison de la combinaison des propriétés viscoélastiques des chaînes polymères et des effets poroélastiques dus à la présence de fluide. Par soucis de biomimétisme, ils sont majoritairement testés par des tests de compression car la charge est plus uniformément répartie sur l'échantillon et est plus proche des conditions réelles auxquelles les hydrogels seront réellement exposés dans le corps. En effet, l'expulsion de l'eau contenu dans le gel lors d'un test mécanique en tension pourrait rendre le test imprécis et/ou entraîner une rupture prématuée de l'échantillon. Les tests de compression peuvent être utilisés pour mesurer comment un hydrogel réagit lorsqu'il est comprimé sous la charge. Cela peut fournir des informations importantes sur la capacité du gel à gonfler ou à dégonfler en réponse à des forces externes, ce qui est essentiel dans de nombreuses applications biomédicales et industrielles. (Xiao et al., 2013)

1.3.1.4 Dégradation des gels

Enfin, la dégradation du gel dans le temps peut être un facteur clé à déterminer. Dans la libération contrôlée de médicaments, l'intérêt sera porté sur la délivrance des biomolécules au bon moment et au bon endroit dans le corps humain. C'est pourquoi les polymères employés pour synthétiser les gels devront se dégrader en fonction de cette contrainte. Le processus majoritaire de dégradation est principalement hydrolytique avec clivage au niveau des liaisons ester, ce qui forme dans un premier temps des oligomères et finalement des monomères. C'est le cas du PLGA, copolymère biodégradable et biocompatible, couramment utilisé car ses produits de dégradations, les acides lactique et glycolique, sont excrétés du corps en $CO_2 + H_2O$. De plus, sa vitesse de dégradation peut être ajustée en modifiant le rapport unités lactide/glycolique et la masse moléculaire du PLGA. Cependant, sa dégradation dépend aussi du milieu physiologique (température, pH) et de ses interactions avec le principe actif. (Xu et al., 2017) Aussi, bien que ces produits de dégradation

soient inertes et facilement excrétés de notre corps, (Ma et al., 2021) ont souligné que la dégradation du PLGA induit un environnement acide qui diminue la viabilité des cellules et augmente l'apoptose cellulaire, ce qui est un facteur potentiel affectant la fonction cellulaire à prendre en compte lors de la conception d'un implant.

1.3.2 Le chitosane

1.3.2.1 Paramètres

Le chitosane, illustré **Figure 2.17**, provient de la désacétylation de la chitine, deuxième polymère naturel le plus abondant après la cellulose. On le retrouve comme composant de l'exosquelette des arthropodes sous forme de microfibrilles cristallines ordonnées ou dans les parois cellulaires des champignons et des levures. Les principales sources commerciales de chitine sont les carapaces de crabes et de crevettes. La chitine, de formule chimique $(C_8H_{13}O_5N)_n$, est un polysaccharide azoté de la famille des glucides qui résulte de la polymérisation d'unités N-acétylglucosamine liées entre elles par une liaison osidique (**Figure 2.17 a)**. Les différentes formes de chitine sont caractérisées par leur degré de désacétylation, qui correspond à la substitution de groupements acétyles CH_3CO (liés aux groupements NH) par des groupes fonctionnels NH_2 . Cette élimination est réalisée par des ultrasons grande puissance dans une solution aqueuse à 100/120°C contenant la chitine et de la soude (Dimida et al., 2017). Le degré de désacétylation détermine la solubilité et les propriétés chimiques du chitosane car les unités glucosamines (**Figure 2.17 b)** sont la raison de sa solubilisation en solution aqueuse (Dimida et al., 2015). C'est pourquoi, les différentes formes de chitine, naturellement partiellement désacétylées, soit composées de peu d'unités glucosamine, sont insolubles. En conséquence, leur utilisation dans cet état est complexe (Aranaz et al., 2021).

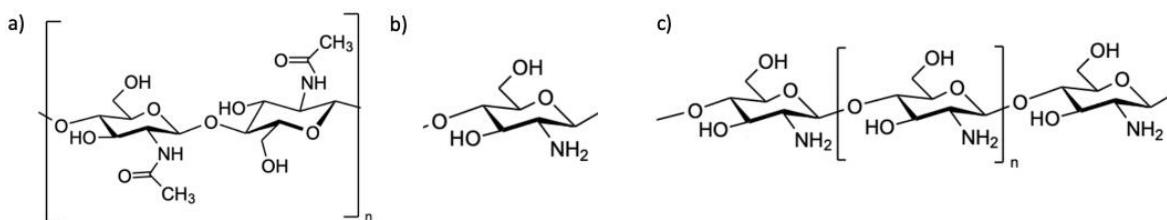


Figure 2.17 Représentation de la chitine (a), d'une unité glucosamine (b) et de la chitosane (c)

A partir d'un degré de désacétylation supérieur à 50%, est obtenu le chitosane, polyoside semi-cristallin, soluble dans les solutions aqueuses acides ($\text{pH} < 6.5$). Sa solubilisation est possible grâce à la protonation des groupements amine en solution, soit l'obtention de NH_3^+ à partir de NH_2 (**Figure 2.18**).

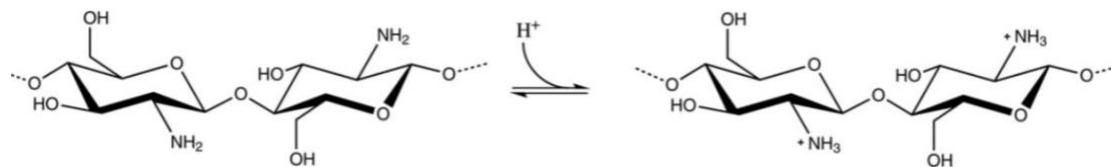


Figure 2.18 Structure du chitosane dans un environnement acide. Tiré de Heimbuck et al. (2019).

Copyright © 2019 American Chemical Society

La solubilisation du chitosane dépend de plusieurs paramètres tels que son degré de désacétylation, de la concentration ionique, du pH de la solution ainsi que de la nature de l'acide utilisé et de la distribution des groupes acétyles le long des chaînes de polymère, car ces derniers participent aux interactions hydrophobes inter-chaînes (Aranaz et al., 2021). Il faut aussi considérer les interactions inter-chaînes, soit les liaisons hydrogènes entre les groupes hydroxyles. Une masse molaire plus faible entraînera une solubilité plus grande sur une gamme plus large de pH, d'où l'intérêt dans certaines applications d'utiliser des oligomères de chitosane, soit un polymère de faible masse moléculaire, pour pouvoir solubiliser le chitosane à des pH plus élevés. Avec un $pK_a \approx 6.5$, plus le pH augmente, moins le chitosane sera soluble car la proportion de groupements amines protonés diminue. Pour un degré de désacétylation faible, le chitosan est soluble à un $pH = 4.5 - 5$ dans l'acide chlorhydrique. Sa dissolution est toutefois plus couramment réalisée dans une solution d'acide acétique à 0.1 M. (Aranaz et al., 2021)

1.3.2.2 Réticulation du chitosane

Le chitosane peut être réticulé suivant deux voies de réticulation : chimique ou physique.

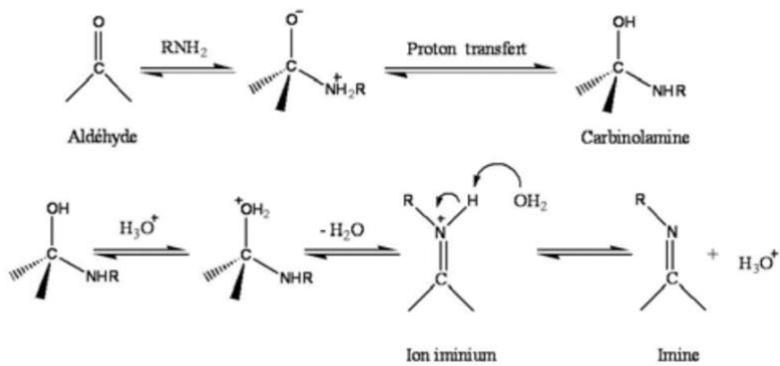
1.3.2.2.1 La réticulation physique

La réticulation physique ou ionique du chitosane s'appuie sur sa forme polycationique en solution, (**Figure 2.18**), qui lui permet de pouvoir réagir avec des molécules chargées négativement (Dimida et al., 2015). Dans la littérature, on le retrouve le plus souvent associé à l'alginate ou à l'acide hyaluronique, avec lesquels il forme un complexe dépendant du pH dont la stabilité dépend de la force ionique. La formation du complexe peut être suivie par mesure du pH et de la conductivité de la solution diluée afin de déterminer la fraction de paires d'ions COO^-/NH_3^+ (Rusu-Balaita et al., 2003). Outre ces exemples courants, il existe des associations de chitosane avec l'acide polyacrylique, des sels de sodium, pectine, sulfate de dextrane, etc.(Rinaudo, 2006), mais aussi avec de l'ADN pour sa capacité à le protéger contre la dégradation des nucléases et à permettre le transfert de gènes dans plusieurs types de cellules (Bravo-Anaya et al., 2016). La réticulation ionique peut aussi passer par l'utilisation de phosphates et de sulfates et a comme atout de ne pas être toxique (Kahu et al., 2014). Cependant, les liaisons formées sont faibles (électrostatique, hydrogène ou hydrophobe) et le gel résultant ne présente pas une bonne stabilité mécanique (Dimida et al., 2015).

1.3.2.2.2 La réticulation chimique

La réticulation chimique, quant à elle, vise à former des liaisons covalentes, donc elle nécessite un agent de réticulation et n'est généralement pas réversible. Anciennement, des dialdéhydes étaient utilisés pour réticuler chimiquement le chitosane, à savoir le glutaraldéhyde, le formaldéhyde ou le glyoxal (Tsai et al., 2021). La condensation d'aldéhydes avec une amine primaire donne lieu à la formation d'une base de Schiff (composé comportant une double liaison C=N avec l'azote lié à un groupe aryle ou alkyle et pas à un hydrogène), aussi appelé imine secondaire (**Figure 2.19**).

Cependant, la toxicité de ces dialdéhydes rend leur utilisation limitée dans certains domaines, d'où l'importance de trouver un réticulant d'origine non toxique, particulièrement pour les applications biomédicales et alimentaires. Plus récemment, des études ont analysé l'utilisation de la génipine, qui a une toxicité *in vivo* 1000 fois plus faible que le glutaraldéhyde (la dose létale médiane chez le modèle de la souris étant de $LD50 = 382\ mg/kg$), et qui est biodégradable et biocompatible.



Copyright © 1998 Elsevier Science Ltd.

La génipine, de formule chimique $C_{11}H_{14}O_5$ et de masse molaire $M = 226.226\text{ g/mol}$, est un iridoïde, c'est-à-dire un métabolite secondaire produit par les plantes comme moyen de défense contre les infections microbiennes (Figure 2.20). Elle présente donc des propriétés médicinales, entre autres anti-inflammatoires, anticancéreuses, antithrombotiques et antibactériennes, d'où l'intérêt de son utilisation dans des applications biomédicales (Pena et al., 2021). Elle réagit spontanément avec les amines primaires des acides aminés, protéines et peptides et forment des pigments bleutés. C'est pourquoi elle est utilisée en tant que colorant dans les jus, desserts et gels, mais aussi dans la teinture du coton, de la laine et du cuir. Deux sources végétales sont utilisées : la *Gardenia jasminoides* et la *Genipa americana L.*

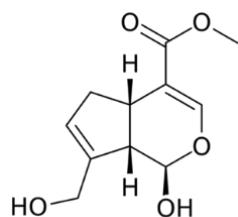


Figure 2.20 Molécule de Génipine

Pour réticuler le chitosane, elle réagit avec les groupements amines pour former des amines hétérocycliques. Il existe deux mécanismes de réticulation selon le pH de la solution. En effet, dans les pH acides et neutres, le procédé se déroule en deux étapes (Figure 2.21.1 a) : la première étape,

rapide, correspond à l'attaque nucléophile du carbone C3 (identifié **Figure 2.21**) de la génipine par le groupement amine primaire du chitosane, conduisant ainsi à la formation d'un composé hétérocyclique lié au résidu de glucosamine dans le chitosane (**Figure 2.21.1 b**). La seconde étape, plus lente, est la substitution nucléophile du groupe ester présent dans la génipine pour libérer du méthanol et former un lien amide secondaire avec le chitosan.

En conditions basiques, c'est une attaque nucléophile par des ions hydroxyles en solution aqueuse (**Figure 2.21.2.a**) qui permet de former des groupes aldéhydes intermédiaires, qui subissent ensuite une crotonisation, soit l'élimination du groupement alcool et la formation d'une nouvelle double liaison C=C (**Figure 2.21.2.b**) (Ramos-de-la-Peña et al., 2016). Les groupements aldéhydes terminaux de la génipine polymérisée subissent une réaction de Schiff avec les groupes amines du chitosane pour former des réseaux réticulés. Lors de cette réticulation, les molécules de génipine constituant les ponts inter-chaînes sont plus longues.

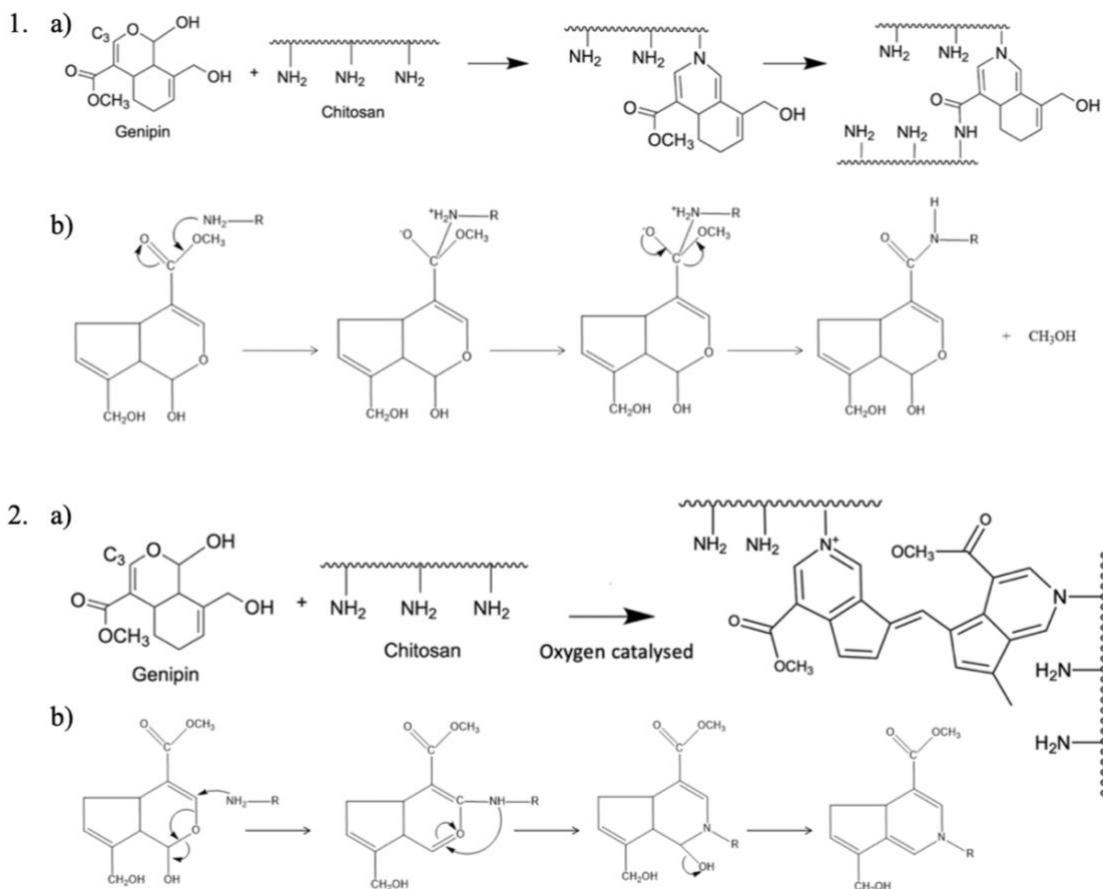


Figure 2.21 Schéma des processus de réticulation de la chitosane par la génipine en pH acide et basique, respectivement 1. et 2. a) avec leurs mécanismes réactionnels associés b). Reproduit à partir de Dimida et al. (2015) et Ramos-de-la-Peña et al. (2016).

La réticulation du chitosane par la génipine donne lieu à des hydrogels bleus et dépend des paramètres suivants. (Muzzarelli, 2009)

- Nature du chitosane employé :

La masse molaire du chitosane a un impact sur les gels obtenus. (Delmar & Bianco-Peled, 2015) ont montré que plus celle-ci augmente, moins il faut de génipine pour gélifier le chitosane. La variation de la masse molaire n'influence pas le gonflement de l'hydrogel mais peut affecter sa solubilité ; en effet, des oligomères de chitosane se solubiliseront plus facilement à des pH plus élevés.

- Concentrations en chitosane et génipine :

La concentration en chitosane doit être suffisamment élevée pour garantir que les chaînes de polymères soient assez longues pour s'enchevêtrer et que la solution gélifie. De plus, la concentration en génipine doit être adaptée selon les propriétés mécaniques et la stabilité des gels visées. De plus, elle doit être adaptée à la concentration en chitosane. (Dimida et al., 2017) ont déterminé le module en compression d'échafaudages lyophilisés de CHI à 1.5 %w/v (diamètre de 6 mm et 3.7 mm d'épaisseur) en se basant sur la pente initiale de la courbe obtenue par essai de compression, pour deux concentrations de GNP : 0.025 %w/v et 0.05 %w/v. Les résultats ont révélé un module d'environ 7 kPa pour les deux concentrations, indiquant que l'augmentation de la concentration de génipine n'a pas nécessairement eu un effet significatif sur le module final obtenu. En effet, (Heimbuck et al., 2019) ont montré l'obtention d'un plateau à partir d'une concentration en génipine de 2% w/w de chitosane (soit 0.04%w/v pour une solution de chitosane de 2% w/v) de masse molaire élevée, et de 3% w/w de chitosan de faible masse molaire (soit 0.06% w/v), à partir duquel le module maximal du gel était obtenu. Pour des raisons de coût et de diminution des risques de toxicité, il est donc préférable de ne pas dépasser ce ratio.

- Température/temps de gélification t_{gel} :

La réaction de réticulation du chitosane par la génipine est une réaction relativement longue. D'après (Dimida et al., 2015), le temps de gélification t_{gel} diminue avec l'augmentation de la température (**Tableau 2.6**).

Tableau 2.6 Évolution du temps de gélification en fonction de la température pour une concentration en génipine de 0.25 M (GN1) et 0.5 M de la solution finale (GN2). Reproduit de Heimbuck et al. (2019)

Température (°C)	t_{gel} GN1 (h)	t_{gel} GN2 (h)
25	46	26
37	24	13
50	13	7

- pH de la solution:

Pour un pH inférieur à 3.5, aucun gel ne se forme car il y a une majorité de groupes aminés protonés. Or, ce sont les groupements aminés neutres NH_2 qui participent à la réaction. Plus le pH est élevé, plus le degré de réticulation, et, par conséquent la rigidité du gel, augmentent, et le temps de gélification diminue (**Tableau 2.7**).

Tableau 2.7 Évolution du temps de gélification et du module élastique de gels de chitosan à 1% w/v réticulé avec de la génipine à 0.1% w/v en fonction du pH de la solution. Reproduit de Delmar & Bianco-Peled (2015)

pH	4	4.5	5	5.5
Temps de gélification (h)	4.5	2.8	1.5	1.2
Module G' (Pa)	19	51.5	96.7	260

- Couleur :

Le degré de réticulation a aussi un impact sur la couleur des gels obtenus. En effet, un degré de réticulation plus élevé implique davantage de doubles liaisons conjuguées formées qui sont la cause de la couleur du gel bleu obtenu. Il en résulte donc un gel plus foncé et plus rigide.

- Gonflement :

Plus le pH de la solution est faible, plus les gels gonflent rapidement et pourront absorber une plus grande quantité d'eau car les groupements aminés du chitosan sont protonés. Le taux de gonflement est plus grand lorsque les gels sont moins réticulés car moins rigides donc pour des concentrations en génipine plus faibles (Dimida et al., 2015).

1.3.3 L'alginate

1.3.3.1 Caractéristiques

L'alginate présente de nombreux avantages quant à son utilisation dans le domaine biomédical car il est, entre autres, biocompatible, non immunogène, abondant, peu onéreux et ses propriétés mécaniques sont proches de celles de certains tissus mous du corps humain. En effet, il intervient dans des applications de cicatrisation des plaies, d'administration de médicaments, en culture cellulaire *in vitro* et ou en ingénierie tissulaire (K. Y. Lee & Mooney, 2012).

Les alginates sont une famille de copolymères linéaires naturels issus d'algues brunes contenant des blocs composés d'unités mannuronique (M), guluronique (G) ou d'un mélange des deux (MG) (Figure 2.22) (Ramdhan et al., 2020). Les différentes sources d'alginate, soient les différentes algues dont ils proviennent, donnent des ratios M/G et des longueurs de blocs différentes, expliquant que plus de 200 types d'alginate sont actuellement commercialisés. Seules les unités guluronates participent à la réticulation ionique, c'est pourquoi un faible ratio M/G entraîne des hydrogels plus résistants.

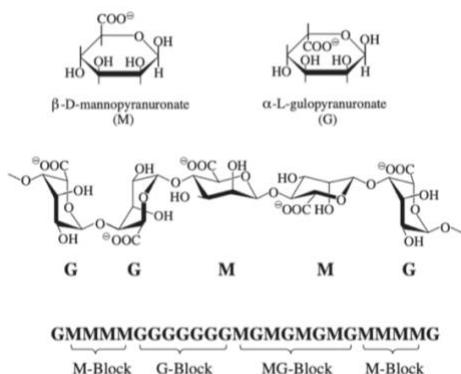


Figure 2.22 Structure de l'alginate et des différents types de block. Tiré de Davis et al. (2003).

Copyright © 2003 Published by Elsevier Ltd.

1.3.3.2 Réticulation

L’alginat a une aptitude à former des gels physiques en présence de cations divalents (ou trivalents) comme le Ca^{2+} , qui se lient à 4 unités guluroniques et forment des réseaux hexagonaux stables thermiquement - on parle de la structure ‘egg-box’ (**Figure 2.23**) (Auriemma et al., 2020).

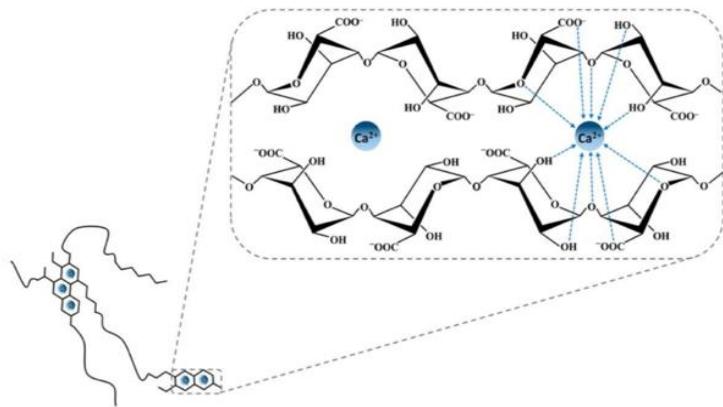


Figure 2.23 Modèle de réticulation « Egg-box » avec des chaînes d’alginat. Tiré de Auriemma et al. (2020). Copyright © 2020 par Auriemma et al.

Pour cela, il existe deux types de réticulation. La première, qualifiée de réticulation externe, repose sur la diffusion des ions Ca^{2+} d’une solution de $CaCl_2$ déposée à la surface de la solution d’alginat. Pour que la majorité des groupes carboxyliques encapsule les ions calcium, la concentration de $CaCl_2$ doit être supérieure à 0.01 M/g d’alginat. Cependant, ce procédé de réticulation entraîne est rapide et peu contrôlé, ce qui diminue la stabilité mécanique des gels résultants.

Le second type de réticulation est interne et consiste à mélanger à l’alginat un sel de calcium inactif (insoluble) tel que le $CaCO_3$ ou le $CaSO_4$, et un composé chélateur du calcium comme le Ca-EDTA ou le citrate de calcium, puis utiliser de l’acide acétique glacial (libération rapide) ou du δ -gluconolactone (GDL) (libération contrôlée) afin de libérer plus ou moins rapidement les ions Ca^{2+} en solution. Ce dernier cas donnera des gels plus homogènes, aux meilleures propriétés mécaniques car la réticulation aura été plus lente, contrôlée et homogène (K. Y. Lee & Mooney, 2012).

Une solution permettant de ralentir la réaction lors d'une réticulation externe serait de la réaliser à une température plus basse, ce qui impliquerait une plus faible diffusivité des ions Ca^{2+} , ralentissant ainsi la réaction. Le réseau obtenu sera plus ordonné et homogène et les propriétés mécaniques du gel en seront améliorées. (K. Y. Lee & Mooney, 2012)

Cependant, dans les deux cas, les gels sont réticulés ioniquement et manquent par conséquent de stabilité sur le long terme dans les conditions physiologiques, car les ions calcium vont être relargués dans le milieu en raison d'échanges ioniques avec les cations monovalents présents dans le milieu (Na^+, K^+). Cela limite donc leur utilisation en tant que tel dans les applications biomédicales de plus longue durée.

1.3.4 Hydrogels à base de mélanges de polymères

1.3.4.1 Les différents types d'hydrogel

Les mélanges de polymères suscitent aujourd’hui un vif intérêt dans des domaines divers et variés : ils permettent d’obtenir des matériaux aux nouvelles propriétés afin de les optimiser en vue d’applications très spécifiques en ajustant la composition des polymères constitutifs du mélange. Ainsi, ces derniers permettent de conserver l’intérêt de chacun tout en améliorant leurs limites.

Dans le cas d’un mélange de deux polymères gélifiants, 3 types de gels peuvent être formés (Ramdhan et al., 2020):

- Le premier type, les **gels complexes**, découlent des interactions électrostatiques entre un polymère cationique et un polymère anionique (**schéma A, Figure 2.24**). La conception de ce type de gel nécessite un ajustement du pH des solutions, de la température et de la concentration des polymères en question. En effet, il est important de bien contrôler la complexation pour éviter une précipitation non-contrôlée de l’un des deux polymères, ce qui donnerait lieu à des agrégats et non à un gel. L’intérêt de ce type de gel réside dans une bonne perméabilité et affinité électrolytique. Cependant, les échanges ioniques peuvent entraîner une perte de stabilité des gels voire une totale désintégration.

- Le second type, les **gels mélangés** (schéma C, Figure 2.24), consiste à mélanger 2 polymères qui forment chacun un gel sans qu'ils n'interagissent entre eux.
- Le dernier type, les **gels remplis** (schéma D, Figure 2.24), consiste en l'ajout d'un composé qui ne gélifie pas dans un autre qui gélifie, comme par exemple l'incorporation d'amidon dans un gel d'alginate dans le but d'imiter les cellules de stockage des plantes. (Zafeiri et al., 2021)
- Un autre moyen de tirer avantage des propriétés de deux polymères est d'appliquer un revêtement d'un polymère sur un autre (schéma B, Figure 2.24). Dans ce cas-là, il est crucial de garantir une adhérence solide entre les deux polymères ainsi que des propriétés mécaniques appropriées pour prévenir tout risque de délamination. Cela implique que le revêtement doit être en mesure de maintenir son intégrité et de résister aux contraintes environnementales sans se détacher du substrat. C'est pourquoi le choix de polymères compatibles, le recours à des techniques d'adhérence efficaces et la considération des différences de propriétés entre les deux polymères deviennent des facteurs clés pour assurer le succès et la durabilité du revêtement.

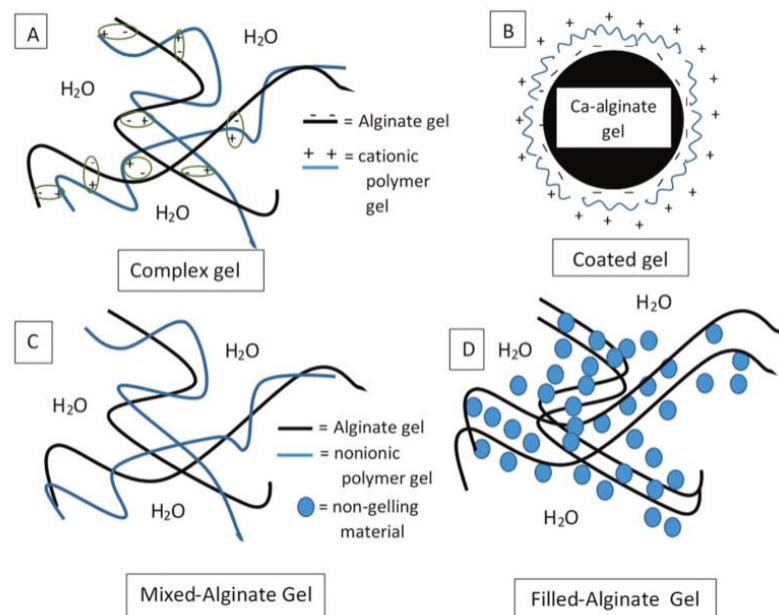


Figure 2.24 Les différents types de gel à base de plusieurs polymères. Tiré de Ramdhan et al. (2020). Copyright © 2020 Published by Elsevier Ltd.

1.3.4.2 Cas particuliers des gels alginate-chitosane

L'intérêt de mélanger ces deux polymères naturels est de créer de fortes liaisons électrostatiques polyanion/polycation, renforçant ainsi la stabilité des gels en milieu ionique. (Safi et al., 2022) ont réalisé des gels poly-électrolytiques de type ‘egg-box’ à partir d’alginate et de chitosane afin de combiner les propriétés des polymères de base à savoir l’alginate, un polymère non-immunogène et souple aux propriétés mécaniques comparables à celles des tissus cérébraux, et le chitosane, qui favorise l’adhésion cellulaire et permet d’obtenir une réticulation électrostatique forte, due à la masse molaire et à la quantité de charges sur les chaînes. En effet, le chitosane, positivement chargé, interagit ioniquement avec l’alginate pour former un gel. Plus précisément, ce sont les groupes carboxyliques de l’alginate qui interagissent avec les amines protonés du chitosane. Plusieurs paramètres gouvernent cette réticulation : la rigidité des gels augmente avec la masse molaire du chitosane et avec la fraction en blocs M d’alginate (Khong et al., 2013).

Contrairement à la chitosane, l’alginate se dissout dans des pH alcalins et se déhydrate dans les pH acides. L’ajout de chitosane permet donc de stabiliser l’alginate. Les deux solutions ne peuvent être homogènes après mélange que si le pH du chitosane est neutre. Cependant, un pH = 7 est difficilement atteignable par ajout de NaOH car le chitosane a un pKa de 6.3. C’est pourquoi, certaines études se sont concentrées sur l’emploi d’oligomères de chitosane, de sorte à augmenter la solubilité de ce dernier sur une plus grande gamme de pH (Khong et al., 2013). Cependant, les propriétés mécaniques des gels qui utilisent des oligomères de chitosane sont faibles; les chaînes de polymère n’étant pas assez longues pour permettre un bon enchevêtrement. (Safi et al., 2022) ont réalisé des suspensions de chitosane en plaçant une sonotrode dans la solution et en augmentant le pH par ajout progressif de NaOH jusqu’à l’obtention d’un $9 < pH < 11$.

Une autre étude conduite par (Komoto et al., 2019) s’est concentrée sur l’utilisation du bicarbonate de soude ($NaHCO_3$) pour augmenter le pH de la solution de chitosane. Ce dernier doit être ajouté en assez grande quantité, la proportion devant être supérieure à 1.4 fois l’équivalent molaire de groupement NH_2 des chaînes de chitosane pour qu’il y ait réaction des ions carbonate et bicarbonate avec les groupements amines de ce dernier. Ainsi, le groupement amine en position C-2 du chitosane est modifié en groupement ionique carbamate, permettant sa solubilisation en milieu

basique (**Figure 2.25**). Après cet ajout, la solution atteint un pH qui de l'ordre de 7-8. Cette réaction génère un dégagement de CO_2 et peut être réversible par ajout d'acide.

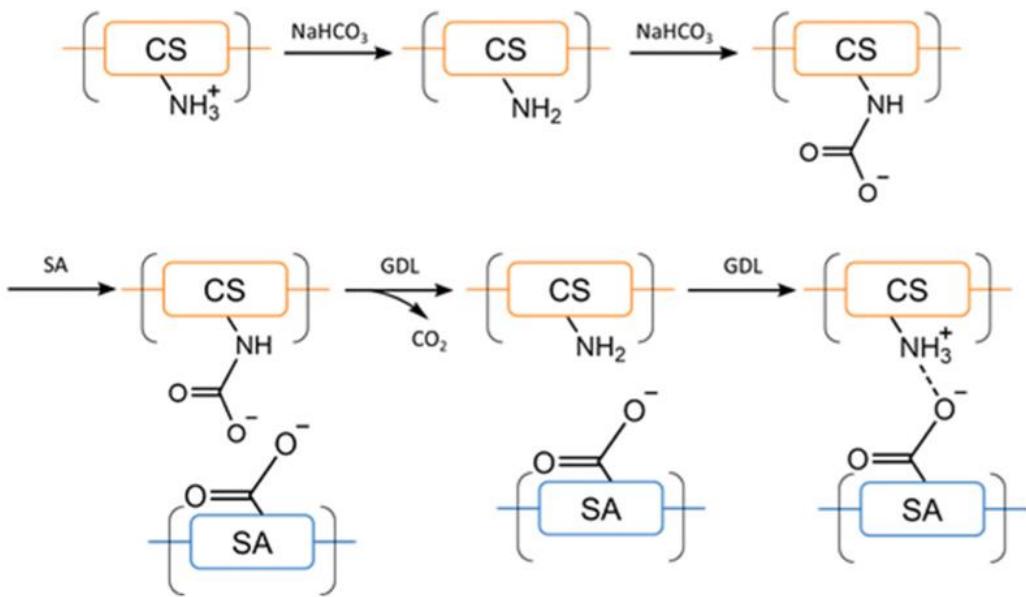


Figure 2.25 Illustration du mécanisme de réticulation. Tiré de Komoto et al. (2019). Copyright © 2018 Elsevier B.V.

Du côté de la préparation des gels, le chitosane est d'abord solubilisé dans une solution d'acide acétique à 0.1 M, puis le bicarbonate de soude est ajouté dans les proportions suivantes (**Tableau 2.8**). Cette solution est ensuite vigoureusement mélangée et dégazée sous la hotte. A la fin de cette étape, le chitosane est à un pH alcalin et peut être mélangé à l'alginate, dissout au préalable dans de l'eau. A la suite du mélange, une solution complètement transparente et homogène est obtenue. Pour finir, du GDL 1M est ajouté à la solution pour enclencher la gélification du mélange, car il permet la diminution contrôlée du pH de la solution. En effet, en diminuant le pH de la solution, le chitosane retrouve graduellement sa forme électrolytique positivement chargée et peut ainsi interagir avec les groupements anioniques (groupes carboxyles COO^-) de l'alginate, illustré **Figure 2.25**.

Tableau 2.8 Masse de bicarbonate de soude ajoutée dans la solution de chitosane à 1% (diluée dans 14 mL d'une solution d'acide acétique à 0.1M + 10 mL d'eau). Reproduit de Komoto et al. (2019).

Concentration en chitosane (%w/v)	Bicarbonate de soude (g)
1	0.5
2	0.75
4	1.25

Des tests mécaniques ont été conduit sur ces gels montrant qu'un ratio molaire chitosane/alginate de 1:1 donne des gels homogènes plus rigides avec un module d'élasticité dépassant le kPa. Cela s'explique par de meilleures interactions entre les deux polymères. Différentes concentrations en alginate et chitosane ont été testées et le plus grand module élastique, de 7 kPa, a été obtenu pour des mélanges de 4% w/v en chitosane et de 2%w/v en alginate. (Komoto et al., 2019)

D'après les études menées sur les gels à base de polymères naturels, il est envisageable de stabiliser des gels de chitosane en milieu physiologique grâce à une réticulation covalente, par exemple, en utilisant la génipine. La génipine est un agent de réticulation privilégié pour les applications médicales en raison de son origine naturelle et de sa biocompatibilité. Cependant, cette approche génère des gels de consistance très molle qui ne conviennent pas à l'application Gliotrappe, qui nécessite un module de compression d'au moins 1 kPa.

Une autre approche consiste à réticuler le chitosane et l'alginate par complexation électrostatique. Pour ce faire, du bicarbonate est préalablement introduit dans la solution de chitosane, puis du GDL (glucono-delta-lactone) est ensuite ajouté à la solution d'alginate et de chitosane. Cette méthode permet d'obtenir des gels homogènes, bien qu'ils restent potentiellement sensibles aux échanges ioniques en milieu physiologique.

Cependant, aucune recherche n'a encore combiné les deux approches précédentes, c'est-à-dire la réticulation chimique du chitosane dans une solution alginate/chitosane préparée avec du bicarbonate de sodium. Aucune étude n'est également rapportée sur la préparation d'hydrogels poreux avec ces méthodes de gélification.

CHAPITRE 3 HYPOTHESE DE RECHERCHE – OBJECTIFS SPECIFIQUES

Actuellement, les gels à base d’alginat et de chitosane élaborés par Safi et al. (2022) présentent une perte de stabilité mécanique une fois plongé dans le milieu de culture qui imite l’environnement cérébral. Cette instabilité résulte de la réticulation physique des gels, réversible par échanges ioniques en solution, ce qui provoque au bout de quelques jours l’affaissement du gel. Toutefois, il a été remarqué que l’augmentation de la quantité de chitosane dans le gel entraîne une détérioration mécanique plus lente au cours du temps dans des milieux riches en ions. De plus, les gels présentent une certaine inhomogénéité, conséquence de la complexation spontanée entre l’alginat, portant des charges négatives en solution, et le chitosane, chargé positivement et insolubles à pH neutres et basiques.

Ainsi, ce projet se fixe comme **objectif principal** d’améliorer l’homogénéité et la stabilité des gels macroporeux à base de chitosane et d’alginat.

« Hypothèse de recherche : L’ajout de bicarbonate de sodium pour former une solution homogène chitosane-alginat, tel que décrit par Komoto et al. (2019), suivi de la réticulation chimique du chitosane par la génipine et de la réticulation physique de l’alginat par une solution de CaCl₂ améliorera la stabilité mécanique des hydrogels obtenus dans les milieux ioniques mimant l’environnement cérébral. »

Les **objectifs spécifiques** du projet sont :

- 1) Développer une formulation d’hydrogels à base d’alginat et de chitosane donnant des gels homogènes et stables dans le milieu de culture;
- 2) Synthétiser des hydrogels poreux, avec un module en compression de l’ordre de 1 à 10 kPa, avec des moules poreux en PLA obtenus à partir de mélanges de polymères PS/PLA co-continus;
- 3) Évaluer la capacité des hydrogels à accumuler et à retenir les cellules cancéreuses;
- 4) Évaluer l’impact de la radiothérapie sur la stabilité des hydrogels.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : CAPTURE OF GLIOBLASTOMA CANCER CELLS WITH MACROPOROUS CHITOSAN/ALGINATE HYDROGELS CROSSLINKED WITH GENIPIN

Submitted article to journal *Carbohydrate Polymers* on Novembre 13th 2023.

Lauriane Pares,^a Sahar Naasri,^b Lisa Delattre,^a Hélène Therriault,^b Benoît Liberelle,^c Gregory De Crescenzo,^c Marc-Antoine Lauzon,^d Nathalie Faucheu,^d Benoit Paquette^{b} and Nick Virgilio^{a*}*

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

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

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

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

* Corresponding authors

ABSTRACT

Grade IV multiforme glioblastoma (GBM) is an aggressive cancer that remains incurable due to the GBM cells invading and proliferating in the surrounding healthy tissues, even after tumor resection. A new therapeutic paradigm to treat GBM is to attract and accumulate GBM cells in a macroporous hydrogel inserted in the surgical cavity after tumor resection, followed by a targeted high dose of radiotherapy. This work presents a molding-based method to prepare macroporous hydrogels composed of sodium alginate and chitosan, homogeneously mixed in solution using sodium bicarbonate, and subsequently crosslinked with genipin and calcium chloride. The gels display a blue color, which is a result of chitosan cross-linking with genipin, fully interconnected pores with an average size of 200 μm (and tunable over a wide range), with a compression modulus of 10 kPa, close to the value of brain tissues. The gels are stable in cell culture media and keep their integrity after radiotherapy doses comparable to current GBM treatment levels. Finally, F98 GBM cells accumulate relatively homogeneously and are retained within the gels.

Keywords: Chitosan, Alginate, Genipin, Crosslinking, Macroporous hydrogels, Glioblastoma

4.1 INTRODUCTION

Grade IV multiforme glioblastoma (GBM) is the most aggressive cancer located in the brain or in the spinal cord, with a survival rate of 5%, 5 years after diagnosis (Ostrom et al., 2017). Current treatments combine surgery, radiotherapy, and chemotherapy. Surgery may improve the quality of life of the patients in the short term by removing the pressure caused by the growing tumor volume, but it has to be combined with radiotherapy and chemotherapy to eradicate the remaining GBM cells. However, GBM cells also invade the surrounding healthy brain tissues where they proliferate (Holland, 2000). Unfortunately, these healthy tissues are more sensitive to the current treatments than the GBM cells, which limits the doses of radiation and chemotherapeutic agents that can be delivered (D'Alessandris et al., 2017). Consequently, and despite these treatments, cancer recurrence is currently inevitable.

A number of new biopolymer-based therapies are being developed to treat GBM. The high heterogeneity of GBM tumors suggests that the ideal therapy will likely be a patient-and-tumor-

specific combination of drugs delivered at optimal release rates, which will then require different polymers and formulations for each drug (Pena, Graham-Gurysh, Bachelder & Ainslie, 2021). One such approach, the GLIADEL wafer, is based on an interstitial drug delivery and has been approved for clinical use. Following tumor resection, the wafers are placed in the surgical cavity. This bio-device gradually releases carmustine directly to the tumor area, allowing for prolonged, targeted exposure of the residual cancer cells to this chemotherapeutic agent. However, benefits are still modest. The administration of non-selective drugs for GBM cells lead to mixed clinical results and various complications arise (Marchi et al., 2007) (Iacob & Dinca, 2009). The maximal tolerated dose for the patient does not frequently reach significant tumoricidal activity for the GBM cells, in addition to the rapid clearance of the drugs from the brain.

Another modality proposed recently is to remove the GBM cells that are infiltrated in the brain tissues, by attracting and concentrating them inside an hydrogel inserted in the surgical cavity – i.e. a cancer cell trap. GBM cells will be attracted by chemoattractants released by the hydrogel, in which they will accumulate via a network of pores. Once into the trap, the next step will be to perform stereotactic radiotherapy, a localized irradiation technique, at a high dose, to eradicate the GBM cells. A larger number of GBM cells will be eliminated without delivering a high and toxic radiation dose to the healthy brain tissues, which will improve the prognosis and the patient's quality of life.

Various hydrogel materials and chemoattractants have been recently tested. Najberg, Haji Mansor, Boury, Alvarez-Lorenzo & Garcion (2019) have used tissue engineering techniques to construct an artificial environment that replicates tumor characteristics by designing a unique three-dimensional matrix incorporating molecular signals that attract tumor cells and effectively trap them. Autier et al. (2019) have developed a bacterial cellulose implant loaded with human serum albumin (HAS), whereas a recent study evaluated the capacity of the chemoattractant CXCL12 to attract residual glioblastoma stem cells into a thiol-Michael hydrogel, confirming the specific attraction of GBM cells into the gel (Khan, Munson, Long, Vlaisavljevich & Verbridge, 2023).

Recently, we reported the development of a sodium alginate/chitosan (SA/CHI) based macroporous hydrogel for the capture and accumulation of GBM cells (Solano et al., 2021) (Safi et al., 2022). The fabrication technique employs porous polymer molds obtained from melt-

processed co-continuous polymer blends, allowing fine control over the porosity features of the hydrogels, including an average pore size tunable from $\approx 5 \mu\text{m}$ to $500 \mu\text{m}$, and with fully interconnected pores (Esquirol, Sarazin & Virgilio, 2014). The method is also compatible with a variety of gel chemistries (Gancheva & Virgilio, 2016). SA is derived from brown algae and comprises a family of anionic linear random block copolymers ($\text{pKa} = 3.5$) composed of mannuronic (M) and guluronic (G) residues (**Figure A.1**). It has gained strong interest in the biomedical field because of its biocompatibility, non-immunogenicity, abundance, and low cost. SA gels display mechanical properties close to certain soft tissues of the human body (K. Y. Lee & Mooney, 2012). It is used in wound healing, drug delivery, *in vitro* cell culture and tissue engineering applications (Lee & Mooney, 2012). SA gels are typically prepared by ionic crosslinking with divalent cations in solution (usually Ca^{2+}), following the “egg-box” model (K. Y. Lee & Mooney, 2012). However, SA gels can lack stability in physiological medium because of ionic exchanges (with Na^+ for example) with the surroundings.

Chitin is a component of the exoskeleton of arthropods and is also found in the cell walls of fungi and yeasts. It is a nitrogenous polysaccharide obtained from the polymerization of *N*-acetylglucosamine units bound together by an osidic bond. Chitosan is then obtained by the deacetylation of chitin, typically above a degree of 50% (**Figure A.1**). It is a semi-crystalline polysaccharide, soluble in acidic aqueous solutions ($\text{pKa} = 6.3$) due to the protonation of the amine groups. Its solubility also depends on its deacetylation degree, the ionic concentration, solution pH and nature of the acid used, and finally the distribution of the acetyl groups along the chain, since they participate in inter-chain hydrophobic interactions (Aranaz et al., 2021).

While a direct combination of SA and CHI in hydrogels provides additional stability in physiological medium due to their complementary charges (Safi et al., 2022), two issues remain: (1) directly mixing SA and CHI results in the formation of aggregates (heterogeneities) in the gels due to their strong electrostatic interactions, and (2) dissolution in physiological medium is only delayed, but not stopped. Komoto, Furuike & Tamura (2019) have shown that adding sodium bicarbonate in excess to a CHI solution renders CHI soluble in basic medium. Indeed, carbonate and bicarbonate ions react with the CHI amino groups to form anionic carbamate groups, while increasing the solution pH (**Figure 4.1 A**). Mixing CHI with SA in solution then results in a fully

homogeneous and transparent solution devoid of aggregates. This reaction is reversible by decreasing the pH again. Indeed, the C – N bonds are cleaved and CO_2 is released (**Figure 4.1 B**). When CHI becomes cationic again, attractive electrostatic interactions between SA and CHI chains can be formed (**Figure 4.1 C**).

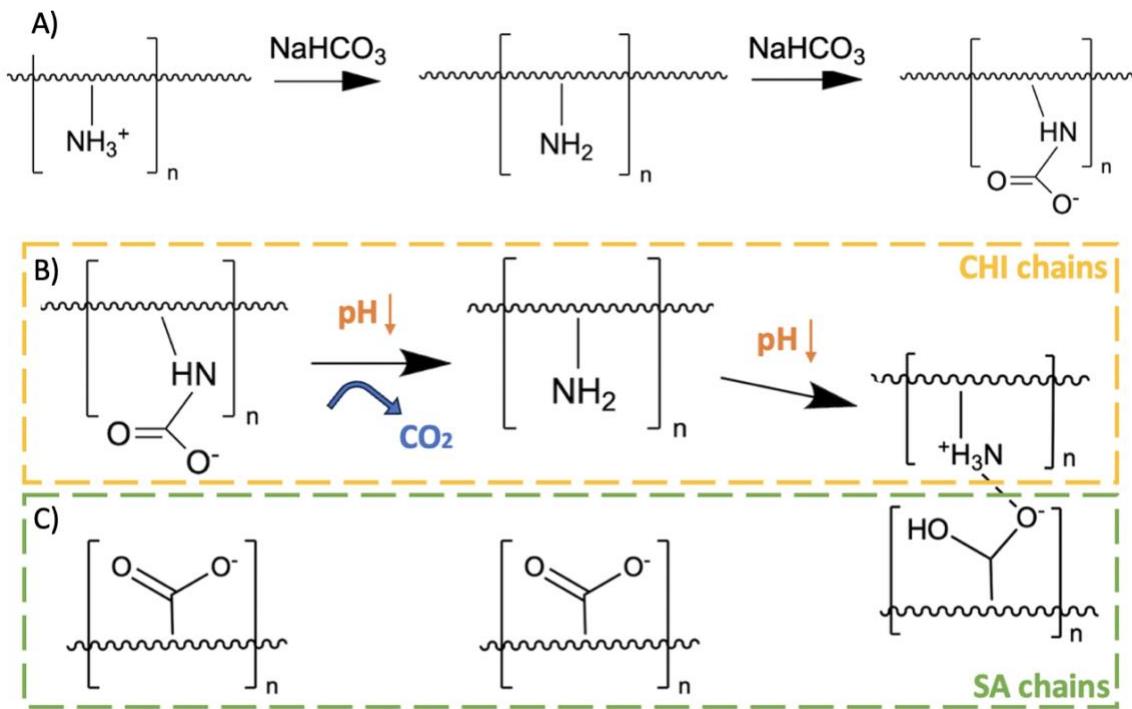


Figure 4.1 A) Chitosan (CHI) reaction with sodium bicarbonate, B) regeneration of primary amines when the pH decreases again, and C) interactions with sodium alginate (SA) chains once CHI recovers its amino groups (Komoto et al., 2019).

In addition, chitosan can also be chemically crosslinked with genipin (GNP). Genipin is an iridoid, i.e. a secondary plant metabolite, produced by *Gardenia jasminoides* and *Genipa americana L* as a mean of defense against microbial infections. It displays a variety of medicinal effects, including anti-inflammatory, anticancer, antithrombotic and antibacterial properties (Ramos-de-la-Peña, Renard, Montañez, de la Luz Reyes-Vega & Contreras-Esquivel, 2016). GNP reacts spontaneously with the primary amines of amino acids, proteins and peptides and forms bluish pigments. It has been used as a crosslinker for chitosan by reacting with its amino groups, forming heterocyclic amines as bridges between chitosan chains (Dimida et al., 2015). There are two cross-linking

mechanisms, depending on the pH of the solution. In acidic and neutral pH, there is a first nucleophilic attack of the C3 carbon of GNP on the primary amine groups of chitosan, leading to the formation of a heterocyclic compound linked to the glucosamine residue of chitosan (**Figure 4.2 A**). This is followed by the nucleophilic substitution of the ester group present in GNP, releasing methanol and forming a secondary amide bond with chitosan. Under alkaline conditions, there is a nucleophilic attack by hydroxyl ions in aqueous solution (**Figure 4.2 B**) forming intermediate aldehyde groups, which then undergo crotonization (a crotonate group $-\text{CH} = \text{CH} - \text{CH}_3$ is formed into the molecule) (Ramos-de-la-Peña, Renard, Montañez, de la Luz Reyes-Vega & Contreras-Esquivel, 2016). The terminal aldehyde groups of the polymerized GNP then undergo a Schiff reaction with the amine groups of chitosan to form cross-linked networks.

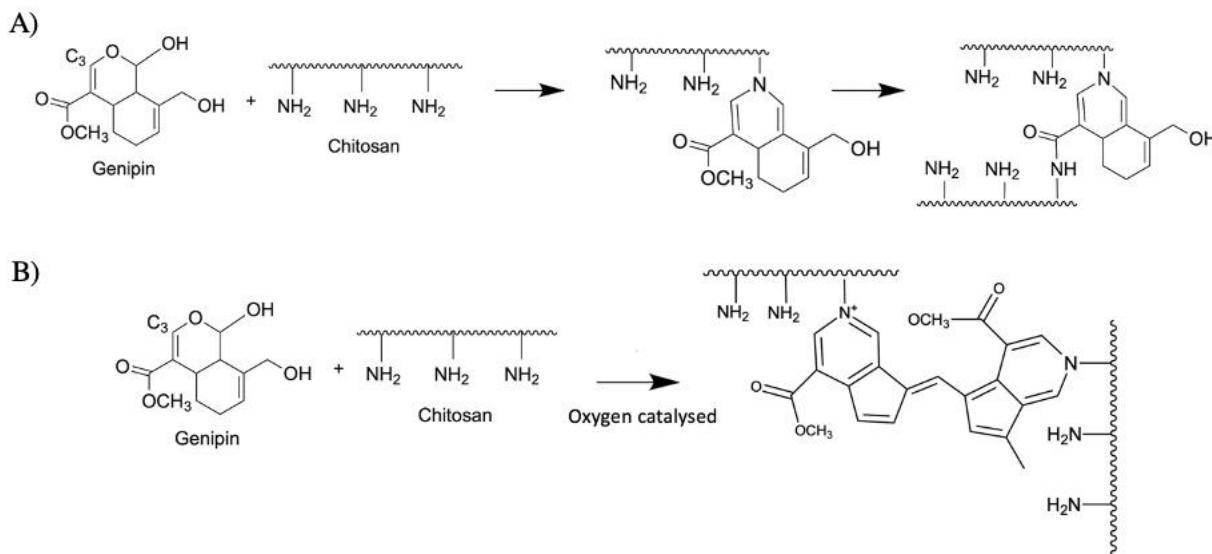


Figure 4.2 Crosslinking reaction of CHI chains by GNP in acidic (A) or alkaline (B) media
(Dimida et al., 2015)

The research hypothesis and main objective of this work was to enhance the stability of SA/CHI macroporous hydrogels in physiological medium for the capture of GBM cells, by combining the protocols developed by Komoto, Furuike & Tamura (2019) for the preparation of homogeneous SA/CHI gels, followed by the chemical crosslinking of CHI with GNP. Macroporous gels with a compression modulus ranging from 1 to 10 kPa, comparable to the properties of brain tissues, were targeted. The gels were prepared following the technique developed by Esquirol, Sarazin &

Virgilio (2014). The gelation kinetics were monitored as a function of SA, CHI and GNP compositions, as well as temperature, by rheometry and UV-Vis spectroscopy. The resulting mechanical properties, stability in physiological media, and stability as a function of irradiation dose, were evaluated by measuring and monitoring in time the unconstrained compressive mechanical properties. Finally, the capacity to accumulate and retain GBM cells within the hydrogels was evaluated.

4.2 MATERIALS AND METHOD

1.3.5 Materials

Sodium alginate (SA) IL-6G grade was purchased from Kimica (Pain, Chile) with the following characteristics: mannuronate/guluronate (M/G) ratio = 0.5, viscosity: 30-60 mPa.s, molecular weight Mn = 67 \pm 8 kDa (Safi et al., 2022). Chitosan (CHI) 85/60/A1 grade was obtained from BioLog Heppe GmbH, Landsberg, Germany: degree of deacetylation (DDA) = 85%, viscosity: 60 mPa.s, Mn = 50 – 100 kDa (from supplier). Polylactic acid Ingeo 4032D (PLA, melt flow index = 7 g/10 min@210 °C/2.16 kg, ρ (200 °C) = 1.11 g/cm³, melting temperature T_m = 169 °C, from supplier) was purchased from NatureWorks, and polystyrene MC3650 (PS, melt flow index = 13.0 g/10 min@200 °C/5 kg, ρ (200 °C) = 0.97 g/cm, glass transition temperature T_g = 94 °C, from supplier) was obtained from Americas Styrenics. Cyclohexane, chloroform, sodium hydroxide (NaOH), acetic acid, and hydrochloric acid (HCl) were all ACS-grade chemical reagents. Calcium chloride (CaCl₂), sodium bicarbonate, *N*-hydroxysuccinimide (NHS, 98% purity), ethyl-*N*'-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC, 99+% purity), phosphate buffered saline (PBS, pH = 7.4, powder form) and sodium azide S2002 (\geq 99.5%) were purchased from Sigma-Aldrich. *N*- ϵ -maleimidocaproic acid hydrazide (EMCH), Dulbecco's Modified Eagle Medium powder (DMEM) and genipin (GNP) (Mw = 226.23 g/mole, purity > 98%) were purchased from Thermo Fisher Scientific. The cysteine-terminated peptide CGRGDS (RGD) was supplied by EZBiolab (98%, N-terminal acetyl, C-terminal amide, New Jersey, USA). All antibiotics, penicillin, streptomycin and amphotericin B were purchased from Sigma-Aldrich. All aqueous solutions were prepared with Milli-Q water (18.2 MΩ·cm, total organic compounds \leq 5 ppb). The glassware was carefully cleansed by overnight immersion in a bath of KOH-saturated

isopropyl alcohol, followed by intensive rinsing with Milli-Q water, and tools were cleaned with Milli-Q water and ethanol 70% v/v before use.

1.3.6 Preparation of PLA macroporous molds

Blends of PS and PLA (50/50 wt%) were melt-processed and pelletized using an AG 34 mm Leistritz co-rotating twin-screw extruder at 190 °C with one feeder at 100 rpm and equipped with a post-processing water cooling bath and a pelletizer. This ratio was chosen to obtain a co-continuous morphology (Sarazin & Favis, 2003). The pellets were next melt-extruded and shaped into rods (2 cm diameter) at 16 rpm in a single screw extruder (Killion KN-150) and quenched into water maintained at approximately 45 °C to freeze-in the desired morphology. The rods were next cut into 12 cm bars and annealed in a hot press at 190 °C for 5, 10, 20, 30, 45 and 60 min to allow microstructure coarsening, before quenching again in water. The annealed bars were machined with a numerically controlled instrument (CNC, Genmitsu 3020-PRO MAX Router) to obtain small cylinders (diameter $\phi = 6.5$ mm, height $h = 6$ mm). Finally, the PS phase was extracted in a soxhlet apparatus using cyclohexane for one week. The resulting porous cylinders were dried overnight in a vacuum oven at 40 °C.

1.3.7 Preparation of alginate, chitosan and genipin stock solutions

Filtration and freeze-drying

SA powder was dissolved in hot water at 1% w/v and sonicated until complete dissolution. Then, it was filtered with PROGENE vacuum filtration units (polyether sulfone membrane, 0.22 μ m pore size, Ultident Scientific, Saint-Laurent, Quebec, Canada) and freeze-dried. CHI flakes were dissolved at 1% w/v in a 0.1 M HCl solution and sonicated until complete dissolution. The solution was filtered likewise and brought to a neutral pH using 5 M NaOH solution before freeze-drying.

RGD grafting on SA

Freeze-dried SA was dissolved in 40 mL of Milli-Q water at 1% w/v. 3.5 μ L of 0.1 M NHS and 1 μ L of 0.4 M EDC were added to the solution and left on a shaker plate for 20 min at room temperature (RT). 17.5 μ L of a 10 mM aliquot of EMCH dissolved in DMSO was then added and the solution was left on the shaker plate for 60 min. Finally, 56.9 μ L of a 2 mg/mL RGD solution

was added to the solution, for a total of 3.5×10^{-7} mol of cysteine-terminated peptide per 400 mg of SA. The solution was maintained under agitation during at least 20 h and filtered next five times to withdraw the remaining free peptides and reagents using Amicon Ultra-15 10 kDa membrane centrifugal filter units (Merck Millipore, Tullagreen, Ireland). The resulting RGD-grafted SA solution was freeze-dried and stored at 4 °C until use.

SA, CHI and GNP stock solutions preparation

Freeze-dried SA was dissolved in hot milliQ water at 2% and 2.5% w/v and sonicated in a warm bath until complete dissolution. Freeze-dried CHI was dissolved in a 0.1 M acetic acid solution at 0.5%, 0.75%, 1%, 1.5% and 2% w/v, and sonicated until complete dissolution. Sodium bicarbonate powder was then added at 4.5% w/v, followed by vigorous stirring, and degassing under the hood. The resulting solutions were completely transparent, and the pH was in between 7 and 8. GNP powder was dissolved at 0.3% w/v in milliQ water and sonicated until complete dissolution. All solutions were stored at 4 °C until use.

SA/CHI/GNP mixed solutions preparation

Various gelling formulations were prepared. SA/CHI solutions were prepared by mixing together the required volumes in order to obtain the following ratios: 0.5/0.5, 1/0.5, 1/0.75 and 1/1% w/v. A volume of GNP stock solution was then added in order to obtain a concentration range of 0.0125 to 0.075% w/v based on the CHI composition (**Tableaux A.1 and A.2**). For example, for a final CHI concentration of 0.75% w/v in solution, a GNP composition of 0.0125% w/v means a CHI/GNP weight ratio of 60 in the final solution.

1.3.8 Preparation of SA/CHI/GNP macroporous hydrogels

Injection of gelling solution in the polymer molds and gelation

Porous PLA molds were placed into 50 mL falcon tubes, and the tubes were next filled with SA/CHI/GNP solution. A small grid was placed onto the molds to maintain them fully immersed. The lidless falcons were deposited in a custom-built injection system and 3 to 4 vacuum – nitrogen (N₂) pressure cycles were applied to fill the molds. Once filled, the molds were gently wiped on their surface to remove the excess of solution, and they were placed in closed Eppendorf tubes at

37 °C in an oven for 24 h to crosslink the CHI with GNP. The filled molds were finally plunged into a 0.22 µm filtered 4% w/v CaCl₂ solution at 4 °C overnight to initiate SA gelation.

PLA molds dissolution

Once the gelation process completed, the PLA molds filled with the gels were placed into vials containing about 10 mL of chloroform and were gently stirred on a shaker plate at 60 rpm to selectively dissolve the PLA phase. The chloroform was changed every two days until the PLA phase was completely dissolved, which corresponded to 3 or 4 solvent changes. Macroporous gels were then rinsed twice with MilliQ water and stirred on a shaker plate for at least one day between the two cleanings, and finally stored in a 4% w/v CaCl₂ solution until use.

1.3.9 Gelation kinetics monitoring

UV-Vis spectroscopy

0.5 mL of CHI/GNP solutions (CHI range: 0.25 to 1% w/v; GNP: 0.0125 to 0.075% w/v) were poured into a 48-well plate and were left to gelify at RT, 37 °C or 50 °C ($N = 3$ per solution composition). Half of the wells were filled with the gelling solutions and the other half with water to prevent the gels from drying out. The absorbance was monitored by UV-Vis spectroscopy with a Victor V Multilabel Counter from PerkinElmer Inc. (Woodbridge, ON) equipped with a plate reader, as a function of time, over a range of 300 nm to 800 nm to identify the maximum absorbance peak, then at 595 nm (based on **Figure A.2**) over a week for each composition. Absorbance values were finally normalized, first by subtracting the value of the CHI solution without GNP, then by dividing the results by the maximum value obtained for a given set of experiment and multiplied by 100 - setting the maximum value at 100%.

Rheometry

The gelling kinetics of CHI/GNP and SA/CHI/GNP solutions were also monitored with a stress-controlled Anton-Paar Physica MCR 501 commercial rheometer with a cylindrical geometry (bob diameter: 16.66 mm; cup diameter: 18.066 mm) (Wang, Virgilio, Wood-Adams & Heuzey, 2018). Dynamic time sweep measurements were performed in the LVE regime at a strain amplitude $\gamma_0 = 3\%$ and an angular frequency $\omega = 1$ rad/s for 48 h. Solutions in the geometry were covered with a thin film of

low viscosity mineral oil to prevent drying. The storage (G') and loss (G'') moduli were plotted as a function of time to determine the gelation time t_{gel} , chosen here when $\tan \delta (= G''/G') = 1$ (Sangroniz, Fernández & Santamaria, 2023), and the equilibrium values once a plateau was reached at gelation completion.

1.3.10 Characterization of PLA molds and SA–CHI hydrogels

X-ray microtomography and porosity quantification by image analysis

Porous PLA molds were analyzed by X-ray microcomputed tomography (microCT) using a Zeiss Xradia 520 Versa instrument with the following parameters: 40 keV (source voltage), 250 μ A (source current), 9.80 μ m (image voxel size), 16 bits (depth), 0.4° (rotation step) and an exposure time of 1 sec and 0.4 or 4x objectives according to pore size. The structure of the PLA molds was then visualized by reconstructing the 3D structure using the Dragonfly software. The microstructure of a SA/CHI/GNP macroporous gel (for an annealing time of 30 min) has also been characterized by removing first the free water contained in the pores with absorbent paper in order to provide contrast between the gel phase and the pores.

After data acquisition and 3D reconstruction, image analysis was realized by applying a Noise Reduction Filter (NRF) with the Scout-and-scan Control System Reconstructor. The data were then post-processed with the Dragonfly software. The contrast was first modulated to obtain a black and white reconstruction, with the pores in black and the PLA (or gel) phase in white. Each domain (PLA, gel, or pores) was then selected in order to create masks. A cylindrical cut was then realized to remove the sample holder and outside environment. The thickness mesh of each domain type (PLA, PS, gel and pores) was obtained using a built-in algorithm, giving the average domain sizes, size distributions and interfacial area/pore surface. The specific interfacial area/pore surface was finally obtained by dividing by the sample volume.

Compression moduli of macroporous hydrogels

Compression tests were performed with a Mach-1 mechanical tester (Biomomentum, Laval, Canada, Actuator A400.25, load cell of 150 g, 10 mm diameter indenter) on bulk and porous gels. The indenter diameter was chosen to be slightly larger than the diameter of the gels. In addition to the porous gels, bulk gels (without pores) were cut with a 5 mm diameter biopsy punch. All gels

were fully covered with water in the instrument testing cell to avoid the effects of capillary forces. Unconstrained compression tests were carried out in two steps: (1) the indenter establishes contact with the gel (speed = 25 $\mu\text{m/s}$, stop criteria: 0.25 g), at the end of which the testing cell reservoir is filled with water; (2) a first pre-compression (displacement of 50 μm) at the same speed is applied to be sure that the probe is fully in contact with the gel surface, followed by two compressions each totaling a 25 μm displacement at 20 $\mu\text{m/s}$ on the gels. The compression modulus was calculated as follow: the Mach-1 software records the displacement Δh in μm and the applied load G in kg at an acquisition rate of 0.1 s^{-1} . By measuring the dimensions of the gels (diameter d and height h_0) with an electronic micrometer prior to testing, and by assuming that the diameter remains constant at such small strain, the stress (σ)/strain (ε) curve is obtained following Equations 1 and 2:

$$\varepsilon = \frac{\Delta h}{h_0} \quad (4.1)$$

$$\sigma(\text{kPa}) = \frac{G \times g}{\pi \frac{d^2}{4}} \quad \text{with } g \text{ the standard gravity} \quad (4.2)$$

Linear regressions of the data (slope) obtained for the last two steps in compression yield the compression modulus. The values are reported as the average \pm one standard deviation, with a total of 5 gels per formulation ($N = 5$).

Dimensional and structural stability tests in saline and cell culture media

The stability of the porous gels has been assessed during two weeks by monitoring their dimensions and compression modulus in four different media. First, two solutions of antibiotics were prepared: (1) a solution of penicillin G 6.1% w/v and streptomycin 10% w/v has been prepared with Milli-Q water and then filtered at 0.22 μm and stored at -20°C until use; (2) In the same way, an amphotericin B solution at 1.25% w/v was prepared. Next, 100 μL of these two solutions were added to 500 mL of three (out of four) tested media, which consisted in: a) a 4% w/v CaCl_2 control solution prepared with Milli-Q water and then filtered at 0.22 μm without any antibiotics; b) a 4% w/v CaCl_2 control solution supplemented with antibiotics; c) a Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) with antibiotics, and d) a PBS 1X solution with antibiotics.

The porous gels were first sterilized in 70% v/v aqueous ethanol for 10 min on a shaker plate. Next, they were washed three times with Milli-Q water during 20 min and they were left overnight in a 4% w/v CaCl_2 solution. The day after, they were first rinsed with their assigned media, and they were deposited next in 2 mL of the same media in a 5 mL Eppendorf, with a total of 3 gels per medium. Gel stability was assessed by monitoring their dimensions with a caliper, and by measuring their compression modulus with the Mach-1 tester, as described previously. Half of the gels in CaCl_2 media were not mechanically tested as controls. Each solution was changed every 3 days, except for 3 additional gels into the PBS media to assess the impact of solution changing on the gel properties.

Structural stability of hydrogels after irradiation

The compression modulus of macroporous hydrogels (SA 1% CHI 0.75% GNP 0.05% w/v, and average pore size of 180 μm) were first measured as described previously in Section 2.6.2. They were next stored in a CaCl_2 4% w/v solution supplemented with sodium azide (6 droplets of sodium azide 5% w/v in 500 mL of CaCl_2 4% w/v). Five days later, the gels were rinsed twice with distilled water. The gels were then placed in a Petri dish and were irradiated with doses of 10, 15, 20 or 30 Gy ($N = 4$ gels per irradiation dose). The dose was delivered by a cesium-137 fixed source (Gammacell 3000 Elan, Best Theratronics, Ottawa, Canada). One week later, compression tests were repeated on gels irradiated at a dose of 30 Gy.

1.3.11 Cell culture

The murine GBM cell line F98 was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and was cultured in a DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, a mixture of antibiotics (100 U/mL of penicillin and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of streptomycin), 44 mM sodium bicarbonate and 2 mM L-glutamine. Then the cells were placed in a humidified incubator with 5% CO_2 at 37 °C. In order to introduce the mCherry marker into F98 cells, the pCDH-CMV-mCherry-T2A-Puro lentiviral vector (Addgene Catalog#72264, Watertown, MA) was used (Bouchard et al., 2013). Cells expressing the mCherry marker were incubated for 10 days in DMEM containing 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mL of puromycin. The expression of mCherry by F98 cells was confirmed by observation with a Leica DM-IRBE fluorescence microscope.

Sterilization of hydrogels

One day before use, the hydrogels were incubated in the presence of 70% ethanol in a 24-well plate for 10 min, then rinsed with distilled water for 20 min, after which they were kept for overnight at 4 °C in a solution of 4% w/v CaCl₂. The next day, the gels were rinsed twice for 20 min in Dulbecco's Minimal Essential Medium (DMEM) without any additives, then stored in DMEM + BSA medium at 4 °C.

Measurement of F98 mCherry cells fluorescence intensity in presence of hydrogels

The fluorescence of F98 mCherry cells accumulated in SA 1% CHI 0.75% GNP 0.05% w/v hydrogels was determined and compared to those formulated with either SA 1% w/v, or with SA 1% CHI 0.75% w/v. All hydrogels were grafted with the cell adhesion peptide RGD. Sterilized hydrogels, 5 mm in diameter and 4 mm high, were carefully placed in a 96-well plate, then different concentrations of F98 mCherry cells (0; 0.1×10⁶; 0.5×10⁶; and 1×10⁶) in 100 µL of DMEM were added dropwise onto the hydrogels surfaces. After 24 h of incubation at 37 °C and 5% CO₂, the hydrogels were placed in a new 96-well plate containing 100 µL additive-free DMEM and fluorescence reading with a microplate reader ($\lambda_{ex} = 530$ nm, $\lambda_{em} = 590$ nm, HT Synergy, Bio-Tek Instrument, Winooski, VT, USA) was performed.

Accumulation and retention of F98 cells in the hydrogels: Alamar Blue assay

As negative control, sterile hydrogels were placed in a 24-well plate and 700 µL of DMEM media containing 10 % Alamar Blue was gently added. After 2 h at 37 °C and 5 % CO₂, 100 µL of this media was taken and transferred to a 96-well black opaque plate (Corning incorporated, Catalog#3915, NY, USA) to perform fluorescence readings ($\lambda_{ex} = 530$ nm, $\lambda_{em} = 590$ nm).

The hydrogels were then placed in a 96-well plate and F98 cells without mCherry (10⁶ in 100 µL of DMEM per well) were gently added onto the hydrogel surface. After 24 h of incubation, the hydrogels were gently transferred in a 24-well plate containing DMEM media and 10% Alamar Blue, and incubated for 2 h at 37 °C. The number of F98 cells accumulated in the hydrogels was determined by measuring the fluorescence of oxidized Alamar Blue. The hydrogels were then transferred in a migration chamber (TC-Insert, Sarstedt, Catalog#83.3922.800, Nümbrecht,

Germany) connected to a 20 mL syringe to carry out stringent washing, and then transferred to a 24-well plate containing 700 μ L of DMEM media and 10 % Alamar Blue to determine the number of F98 WT cells retained in the hydrogels.

Distribution of F98 cells through the hydrogels

F98 cells (0.5×10^6) were added gently on the top of the hydrogels. After incubation for 24 h at 37 °C and 5% CO₂, the cells were fixed with 3% w/v paraformaldehyde (PFA) and then stained with rhodamine-phalloidin 2105247 (actin cytoskeleton, red channel) (1:100) and Hoechst 33342 (nuclei, blue channel) (ThermoFisher Canada), at a final concentration of 5 μ g/mL in 0.1% w/v BSA in DMEM red phenol-free media. The distribution of F98 cells was evaluated at 4 different levels (L), the first level L1 was 1 mm deep from the top of the hydrogels, while the last level L4 was 3.5 mm deep. F98 cell distribution within the hydrogels was evaluated by using an epifluorescence microscope (EVOS FL Auto Imaging System, Life Technologies). The images were then analysed with tools developed by our team in order to determine the number and the size of the clusters of F98 cells in each level (Solano et al., 2021).

1.3.12 Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm standard deviation of 2 to 4 experiments performed in triplicate. Statistical analyses were performed using two ways analysis of variance (ANOVA). A value of $p < 0.05$ was considered to be statistically significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

4.3 RESULTS

1.3.13 Kinetics of CHI crosslinking reaction with GNP

UV-Vis spectroscopy

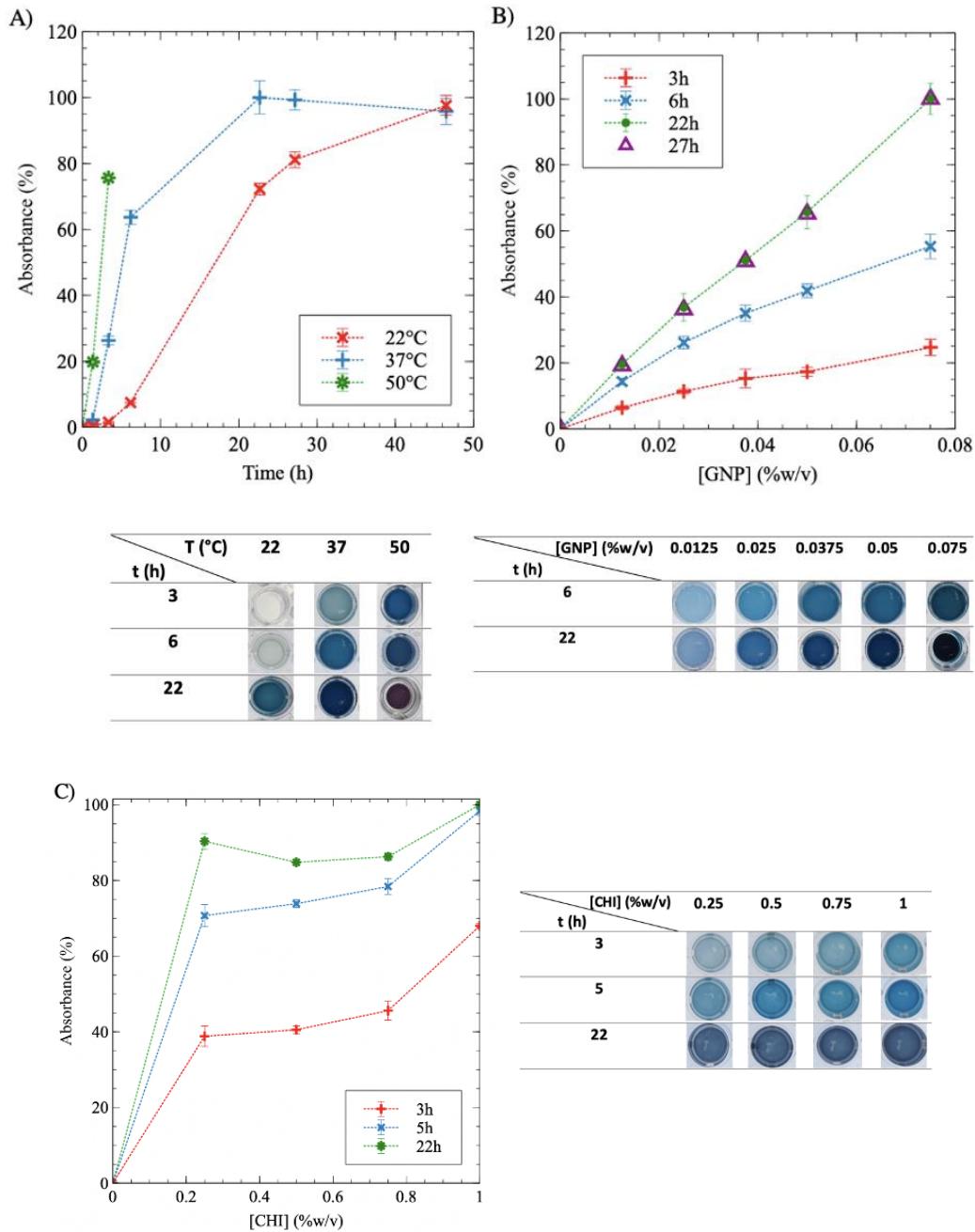


Figure 4.3 Chitosan (CHI) crosslinking kinetics using genipin (GNP) as monitored by UV-Vis spectroscopy. A) Absorbance as a function of time t and temperature T , at $[CHI] = 0.75\% \text{ w/v}$ and $[GNP] = 0.05\% \text{ w/v}$; B) Absorbance as a function of GNP composition and reaction time, at $[CHI] = 0.75\% \text{ w/v}$ and $T = 37^\circ\text{C}$; C) Absorbance as function of CHI concentration at $[GNP] = 0.025\% \text{ w/v}$ and $T = 37^\circ\text{C}$. Three samples were tested per condition ($N = 3$), the dotted lines are guides for the eyes. After 22 h, the absorbance remained constant in all cases (data at longer times are not shown). Absorbance values (%) are normalized using the maximum value obtained for a given experiment. Pictures of well-plates containing CHI hydrogels at various conditions are displayed under the graphics.

GNP, used to crosslink CHI, produces blue pigments during the reaction, allowing the reaction progress to be monitored by UV-Vis spectroscopy (see photos of the well-plates containing the gels in **Figure 4.3**). The intensity of the blue color increases as crosslinking progresses. The full absorbance spectra for 0.75% w/v CHI hydrogels were obtained, and a peak at 595 nm was identified (**Figure A.2**). Hence, only the absorbance value at 595 nm was considered for subsequent analyses.

To investigate the effect of temperature on CHI gelation, the crosslinking kinetics were monitored at three different temperatures: 22°C (room temperature), 37°C and 50°C. When $[CHI] = 0.75\%$ and $[GNP] = 0.05\% \text{ w/v}$, Figure 3A demonstrates that as T increases, the reaction accelerates (curves shift to the left), and it reaches completion – i.e. a plateau at 100% – more rapidly. After 3 h, a noticeable difference in color is observed: the solution remains transparent at 22°C, becomes a clear blue at 37°C, and dark blue at 50°C. At the end of the experiment, similar plateau values were obtained for reactions carried out at 22°C and 37°C, but the reaction time at 22°C was twice as long compared to 37°C – 46 h and 22 h, respectively. Gelation at 50°C resulted in syneresis, with the gel shrinking and surrounded by water after 6 h, as the pictures of the gels in well-plates below the graphic in **Figure 4.3 A** show. Syneresis was also observed at 22°C for prolonged gelation times exceeding 48 h (not shown). Thus, a temperature of 37°C provides a favorable compromise, reducing gelation time while minimizing syneresis. The same approach was employed to study the influence of GNP concentration on CHI gelation (**Figure 4.3 B**). During the crosslinking reaction, absorbance exhibited a quasi-linear relationship with GNP content, and the

gel color gradually darkened accordingly. A higher GNP concentration resulted in more extensive crosslinking during and at the end of the experiment. However, an excessive GNP composition led to syneresis, as observed at a GNP concentration of 0.075% w/v after 22 h of crosslinking. Consequently, the GNP fraction should not exceed 0.05% w/v in the GNP/CHI solution. Similar trends were obtained at lower CHI and GNP concentrations (Figure A.3). Modulating the CHI composition resulted only in a slight difference in absorbance between the solutions, at a given reaction time, as the GNP content remained constant (Figure 4.3 C). The slightly higher absorbance observed at 1% w/v CHI is likely due to the increased availability of CHI chains. At reaction completion, the gels reached approximately the same absorbance values and exhibited similar blue colors. This suggests that GNP is likely the limiting reactant and was not added in excess. In addition, solutions at higher CHI concentrations were not fully crosslinked at similar GNP concentrations.

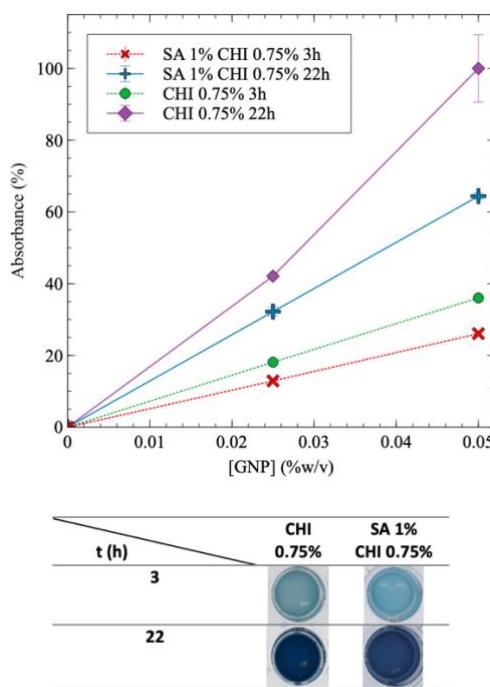


Figure 4.4 Kinetics of sodium alginate (SA)/chitosan (CHI) solutions crosslinked using genipin (GNP) and monitored by UV-vis spectroscopy. Absorbance as a function of GNP concentration and time, for both pure CHI (0.75% w/v), and 1% SA 0.75% CHI (w/v) starting solutions. For all experimental points, $N = 3$, and dotted lines are guides for the eyes. Some of the plate wells have

been filled with water so the gels do not dry out. After 22 h, gels were fully formed, and data at longer times are not shown.

The addition of SA into CHI gels was next investigated. **Figure 4.4** exhibits similar trends for SA/CHI gels, compared to pure CHI gels. However, the absorbance values at a given time are always lower for the SA/CHI formulations, compared to pure CHI (at similar CHI compositions). This is probably due to the slower GNP diffusion in solutions and gels also containing SA, slowing down the crosslinking reaction. To validate these observations, the gelation time was also quantified by rheometry on the same CHI and SA/CHI solutions.

Rheometry

Figure 4.5A displays the value of the storage (G') and loss (G'') moduli as a function of time during the crosslinking reaction of pure CHI solutions (0.75% w/v), for GNP contents ranging from 0.0125% to 0.05% w/v. Whereas G' and G'' are comparable in magnitude initially – the solutions display viscoelastic behavior –, G' significantly increases compared to G'' when the gelation point is reached, which is often associated to the intersection of the G' and G'' curves (Wang, Virgilio, Wood-Adams & Heuzey, 2018). At this point, G' becomes significantly superior to G'' and the material then behaves as a soft solid. Two trends are clearly observed : (1) the gelation point occurs earlier as the composition in GNP increases, and (2) the G' plateau value obtained at reaction completion, once it reaches a nearly stable value, increases as the GNP content increases. Both trends are expected since more GNP means that the network can form more quickly, and gives a stronger gel at the end due to the higher crosslinks density.

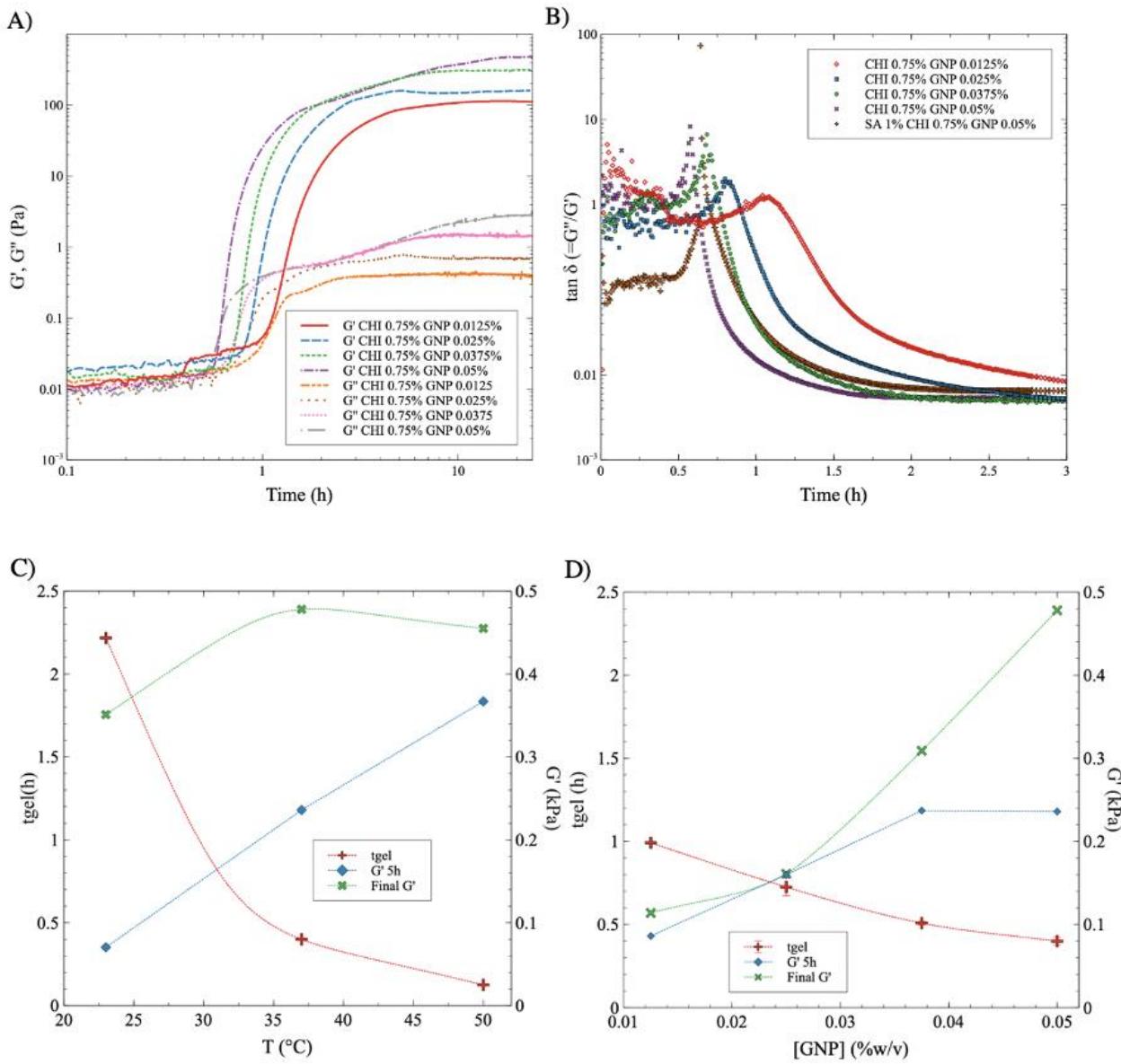


Figure 4.5 Rheological properties of SA/CHI/GNP gelling solutions: A) Storage (G') and loss (G'') moduli for pure CHI gels (0.75% w/v) crosslinked with GNP, at a composition ranging from 0.0125% to 0.05% w/v, at 37°C ; B) $\tan \delta (= G''/G')$ as a function of time, from data in (A), compared to a solution composed of SA (1% w/v), CHI (0.75% w/v) and GNP (0.05% w/v); C) Gelation time (t_{gel}), and storage modulus (G') after 5 h of reaction time, and at equilibrium at reaction completion, as a function of temperature, for SA/CHI/GNP (1% w/v/0.75% w/v/0.05% w/v); D) Gelation time (t_{gel}) and storage modulus (G') as a function of GNP concentration ([GNP] (% w/v)) for the same composition as in (C).

Gelation time (t_{gel}), storage modulus (G') after 5 h of reaction time, and at equilibrium at reaction completion, as a function of GNP concentration for SA/CHI 1%/0.75% w/v at 37 °C.

The gelation point was next determined by plotting the values of $\tan \delta$ ($= G''/G'$) as a function of time and GNP composition (**Figure 4.5 B**). $\tan \delta = 1$ corresponds to the intersection of G' and G'' in **Figure 4.5 A**, and was used to determine the gelation time t_{gel} – i.e. when the storage modulus becomes equal to the loss modulus and the material starts to display a dominant soft solid-like behavior (Sangroniz, Fernández & Santamaria, 2023). As expected, the gelation time decreases with increasing GNP content, from 65 min for GNP at 0.0125% w/v to 34 min for GNP at 0.05% w/v. Interestingly, adding 1% w/v of SA (at a GNP content of 0.05% w/v) slightly increases gelation time – 39 min compared to 34 min without SA. This is also consistent with UV-Vis results in **Figure 4.4**, which shows that adding SA decreases the absorbance value at a given reaction time, supporting slower GNP diffusion and reaction with CHI.

The data displayed in **Figure 4.5 C and D**, extracted in part from Figure 5A and B, exhibit similar trends as compared to UV-Vis results: t_{gel} decreases with increasing T, from nearly 140 min down to 15 min as T increases from 22 °C to 50 °C (**Figure 4.5 C** for SA 1% CHI 0.75% GNP 0.05% w/v). t_{gel} also decreases with increasing GNP composition, from 105 min down to 35 min as the concentration of GNP increases from 0.0125% to 0.05% in SA 1% CHI 0.75% w/v gels at 37°C. At a given reaction time, G' is also higher at higher temperatures (**Figure 4.5 C**); however, when crosslinking is completed, the G' values are comparable in magnitude for all three T. In addition, increasing the GNP composition leads to higher G' values and shorter gelation times (**Figure 4.5 D**), consistent with the findings in Figure 3. Similar trends and conclusions are observed when [CHI] = 0.5% (**Figure A.4**).

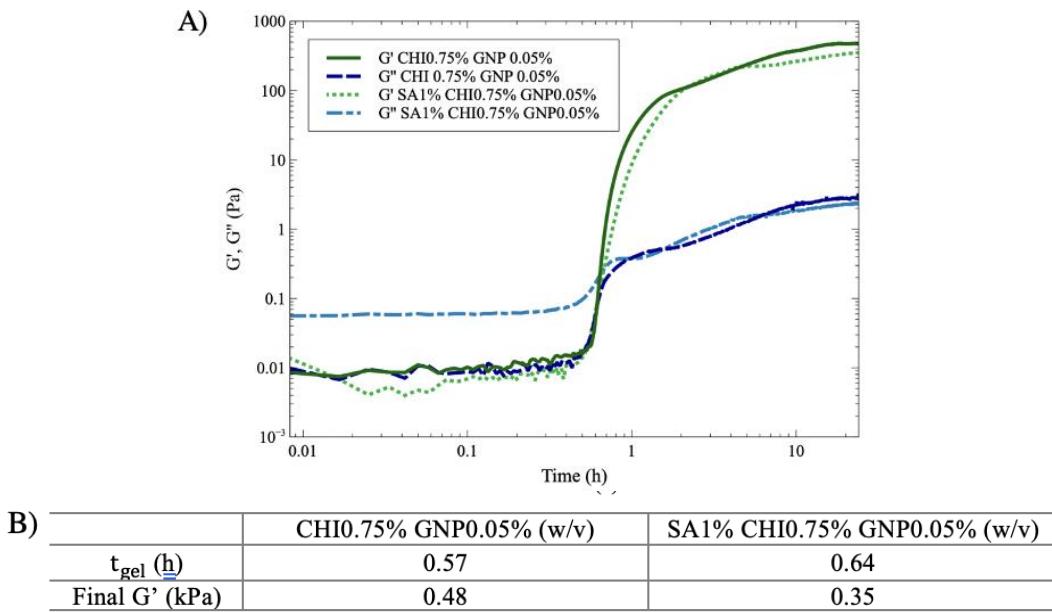


Figure 4.6 Impact of SA (1% w/v) addition on the crosslinking of CHI (0.75% w/v) with GNP (0.05%) at 37 °C. A) G' and G'' as a function of time, with and without the addition of SA; B) Impact of SA addition on t_{gel} and final G' value.

Figure 4.6 shows that t_{gel} increases by nearly 15% with the addition of SA (1% w/v). In addition, G'' is significantly higher initially for the solution containing SA (**Figure 4.6 A**), which slows down GNP diffusion and increases t_{gel} . The presence of SA also leads to nearly comparable (or slightly lower) final G' values. Finally, when both the SA and the GNP concentrations are kept constant at 1% and 0.025% w/v respectively (**Figure A.5 A**), the final G' and t_{gel} values do not show clear dependences on CHI composition and remain nearly constant. However, at 0.05% w/v of GNP (**Figure A.5 B**), the final G' value significantly decreases as the composition in CHI increases from 0.5% to 0.75% w/v, whereas t_{gel} does not vary much. This is explained by the syneresis observed at higher GNP content, as Figure 3B illustrates, combined with the higher amount of CHI.

3.2 Microstructure analysis of polymer molds and macroporous gels

Quiescent annealing of the melt-processed co-continuous blend of PS and PLA (50/50 wt%) leads to the gradual coarsening of the microstructure, as the microCT micrographs in **Figure 4.7** illustrate. Coarsening of the microstructure occurs due to the interfacial tension between the PS

and PLA phases (5.8 ± 0.6 mN/m) (Virgilio, Desjardins, L'Espérance & Favis, 2009), as a way to reduce the specific interfacial area towards full phase separation. Porous PLA molds with a range of porosities are then obtained by selectively extracting the PS phase.

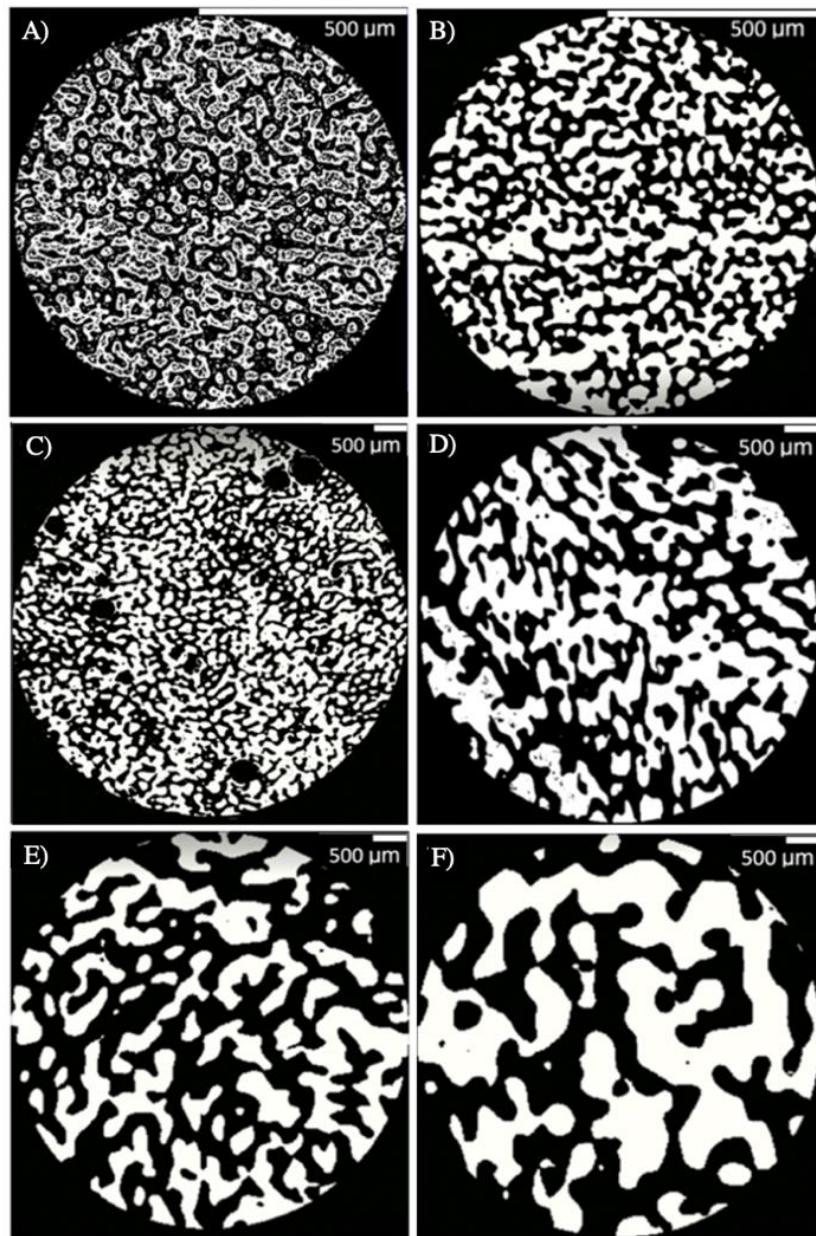


Figure 4.7 Cross-section of porous PLA molds obtained by microCT for A) 5, B) 10, C) 20, D) 30, E) 45 and F) 60 min of quiescent annealing time (PLA: white domains; Pores resulting from

selective PS extraction: black domains). Note the difference between the scales of (A) and (B), compared to (C to F).

For short annealing times, coarsening is slower due to thermal inertia of the samples (**Figure 4.8**). However, over 10 min of annealing time, a quasi-linear trend is observed. MicroCT evaluation confirms that the volume fraction of PS and PLA domains closely resembles the composition of the original extruded blend, with both materials occupying approximately 50% of the total volume (**Tableau A.3**). The average sizes of the PS and PLA domains are nearly identical at a given annealing time - for PLA, it increases from 12 μm to 373 μm as annealing progresses from 5 min to 60 min. The specific interfacial area S decreases then from 1531 to 48 cm^{-1} . This is consistent with values reported by (Esquirol, Sarazin & Virgilio, 2014). **Figure A.6** provides the pore size distributions as a function of annealing time, displaying a displacement of the distribution towards higher values as annealing time increases.

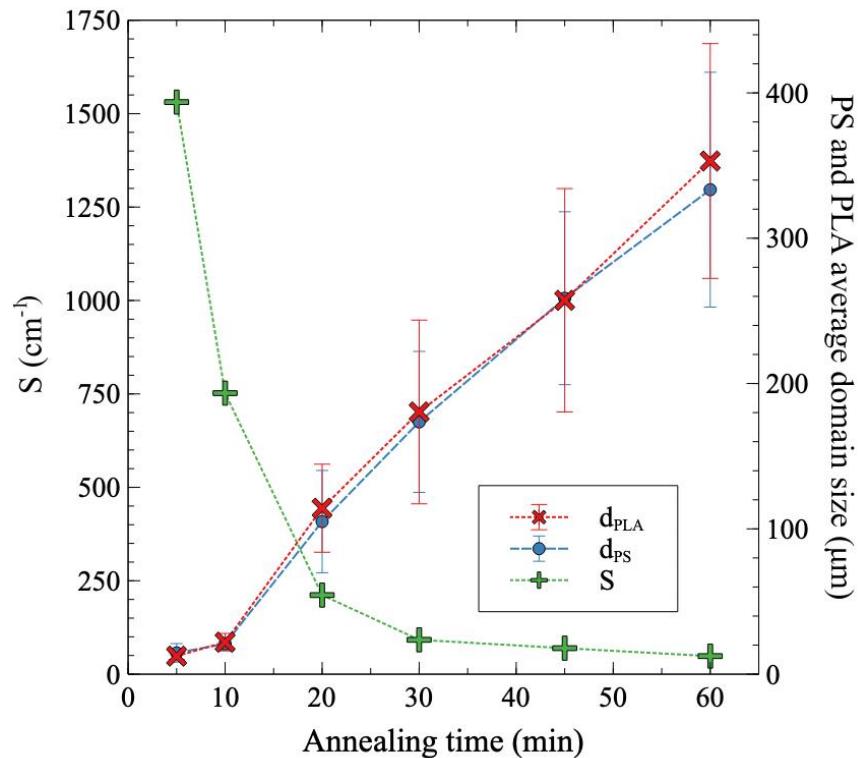
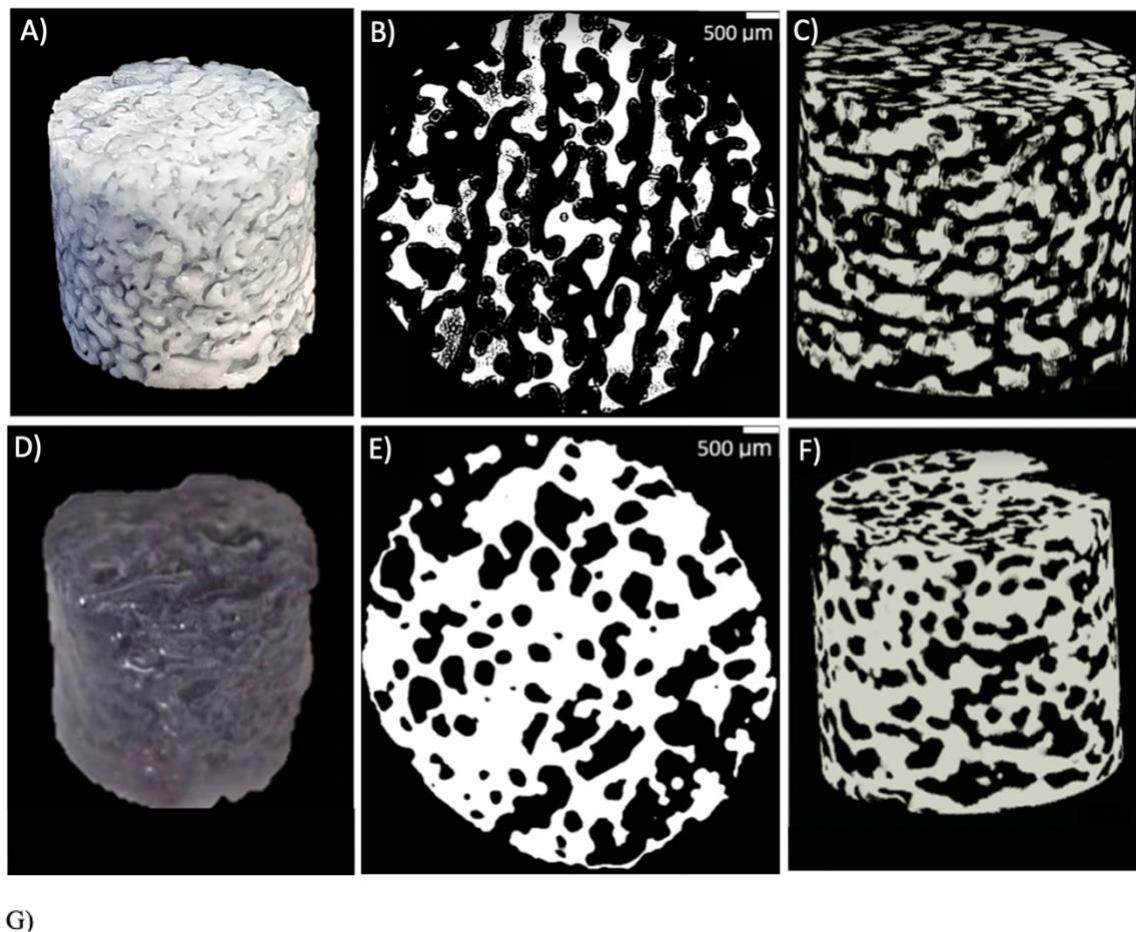


Figure 4.8 Extracted data from microCT analysis of the PS and PLA domains sizes (d_{PLA} and d_{PS}), and specific interfacial area (S) between the PS and PLA phases. The average domain sizes

data represent the average size ± 1 standard deviation, from the domain size distributions provided in **Figure A.5**.

Figure 4.9 compares the microstructural features of a PLA mold ($t_{anneal} = 30$ min) to the resulting macroporous gel. During the molding process, the gel phase replaces the PS phase in the original polymer blend, whereas the pores in the gel come from extracting the PLA phase.



G)

	PLA Mold	Resulting gel : SA/CHI/GNP 1%/0.75%/0.05% w/v
Dimensions (diameter \times height, mm)	6.5 \times 6	5.5 \times 5.1
Volume (mm ³)	199	121
ϕ_{PLA} and ϕ_{Pores} (%)	40	45
ϕ_{PS} and ϕ_{Gel} (%)	60	55
d_{PLA} and d_{Pores} (μ m)	182 ± 94	297 ± 85
d_{PS} and d_{Gel} (μ m)	155 ± 93	278 ± 104
Specific surface (PLA/PS or pores/gel) (cm ⁻¹)	138	58

Figure 4.9 Injected mold (A) and resulting gel (B) with their 2D and 3D microscopic views respectively (C), (D) and (E), (F), and extracted microstructural data (G).

First, the porous gel retains the overall cylindrical shape of the mold, as **Figure 4.9 A and 4.9D** illustrate. However, the gel decreases in size compared to the mold (**Figure 4.9 G**): 15% of reduction for the dimensions, 40% reduction in volume, which is attributed to syneresis. The gel also exhibits larger pores compared to the original PLA domains ($d_{PLA} = 182 \mu\text{m}$ vs $d_{pores} = 297 \mu\text{m}$, recall that the PLA domains are extracted to yield the porous gel) – a similar feature is observed when comparing the average size of the gel domains, compared to the initial PS domains. This apparent increase in pore size could be the result of gel syneresis, but also (and most probably) from the difficulty in completely removing the free water within the smaller pores with absorbent paper before the microCT analysis, leading to an apparently larger average pore size within the gel. However, the porosity remains fully interconnected, as **Figure 4.9 C and 4.9F** show. For the sake of clarity in the following sections, the average size of the PLA domains will be used as the value of the average pore size in porous gels, since it was not possible to visualize the microstructure of gels with smaller pore sizes, as removing the water from the pores resulted in significant gel shrinking and collapse of the pores.

1.3.14 Mechanical properties in compression

There is a nearly linear relationship between the compression modulus of pure, bulk SA gels crosslinked with CaCl_2 , with SA concentration – from 16.8 kPa at 0.5% w/v SA, to 95.4 kPa at 2% w/v SA (**Figure A.7**). As expected, the modulus of SA porous gels (with an average pore size of 180 μm , prepared with PLA molds initially annealed during 30 min) decreases significantly compared to the bulk gels. At 0.5% w/v SA, the porous gels could not withstand the compression test, whereas the modulus at 1% and 2% w/v SA decreased by factors of approximately 4 and 4.2, at respectively 9.4 and 22.2 kPa (**Figure A.7**).

For porous gels (average pore size of 180 μm), adding CHI to the formulation resulted only in a slight decrease of the compression modulus (not statistically significant, $p = 0.1394$), from $9.4 \pm 1.4 \text{ kPa}$ for SA 1% w/v, to $5.3 \pm 1.6 \text{ kPa}$ for SA 1% CHI 0.5% w/v (no GNP crosslinking), as **Tableau 4.1** shows. Then, when CHI is also chemically crosslinked with GNP, the compression

modulus increases from 5.3 to nearly 10 kPa, indicating that covalent crosslinking enhances gel strength. Furthermore, two methods of crosslinking with GNP were evaluated: adding GNP to the SA/CHI solution before injection and gelation in the molds, or immersing the physically (Ca^{2+}) crosslinked SA/CHI gels, following mold extraction, into an aqueous GNP solution – i.e. gelation via diffusion. Both methods resulted in similar compression moduli (**Tableau 4.1**), demonstrating that either approach can be used, although the result was less significant for the diffusion-based process compared to GNP added before molding ($p = 0.24$ vs p^*).

Table 4.1 Porous gel mechanical properties in compression: effect of genipin crosslinking before VS after crosslinking with CaCl_2 , ($N = 4$)

	SA 1%	SA 1% CHI 0.5%	SA 1% CHI 0.5% GNP 0.05%	SA 1% CHI 0.5% GNP 0.05% by diffusion
Compression modulus (kPa)	9.4 ± 1.4	5.3 ± 1.6	9.8 ± 3.1	8.2 ± 2.2

The impact of CHI composition was also evaluated. A very slight increase for the porous gels modulus was observed, but no significant effect was noticed for bulk gels (**Tableau A.4**). A similar result was also obtained regarding the effect of GNP, since no significant difference was observed by increasing the GNP concentration from 0.025% to 0.1% ($p > 0.05$) (**Tableau A.5**). Overall, the concentration of SA, combined with CHI crosslinking, are the two factors having the most significant effects on the compression modulus, whereas the effects of CHI and GNP concentrations do not significantly impact the resulting modulus, at least over the investigated ranges of concentrations.

Next, the relationship between the value of the compression modulus and average pore size was investigated, over the whole range of average pore sizes, from 12 to 373 μm (**Figure 4.10**). Gels with the smallest pore sizes, 12 and 22 μm , corresponding to annealing times of 5 and 10 min, exhibited significant size reduction and deformation after the extraction of the PLA phase (**Figure 4.10 A**), and it was impossible to accurately measure their compression moduli. Although the exact causes are still not clear, excessive syneresis, or crosslinking under strong confinement conditions, could be involved and remains to be fully investigated.

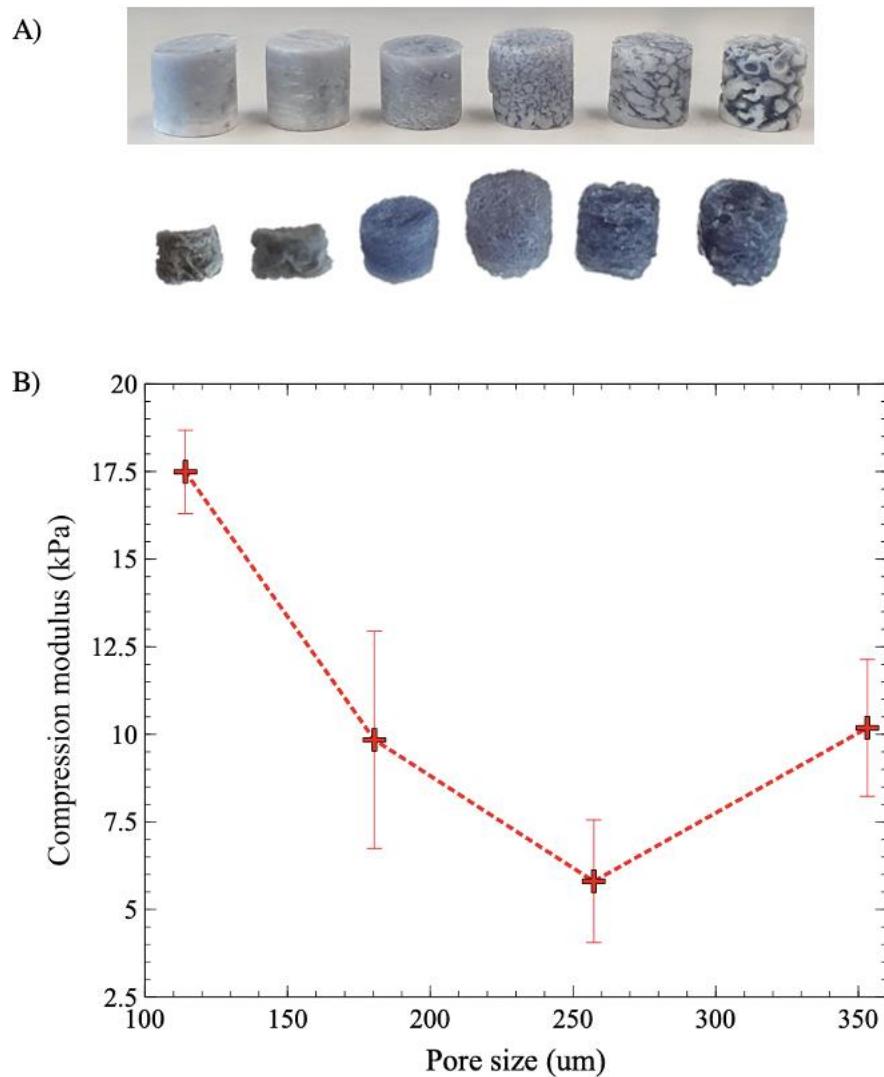


Figure 4.10 Appearance (A) and compression modulus (B) of porous hydrogels. A) PLA molds filled with hydrogels (top) and resulting porous SA/CHI/GNP porous gels (bottom) after PLA extraction; B) Compression modulus as a function of pore size, for gels of 1% w/v SA, 0.75% w/v CHI, and 0.05% w/v GNP.

Starting from 20 min of annealing time, the compression modulus of the gels showed a decreasing trend, from 17.5 kPa at an average pore size of 114 μm , to 5.8 kPa at 257 μm (**Figure 4.10 B**). However, an increase in the compression modulus was observed when the pore size increased to

353 μm . In a recent work, Zhang et al. (2020) demonstrated a similar behavior for polymer foams. At small pore size values, the compression modulus first decreases rapidly as pore size increases. Then, this sharp decrease levels off and is followed by a slower one as pore size continues to increase. Their numerical modeling experiments demonstrated that at small pore sizes, the stress concentration is more equally distributed, and the porous structure becomes “self-reinforcing”. At larger pore sizes, however, stress concentrates in the walls or struts, until failure occurs.

Interestingly, nearly all tested formulations yielded porous gels with a compression modulus within the targeted range of 1-10 kPa, corresponding to the properties of soft brain tissues. This is useful since it could provide some flexibility on the formulation when assessing other properties such as colonization by GBM cells and their accumulation as a function of pore size, without impacting significantly the mechanical properties.

1.3.15 Porous gel stability in aqueous medium

The dimensional and mechanical stability of the gels in four different aqueous media at 37 °C were assessed next over 15 days. The results in CaCl_2 solutions, without and with antibiotics, are not shown as no significant change in gel integrity, dimensions, or compression modulus were observed, and thus served as references.

In PBS media supplemented with antibiotics, the compression modulus initially undergoes a noticeable decrease by more than 50% after 3 days, and then remains relatively stable over time (**Figure 4.11 A**). At constant SA and GNP contents (1% and 0.025% w/v, respectively), increasing the CHI content from 0.5% to 1% w/v slightly lowers the initial compression modulus, from nearly 12.5 kPa to 10 kPa, as reported in **Figure 4.11 A**. The modulus however decreased less sharply as the content in CHI increased. After 3 days, the gels with the lowest content in CHI, at 0.5% w/v, became too soft for further testing (see also **Figure A.8 A** for visual aspect of the gels). At higher contents however, the gels remained stable and could be handled for mechanical testing, and displayed stable modulus afterwards, demonstrating the stabilization impact of crosslinked CHI.

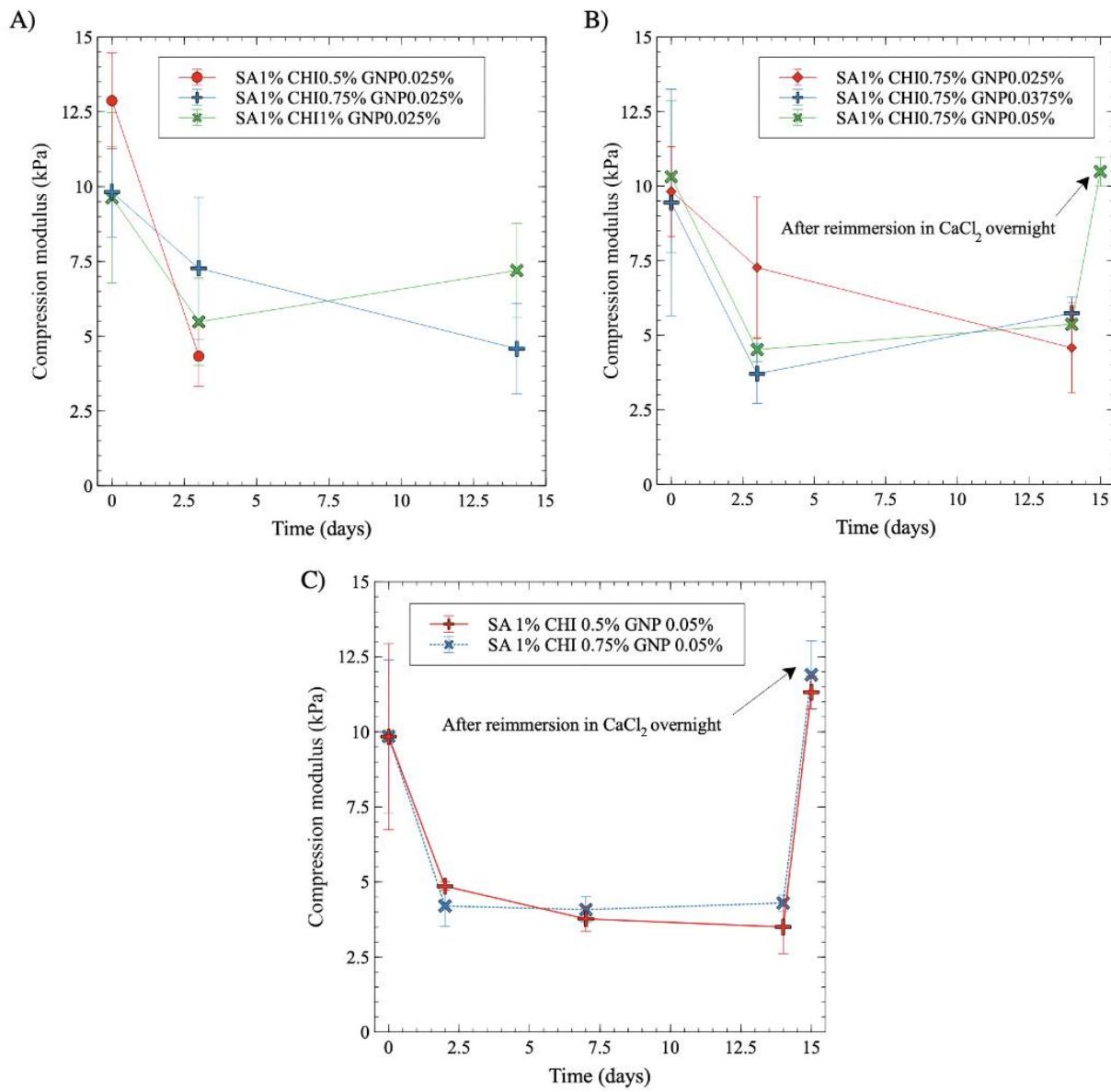


Figure 4.11 Evolution of compression modulus of porous gels (average pore size of 180 μm) in PBS medium: A) effect CHI composition at constant SA and GNP contents (1% and 0.025% w/v, respectively); B) effect of GNP composition at constant SA and CHI contents (1% and 0.75% w/v, respectively). C) Evolution of compression modulus in DMEM medium, for 1% w/v SA, (0.5% or 0.75% w/v) CHI, 0.025% w/v GNP. Tests were realized at 37 $^{\circ}\text{C}$, and solutions were changed after each measurement.

Increasing the GNP composition further did not lead to a significant improvement in gel stability after 15 days in PBS, as the compression modulus values are close and comprised between 4.6 and 5.7 kPa for GNP contents ranging from 0.025% to 0.05% w/v (p* for GNP 0.0375% and p > 0.05 for GNP 0.05% w/v between the first and 14th day) (**Figure 4.11 B**). However, it is worth noting that after 3 days in PBS, the composition with the lowest GNP content (0.025%) exhibited a comparatively smaller decrease of its compression modulus. Then, upon immersion in a CaCl₂ solution on the 15th day, the gels regained their initial compression modulus of 10.4 kPa.

A similar decreasing trend is observed when the gels are immersed in DMEM medium (**Figure 4.11 C** and **Figure A.8 B** for visual aspect). SA 1% CHI 0.75% GNP 0.05% w/v gels appear to stabilize slightly more rapidly compared to a 0.5% w/v content in CHI. In addition, all gels maintained their integrity in DMEM - even at 0.5% CHI, which was not the case in PBS. Again, plunging back the gels after 15 days into a CaCl₂ solution resulted in a full recovery of gel strength, at respectively 11.6 and 11.9 kPa for 0.5% and 0.75% w/v CHI contents.

The dimensions of the gels also changed in PBS and DMEM medium (**Figure A.9**). First, each gel decreases in size following the extraction of the mold, as illustrated previously in Figure 9. Specifically, gel thickness decreases from 6 mm to 5.1 mm, and the diameter decreases from 6.5 mm to 5.2 mm. When the gels are placed in PBS (**Figure A.9 A**), the dimensions further decrease, and stabilize after 3 days at a diameter of 4.8 mm and a height of 4.5 mm (p* and p**, respectively, between day 1 and day 3). On the other hand, when the gels are placed in DMEM medium (**Figure A.9 B**), the dimensions only slightly decrease, and they stabilize at a diameter of 5.2 mm and a height of 5.1 mm (p > 0.05). As a result, the effects of DMEM are milder on gel integrity and mechanical properties, compared to PBS, and CHI crosslinking clearly helps stabilize the materials (Sangroniz, Fernández & Santamaria, 2023).

1.3.16 Impact of irradiation on macroporous gels compression modulus

The effect of gamma irradiation dose on the mechanical properties was also assessed. The results are presented in **Tableau 4.2**. The dose was gradually increased from 10 to 30 Gy, which is considered as the superior limit for the treatment of GBM cancer. Overall, irradiation did not significantly alter or degrade the macroscopic aspects and mechanical properties of the gels (p > 0.05 for all doses compared to non-irradiated gels). In addition, no delayed impact was observed

as the modulus remained unchanged one week after irradiation. When placed on absorbent paper, water could easily be absorbed, suggesting that the pores were still open and accessible.

Table 4.2 Compression modulus of porous gels after exposure to increasing doses of gamma irradiation (SA/CHI/GNP 1%/0.75%/0.025% w/v, average pore size = 180 μm) (N = 4).

Dose (Gy)	0	10	15	20	30	30 (1 week after irradiation)
Compression modulus (kPa)	9.9 ± 2.5	10.2 ± 2.4	8.3 ± 1.0	9.9 ± 1.3	9.0 ± 2.4	10.0 ± 6.0

1.3.17 Impact of hydrogel formulation on the fluorescent properties of mCherry expressed by the F98 cells

The products of GNP reaction with primary amine groups are known to fluoresce in the 380-700 nm wavelength region. When GNP crosslinks CHI, the maximum excitation and emission wavelengths are measured at 550 nm and 650 nm, respectively (Vukajlovic, Bretcanu & Novakovic, 2021). An overlap with the fluorescence properties of mCherry expressed by F98 cells is expected since its maximum excitation wavelength $\lambda_{ex} = 530$ nm, while $\lambda_{em} = 590$ nm. The extent of interference with the fluorescence expressed by the F98 mCherry cells has been determined in the presence of three different types of hydrogel formulations: SA 1% CHI 0.75% GNP 0.05% w/v, and those formulated with SA 1% CHI 0.75% (no GNP), and SA 1% only (Figure A.10). All three were grafted with the RGD adhesion peptide and have similar average pore sizes (180 μm). Our results show that in SA 1% hydrogels, the fluorescence of the F98 mCherry cells is proportional to the added number of cells (Figure A.10A). On the other hand, slight fluorescence was measured due to the addition of CHI even without cells (Figure A.10B), whereas a very high fluorescence intensity was observed in the absence of F98 mCherry cells in hydrogels containing CHI crosslinked by GNP (almost 8 times higher than the value observed when adding 1×10^6 F98 mCherry cells to 1% SA hydrogels) (Figure A.10C). This intensity gradually decreased while adding F98 mCherry cells to reach a stable value of around 60,000. These results confirm the interference of the fluorescence of the product of the crosslinking reaction between CHI and GNP, and the fluorescence of the mCherry marker.

1.3.18 Accumulation and retention of F98 cells in hydrogels

The accumulation and retention of F98 cells in the hydrogels were then quantified using the Alamar Blue reagent, which measures the metabolic activity of cells present in the hydrogels. After 24 h of incubation, the number of F98 cells accumulated in the hydrogels was determined after gentle washing with PBS buffer first. The number of retained cells was then determined afterwards following a rigorous wash (Safi et al., 2022). For this test, two different types of hydrogels were used: SA 1% CHI 0.5% GNP 0.05% w/v, and SA 1% CHI 0.75% GNP 0.05% w/v, to determine which formulation would optimize F98 cellular accumulation and retention (Figure 4.12).

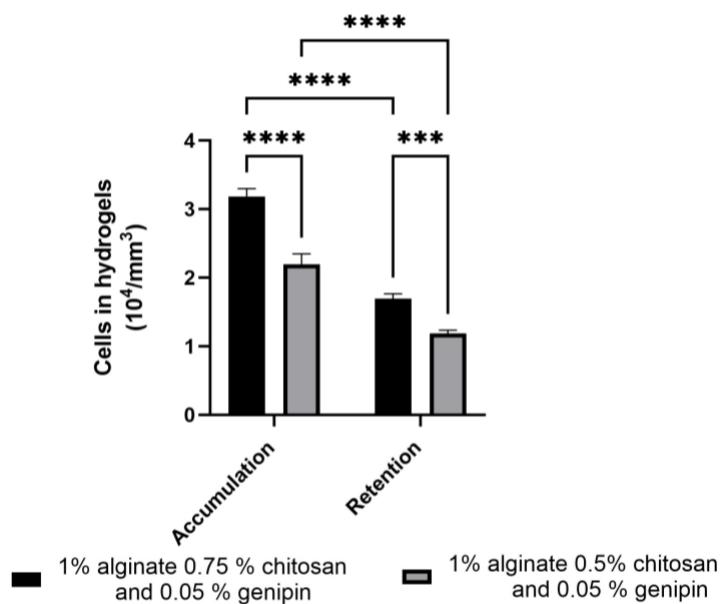


Figure 4.12 Accumulation and retention of F98 mCherry cells in hydrogels formulated with 1% SA 0.75% CHI 0.05% GNP (w/v, in black), and in 1% SA 0.5% CHI and 0.05% GNP (w/v, in grey).

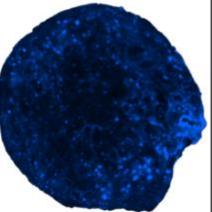
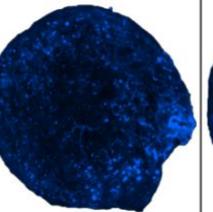
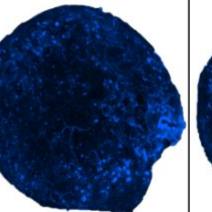
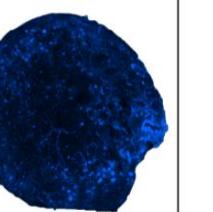
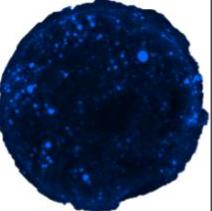
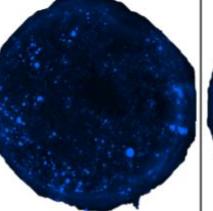
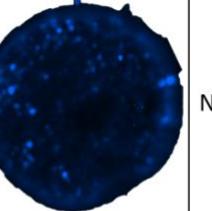
Hydrogels composed of SA 1% CHI 0.75% GNP 0.05% w/v significantly accumulated (p****) and retained (p***) more F98 cells. In fact, the accumulation as well as the retention of F98 cells were 1.4 times higher in SA 1% CHI 0.75% GNP 0.05% hydrogels, compared to SA 1% CHI 0.5% GNP 0.05% gels. These increases could be associated with a higher positive charge when the percentage of CHI increases from 0.5% to 0.75%, which favors the adhesion of negatively charged

F98 cells. However, cellular retention decreased by 1.8% in both hydrogels, suggesting that not all F98 cells were firmly adhered to the gels after 24 h of incubation.

1.3.19 Distribution of F98 cells within the hydrogels

The distribution of F98 cells in the hydrogels was measured at four different levels (L1 to L4) ranging from 1 mm to 3.5 mm deep, starting from the top of the hydrogels. Two hydrogel formulations were tested: SA 1% CHI 0.5% GNP 0.05 w/v, and SA 1% CHI 0.75% GNP 0.05% w/v. Images at the different levels, for both formulations, are shown in **Tableau 4.3**. Cells accumulated in the hydrogels were fixed and labeled, and their distribution was assessed using the epifluorescence microscope EVOS. The images obtained were then analyzed using a home made algorithm which allows to determine the number of cell clusters and their average size at each level (Safi et al., 2022).

Table 4.3 Representative distribution of F98 cells at 4 different levels (L1-L4) in 1% SA 0.75% CHI 0.05% GNP w/v, and 1% SA 0.5% CHI 0.05% GNP w/v hydrogels.

Levels	L1	L2	L3	L4
1% Alg 0.75% chitosan 0.05% genipin				
1% Alg 0.5% chitosan 0.05% genipin				No cells observed

In the SA 1% CHI 0.5% GNP 0.05% hydrogels, the cells stopped migrating once they reached level L3, while they reached level L4 in the SA 1% CHI 0.75% GNP 0.05% hydrogels. The results also show that by increasing the concentration of CHI from 0.5% to 0.75%, twice as more cell

clusters are observed, supporting the role of the positively charged CHI in promoting adhesion of F98 cells (**Figure 4.13 A**), a result that was also observed with cell accumulation and retention assays (**Figure 4.12**). In addition, the mean surface area of the cell clusters at the 4 levels in hydrogels containing 0.75% CHI were 3 times greater compared to clusters in gels containing 0.5% CHI (**Figure 4.13 B**).

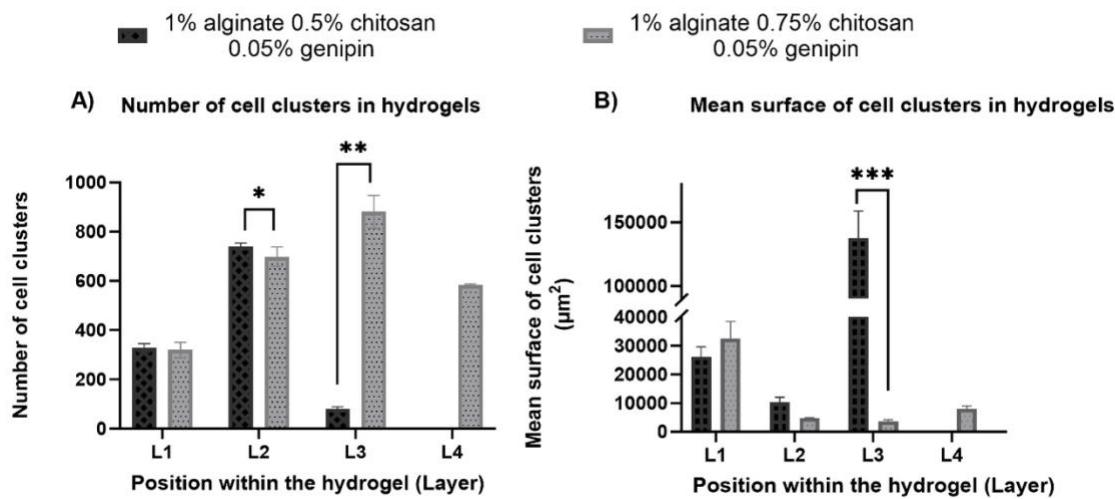


Figure 4.13 A) Number of cell clusters within levels L1 to L4 in hydrogels formulated with 1% SA 0.75% CHI 0.05% GNP, and in 1% SA 0.5% CHI and 0.05% GNP; **B)** Mean surface of cell clusters in levels L1 to L4, in hydrogels formulated with 1% SA 0.75% CHI 0.05% GNP, and in 1% SA 0.5% CHI and 0.05% GNP.

Interestingly, in SA 1% CHI 0.5% GNP 0.05% hydrogels, the highest cell clusters average surface area was observed at level L3. This observation is consistent with the cessation of cell migration at this level, which could be associated with the larger size of the cell clusters. Conversely, in hydrogels containing 0.75% CHI, the average size of cell clusters at this level was 38 times smaller, correlating with their migration down to level L4 (**Figure 4.13B**). To conclude, these results show that hydrogels composed of SA 1% CHI 0.75% GNP 0.05% yields a more homogeneous distribution of F98 cells.

4.4 DISCUSSION

This work improves on the previous results of Safi et al. (2022), which demonstrated that the addition of CHI in SA based gels indeed delayed, but did not stop, gel dissolution in media containing electrolytes (i.e. Na^+ ions) such as cell culture medium, and especially PBS. In this case, CHI interacted electrostatically with SA, but was not chemically crosslinked, and the gels displayed very fine but uncontrolled precipitates of SA and CHI. The main objective of the present work was then to develop homogeneous, chemically crosslinked and macroporous SA/CHI gels to enhance their stability in cell culture medium. This was achieved by combining (1) the addition of sodium bicarbonate to the initial CHI solution, followed by the addition of the SA solution (Komoto, Furuike & Tamura, 2019), and (2) by subsequently crosslinking CHI with GNP. Interestingly, the gelling kinetics can be monitored both by rheology, but also by UV-Vis spectroscopy, as Figures 3 to 6 demonstrate, due to the bluish color associated to the GNP crosslinking reaction. Controlling the gelling kinetics then allows the preparation of porous gels by molding in porous PLA templates.

The gel chemistry developed in this work respects the cancer cell trap requirements, with all selected components (biopolymers and crosslinking agent) being natural to ensure biocompatibility of the gels. The optimal formulation comprises 1% SA, 0.75% CHI, and 0.05% GNP w/v. Gels displaying an average pore size of 180 microns, chosen to ensure an effective cellular infiltration, exhibit a compression modulus similar to brain tissues (1-10 kPa) both immediately after preparation, and after immersion in PBS and cell culture medium (rich in ionic species) for 15 days. They are also resistant to radiation and capable of accumulating and retaining F98 mCherry cells throughout their entire volume. However, the blue color of the gels creates interference with the fluorescence measurements of F98 mCherry cells. Future work will then aim at substituting GNP chemical crosslinking, by a reaction avoiding the development of such coloration (while maintaining biocompatibility). This will facilitate the next step to evaluate the capacity of these gels to attract, using chemoattractants such as CXCL12 (El Kheir et al., 2023), and accumulate GBM cells in an *in vivo* rat model.

4.5 CONCLUSION

In this work, we have developed a sodium alginate/chitosan gel formulation to prepare homogeneous macroporous hydrogels, chemically crosslinked with genipin, and comprising fully interconnected pores with an average size of 180 microns. The best results were obtained with a formulation of SA 1% CHI 0.75% GNP 0.05% w/v. Indeed, chemical crosslinking of CHI by GNP yields a compression modulus of 10.3 kPa. This resulted in enhanced gel stability in cell culture medium rich in ionic species, with a compression modulus of 4.3 kPa after 14 days in DMEM medium. In addition, a radiation dose of 30 Gy had no significant impact on the mechanical properties and stability of the gels, even one week after irradiation. F98 mCherry cells distributed, accumulated and were retained in the whole gel volume.

Funding

The authors acknowledge the *Fonds de Recherche du Québec – Nature et Technologie* for financial support via the *Projet de Recherche en Équipe* program (grant number 2022-PR-299713). This work was also supported by the TransMedTech Institute (NanoBio Technology Platform) and its main funding partner, the Canada First Research Excellence Fund.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Marie-Hélène Bernier, from the GCM laboratory, for her expertise and support with the MicroCT experiments (Polytechnique Montreal) and Matthieu Gauthier for his expertise in rheology and his help into the lab.

CHAPITRE 5 DISCUSSION

L'objectif principal de ce projet de recherche était de développer une chimie de gel à base d'alginate et de chitosane qui réponde aux exigences de l'application Gliotrappe. S'appuyant sur les travaux récents de l'équipe Gliotrappe, menés par Safi et al. (2022), il est apparu que le principal défi des gels synthétisés à partir de SA/CHI réside dans leur perte de stabilité dans des milieux simulant l'environnement cérébral (DMEM, PBS), où des échanges ioniques se produisaient, perturbant la réticulation physique des gels. Pour résoudre ce problème, la recherche s'est donc orientée vers la réticulation chimique du chitosane à l'aide de la génipine.

Les premières expériences se sont centrées sur l'utilisation du chitosane pur réticulé chimiquement par la génipine, visant à déterminer si, à une certaine concentration et un rapport CHI/GNP, des gels poreux présentant un module de 1-10 kPa pouvaient être obtenus. Les essais initiaux ont porté sur la cinétique de réticulation, ainsi que sur la sélection et l'optimisation de la plage de concentrations de CHI et GNP à tester. De manière intéressante, la cinétique de gélification a pu être surveillée à la fois par rhéologie et par spectroscopie UV-Vis, grâce à l'accentuation de la couleur bleue des gels au cours de la réaction. Il était essentiel de maîtriser la cinétique de gélification pour la préparation des gels poreux, afin de déterminer le moment optimal pour dissoudre les moules en PLA. Un délai de 24 heures à 37°C a été choisi, car l'augmentation de la température permettait d'accélérer la réaction sans assécher excessivement les gels ni provoquer de synérèse. Cependant, les premiers tests sur des gels non poreux ont révélé une résistance mécanique inférieure à celle des gels d'alginate, ce qui a empêché la conception de gels poreux, car lors de la dissolution du moule, les pores se refermaient et les gels se désintégraient. Une solution a été d'augmenter la concentration en génipine, mais une concentration excessive rendait les gels trop cassants et difficiles à manipuler, réduisant leur résistance à des forces de compression. Suite à ces observations, le maintien de l'alginate dans la formulation était nécessaire.

Le deuxième défi que j'ai rencontré concernait le mélange de l'alginate et du chitosane. En effet, le chitosane est insoluble à des pH neutres et alcalins, ce qui entraînait la formation d'un précipité dans la solution d'alginate. Pour obtenir une solution homogène, j'ai d'abord tenté d'augmenter le pH de la solution de chitosane en utilisant une solution de NaOH, en approchant au maximum son pKa de 6.3. Cependant, le même résultat de précipitation a été observé lors du mélange avec

l'alginate. Après avoir effectué une veille littéraire sur le sujet, j'ai décidé d'ajouter du bicarbonate de sodium sous forme de poudre en excès à ma solution de chitosane, afin d'augmenter son pH, comme cela avait été développé par Komoto et al. (2019). Ces essais se sont avérés concluants, amenant la solution de chitosane à un pH d'environ 7.5, rendant le chitosane complètement soluble en solution. Lorsque cette solution de chitosane a été mélangée à l'alginate, des solutions entièrement transparentes ont été obtenues, aboutissant à des gels homogènes.

Cependant, j'ai rencontré des difficultés supplémentaires lors de la mise en œuvre de cette étape : si l'agitation de la solution de chitosane après l'ajout de bicarbonate n'était pas suffisamment rapide, le chitosane précipitait et une solution trouble se formait. De plus, l'application de cette méthode pour des solutions de chitosane de concentration élevée était plus complexe en raison de la viscosité élevée de ces solutions, ce qui rendait le mélange du bicarbonate moins efficace et résultant aussi à une précipitation incontrôlée. C'est pourquoi les concentrations des solutions mères de chitosane utilisées dans cette étude n'ont jamais dépassé 2 % w/v avant leur mélange avec l'alginate.

En utilisant cette chimie de gels et après conception des gels poreux, j'ai pu explorer le ratio optimal de SA/CHI ainsi que l'effet de l'augmentation de la concentration en GNP grâce à des tests de compression. Pour reproduire au mieux les contraintes de compression présentes dans l'environnement cérébral, j'ai immergé mes gels pendant les tests de compression. Il était essentiel d'ajouter un volume constant d'eau à chaque fois pour ne pas influencer les résultats obtenus. De plus, étant donné que les gels ne présentent pas un comportement purement élastique, la vitesse de déformation avait un impact sur la valeur du module de compression obtenue. Il serait par conséquent intéressant de modéliser et caractériser la vitesse de la pression exercée par les tissus cérébraux afin d'optimiser les tests de compression effectués, et par conséquent, les ratios de concentration des polymères utilisés. La formulation optimale identifiée dans le cadre des tests actuels comprend 1 % de SA, 0.75 % de CHI et 0.05 % de GNP (w/v). Les gels, qui présentent une taille moyenne de pores de 180 microns (choisie pour assurer une infiltration cellulaire efficace), affichent un module de compression similaire à celui des tissus cérébraux (de 1 à 10 kPa) après leur synthèse. Ce module reste dans cette plage même après immersion dans du PBS ou un milieu de culture cellulaire riche en espèces ioniques pendant 15 jours. Des tests supplémentaires ont été effectués pour évaluer si les pores étaient toujours présents en utilisant une reconstruction par microCT. Cependant, étant donné que les gels ont perdu de leur résistance mécanique, lors de

l'évacuation de l'eau avant les tests, il semble que les pores se referment sur eux-mêmes, ce qui complique la reconstruction et ne permet pas de tirer de réelle conclusion. Pour finir avec les tests de stabilité, un résultat important de ce mémoire est que les gels sont résistants à l'irradiation : la dose maximale applicable dans le cadre de l'application Gliotrappe n'a pas eu d'impact significatif sur la résistance des gels, soumis en compression post-irradiation. Une manipulation complémentaire serait de réaliser une reconstruction par microCT du gel post-irradiation pour affirmer que la porosité est toujours présente.

Enfin, les gels sont capables d'accumuler et de retenir des cellules F98 mCherry dans l'ensemble de leur volume. Cependant, la couleur bleue des gels crée une interférence avec les mesures de fluorescence des cellules F98 mCherry. Les travaux futurs viseront donc à substituer la réticulation chimique par une réaction évitant le développement d'une telle coloration (tout en maintenant la biocompatibilité des gels). Cela facilitera la prochaine étape visant à évaluer la capacité des gels à attirer, à l'aide de chimiokines telles que la CXCL12 (El Kheir et al., 2023), et à accumuler des cellules GBM dans un modèle *in vivo* chez le rat.

Pour finir, le stage réalisé au LCC de Toulouse a ouvert une piste de recherche très intéressante quant à l'ajout de nanoparticules d'or à la Gliotrappe, l'intérêt étant de détruire plus efficacement les cellules cancéreuses. Les tests préliminaires ont montré que l'utilisation du chitosane dans la chimie des gels est un avantage car ce dernier peut réduire directement l'or sur le gel. Aussi, l'intérêt de tester un nouveau mécanisme de réticulation chimique pourrait être le moyen de s'affranchir de l'utilisation de CaCl_2 , qui provoque l'agrégation non contrôlée des NPs d'or en solution colloïdale. En effet, cette technique est aussi très intéressante car elle permet d'avoir un meilleur contrôle sur la taille des NPs absorbées par le gel, caractérisée au préalable par microscopie à transmission suite à la synthèse. Si les premiers tests se révèlent prometteurs, une étude plus approfondie serait d'évaluer l'impact de la taille des NPs, leur concentration et localisation dans le gel. De plus, en cas de démonstration d'une localisation privilégiée dans le volume, il pourrait être envisagé d'effectuer de nouvelles expériences visant à réduire l'or dans la solution de chitosane avant son injection et sa gélification dans les moules.

CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Les travaux réalisés dans le cadre de cette maîtrise ont permis de développer une nouvelle chimie de gel à base de biopolymères, l'alginate et le chitosane, et d'un agent de réticulation, lui-aussi d'origine naturelle, le génipine. Le mélange de ces deux polymères permettant de bénéficier des propriétés de chacun. D'une part, l'alginate est intéressant par son caractère non immunogène ainsi que pour la rigidité qu'il apporte post-conception par sa réticulation physique avec une solution de CaCl_2 . D'autre part, le chitosane améliore l'adhésion cellulaire ainsi que la stabilité des gels en milieu ionique grâce à sa réticulation chimique. Aussi, l'association de ces deux polymères est intéressante car ils établissent entre eux des liaisons physiques en solution, étant donné que ce sont deux polymères ioniques de charges opposées.

Cependant, une des difficultés majeures qui a été rencontrées a été de préparer un mélange homogène de chitosane et d'alginate. À cause de leur charge complémentaire en solution, le chitosane, insoluble pour des pH neutre et alcalin, forme un précipité dans la solution d'alginate. Pour pallier ce problème, l'ajout de bicarbonate de soude à la solution de chitosane, sous forme de poudre, a permis d'augmenter le pH de la solution à 7, tout en maintenant son homogénéité. L'ajout de cette solution à l'alginate n'a pas entraîné la formation de précipité, ce qui a donc permis d'obtenir des solutions homogènes et par conséquent des gels homogènes, suite à la réticulation chimique avec la génipine.

Cette chimie de gel développée a aussi l'avantage d'être compatible avec la méthode de préparation des gels poreux utilisant la morphologie co-continue de mélanges immiscibles de polymères. Cependant, pour que la solution soit correctement introduite dans le moule en PLA, il n'est pas possible d'utiliser des solutions trop visqueuses, donc trop concentrées en alginate et chitosane. C'est pourquoi, le choix des concentrations finales a été de SA 1% et CHI 0.75% w/v.

Cette chimie de gel étant complexe, il a été important dans un premier temps de bien caractériser la réaction de réticulation du chitosane, dont la solution a été préalablement amenée à un pH neutre avec le bicarbonate. Pour cela, la coloration bleutée des gels, résultat de la réticulation chimique à la génipine, présentait un avantage, permettant de surveiller la progression de la réaction à la fois visuellement et de manière plus quantitative à l'aide de la spectroscopie UV-Vis et de la rhéologie. Une température de 37°C a été choisie pour accélérer la réaction et une concentration en GNP de

0.05% w/v, par rapport à une solution à 0.75% de CHI, a été choisie pour que les gels ne deviennent pas trop cassants et résistent aux forces de compression.

La deuxième partie de l'étude s'est concentrée sur les propriétés des gels poreux. Les gels synthétisés à partir des concentrations finales choisies, à savoir SA 1% CHI 0.75% GNP 0.05% w/v, ont un module de compression proche de celui des tissus cérébraux visés (soit 1 à 10 kPa) et ce, même après 15 jours dans le DMEM. En effet, malgré une perte de rigidité des gels, leur module, diminuant de 10 à 4 kPa, reste toujours dans l'intervalle attendu. Cette diminution résulte de la réticulation physique de l'alginate, réticulation qui est réversible et accentuée dans les milieux ioniques. Pour prévenir ce problème, des gels poreux ont été fabriqués à partir de chitosane à 100%, et d'un mélange d'alginate et de chitosane réticulé chimiquement avec de la génipine, sans ajout de CaCl₂. Cependant, ces derniers n'ont pas résisté à la dissolution du moule en PLA en raison de leur trop faible résistance, et ce même pour des concentrations élevées en génipine. C'est pourquoi, la conservation de l'alginate, ainsi que sa réticulation physique, ont été les choix effectués quant à la synthèse des gels poreux. Enfin, la radiothérapie n'a pas montré d'impact significatif sur la rigidité des gels.

Ce travail a finalement montré l'intérêt d'augmenter la concentration en chitosane des gels et d'utiliser une voie de réticulation covalente pour un maintien de la stabilité dans le temps. En effet, cela permet au gel de diminuer la perte progressive de sa résistance mécanique dans les milieux ioniques ainsi que d'accumuler plus de cellules F98. En effet, les tests cellulaires ont montré une accumulation et une rétention cellulaire dans tout le volume des gels. Cependant, la génipine fluoresce et perturbe la quantification des cellules mCherry, d'où l'utilisation du réactif de viabilité cellulaire Alamar Blue dans cette étude. Toutefois, la problématique de la quantification cellulaire lors des tests *in vivo* persiste, ce qui rend complexifie l'utilisation de gels à base de génipine pour la suite du projet – indiquant ainsi des pistes de travaux futurs.

Par rapport à ce travail et aux défis rencontrés, plusieurs recommandations peuvent être apportées:

- Les difficultés liées à la fluorescence de la génipine ne permettront pas la quantification cellulaire lors des tests *in vivo*. Cependant, les polymères utilisés présentent des caractéristiques précieuses pour l'application, donc il est essentiel de conserver le chitosane et l'alginate. Aussi, il est important de conserver une réticulation covalente des gels pour le

maintien de la stabilité des gels dans des milieux ioniques. C'est pourquoi, afin de résoudre ce problème, il faudra choisir un autre agent de réticulation chimique biocompatible. Des études récentes ont exploré l'utilisation de la chimie NHS/EDC pour réticuler l'alginate avec le chitosane et donner lieu à des gels homogènes. L'utilisation de cette chimie permettrait potentiellement de s'affranchir de la réticulation physique de l'alginate, responsable de la perte de résistance mécanique des gels, si un certain ratio de concentrations permet d'obtenir le module de compression souhaité.

- Concernant la conception des moules, il serait plus judicieux d'opter pour des polymères hydrosolubles, afin d'éviter l'utilisation de solvants tels que le cyclohexane et le chloroforme pour dissoudre le PS et le PLA. En effet, la présence potentielle de résidus de solvants aurait un impact significatif sur la biocompatibilité des implants. De nouveaux polymères sont en cours d'étude par Lisa Delattre à travers son projet de maîtrise.
- La synthèse de nanoparticules d'or dans les gels pourraient être une voie pour exacerber la sensibilité des cellules cancéreuses à la radiothérapie. Des tests préliminaires sur les gels synthétisés, présentés dans l'Annexe 1, sont à venir pour évaluer l'intérêt de l'or. Si ces résultats sont intéressants, d'autres tests seront à prévoir quant à la taille des NPs d'or synthétisées, leur concentration ainsi que leur localisation préférentielle dans le gel (surface ou volume) pour que la destruction soit optimale.
- La reconstruction des moules et gels résultants établis par microCT a montré que les gels semblaient avoir une taille de pores plus grande que leur moule correspondant donc il serait intéressant d'étudier plusieurs moules/gels correspondants pour différentes tailles de pores afin de voir si cette observation est récurrente, et par conséquent à prendre en compte, dès le début lors de la conception. Une autre possibilité serait qu'il reste de l'eau contenu dans les pores même après séchage sur un papier absorbant.

RÉFÉRENCES

- Aderibigbe, B. A., & Buyana, B. (2018). Alginate in Wound Dressings. *Pharmaceutics*, 10(2), 42. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020042>
- Annur, S., Santosa, S., Aprilita, N., Phuong, N., & Phuoc, N. (2018). Rapid Synthesis of Gold Nanoparticles without Heating Process. *Asian Journal of Chemistry*, 30, 2399-2403. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2018.21386>
- Aranaz, I., Alcántara, A. R., Civera, M. C., Arias, C., Elorza, B., Heras Caballero, A., & Acosta, N. (2021). Chitosan : An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers*, 13(19), 3256. <https://doi.org/10.3390/polym13193256>
- Auriemma, G., Russo, P., Del Gaudio, P., García-González, C. A., Landin, M., & Aquino, R. (2020). Technologies and Formulation Design of Polysaccharide-Based Hydrogels for Drug Delivery. *Molecules*, 25, 3156. <https://doi.org/10.3390/molecules25143156>
- Autier, L., Clavreul, A., Cacicedo, M. L., Franconi, F., Sindji, L., Rousseau, A., Perrot, R., Montero-Menei, C. N., Castro, G. R., & Menei, P. (2019). A new glioblastoma cell trap for implantation after surgical resection. *Acta Biomaterialia*, 84, 268-279. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.027>
- Bell, J. R., Chang, K., López-Barrón, C. R., Macosko, C. W., & Morse, D. C. (2010). Annealing of Cocontinuous Polymer Blends : Effect of Block Copolymer Molecular Weight and Architecture. *Macromolecules*, 43(11), 5024-5032. <https://doi.org/10.1021/ma902805x>
- Bhumkar, D. R., Joshi, H. M., Sastry, M., & Pokharkar, V. B. (2007). Chitosan reduced gold nanoparticles as novel carriers for transmucosal delivery of insulin. *Pharmaceutical Research*, 24(8), 1415-1426. <https://doi.org/10.1007/s11095-007-9257-9>
- Bouchard, G., Bouvette, G., Therriault, H., Bujold, R., Saucier, C., & Paquette, B. (2013). Pre-irradiation of mouse mammary gland stimulates cancer cell migration and development of lung metastases. *British Journal of Cancer*, 109(7), 1829-1838. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.502>
- Bourry, D., & Favis, B. D. (1998). Cocontinuity and phase inversion in HDPE/PS blends : Influence of interfacial modification and elasticity. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer*

Physics, 36(11), 1889-1899. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-0488\(199808\)36:11<1889::AID-POLB10>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-0488(199808)36:11<1889::AID-POLB10>3.0.CO;2-3)

Bravo-Anaya, L. M., Soltero, J. F. A., & Rinaudo, M. (2016). DNA/chitosan electrostatic complex. *International Journal of Biological Macromolecules*, 88, 345-353. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.035>

Brown, M. B., & Jones, S. A. (2005). Hyaluronic acid : A unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 19(3), 308-318. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2004.01180.x>

Chan, P. S., Xian, J. W., Li, Q., Chan, C. W., Leung, S. S. Y., & To, K. K. W. (2019). Biodegradable Thermosensitive PLGA-PEG-PLGA Polymer for Non-irritating and Sustained Ophthalmic Drug Delivery. *The AAPS Journal*, 21(4), 59. <https://doi.org/10.1208/s12248-019-0326-x>

Chen, Y., Jia, Z., Shafiq, M., Xie, X., Xiao, X., Castro, R., Rodrigues, J., Wu, J., Zhou, G., & Mo, X. (2021). Gas foaming of electrospun poly(L-lactide-co-caprolactone)/silk fibroin nanofiber scaffolds to promote cellular infiltration and tissue regeneration. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 201, 111637. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.111637>

D'Alessandris, Q. G., Biffoni, M., Martini, M., Runci, D., Buccarelli, M., Cenci, T., Signore, M., Stancato, L., Olivi, A., De Maria, R., Larocca, L. M., Ricci-Vitiani, L., & Pallini, R. (2017). The clinical value of patient-derived glioblastoma tumorspheres in predicting treatment response. *Neuro-Oncology*, 19(8), 1097-1108. <https://doi.org/10.1093/neuonc/now304>

Davis, T. A., Volesky, B., & Mucci, A. (2003). A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research*, 37(18), 4311-4330. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(03\)00293-8](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(03)00293-8)

Delmar, K., & Bianco-Peled, H. (2015). The dramatic effect of small pH changes on the properties of chitosan hydrogels crosslinked with genipin | Elsevier Enhanced Reader. *Carbohydrate Polymers*, 127, 28-37. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.03.039>

Deraedt, C., Salmon, L., Gatard, S., Ciganda, R., Hernandez, R., Ruiz, J., & Astruc, D. (2014). Sodium borohydride stabilizes very active gold nanoparticle catalysts. *Chemical Communications*, 50(91), 14194-14196. <https://doi.org/10.1039/C4CC05946H>

Dimida, S., Barca, A., Cancelli, N., De Benedictis, V., Raucci, M., & Demitri, C. (2017). Effects of Genipin Concentration on Cross-Linked Chitosan Scaffolds for Bone Tissue Engineering: Structural Characterization and Evidence of Biocompatibility Features. *International Journal of Polymer Science*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8410750>

Dimida, S., Demitri, C., De Benedictis, V. M., Scalera, F., Gervaso, F., & Sannino, A. (2015). Genipin-cross-linked chitosan-based hydrogels: Reaction kinetics and structure-related characteristics. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(28). <https://doi.org/10.1002/app.42256>

Dong, J., Carpinone, P. L., Pyrgiotakis, G., Demokritou, P., & Moudgil, B. M. (2020). Synthesis of Precision Gold Nanoparticles Using Turkevich Method. *Kona : powder science and technology in Japan*, 37, 224-232. <https://doi.org/10.14356/kona.2020011>

El Kheir, W., Dumais, A., Beaudoin, M., Marcos, B., Virgilio, N., Paquette, B., Faucheu, N., & Lauzon, M.-A. (2023). Impact of simulated brain interstitial fluid flow on the chemokine CXCL12 release from an alginate-based hydrogel in a new 3D in vitro model. *Frontiers in Drug Delivery*, 3. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fddev.2023.1227776>

Esquirol, A.-L., Sarazin, P., & Virgilio, N. (2014). Tunable Porous Hydrogels from Cocontinuous Polymer Blends. *Macromolécules*, 47(9), 3068-3075. <https://doi.org/10.1021/ma402603b>

Favis, B. D., & Therrien, D. (1991). Factors influencing structure formation and phase size in an immiscible polymer blend of polycarbonate and polypropylene prepared by twin-screw extrusion. *Polymer*, 32(8), 1474-1481. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(91\)90429-M](https://doi.org/10.1016/0032-3861(91)90429-M)

Formation of porous biodegradable scaffolds based on poly(propylene carbonate) using gas foaming technology / Elsevier Enhanced Reader. (s. d.). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.088>

Galloway, J. A., Jeon, H. K., Bell, J. R., & Macosko, C. (2005). Block copolymer compatibilization of cocontinuous polymer blends. *Polymer*, 46(1), 183-191. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.10.061>

Gancheva, T., & Virgilio, N. (2016). Enhancing and Tuning the Response of Environmentally Sensitive Hydrogels With Embedded and Interconnected Pore Networks. *Macromolecules*, 49(16), 5866-5876. <https://doi.org/10.1021/acs.macromol.6b01411>

- Ghavidel Mehr, N., Li, X., Ariganello, M. B., Hoemann, C. D., & Favis, B. D. (2014). Poly(ϵ -caprolactone) scaffolds of highly controlled porosity and interconnectivity derived from co-continuous polymer blends: Model bead and cell infiltration behavior. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25(9), 2083-2093. <https://doi.org/10.1007/s10856-014-5256-7>
- Giraldo Solano, A. M., el Kheir, W., Therriault, H., Gascon, S., Berthelin, P., Cattier, B., Marcos, B., Faucheu, N., Lauzon, M.-A., Virgilio, N., & Paquette, B. (2020). Development of a cancer cell trap: Accumulation, retention and elimination of glioblastoma cells by radiation. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.16721.86889>
- Gu, L., Nessim, E. E., & Macosko, C. W. (2018). Reactive compatibilization of poly(lactic acid)/polystyrene blends and its application to preparation of hierarchically porous poly(lactic acid). *Polymer*, 134, 104-116. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2017.11.054>
- Guarino, V., Guaccio, A., & Ambrosio, L. (2011). Manipulating Co-Continuous Polymer Blends to Create PCL Scaffolds with fully Interconnected and Anisotropic Pore Architecture. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*, 9(1), 34-39. <https://doi.org/10.5301/JABB.2011.6473>
- Guo, B., Elgsaeter, A., & Stokke, B. T. (1998). Gelation kinetics of scleraldehyde–chitosan co-gels. *Polymer Gels and Networks*, 6(2), 113-135. [https://doi.org/10.1016/S0966-7822\(98\)00005-7](https://doi.org/10.1016/S0966-7822(98)00005-7)
- Hainfeld, J. F., Dilmanian, F. A., Slatkin, D. N., & Smilowitz, H. M. (2010). Radiotherapy enhancement with gold nanoparticles. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60(8), 977-985. <https://doi.org/10.1211/jpp.60.8.0005>
- Heimbuck, A. M., Priddy-Arrington, T. R., Padgett, M. L., Llamas, C. B., Barnett, H. H., Bunnell, B. A., & Caldorera-Moore, M. E. (2019). Development of Responsive Chitosan–Genipin Hydrogels for the Treatment of Wounds. *ACS Applied Bio Materials*, 2(7), 2879-2888. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00266>
- Holland, E. C. (2000). Glioblastoma multiforme: The terminator. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6242-6244. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.12.6242>
- Hwang, Y.-J., Larsen, J., Krasieva, T. B., & Lyubovitsky, J. G. (2011). Effect of genipin crosslinking on the optical spectral properties and structures of collagen hydrogels. *ACS applied materials & interfaces*, 3(7), 2579-2584. <https://doi.org/10.1021/am200416h>

Iacob, G., & Dinca, E. (2009). Current data and strategy in glioblastoma multiforme. *Journal of Medicine and Life*, 2(4), 386-393.

Kahu, S., Saravanan, D., & Jugade, R. (2014). Effective detoxification of hexavalent chromium using sulfate-crosslinked chitosan. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 70(12), 2047-2055. <https://doi.org/10.2166/wst.2014.455>

Keriquel, V., Oliveira, H., Rémy, M., Ziane, S., Delmond, S., Rousseau, B., Rey, S., Catros, S., Amédée, J., Guillemot, F., & Fricain, J.-C. (2017). In situ printing of mesenchymal stromal cells, by laser-assisted bioprinting, for in vivo bone regeneration applications. *Scientific Reports*, 7(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01914-x>

Khalil, F. (s. d.). *Mélanges de polymères biodégradables immiscibles : Influence de la morphologie sur le contrôle de la libération de substances actives ou modèles*.

Khan, M. A., Hussain, Z., Liaqat, U., Liaqat, M. A., & Zahoor, M. (2020). Preparation of PBS/PLLA/HAP Composites by the Solution Casting Method: Mechanical Properties and Biocompatibility. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*, 10(9), 1778. <https://doi.org/10.3390/nano10091778>

Khan, Z. M., Munson, J. M., Long, T. E., Vlaisavljevich, E., & Verbridge, S. S. (2023). Development of a Synthetic, Injectable Hydrogel to Capture Residual Glioblastoma and Glioblastoma Stem-Like Cells with CXCL12-Mediated Chemotaxis. *Advanced Healthcare Materials*, 12(14), 2300671. <https://doi.org/10.1002/adhm.202300671>

Khong, T. T., Aarstad, O. A., Skjåk-Bræk, G., Draget, K. I., & Vårum, K. M. (2013). Gelling Concept Combining Chitosan and Alginate—Proof of Principle. *Biomacromolecules*, 14(8), 2765-2771. <https://doi.org/10.1021/bm400610b>

Komoto, D., Furuike, T., & Tamura, H. (2019). Preparation of polyelectrolyte complex gel of sodium alginate with chitosan using basic solution of chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*, 126, 54-59. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.195>

Kus-Liskiewicz, M., Fickers, P., & Ben Tahar, I. (2021). Biocompatibility and Cytotoxicity of Gold Nanoparticles : Recent Advances in Methodologies and Regulations. *International Journal*

of Molecular Sciences, 22(20), 10952. <https://doi.org/10.3390/ijms222010952>

Lee, B.-H., Li, B., & Guelcher, S. A. (2012). Gel microstructure regulates proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells encapsulated in alginate beads. *Acta Biomaterialia*, 8(5), 1693-1702. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.01.012>

Lee, K. Y., & Mooney, D. J. (2012). Alginate : Properties and biomedical applications. *Progress in polymer science*, 37(1), 106-126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>

Liu, J., Zheng, H., Poh, P. S. P., Machens, H.-G., & Schilling, A. F. (2015). Hydrogels for Engineering of Perfusionable Vascular Networks. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15997-16016. <https://doi.org/10.3390/ijms160715997>

Lyu, S., Jones, T. D., Bates, F. S., & Macosko, C. W. (2002). Role of Block Copolymers on Suppression of Droplet Coalescence. *Macromolecules*, 35(20), 7845-7855. <https://doi.org/10.1021/ma020754t>

Ma, S., Feng, X., Liu, F., Wang, B., Zhang, H., & Niu, X. (2021). The pro-inflammatory response of macrophages regulated by acid degradation products of poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles. *Engineering in Life Sciences*, 21(10), 709-720. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100040>

Marchi, N., Angelov, L., Masaryk, T., Fazio, V., Granata, T., Hernandez, N., Hallene, K., Diglaw, T., Franic, L., Najm, I., & Janigro, D. (2007). Seizure-Promoting Effect of Blood–Brain Barrier Disruption. *Epilepsia*, 48(4), 732-742. <https://doi.org/10.1111/j.1528-1167.2007.00988.x>

Mooney, D. J., Baldwin, D. F., Suh, N. P., Vacanti, J. P., & Langer, R. (1996). Novel approach to fabricate porous sponges of poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials*, 17(14), 1417-1422. [https://doi.org/10.1016/0142-9612\(96\)87284-X](https://doi.org/10.1016/0142-9612(96)87284-X)

Muzzarelli, R. A. (2009). Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*, 77(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.01.016>

Najberg, M., Haji Mansor, M., Boury, F., Alvarez-Lorenzo, C., & Garcion, E. (2019). Reversing the Tumor Target : Establishment of a Tumor Trap. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 887.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00887>

Noori, A., Ashrafi, S. J., Vaez-Ghaemi, R., Hatamian-Zaremi, A., & Webster, T. J. (2017). A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 4937-4961. <https://doi.org/10.2147/IJN.S124671>

Ostrom, Q. T., Gittleman, H., Liao, P., Vecchione-Koval, T., Wolinsky, Y., Kruchko, C., & Barnholtz-Sloan, J. S. (2017). CBTRUS Statistical Report : Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010–2014. *Neuro-Oncology*, 19(suppl_5), v1-v88. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nox158>

Pená, E. S., Graham-Gurysh, E. G., Bachelard, E. M., & Ainslie, K. M. (2021). Design of Biopolymer-Based Interstitial Therapies for the Treatment of Glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), Article 23. <https://doi.org/10.3390/ijms222313160>

Pezeshki-Modaress, M., Zandi, M., & Rajabi, S. (2018). Tailoring the gelatin/chitosan electrospun scaffold for application in skin tissue engineering : An in vitro study. *Progress in Biomaterials*, 7, 207-218. <https://doi.org/10.1007/s40204-018-0094-1>

Piard, J., Maisonneuve, F., Allain, C., & Schaming, D. (2013). Synthèse et détermination de la taille de nanoparticules d'or. *Le Bulletin de l'Union des Professeurs de Physique et de Chimie*, 107(952), 327-339.

Prasad, A., Sankar, M. R., & Katiyar, V. (2017). State of Art on Solvent Casting Particulate Leaching Method for Orthopedic ScaffoldsFabrication. *Materials Today: Proceedings*, 4(2, Part A), 898-907. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.01.101>

Ramdhani, T., Ching, S. H., Prakash, S., & Bhandari, B. (2020). Physical and mechanical properties of alginate based composite gels. *Trends in Food Science & Technology*, 106, 150-159. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.002>

Ramos-de-la-Peña, A. M., Renard, C. M. G. C., Montañez, J., de la Luz Reyes-Vega, M., & Contreras-Esquivel, J. C. (2016). A review through recovery, purification and identification of genipin. *Phytochemistry Reviews*, 15(1), 37-49. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9383-z>

Ravati, S., & Favis, B. D. (2010). Morphological states for a ternary polymer blend demonstrating

- complete wetting. *Polymer*, 51(20), 4547-4561. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2010.07.014>
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan : Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, 31(7), 603-632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Rusu-Balaita, L., Desbrieres, J., & Rinaudo, M. (2003). Formation of a biocompatible polyelectrolyte complex : Chitosan-hyaluronan complex stability. *Polymer Bulletin*, 50, 91-98. <https://doi.org/10.1007/s00289-003-0144-1>
- Safi, C., Solano, A. G., Liberelle, B., Therriault, H., Delattre, L., Abdelkhalek, M., Wang, C., Bergeron-Fortier, S., Moreau, V., Crescenzo, G. D., Faucheu, N., Lauzon, M.-A., Paquette, B., & Virgilio, N. (2022). Effect of Chitosan on Alginate-Based Macroporous Hydrogels for the Capture of Glioblastoma Cancer Cells. *ACS Applied Bio Materials*. <https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00598>
- Salehi, P., Sarazin, P., & Favis, B. D. (2008). Porous Devices Derived from Co-Continuous Polymer Blends as a Route for Controlled Drug Release. *Biomacromolecules*, 9(4), 1131-1138. <https://doi.org/10.1021/bm7010467>
- Sangroniz, L., Fernández, M., & Santamaria, A. (2023). Polymers and rheology : A tale of give and take. *Polymer*, 271, 125811. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2023.125811>
- Sarazin, P., & Favis, B. D. (2003). Morphology Control in Co-continuous Poly(L -lactide)/Polystyrene Blends : A Route towards Highly Structured and Interconnected Porosity in Poly(L -lactide) Materials. *Biomacromolecules*, 4(6), 1669-1679. <https://doi.org/10.1021/bm030034+>
- Sarazin, P., & Favis, B. D. (2005). Influence of temperature-induced coalescence effects on co-continuous morphology in poly(ε-caprolactone)/polystyrene blends. *Polymer*, 46(16), 5966-5978. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.04.064>
- Sarazin, P., Roy, X., & Favis, B. D. (2004). Controlled preparation and properties of porous poly(l-lactide) obtained from a co-continuous blend of two biodegradable polymers. *Biomaterials*, 25(28), 5965-5978. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.065>
- Smith, I. O., Liu, X. H., Smith, L. A., & Ma, P. X. (2009). Nanostructured polymer scaffolds for

tissue engineering and regenerative medicine. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1(2), 226-236. <https://doi.org/10.1002/wnan.26>

Smyth, N. A., Murawski, C. D., Hannon, C. P., Kaplan, J. R., & Aiyer, A. A. (2021). The Use of a Synthetic Cartilage Implant for Hallux Rigidus : A Systematic Review. *Foot & Ankle Specialist*, 14(4), 366-371. <https://doi.org/10.1177/1938640020937160>

Solano, A. G., Dupuy, J., Therriault, H., Liberelle, B., Faucheu, N., Lauzon, M.-A., Virgilio, N., & Paquette, B. (2021). An alginate-based macroporous hydrogel matrix to trap cancer cells. *Carbohydrate Polymers*, 266, 118115. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118115>

Strugova, D., David, E., & Demarquette, N. (2022). Linear viscoelasticity of PP/PS/MWCNT composites with co-continuous morphology. *Journal of Rheology*, 66, 671-681. <https://doi.org/10.1122/8.0000441>

Su, K., & Wang, C. (2015). Recent advances in the use of gelatin in biomedical research. *Biotechnology Letters*, 37(11), 2139-2145. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1907-0>

Suamte, L., Tirkey, A., Barman, J., & Jayasekhar Babu, P. (2023). Various manufacturing methods and ideal properties of scaffolds for tissue engineering applications. *Smart Materials in Manufacturing*, 1, 100011. <https://doi.org/10.1016/j.smmf.2022.100011>

Tan, H., Jin, D., Qu, X., Liu, H., Chen, X., Yin, M., & Liu, C. (2019). A PEG-Lysozyme hydrogel harvests multiple functions as a fit-to-shape tissue sealant for internal-use of body. *Biomaterials*, 192, 392-404. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.10.047>

Teyssandier, F. (s. d.). *Formulation et morphologies de mélanges de polymères thermoplastiques à base d'amidon*.

Tsai, C.-C., Young, T.-H., Chen, G.-S., & Cheng, N.-C. (2021). Developing a Glyoxal-Crosslinked Chitosan/Gelatin Hydrogel for Sustained Release of Human Platelet Lysate to Promote Tissue Regeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6451. <https://doi.org/10.3390/ijms22126451>

Turkevich, J., Stevenson, P. C., & Hillier, J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discussions of the Faraday Society*, 11(0), 55-75.

<https://doi.org/10.1039/DF9511100055>

Van Overschelde, P., Chausson, M., Portelange, N., & Schiffiers, M. (2022). CM-Chitosan dans l'arthrose avancée du genou : Bénéfices prometteurs à long terme après une seule injection intra-articulaire. *Revue du Rhumatisme*, 89, A199-A200. <https://doi.org/10.1016/j.rhum.2022.10.301>

Virgilio, N., Desjardins, P., L'Espérance, G., & Favis, B. D. (2009). In Situ Measure of Interfacial Tensions in Ternary and Quaternary Immiscible Polymer Blends Demonstrating Partial Wetting. *Macromolecules*, 42(19), 7518-7529. <https://doi.org/10.1021/ma9005507>

Vukajlovic, D., Bretcanu, O., & Novakovic, K. (2021). Fabrication and characterization of two types of bone composites made of chitosan-genipin hydrogel and Bioglass 45S5. *Open Ceramics*, 8, 100174. <https://doi.org/10.1016/j.oceram.2021.100174>

Wang, C.-S., Virgilio, N., Wood-Adams, P. M., & Heuzey, M.-C. (2018). A gelation mechanism for gelatin/polysaccharide aqueous mixtures. *Food Hydrocolloids*, 79, 462-472. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.01.016>

Westphal, M., Hilt, D. C., Bortey, E., Delavault, P., Olivares, R., Warnke, P. C., Whittle, I. R., Jääskeläinen, J., & Ram, Z. (2003). A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-Oncology*, 5(2), 79-88. <https://doi.org/10.1093/neuonc/5.2.79>

Wu, S. (1982). *Polymer interface and adhesion*. Marcel Dekker.

Xiao, Y., Friis, E. A., Gehrke, S. H., & Detamore, M. S. (2013). Mechanical Testing of Hydrogels in Cartilage Tissue Engineering : Beyond the Compressive Modulus. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 19(5), 403-412. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2012.0461>

Xu, Y., Kim, C.-S., Saylor, D. M., & Koo, D. (2017). Polymer degradation and drug delivery in PLGA-based drug-polymer applications : A review of experiments and theories. *Journal of Biomedical Materials Research. Part B, Applied Biomaterials*, 105(6), 1692-1716. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33648>

Yang, Y., Ren, Y., Song, W., Yu, B., & Liu, H. (2022). Rational design in functional hydrogels towards biotherapeutics. *Materials & Design*, 223, 111086.

<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2022.111086>

Yin, H.-M., Li, X., Xu, J.-Z., Zhao, B., Li, J.-H., & Li, Z.-M. (2017). Highly aligned and interconnected porous poly(ϵ -caprolactone) scaffolds derived from co-continuous polymer blends. *Materials & Design*, 128, 112-118. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.05.004>

Yuan, Z., & Favis, B. D. (2005). Coarsening of immiscible co-continuous blends during quiescent annealing. *AIChE Journal*, 51(1), 271-280. <https://doi.org/10.1002/aic.10281>

Zafeiri, I., Beri, A., Linter, B., & Norton, I. (2021). Mechanical properties of starch-filled alginate gel particles. *Carbohydrate Polymers*, 255, 117373. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117373>

Zhang, Y., Chen, G., Zhu, Z., Yun, L., Cao, Y., & Shen. (2020). Correlation Between the Structure and Compressive Property of PMMA Microcellular Foams Fabricated by Supercritical CO₂ Foaming Method. *Polymers*, 12, 315. <https://doi.org/10.3390/polym12020315>

ANNEXE A INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES ARTICLE

Tableau A.1 Fraction de GNP par rapport au CHI pour des gels CHI 0.75% w/v

GNP fraction (% w/v)	0.0125	0.025	0.0375	0.05
CHI / GNP ratio	60	30	20	15

Tableau A.2 GNP fraction of CHI for CHI 0.5%w/v

GNP fraction (% w/v)	0.025	0.0375	0.05	0.075
CHI / GNP ratio	20	13.33	10	6.67

Tableau A.3 Extracted data from microCT analysis of the PS and PLA domains: volume fractions ϕ , average domain sizes d and specific interfacial area S

Annealing time (min)	5	10	20	30	45	60
ϕ_{PLA}	40.7	41.1	49.1	47.6	44.7	48.7
ϕ_{PS}	58.5	58.6	50.9	52.3	55.3	52.2
d_{PLA}	12.4 ± 2.2	22.0 ± 6	114.2 ± 30.3	187.3 ± 63.2	255.9 ± 76.9	372.9 ± 80.7
d_{PS}	14.7 ± 6.4	20.9 ± 4.3	105 ± 35.2	173.6 ± 48.5	258.7 ± 59.5	333.4 ± 80.8
Specific surface PLA (cm^{-1})	1531.0	752.1	211.6	91.9	69.6	48.4

Tableau A.4 Bulk and porous hydrogels (180 μm average pore size) compression modulus as a function of SA and CHI contents, at 0.025% w/v GNP content

	SA 0.5% CHI 1%	SA 1% CHI 0.25%	SA 1% CHI 0.5%	SA 1% CHI 0.75%	SA 1% CHI 1%
Bulk gels	11.5 ± 1.02	26.3 ± 9.9	20.5 ± 8.5	24.3 ± 9.4	Not tested
Porous gels	Can't stand	7.6 ± 3.3	8.4 ± 0.1	9.0 ± 1.5	9.6 ± 2.9

Tableau A.5 Compression modulus of porous gels (180 μm average pore size) as a function of GNP and CHI compositions

[GNP] (% w/v)	SA 1% CHI 0.5%	SA 1% CHI 0.75%	SA 1% CHI 1%
0.025	8.4 ± 0.1	9.0 ± 1.5	9.6 ± 2.9
0.0375	6.7 ± 2.1	9.5 ± 3.8	6.9 ± 1.5
0.05	9.8 ± 3.1	10.3 ± 2.6	Not tested
0.1	8.5 ± 0.9	Not tested	Note tested

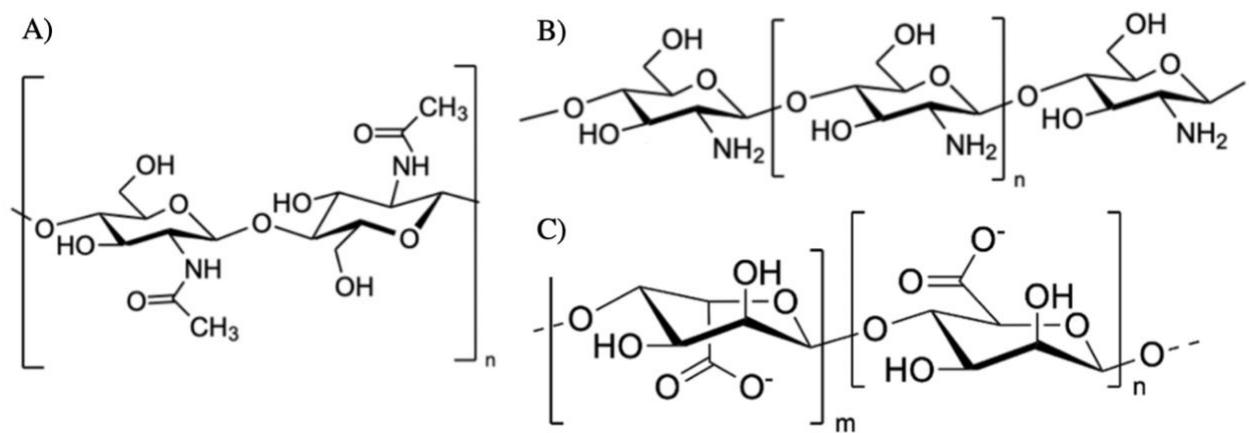


Figure A.1 Molecular structure of A) chitin B) chitosan and C) sodium alginate

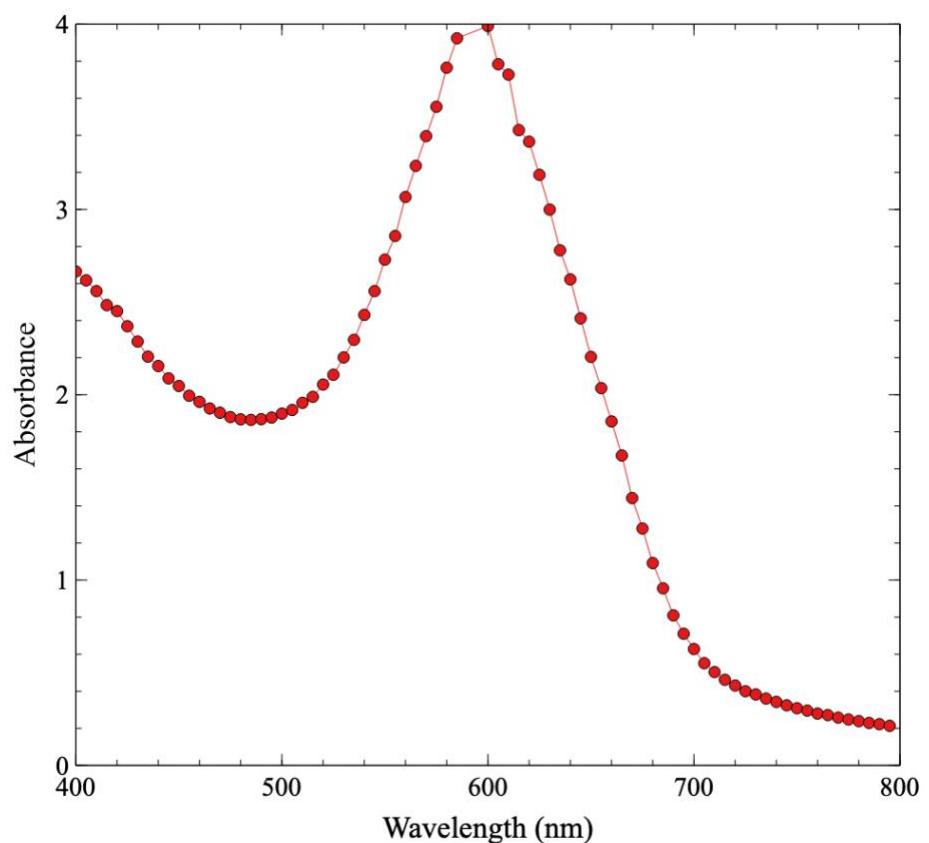


Figure A.2 Absorbance master curve of CHI 0.75% GNP 0.05% w/v after 24h of gelation at 37°C in a plate well

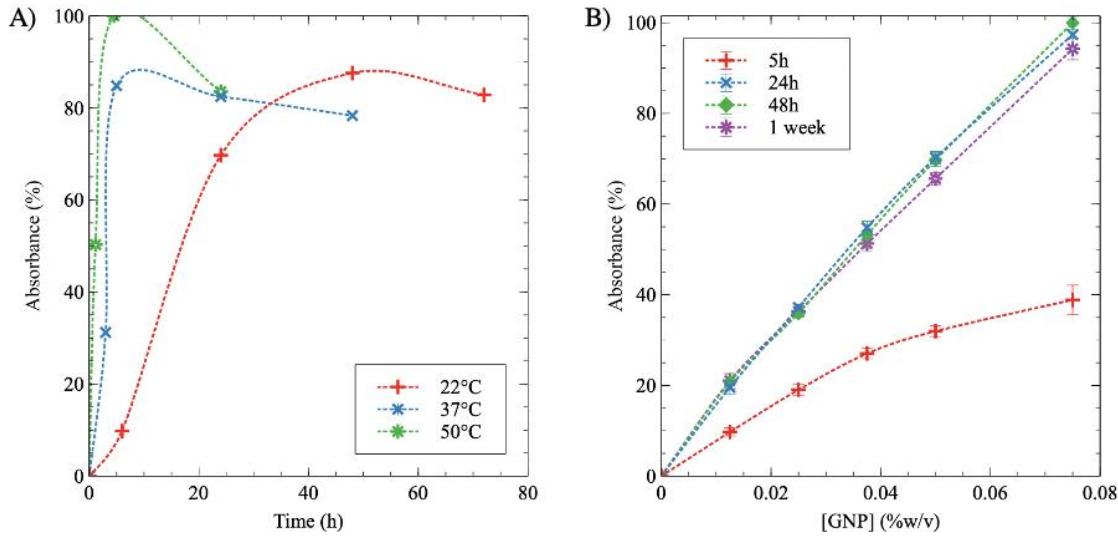


Figure A.3 Chitosan (CHI) crosslinking kinetics using genipin (GNP) as monitored by UV-Vis spectroscopy. A) Absorbance as a function of time t and temperature T , at $[CHI] = 0.5\% \text{ w/v}$ and $[GNP] = 0.025\% \text{ w/v}$; B) Absorbance as a function of time t and GNP composition, at $[CHI] = 0.5\% \text{ w/v}$ and 37°C and C) Storage (G') and loss (G'') moduli for pure CHI gels (0.5% w/v) crosslinked with GNP, at a composition ranging from 0.025% to 0.05% w/v, at 37°C .

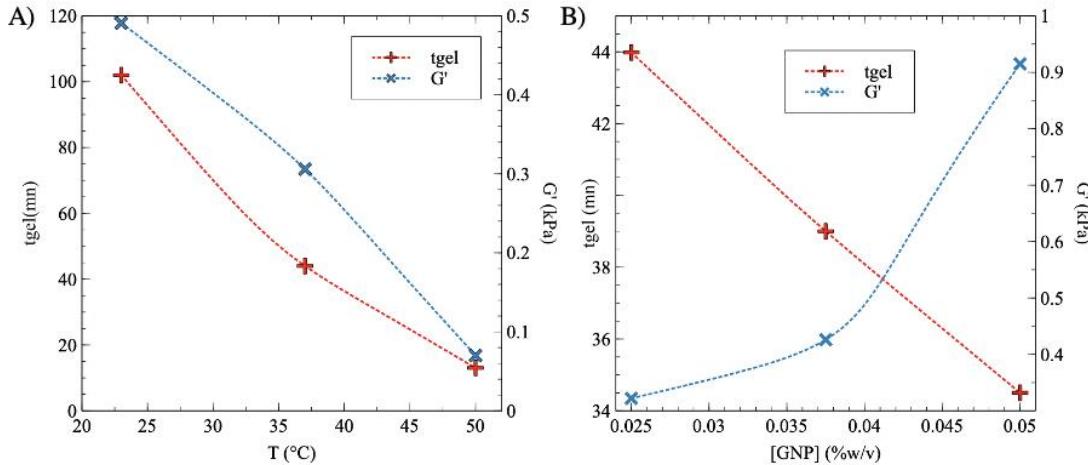


Figure A.4 A) Storage (G') and loss (G'') modulus for pure CHI gels (0.5% w/v) crosslinked with GNP, at a composition ranging from 0.025% to 0.05% w/v, at 37°C ; B) Gelation time (t_{gel}), and storage modulus (G') at equilibrium at reaction completion, as a function of temperature, for CHI/GNP (0.5%/0.025% w/v) gels.

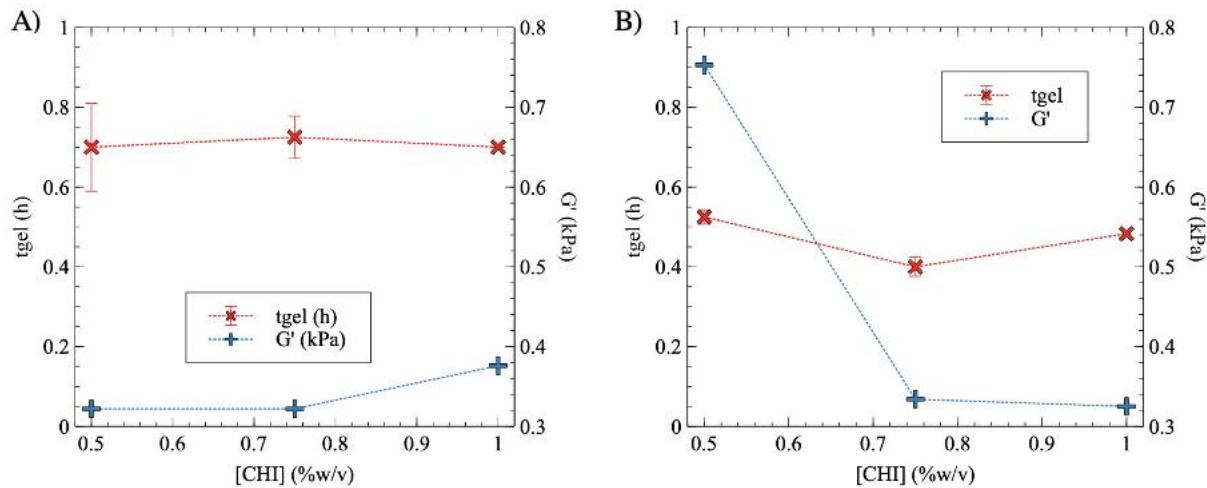


Figure A.5 Influence of CHI composition on t_{gel} and final G' values, at constant SA (1% w/v) content, and at GNP compositions of (A) 0.025% and (B) 0.05% w/v.

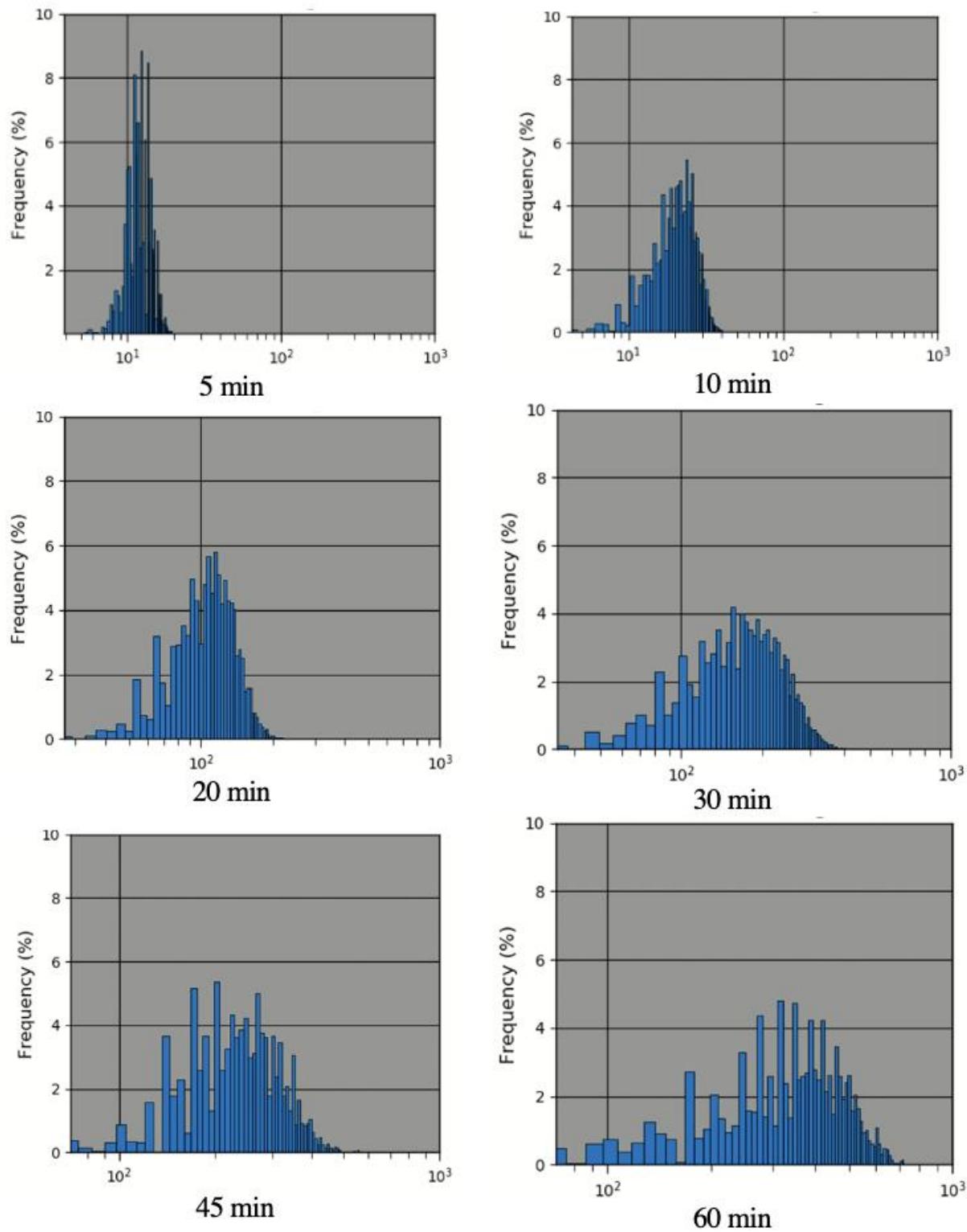


Figure A.6 Pore size distributions for different annealing times.

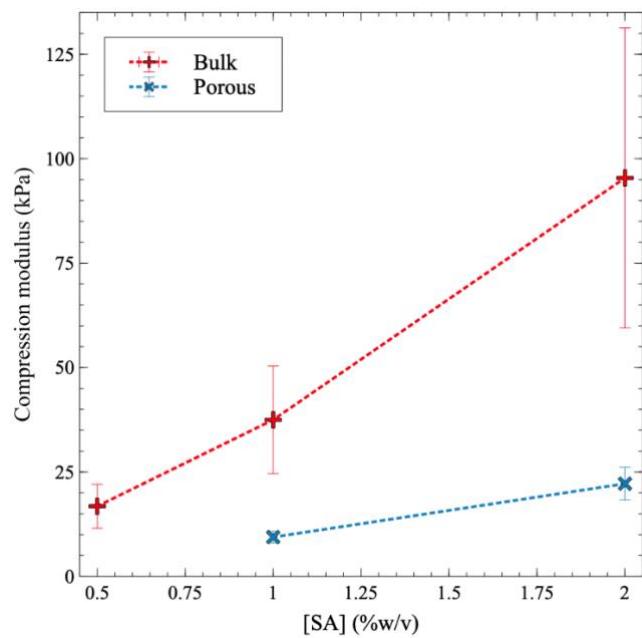


Figure A.7 Compression modulus of sodium alginate (SA) bulk and porous (pore size = 180 μm) gels as a function SA composition.

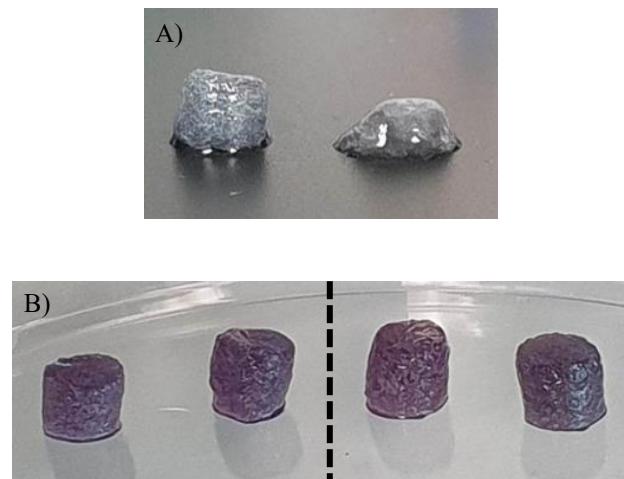


Figure A.8 SA 1% CHI 0.75% GNP 0.025% w/v (left) and SA1% CHI0.5% GNP0.025% w/v (right) after (A) 1 week in PBS and (B) 2 weeks in DMEM medium.

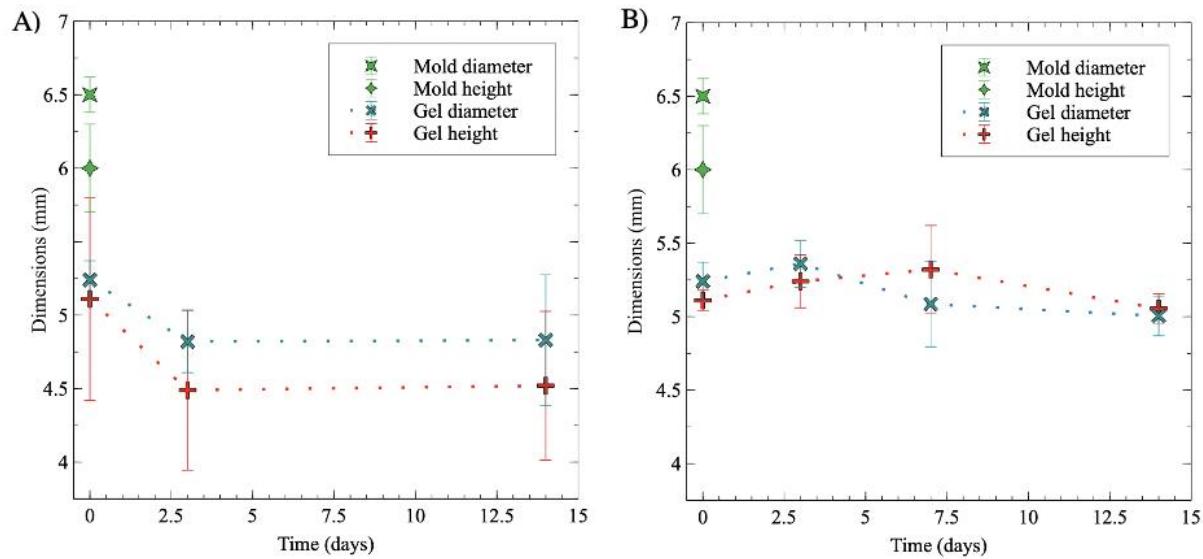


Figure A.9 Evolution of porous gels dimensions (1% w/v SA, 0.75% w/v CHI, 0.025% w/v GNP, average pore size = 180 μ m) in a) PBS and b) DMEM medium, as a function of time, and compared to the initial PLA molds dimensions.

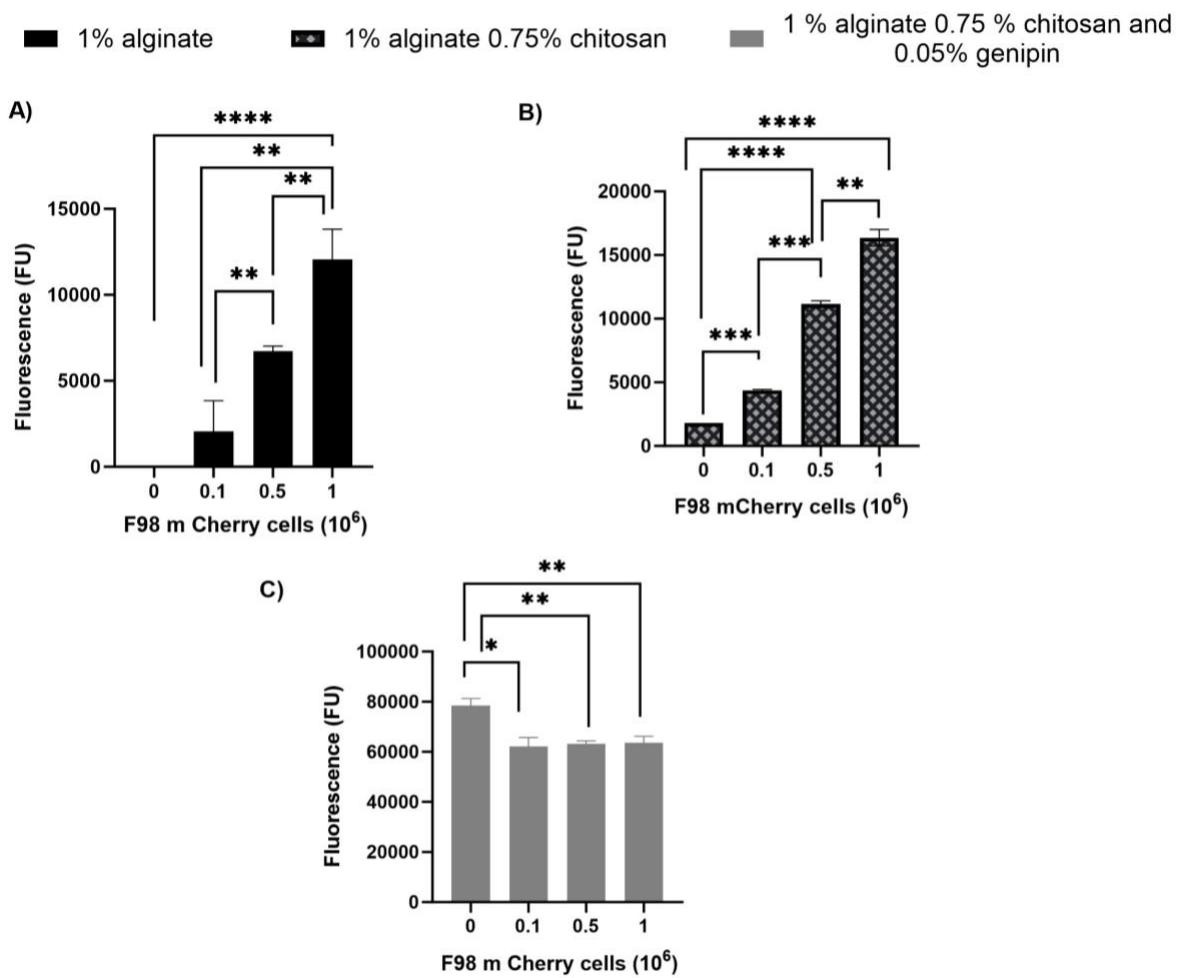


Figure A.10 F98 mCherry cells fluorescence intensity in 1% alginate hydrogels (A), 1% alginate 0.75% CHI hydrogels (B) vs 1% SA 0.75% CHI and 0.05% GNP w/v hydrogels (C).

ANNEXE B SYNTHÈSE DE NANOPARTICULES D'OR

Dans le cadre de mon projet de maîtrise, j'ai eu l'opportunité de réaliser un stage au laboratoire de Chimie de Coordination de Toulouse dans l'équipe de Myrtil Kahn afin d'étudier une nouvelle piste d'amélioration de l'efficacité des gels pour détruire les cellules cancéreuses. En effet, des études ont montré que les nanoparticules (NPs) d'or permettent d'augmenter localement l'intensité de la radiation appliquée car ces dernières absorbent efficacement les rayons X (Hainfeld et al., 2010). Aussi, les NPs d'or sont biocompatibles, bien que leur biocompatibilité dépende de l'application et peut varier en fonction de leur taille, forme et surface (Kus-Liśkiewicz et al., 2021). C'est pourquoi, en vue d'optimiser les propriétés de la Gliotrappe, une nouvelle piste d'étude a été de synthétiser des NPs d'or à la surface des gels pour évaluer leur impact sur la destruction des cellules cancéreuses.

L'objectif principal de ce stage était de synthétiser des nanoparticules sur les gels macroporeux de concentration SA 1% CHI 0.75% GNP 0.05% w/v. Pour cela, le premier sous-objectif était de synthétiser et de caractériser des solutions colloïdales de NPs d'or. Puis dans un second temps, plusieurs méthodes ont été testées afin d'obtenir des NPs sur les gels : l'une se base sur l'absorption des NPs des synthèses colloïdales et l'autre, sur la synthèse directe de l'or sur les gels grâce à la réduction par le chitosane.

B.1 Synthèse et caractérisation de solutions colloïdales de NPs d'or

La synthèse d'une solution colloïdale de NPs d'or nécessite la présence d'un précurseur d'or, d'un réducteur et d'un agent stabilisant. Lorsque le précurseur d'or est soluble dans l'eau, on parle de synthèse hydrosoluble. Dans le cas où il est soluble dans un solvant organique, on parle de synthèse organométallique.

Dans un premier temps, des tests préliminaires de synthèse hydrosoluble ont été effectués avec l'acide chloraurique comme précurseur et plusieurs réducteurs tels que le citrate de sodium (Turkevich et al., 1951), le NaBH_4 (Deraedt et al., 2014) et l'acide ascorbique (Annur et al., 2018). L'impact des conditions de synthèse, à savoir les concentrations des différents agents et l'environnement (synthèse réalisée à l'air ou sous atmosphère d'argon), ont également été étudiés. Pour cela, les synthèses ont été caractérisées par spectroscopie UV-visible et par microscopie

électronique à transmission (TEM). En effet, les NPs ont la particularité d'absorber dans le bleu-vert et de transmettre dans le rouge, d'où la couleur des solutions colloïdales de NPs d'or qui permet la caractérisation des synthèses par UV-visible (Piard et al., 2013). L'analyse TEM permet avoir une idée sur la taille, la forme et l'homogénéité des NPs synthétisées.

Suite à ces tests initiaux, les clichés de TEM ont montré que la synthèse la plus homogène en termes de taille et de forme de NPs est la synthèse suivant la méthode de Turkevich et al. (1951), soit avec HAuCl_4 comme précurseur, le citrate comme réducteur (**Figure B.1**). Aussi, la synthèse réalisée sous atmosphère d'argon était plus homogène que celle réalisée à l'air libre. L'intérêt des synthèses avec le citrate est que ce dernier joue à la fois le rôle de réducteur et d'agent stabilisant, dont le rôle est de diminuer la croissance des NPs après leur germination (Piard et al., 2013).

Pour former les NPs d'or, les solutions de HAuCl_4 et de citrate ont été au préalable dégazées séparément sous argon. La solution de précurseur d'or est par la suite chauffée dans un ballon sous agitation vigoureuse jusqu'à ébullition, moment auquel la solution de citrate est introduite rapidement. La solution est ensuite maintenue à la température de 100°C pendant 30 minutes (Dong et al., 2020) (montage **Figure B.2 A**). Plusieurs concentrations en HAuCl_4 ont été testées tout en maintenant le ratio molaire citrate/ HAuCl_4 constant et égal à 3.2. L'impact de l'augmentation de la concentration en précurseur d'or est directement visible en observant la couleur des solutions obtenues : de plus en plus rouges foncées (**Figure B.2 B**). En effet, les propriétés optiques des solutions colloïdales dépendent de la taille, de la forme, de l'agrégation et la concentration en NPs d'or (Piard et al., 2013).

Ces synthèses ont été caractérisés par spectroscopie UV-Vis (**Figure B.2 C**) et montrent une bande d'absorbance pour des pics de 520 nm. Cette bande de résonnance plasmon est caractéristique des nanoparticules d'or d'une taille de 20 nm (Piard et al., 2013).

Les NPs obtenues pour la concentration en HAuCl_4 la plus élevée, soit 0.6 mM, manquent d'homogénéité en termes de taille car il aurait été préférable d'augmenter la concentration en citrate, qui joue le rôle du stabilisant en gardant les NPs de petites tailles.

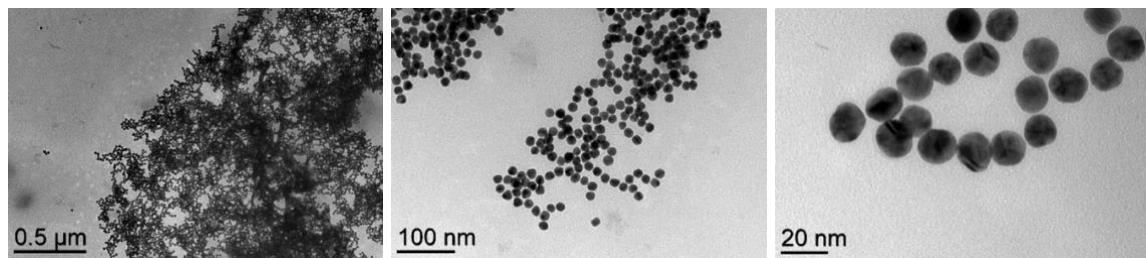


Figure B.1 Morphologies TEM de nanoparticules d'or $[\text{HAuCl}_4] = 0.3\text{mM} + \text{citrate}$ sous argon selon la méthode de Turkevich. La grille TEM a été réalisée suite à la synthèse et a été laissée à sécher sous vide pendant une nuit.

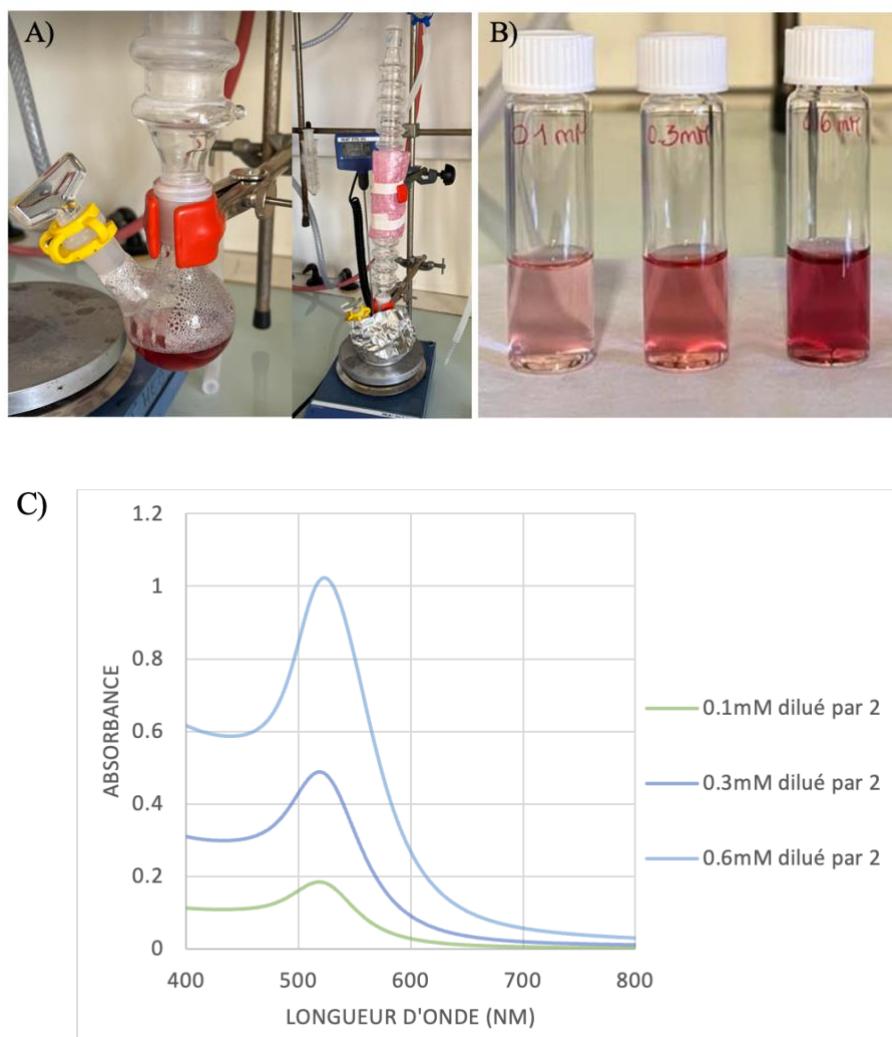


Figure B.2 A) Montage de la synthèse de NPs, B) colorimétrie et C) caractérisations UV-Vis des solutions obtenues pour $[\text{HAuCl}_4] = 0.1 ; 0.3$ et 0.6 mM .

B.2 Synthèse de NPs d'or dans les gels SA/CHI/GNP poreux

Dans un second temps, l'étude s'est axée sur la synthèse de NPs d'or à la surface des gels, ainsi que sur la technique de caractérisation de cette présence d'or. Deux méthodes différentes et plus ou moins simples à mettre en œuvre se sont avérées efficaces : l'une utilise les solutions colloïdales synthétisées dans la partie B.1, et l'autre utilise le chitosane contenu dans les gels comme agent réducteur.

Pour caractériser la présence d'or dans les gels, des techniques telles que la RMN, l'AFM et la FTIR ont été testées mais n'ont pas donné de résultats concluants. La méthode de caractérisation optimale a été finalement déterminée comme étant la microscopie électronique à balayage (MEB). Cette méthode a permis de déterminer la présence d'or dans le gel, sa localisation (surface / volume, extérieur / intérieur du gel), ainsi que la taille des particules. Ces tests ont été réalisés sur des gels SA 1% CHI 0.075% GNP 0.05% w/v, présentant une taille moyenne de pores de 180 microns, et ayant des dimensions de 5 mm de diamètre sur 5 mm de hauteur.

B.2.1 Voie de synthèse n°1 : par trempe dans une solution de précurseur d'or

Une première voie de synthèse, très simple à mettre en œuvre, a été de plonger les gels dans des solutions plus ou moins concentrées en précurseur d'or, le chitosane pouvant agir comme agent réducteur (Bhumkar et al., 2007). Ce dernier, présent dans les gels, a permis de directement réduire l'or et de former des NPs à la surface du gel. La réduction de l'or est visible à l'œil nu car les gels résultants deviennent de plus en plus rouges au cours de la réaction de réduction (**Figure B.3 A**). Cette méthode est facile à mettre en œuvre et présente l'avantage d'obtenir des NPs à l'interface gel/pores au sein du gel. En effet, en injectant la solution de précurseur d'or dans les pores en appliquant plusieurs cycles de vide et d'argon, on permet la pénétration de la solution par capillarité au sein des pores. Les clichés obtenus au MEB combinés à une analyse DRX ont montré l'obtention de NPs de forme plutôt sphérique d'une taille d'environ 30-50 nm à la surface et au sein de l'hydrogel (**Figure B.3 B et C**). C'est donc une nouvelle voie de synthèse interfaciale.

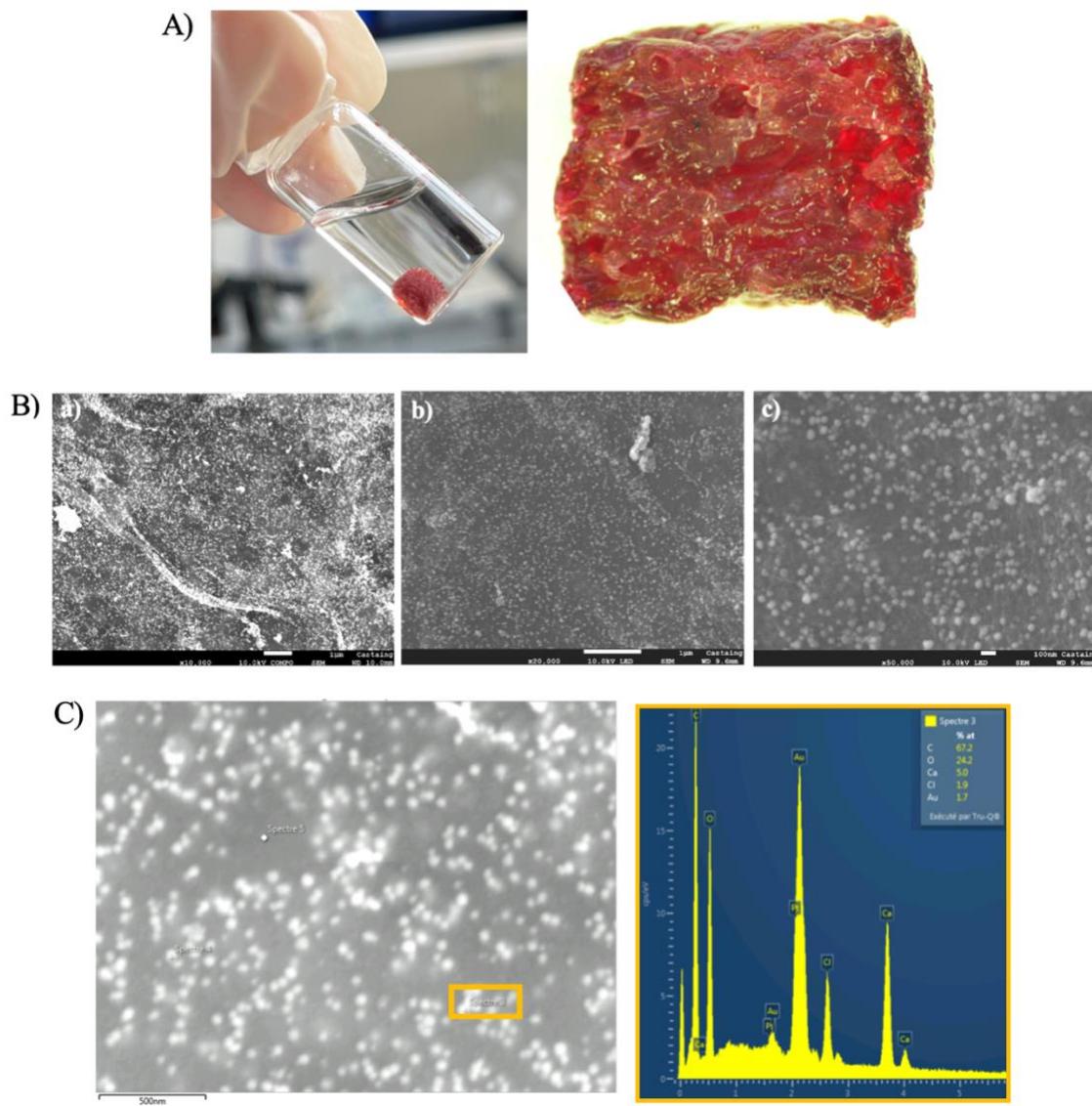


Figure B.3 A) Photos des gels obtenus après trempe pendant une semaine dans 3 mL d'une solution de $[\text{HAuCl}_4] = 1.5\text{mM}$; B) clichés MEB pour des grossissements a) x10 000 ; b) x20 000 ; c) x50 000 et C) analyse DRX correspondante. Les gels ont été séchés sous vide secondaire pendant une nuit et ont été ensuite métallisés avec du platine.

Cette méthode fonctionne aussi pour des synthèses organométalliques utilisant l' AuClPPh_3 , dilué dans le toluène, comme précurseur. L'augmentation de la température accélère le processus de réduction mais une température trop élevée provoque une synérèse (**Figure B.4 A**). La taille des

particules d'or obtenues est beaucoup plus hétérogène, certaines de l'ordre de 100 nm et une autre population de l'ordre du micron (**Figure B.4 B et C**).

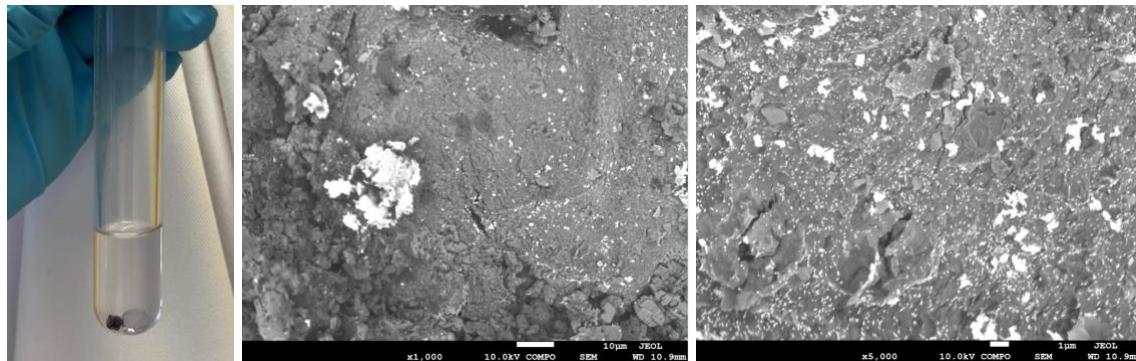


Figure B.4 A) Gel plongé dans une solution de $[\text{AuClPPh}_3] = 4 \text{ mM}$ (diluée dans du toluène) et maintenu à 40°C pendant 72h et clichés MEB correspondants grossi B) x1000 et C) x5000

B.2.2 Voie de synthèse n°2 : par absorption des NPs d'une solution colloïdale

Une alternative pour synthétiser de l'or dans les gels consiste à utiliser les solutions colloïdales préalablement synthétisées dans la section A.1. Pour ce faire, un gel a été immergé dans 3 mL de la solution afin de permettre l'absorption des NPs d'or présentes. La **Figure B.5** confirme que le gel a efficacement adsorbé les NPs, qui sont principalement présentes en surface. On note cependant beaucoup d'agrégats de NPs d'or et moins de NPs isolées. Cette observation s'explique par la libération du CaCl_2 résiduel du gel, utilisé pour sa réticulation physique. Ce dernier diffuse dans la solution et entraîne l'agrégation des NPs car il écrante les charges à la surface des NPs (Piard et al., 2013). La solution, initialement de couleur rouge rubis, prend d'abord une teinte bleue en raison des agrégats de NPs de tailles et de formes variées, puis devient transparente au bout de quelques heures, car les agrégats donnent lieu à une suspension d'or en solution qui absorbe et diffuse la lumière.

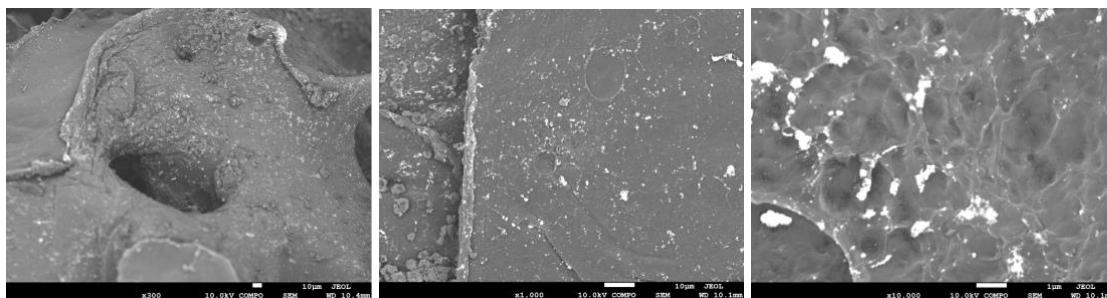


Figure B.5 Morphologies observées au MEB sur des gels plongés dans 3mL d'une solution colloïdale de NPs à partir de $[\text{HAuCl}_4] = 0.6 \text{ mM}$ (dilué par 2) pendant 24h.

B.2.3 Conclusion en lien avec l'application Gliotrappe

Les deux méthodes étudiées en B.2.1 et B.2.2 permettent d'obtenir des NPs d'or à la surface des gels. Dans le cas de la seconde méthode, pour s'affranchir de la diffusion des ions chlorures provoquant l'agrégation des particules, les gels doivent être bien lavés à l'eau avant absorption. Si le lavage est correctement effectué, cette méthode permet un meilleur contrôle sur la taille des NPs d'or absorbées à la surface des gels. En effet, les synthèses peuvent être caractérisées au préalable au MET en termes d'homogénéité, taille et forme de NPs. Bien que plus simple à mettre en œuvre, la première méthode de réticulation directe de l'or par le chitosane sur le gel ne permet pas d'avoir un bon contrôle sur la taille des particules synthétiser, leur taille ne pouvant être caractérisée qu'après réduction. La méthode optimale de synthèse dépend par conséquent de l'application visée et par conséquent de la taille, forme et nombre des NPs attendus.