

Titre: Conception d'hydrogels à base de chitosane et de dextrane pour la
prévention des adhérences postopératoires

Auteur: Vaiana Moreau

Date: 2025

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Moreau, V. (2025). Conception d'hydrogels à base de chitosane et de dextrane
pour la prévention des adhérences postopératoires [Mémoire de maîtrise,
Polytechnique Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/68443/>

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

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/68443/>
PolyPublie URL:

**Directeurs de
recherche:** Gregory De Crescenzo, & Nick Virgilio
Advisors:

Programme: Génie chimique
Program:

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

**Conception d'hydrogels à base de chitosane et de dextrane pour la prévention
des adhérences postopératoires**

VAIANA MOREAU

Département de génie chimique

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

Génie chimique

Août 2025

POLYTECHNIQUE MONTRÉAL

affiliée à l'Université de Montréal

Ce mémoire intitulé :

Conception d'hydrogels à base de chitosane et de dextrane pour la prévention des adhérences postopératoires

présenté par **Vaiana MOREAU**

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

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

Abdellah AJJI, président

Gregory DE CRESCENZO, membre et directeur de recherche

Nick VIRGILIO, membre et codirecteur de recherche

Marie-Claude HEUZEY, membre

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à mes directeurs de recherche, les professeurs Gregory De Crescenzo et Nick Virgilio, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce projet au sein de leur équipe. Je les remercie sincèrement, non seulement pour les précieuses connaissances qu'ils m'ont transmises tout au long de mon parcours, mais aussi pour leur soutien constant, leurs encouragements et la confiance qu'ils m'ont accordée. Leur expertise, leur patience et leur encadrement bienveillant ont été essentiels à la réalisation de ce travail.

Un merci tout particulier à Nick, qui m'a fait découvrir le monde de la recherche ; sans cette rencontre déterminante, je n'aurais probablement jamais entrepris une maîtrise. Et un grand merci à Greg de m'avoir accueillie dans son laboratoire : sans cette opportunité, ce mémoire n'aurait tout simplement pas vu le jour.

Je tiens également à remercier Benoît Liberelle pour son aide constante et ses conseils en laboratoire, ainsi que pour ses réponses à mes questions et ses retours constructifs constants.

À Lydia Simard et Yuan Chang, je vous remercie chaleureusement pour vos conseils et votre aide en laboratoire.

À Matthieu Gauthier, toujours disponible, il joue un rôle essentiel au bon déroulement des expériences grâce à son regard technique et son expertise appliquée à différents projets.

Je souhaite accorder une mention toute particulière à mes collègues de laboratoire – Lucile, Faranak, Benjamin, Ilona, Julie, Emma, Hélène – ainsi qu'à l'équipe de Nick Virgilio : Arthur, Alex, Guillaume, Lisa, Olivier, Parniyan. Je tiens également à remercier les étudiants déjà diplômés, en maîtrise ou doctorat, avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer, notamment Romane Oliviero, Lauriane Parès et Jimmy Gaudreault. Leur soutien constant, leurs discussions enrichissantes et leur aide précieuse lors des manipulations ont grandement contribué à la qualité de ce travail. Je remercie également ma stagiaire, Chérine Marie Diab, pour son aide précieuse dans les manipulations en laboratoire.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance au professeur Marc Lavertu et à Anik Chevrier pour m'avoir accordé l'accès à leur microscope, un soutien précieux pour la réalisation de ce projet.

Je souhaite exprimer toute ma gratitude à ma famille – ma mère, mon père et mon frère – même à distance, pour leur soutien indéfectible tout au long de mes études. Leur présence, bien que

lointaine, s'est toujours fait sentir par leurs encouragements, leur bienveillance et leur confiance en moi, qui m'ont profondément portée dans ce parcours.

Ensuite, je remercie profondément mon conjoint, dont la présence constante et le soutien précieux ont été essentiels tout au long de mon parcours. Sa patience, ses connaissances informatiques (notamment pour le débogage de mes scripts Python), sa compréhension et ses encouragements m'ont permis de surmonter les moments difficiles et de garder la motivation nécessaire pour mener ce projet à son accomplissement.

Enfin, et non des moindres, je souhaite remercier les membres de mon jury, les professeurs Marie-Claude Heuzey et Abdellah Ajjji, pour avoir accepté d'évaluer mon mémoire de maîtrise.

RÉSUMÉ

Les adhérences postopératoires (POA), notamment abdominales et pelviennes, constituent une complication fréquente des interventions chirurgicales. Les POA peuvent entraîner des douleurs chroniques, des occlusions intestinales, une infertilité ou encore un dysfonctionnement d'organe. Ces adhérences résultent d'une réponse inflammatoire excessive et d'un processus de cicatrisation désorganisé, menant à la formation de bandes fibreuses anormales entre les organes et les tissus. Parmi les stratégies de prévention des POA explorées, les hydrogels constituent des biomatériaux prometteurs. En effet, grâce à leur structure tridimensionnelle (3D) riche en eau, les hydrogels forment une barrière physique, empêchant le contact direct entre différents organes proches du site de l'opération chirurgicale, et la formation de ponts fibreux à l'origine de ces adhérences. Les hydrogels hybrides à base de chitosane et de dextrane ont un fort potentiel pour cette application. Le chitosane (CHI) a été choisi pour son origine naturelle, sa biocompatibilité, sa biodégradabilité, ses propriétés hémostatiques et antimicrobiennes ; le dextrane, pour sa part, a été choisi pour ses propriétés antiadhésives (« low fouling »), son caractère non-immunogénique, sa biocompatibilité et biodégradabilité. Par le passé, ces deux polymères étaient réticulés en oxydant le dextrane afin de créer des groupements aldéhydes capables de réagir avec les groupements amines du chitosane. Cependant, la préparation du dextrane-aldéhyde par oxydation suscite des enjeux au niveau de la biocompatibilité, car le processus d'oxydation, souvent réalisé à l'aide de périodate de sodium, peut générer des sous-produits potentiellement cytotoxiques.

Ce projet de recherche a comme objectif de changer la technique de réticulation ; la contribution originale de ce projet de maîtrise a été de concevoir des hydrogels hybrides à base de chitosane et de dextrane sans dégradation des biopolymères, sans génération de sous-produits, et par réticulation chimique. Plus précisément, nous avons modifié le dextrane par carboxyméthylation. L'idée est de faire réagir les fonctions acides carboxylique du dextrane carboxyméthylé (DCM) avec les fonctions amine natives du chitosane pour établir des liens covalents. L'agent de couplage sélectionné est le NHS/EDC, bien connu pour le greffage de protéines, en formant des liaisons amide stables entre les groupements carboxyles activés et les groupements amines libres à pH neutre. Le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) active les acides carboxyliques du dextrane carboxyméthylé (DCM), tandis que le N-hydroxysuccinimide (NHS) stabilise l'intermédiaire réactif en formant un ester de NHS, plus durable et plus réactif avec les amines. Cette méthode de couplage s'effectue en milieu aqueux, à température ambiante, et sans générer

de sous-produits toxiques, ce qui en fait une stratégie idéale pour la conception de biomatériaux destinés à un usage médical. Cependant, le chitosane ($pK_a \approx 6.5$) n'est soluble que dans des conditions acides, en lien avec la protonation de ses groupements amines ($-NH_3^+$). Au pH optimum pour la réaction NHS/EDC ($pH \approx 7-8$), le chitosane seul a tendance à précipiter. Dans notre groupe de recherche, il a été démontré récemment que l'ajout de bicarbonate de sodium permet d'augmenter le pH de la solution au-delà du pK_a du chitosane sans le faire précipiter. C'est cette astuce qui sera exploitée afin de coupler, pour la première fois, CHI et DCM via la chimie NHS/EDC, conduisant à la formation d'un hydrogel stable, biocompatible et potentiellement efficace pour la prévention des adhérences postopératoires.

La seconde partie du projet portait sur la caractérisation des hydrogels. Leurs propriétés mécaniques ont été évaluées par des essais de compression non confinée, pour divers ratios volumiques CHI:DCM (30:70 à 80:20 %v/v), à partir de solutions-mères à 20 mg/mL. Tous les échantillons présentaient un module de l'ordre du kPa, similaire à celui des tissus mous. La gélification, mesurée par rhéométrie, dépend fortement de la température : elle est quasi-instantanée à 37 °C, mais demande environ 30 min à 4 °C. Cette variation permet de contrôler la forme des hydrogels (par moulage par exemple), ouvrant la voie à des applications biomédicales, notamment injectables.

Enfin, la dernière étape du projet a visé à évaluer la non-adhérence des cellules sur nos hydrogels. Des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVECs), modèles courants *in vitro* pour étudier les interactions cellules-matériaux, ont été choisies en raison de leur rôle clé dans l'inflammation, la réparation tissulaire et la formation de vaisseaux, processus liés aux adhérences postopératoires. Les HUVECs n'ont montré aucune adhésion sur les hydrogels CHI-DCM, ce qui suggère un faible risque de colonisation cellulaire et de formation de tissus fibreux entre organes. Contrairement aux surfaces 2D favorisant l'adhésion, les hydrogels empêchaient l'attachement cellulaire, même en présence de peptides d'adhésion greffés sur les hydrogels. Ces résultats renforcent leur potentiel pour prévenir les adhérences postopératoires.

Ainsi, nous proposons une méthode simple et originale, polyvalente et innovante pour la conception d'hydrogels destinés à la prévention des adhérences postopératoires. Cette approche évite la formation de sous-produits indésirables, offre de nouvelles opportunités dans les procédés de production d'hydrogels pour des applications biomédicales.

ABSTRACT

Postoperative adhesions (POA) are a common complication following surgical procedures, particularly abdominal and pelvic surgeries. POA can lead to chronic pain, bowel obstruction, infertility, and organ dysfunction. These adhesions result from an excessive inflammatory response and a disorganized healing process, leading to the formation of abnormal fibrous bands between organs and tissues. Among the various strategies explored to prevent POA, hydrogels have emerged as promising biomaterials. Due to their water-rich three-dimensional (3D) structure, hydrogels act as physical barriers between surgical surfaces, preventing direct contact between nearby organs at the surgical site and thus reducing the formation of fibrous bridges responsible for adhesions. Hybrid hydrogels composed of chitosan and dextran have shown significant potential in this application. Chitosan (CHI) is selected for its natural origin, biocompatibility, biodegradability, as well as its hemostatic and antimicrobial properties, while dextran is favored for its anti-adhesive and low fouling properties, non-immunogenic nature, biocompatibility, and biodegradability. Until now, these two polymers have typically been crosslinked by chemically modifying dextran through oxidation to introduce aldehyde groups that can react with the amine groups of chitosan, forming a stable 3D structure. However, the preparation of aldehyde-modified dextran via oxidation raises concerns regarding biocompatibility, as the oxidation process, often performed using sodium periodate, can lead to partial degradation of the polymer and generate potentially cytotoxic by-products.

This research project aims to change the crosslinking technique; its original contribution lies in the design of hybrid hydrogels based on chitosan and dextran without degradation of the biopolymers, without generating by-products, and using chemical crosslinking. Specifically, we modified dextran by carboxymethylation. The idea is to react the carboxylic acid groups of carboxymethylated dextran (CMD) with the native amine groups of chitosan to form covalent bonds. The selected coupling agent is NHS/EDC, widely used for protein grafting, as it forms stable amide bonds between activated carboxyl groups and free amine groups at neutral pH. 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) activates the carboxylic acids of CMD, while N-hydroxysuccinimide (NHS) stabilizes the reactive intermediate by forming an NHS ester, which is more durable and more reactive with amines. This coupling method is carried out in aqueous media, at room temperature, and without generating toxic by-products, making it an ideal strategy for

designing biomaterials intended for medical use. However, chitosan ($pK_a \approx 6.5$) is only soluble under acidic conditions due to the protonation of its amine groups ($-NH_3^+$), and at the optimal pH for the NHS/EDC reaction ($pH \approx 7-8$), chitosan alone tends to precipitate. In our research group, it was recently demonstrated that the addition of sodium bicarbonate increases the pH of the solution beyond the pK_a of chitosan without causing precipitation. This approach will be used to couple, for the first time, chitosan and CMD via NHS/EDC chemistry, leading to the formation of a stable, biocompatible hydrogel that is potentially effective for the prevention of postoperative adhesions.

The second part of the project focused on the characterization of the hydrogels. Their mechanical properties were evaluated through unconfined compression tests for various CHI:CMD volume ratios (ranging from 30:70 to 80:20 %v/v), using stock solutions at 20 mg/mL. All samples exhibited a modulus in the kPa range, similar to that of soft tissues. Gelation, assessed by rheometry, was found to be highly temperature-dependent: it occurred almost instantaneously at 37 °C but took approximately 30 minutes at 4 °C. This temperature-sensitive behavior enables control over the shape of the hydrogels (through molding for example), paving the way for biomedical applications, particularly in injectable systems.

Finally, the last phase of the project aimed to evaluate the cell non-adhesiveness of the hydrogels. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), commonly used *in vitro* to study cell-material interactions due to their key role in inflammation, tissue repair, and vascular formation, processes associated with postoperative adhesions, were selected for this purpose. HUVECs showed no adhesion to the CHI-CMD hydrogels, suggesting a low risk of cell colonization and fibrous tissue formation between organs. Unlike 2D surfaces that promote cell attachment, the 3D hydrogels prevented cell adhesion even in the presence of adhesion peptides. These results further support their potential in preventing postoperative adhesions.

Thus, we present a simple and original method, both versatile and innovative, for the design of hydrogels intended for the prevention of postoperative adhesions. This approach avoids the formation of by-products, while opening new opportunities in hydrogel production processes and their application across various other biomedical fields.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ.....	v
ABSTRACT	vii
TABLE DES MATIÈRES	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xii
LISTE DES FIGURES.....	xiii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	xvi
CHAPITRE 1 INTRODUCTION.....	1
1.1 L'adhésion cellulaire, un problème post-opératoire important en chirurgie	1
1.2 Les techniques proposées pour prévenir les POA.....	2
1.3 Le choix des hydrogels : composition et réticulation.....	5
CHAPITRE 2 ÉTAT DE L'ART.....	8
2.1 Les hydrogels en tant que biomatériaux.....	8
2.1.1 Les biomatériaux : définition et classification	8
2.1.2 Les hydrogels : définition et classification.....	11
2.1.3 Les caractéristiques optimales pour une application médicale	14
2.2 Les polymères utilisés	15
2.2.1 La chitine et le chitosane	15
2.2.2 Le dextrane	19
2.3 Système hybride à base de chitosane et de dextrane	22
2.3.1 Techniques développées pour réticuler ces deux polymères	22
2.3.2 La réticulation avec NHS/EDC, une nouvelle approche.....	23
2.4 Contrôle de l'interface entre l'hydrogel et le matériel biologique	25

2.4.1	Interactions entre la MEC et le matériel biologique	25
2.4.2	Biofonctionnalisation de la surface des hydrogels	26
2.5	Application de ces systèmes hybrides non modifiés ou décorés	27
2.5.1	Prévention des adhérences péritonéales et abdominales	27
2.5.2	Le choix des cellules endothéliales vasculaires (HUVEC)	31
2.5.3	Force et limite de ces systèmes	31
CHAPITRE 3 HYPOTHÈSE DE RECHERCHE – OBJECTIFS SPÉCIFIQUES		33
CHAPITRE 4 ARTICLE 1 CHITOSAN AND CARBOXYMETHYLATED DEXTRAN HYDROGELS CROSSLINKED WITH NHS/EDC FOR PREVENTING POSTOPERATIVE ADHESIONS.....		34
4.1	Introduction	35
4.2	Experimental Section	40
4.2.1	Materials.....	40
4.2.2	Preparation of Carboxymethyl Dextran and Chitosan	41
4.2.3	Production of CHI and CMD Hydrogels.....	41
4.2.4	Swelling Behavior in Water, PBS and Cell Culture Medium	43
4.2.5	Rheological Characterization	43
4.2.6	Mechanical Characterization: Compression Modulus	44
4.2.7	Preparation of Glass Coverslips	45
4.2.8	Attachment of CHI and CMD Polymers on Glass Surfaces (2D).....	46
4.2.9	Attachment of Thin Hydrogel Films on Glass Surfaces (3D).....	46
4.2.10	RGD Functionalization of CMD-covered surfaces (2D) and Grafted Thin Hydrogels (3D).....	47
4.2.11	Cell Culture	48
4.3	Results	49

4.3.1	Production of CHI/CMD Hydrogels	49
4.3.2	Gelling Kinetics.....	53
4.3.3	Mechanical Characterization.....	55
4.3.4	Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) Behavior on 2D and 3D Surfaces.....	57
4.4	Discussion	61
4.5	Conclusion.....	65
4.6	SI Supporting Information	68
CHAPITRE 5	DISCUSSION GÉNÉRALE	72
CHAPITRE 6	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS	75
RÉFÉRENCES.....		77

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 Catégories de biomatériaux, leurs propriétés et leurs applications biomédicales. Adapté de (Festas et al., 2020; Mahdi et al., 2024).....	10
Tableau 2.2 Origine des polysaccharides et leurs caractéristiques principales.....	12
Tableau 2.3 Propriétés des principaux polymères synthétiques.....	13
Table 4.1 Impact of the CHI:CMD ratio and reaction conditions on hydrogel preparation.....	42

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 Schéma montrant des organes sains sans adhérences à gauche et avec des adhérences postopératoires à droite. Cette figure a été réalisée en utilisant des images provenant de Servier Medical Art. Servier Medical Art par Servier est sous licence Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).....	2
Figure 1.2 Stratégies de prévention des adhérences postopératoires à l'aide de biomatériaux, basées sur les mécanismes de formation et de développement des adhérences. Tiré de Liao et al (2023). Copyright 2023 © Liao et al. CC BY-NC-ND.	4
Figure 1.3 Isolation physique. Un modèle de paroi latérale du cæcum a été établi afin d'évaluer les effets comparés avec et sans traitement par hydrogel. Parmi les groupes étudiés, celui traité avec l'hydrogel a efficacement inhibé la fibrose en réduisant les niveaux d'IL-6, d'IL-1 β et de TGF- β 1, en activant la voie de signalisation TGF- β 1/Smad7 et en limitant celle de TGF- β 1/Smad3, tandis que le groupe non traité a présenté des adhérences. Adapté de Chen et al. (2025). © 2025 Chen et al. CC BY.	5
Figure 2.1 La réaction de désacétylation de la chitine. Le processus de désacétylation et les groupes aminés réactifs formés lors de celui-ci sont marqués en rouge. Adapté de Piekarska et al. (2023) CC BY 4.0	16
Figure 2.2 Structures chimiques de la β -d-glucosamine (2-amino-2-désoxy-d-glucose) et de la N-acétyl-d-glucosamine (2-acétamido-2-désoxy-d-glucose). Tiré de Kotena et al. (2020) Copyright © 2020 Elsevier Ltd.	17
Figure 2.3 Protonation/déprotonation du chitosane. Tiré de Yaneva et al. (2020) CC BY 4.0 ...	18
Figure 2.4 Structure chimique du dextrane, principalement composé d'unités de glucose.	19
Figure 2.5 Cavité péritonéale, par Winslow, 2024. © 2024 par National Cancer Institute. Adapté avec permission.	28
Figure 2.6 Adhérences après appendicectomie, par Hic et nunc, 2009, Wikimedia Commons. Image libre de droit.	28

- Figure 2.7** Schéma d'un modèle d'adhérence entre la paroi abdominale et le cæcum chez le rat, avec un traitement par hydrogel servant de barrière physique et libérant des médicaments à la demande de manière synchronisée. Adapté de Sun et al. (2024). Copyright © 2024, American Chemical Society..... 30
- Figure 4.1** (A) Synthesis of carboxymethylated dextran (CMD) with bromoacetic acid; (B) Crosslinking reaction of CMD and chitosan (CHI), using EDC/NHS chemistry..... 50
- Figure 4.2** (A) Hydrogels after 3 days of immersion in Milli-Q water, PBS and F17 cell culture media, at CHI:CMD volume ratios varying from 30:70 (left) to 80:20 (right), by increment of 10. Scale bars: 1 cm. (B) Evolution of the volumetric swelling capacity (V_{SC}) as a function of the CHI volume ratio ($n = 5$)..... 53
- Figure 4.3** Storage modulus (G') and loss modulus (G'') as a function of time for a 50:50 CHI:CMD volume ratio at (A) 37 °C ($n = 5$) and (B) 20, 12 and 4 °C ($n = 1$). Evolution of the gelation time (t_{gel}) for a 50:50 ratio as a function of temperature: (C) t_{gel} vs *Temperature* and (D) $\ln(t_{gel})$ vs $1/T$ to determine the activation energy. 55
- Figure 4.4** Compression modulus of hydrogels, for composition ranging from 30 %v/v to 80 %v/v CHI solution. The mechanical characterization was performed (A) right after unmolding or after 3 days in (B) water, (C) PBS 1X and (D) F17 culture medium..... 57
- Figure 4.5** Representative optical microscopy images of HUVECs adhesion after 24 h on (A) CellBind well, (B) CMD-covered glass surfaces, (C) CHI-covered glass surfaces, (D) RGD peptide on CMD covered glass surfaces, (E) 50:50 volume ratio CHI:CMD hydrogel, and (F) 50:50 volume ratio CHI:CMD hydrogel functionalized with RGD peptide. Scale bars: 300 μm 60
- Figure 4.6** Gelation of 50:50 volume ratio CHI:CMD at 37 °C in a syringe; (B) Preparation of macroporous hydrogel using a macroporous PVA mold; (C) Compression modulus at equal volumes of CHI (2 %w/v) and CMD (increasing mass concentration from 2 to 10% w/v) ; (D) Remaining amino groups in CHI after gel formation revealed by the genipin colorimetric marker, for different CHI:CMD volumetric compositions (%v/v). 63
- Figure 4.7** Formation of precipitates when the CHI solution (without addition of NaHCO_3) is mixed with CMD at pH 1-1.5..... 68

Figure 4.8 Evolution of G' and G'' as a function of time and at different CHI solution composition (%v/v), for CHI:CMD hydrogels, at 37 °C.	68
Figure 4.9 Evolution of storage modulus (G') as a function of CHI solution composition in %v/v.	69
Figure 4.10 G' reported at 1000 min for a 50:50 volume ratio CHI:CMD at different temperatures.	69
Figure 4.11 Image of the 2% w/v CHI gel crosslinked with genipin showing no HUVECs attachment, scale bar: 300 μm	70
Figure 4.12 Gelation of sodium alginate (SA) and chitosan at 50:50 volume ratio SA:CMD, using EDC/NHS crosslinking chemistry. CMD was substituted with SA to display the versatility of our approach to produce clear and stable hydrogels.	70
Figure 4.13 Image of the HUVECs growing on the glass coverslip next to the 50:50 volume ratio CHI:CMD gel grafted on glass surfaces. Note that this image shows the edge of the round glass coverslip (with gel on the left side) and the CellBind well surface.	71

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

2D	Deux dimensions (<i>fr</i>) / Two-dimensional (<i>en</i>)
3D	Trois dimensions (<i>fr</i>) / Three-dimensional (<i>en</i>)
APTES	Aminopropyltriethoxysilane
CHI	Chitosane (<i>fr</i>) / Chitosan (<i>en</i>)
D	Diamètre du gel (<i>fr</i>) / Diameter of the gel (<i>en</i>)
DCM/CMD	Dextrane carboxyméthylé (<i>fr</i>) / Carboxymethylated dextran (<i>en</i>)
dcm	Degré de carboxyméthylation (<i>fr</i>) / Degree of carboxymethylation (<i>en</i>)
DDA	Degré de désacétylation (<i>fr</i>) / Degree of deacetylation (<i>en</i>)
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide
Egel	Énergie d'activation de gélification (<i>fr</i>) / Gelation activation energy (<i>en</i>)
F17	Milieu de culture FreeStyle
g	Constante de pesanteur
G	Force appliquée
G'	Module de conservation (élastique) (<i>fr</i>) / Storage modulus (<i>en</i>)
G''	Module de perte (visqueux) (<i>fr</i>) / Loss modulus (<i>en</i>)
GOPS	(3-glycidyloxypropyl) trimethoxysilane
HCl	Acide chlorhydrique (<i>fr</i>) / Hydrochloric acid (<i>en</i>)
HUVEC	Cellule Endothéliale de la Veine Omphalique Humaine (<i>fr</i>) / Human Umbilical Vein Endothelial Cell (<i>en</i>)
Mw	Masse molaire en poids (<i>fr</i>) / Molecular weight (<i>en</i>)
MEC	Matrice extracellulaire
NaHCO ₃	Bicarbonate de sodium (<i>fr</i>) / Sodium bicarbonate (<i>en</i>)

NHS	N-hydroxysuccinimide
ODA	Dextrane oxydé (<i>fr</i>) / Oxydized dextran (<i>en</i>)
PBS	Tampon Phosphate Salin (<i>fr</i>) / Phosphate Buffered Saline (<i>en</i>)
POA	Adhérences postopératoires (<i>fr</i>) / Postoperative adhesions (<i>en</i>)
PVA	Alcool Polyvinylique (<i>fr</i>) / Polyvinyl Alcohol (<i>en</i>)
R	Constante
T	Température
tgel	Temps de gélification (<i>fr</i>) / Gelation time (<i>en</i>)
V	Volume du gel (<i>fr</i>) / Gel's volume (<i>en</i>)
VSC	Capacité volumique de gonflement (<i>fr</i>) / Volumetric swelling capacity (<i>en</i>)
VEGF	Facteur de Croissance de l'Endothelium Vasculaire (<i>fr</i>) / Vascular Endothelial Growth Factor (<i>en</i>)
ρ	Masse volumique (<i>fr</i>) / Volumetric mass (<i>en</i>)
Δh	Déplacement (<i>fr</i>) / Displacement (<i>en</i>)
h_0	Hauteur du gel (<i>fr</i>) / Height of the gel (<i>en</i>)
ε	Déformation (<i>fr</i>) / Strain (<i>en</i>)

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 L'adhésion cellulaire, un problème post-opératoire important en chirurgie

Les adhérences postopératoires (POA) sont un problème récurrent et une source de complications à long terme faisant suite à de nombreuses interventions chirurgicales. Ces adhérences sont caractérisées par des bandes de tissu cicatriciel qui peuvent se former après une chirurgie, souvent entre les organes internes où a eu lieu l'opération (Arung, Meurisse, & Detry, 2011). Ces POA font partie intégrante du processus naturel de guérison du corps humain. Toutefois, elles peuvent entraîner diverses complications indésirables après une intervention chirurgicale, telles que des douleurs chroniques sévères, des dysfonctionnements des organes, ou encore la nécessité de recourir à de nouvelles interventions chirurgicales. Ces dernières peuvent inclure une adhésiolyse, c'est-à-dire une procédure destinée à éliminer les adhérences elles-mêmes (Fatehi Hassanabad, Zarzycki, Jeon, Deniset, & Fedak, 2021). Ce problème d'adhérence est fréquemment retrouvé après une chirurgie abdominopelvienne car les tissus peuvent se coller à la paroi abdominale et former des contractions abdominales au patient, ce qui peut diminuer la qualité de vie des patients, voire mettre leur vie en danger (J. Li et al., 2017). En effet, plusieurs études ont démontré que les adhérences sont fréquemment associées à une morbidité et une mortalité importante, en particulier chez les patients devant subir des interventions chirurgicales répétées (Fatehi Hassanabad, Zarzycki, Jeon, Deniset, et al., 2021). Leur impact ne se limite cependant pas à la sphère clinique : elles représentent également un fardeau économique considérable pour les systèmes de santé. Aux États-Unis, par exemple, le coût annuel lié aux adhérences est estimé à environ 2,5 milliards de dollars (M. Chen et al., 2025; Stapleton et al., 2021). La **Figure 1.1** illustre sous la forme de schéma ce que sont les adhérences postopératoires.

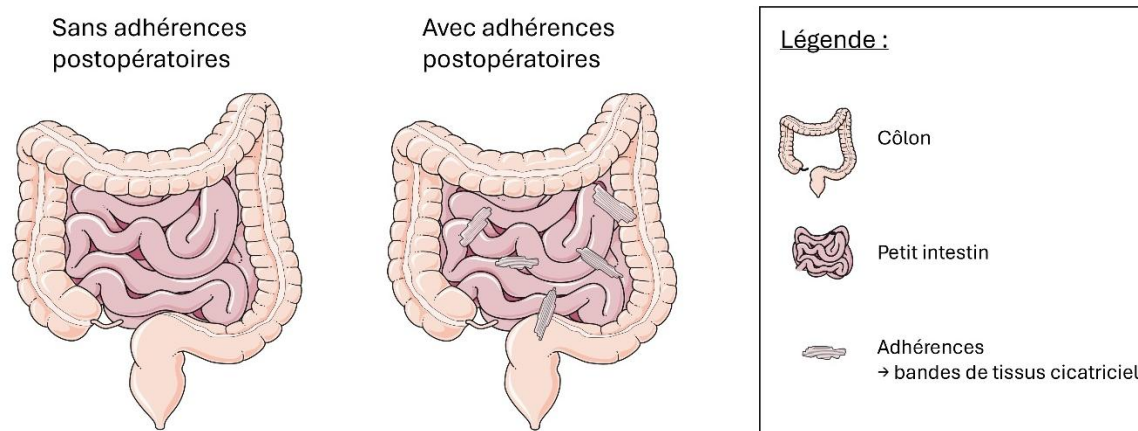


Figure 1.1 Schéma montrant des organes sains sans adhérences à gauche et avec des adhérences postopératoires à droite. Cette figure a été réalisée en utilisant des images provenant de Servier Medical Art. Servier Medical Art par Servier est sous licence Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0).

De plus, les adhérences compliquent les interventions chirurgicales ultérieures, nécessitant davantage de temps et de ressources de la part des chirurgiens, ce qui augmente non seulement les risques opératoires, mais accroît également la charge de travail des professionnels de santé. Il est donc important de pouvoir contrôler ces adhérences postopératoires, et trouver une solution à ces complications dans le but d'une guérison et d'une récupération post-chirurgicale réussies, évitant aussi des coûts économiques supplémentaires.

1.2 Les techniques proposées pour prévenir les POA

Différentes stratégies et approches ont été développées pour répondre à cette problématique, telles que :

- Adoption de stratégies chirurgicales : la laparoscopie est une technique chirurgicale qui consiste à intervenir à l'intérieur de l'abdomen sans ouvrir largement la paroi abdominale. Au lieu d'une grande incision (comme en chirurgie ouverte), le chirurgien réalise de petites incisions (généralement 0,5 à 1 cm) par lesquelles sont introduits une caméra (laparoscope) et des instruments chirurgicaux fins (Buia, Stockhausen, & Hanisch, 2015; Schnüriger et al., 2011);
- Application de barrières physiques/chimiques : afin d'empêcher un contact physique entre deux surfaces tissulaires et éviter la formation d'adhérences pendant la cicatrisation. Ces

dispositifs peuvent être des barrières solides, des gels ou bien des solutions (Fatehi Hassanabad, Zarzycki, Jeon, Dundas, et al., 2021);

- Utilisation de stratégies pharmaceutique : ciblant principalement l'inflammation, la fibrose et le déséquilibre fibrinolytique avec des médicaments (Fatehi Hassanabad, Zarzycki, Jeon, Dundas, et al., 2021).

Récemment, l'attention se porte sur l'utilisation de biomatériaux en tant que systèmes barrières pour prévenir les adhérences abdominales postopératoires. Cette approche innovante et prometteuse inclut l'utilisation de solutions polymères, d'hydrogels, de membranes et de feuilles solides, en fonction de l'application finale (J. Li et al., 2017). Cette technique repose sur différents aspects du biomatériau, se basant sur les mécanismes de formation et de développement des adhérences. Elle ne se limite pas seulement à un rôle de barrière physique, mais vise aussi à interférer activement avec les processus inflammatoires, fibrinolytiques et de cicatrisation (Liao, Li, & Fan, 2023). Plusieurs stratégies de prévention basées sur l'utilisation des biomatériaux ont été reportées dans la littérature. La **Figure 1.2** résume six différents aspects à considérer lors de la conception d'un biomatériau, et la combinaison de différentes composantes de ce diagramme peut s'avérer plus efficace pour prévenir les adhérences postopératoires.

Ces stratégies, fondées sur les mécanismes d'apparition et de développement des POA, permettent d'orienter le choix et l'optimisation des matériaux. Parmi les différentes approches identifiées, les hydrogels se distinguent par leurs propriétés physico-chimiques modulables, leur biocompatibilité, leurs propriétés mécaniques ajustables, et leur capacité à former des barrières temporaires. Ils

constituent ainsi une solution idéale pour prévenir les adhérences postopératoires de façon générale.

1.3 Le choix des hydrogels : composition et réticulation

Les polymères naturels, tels que le chitosane, l'acide hyaluronique, le dextrane ou la cellulose, et les polymères synthétiques comme le polyéthylène glycol, le polylactide, le poly(alcool polyvinylique) ou le polyglycolide ont été testés pour cette application (J. Li et al., 2017). Les hydrogels à base de polymères ont suscité un intérêt particulier en raison de leur capacité à servir à la fois de barrières physiques et de vecteurs de libération contrôlée de médicaments, ce qui les rend particulièrement efficaces dans la réduction des POA (Liao et al., 2023). Leur structure 3D hydratée de chaînes polymériques réticulées permet une bonne imitation de la matrice extracellulaire, ce qui favorise leur intégration avec les tissus environnants une fois implantés. En plus de prévenir les adhérences, ces hydrogels remplissent d'autres fonctions cruciales, comme le contrôle des saignements et le maintien de la position correcte des tissus après la chirurgie (M. Chen et al., 2025; G. Liu et al., 2009; Zhang & Khademhosseini, 2017). La **Figure 1.3** met en évidence l'efficacité d'un hydrogel à base de polysulfobétaïne méthacrylate (PSBMA) pour prévenir l'adhésion postopératoire (M. Chen et al., 2025).

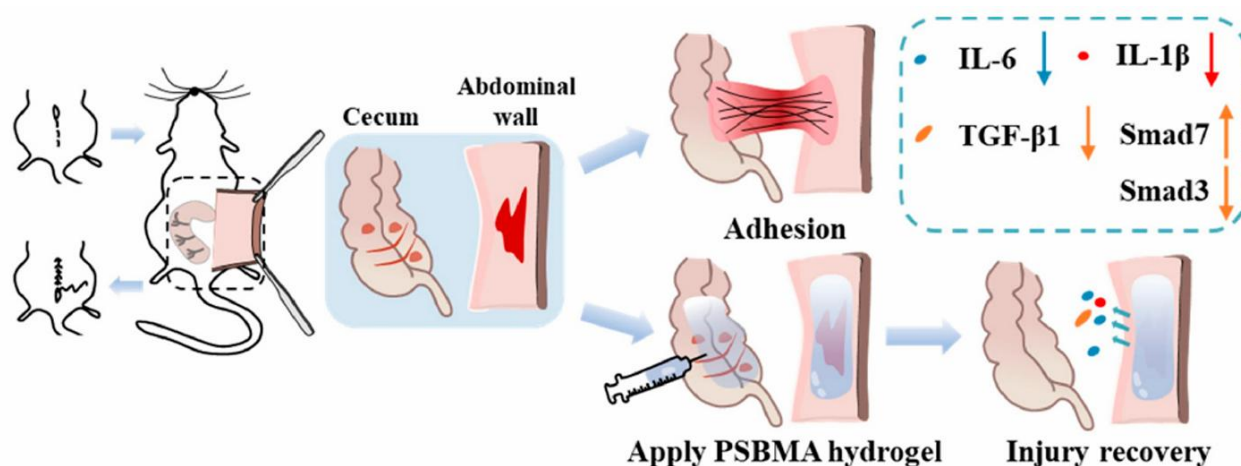


Figure 1.3 Isolation physique. Un modèle de paroi latérale du cæcum a été établi afin d'évaluer les effets comparés avec et sans traitement par hydrogel. Parmi les groupes étudiés, celui traité avec l'hydrogel a efficacement inhibé la fibrose en réduisant les niveaux d'IL-6, d'IL-1β et de TGF-β1, en activant la voie de signalisation TGF-β1/Smad7 et en limitant celle de TGF-

$\beta 1$ /Smad3, tandis que le groupe non traité a présenté des adhérences. Adapté de Chen et al. (2025). © 2025 Chen et al. CC BY.

Au cours des dernières décennies, des hydrogels à base de chitosane et de dextrane ont été testés pour la prévention des adhérences postopératoires après diverses chirurgies, notamment au niveau de l'oreille, du nez, de la gorge, ou dans la zone abdominale. Ces études ont démontré une réduction considérable des adhérences après opération chirurgicale et mise en place de la barrière hydrogel. Divers groupes de recherche (Aziz, Cabral, Brooks, Moratti, & Hanton, 2012; Cabral et al., 2014; Lauder, Garcea, Strickland, & Maddern, 2011; Lauder, Strickland, & Maddern, 2012; G. Liu et al., 2009) ont travaillé sur ce système de combinaison à base de ces deux polymères, en modifiant les biopolymères en chitosane N-succinylé et en dextrane oxydé (ODA). Les groupes succinyles ajoutés ont permis d'améliorer la solubilité du chitosane dans l'eau. Les groupements amine restants du chitosane ont ensuite été impliqués dans une réaction de réticulation avec les groupes aldéhyde de l'ODA. Les hydrogels obtenus se sont révélés biocompatibles, non cytotoxiques et capables de prévenir la réponse immunitaire pro-inflammatoire *in vivo*. Cependant, lors de la modification du dextrane en ODA, du périodate de sodium est utilisé et des sous-produits indésirables sont formés (tels que l'iodate de sodium ou l'acide formique), ainsi qu'une sur-oxydation non souhaitée du dextrane. Cette réaction de sur-oxydation réduit la disponibilité des fonctions aldéhydes et diminue le poids moléculaire du dextrane (Aziz et al., 2012; Cabral et al., 2014; Lauder et al., 2011; Lauder et al., 2012; G. Liu et al., 2009).

L'objectif principal de ce projet de maîtrise est par conséquent de développer une chimie simple, sans sous-produits toxiques et réactions secondaires indésirables, permettant d'obtenir des hydrogels homogènes, stables et modulables, à base de chitosane et de dextrane. Ces hydrogels doivent être biocompatibles, dotés de propriétés mécaniques similaires à celles des tissus mous, et avec un comportement répulsif vis-à-vis des cellules.

Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que les groupements amines du chitosane non modifié (CHI) pouvaient réagir avec les groupements carboxyles du dextran carboxyméthylé (DCM) via la chimie bien connue, non cytotoxique et simple basée sur le N-hydroxysuccinimide (NHS) et le carbodiimide 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) (EDC), aboutissant à la formation d'hydrogels réticulés chimiquement. Bien que cette stratégie de réticulation par NHS/EDC soit couramment

utilisée pour produire des hydrogels à base de collagène, elle n'a pas encore été envisagée pour préparer des hydrogels CHI-CMD (Grabska-Zielińska, Sionkowska, Carvalho, & Monteiro, 2021; Pieper, Hafmans, Veerkamp, & Van Kuppevelt, 2000; Wissink et al., 2001). L'un des principaux défis dans la formation des gels CHI-CMD réside dans la précipitation spontanée non-contrôlée qui survient après leur combinaison en solution, lorsque le pH est ajusté afin d'atteindre des conditions optimales pour la chimie NHS/EDC.

Dans ce mémoire, nous présentons une voie de synthèse permettant de préparer des hydrogels à base de chitosane et de dextrane modifiée pour la prévention des adhérences post-opératoires. Ces hydrogels polysaccharidiques montrent des propriétés morphologiques modulables, ainsi que des propriétés rhéologiques et mécaniques intéressantes pour ce genre d'application. De plus, ce travail démontre que même en enrichissant la surface de ces gels avec des peptides d'adhésion ou d'autres protéines, l'adhésion de cellules vasculaires endothéliales (HUVEC) ne se produit pas.

Ce mémoire est divisé en 6 chapitres. Le **CHAPITRE 1** introduit la problématique générale des POA et du potentiel des hydrogels pour traiter cette condition. Le **CHAPITRE 2** propose une revue sur l'état de l'art concernant les biomatériaux, plus particulièrement les hydrogels, et les différentes approches développées pour la prévention des POA. Le **CHAPITRE 3** présente les objectifs généraux et spécifiques du projet. Le **CHAPITRE 4** est consacré à la présentation des résultats expérimentaux, sous la forme d'un article scientifique. Le **CHAPITRE 5** offre une discussion approfondie des résultats, en soulignant les points clés de l'étude ainsi que les pistes d'amélioration envisageables. Enfin, le **CHAPITRE 6** conclut ce mémoire par une synthèse générale et des recommandations pour les travaux futurs.

CHAPITRE 2 ÉTAT DE L'ART

2.1 Les hydrogels en tant que biomatériaux

2.1.1 Les biomatériaux : définition et classification

De nos jours, les biomatériaux jouent un rôle crucial dans les applications biomédicales et dans les soins de santé. Conçus pour être compatibles avec le corps humain, ils sont utilisés dans une vaste gamme d'applications, notamment dans le domaine du génie tissulaire ou de la médecine régénératrice, allant des implants chirurgicaux aux dispositifs médicaux en passant par les systèmes de délivrance de médicaments (Abdessamed, 2018). Ces matériaux sont d'origines naturelle ou synthétique. Leur importance demeure dans leur capacité à s'adapter à leur environnement, de favoriser la guérison, d'améliorer la qualité de vie des patients et de développer des traitements de plus en plus personnalisés. En effet, la maîtrise de la chimie des matériaux et des technologies de traitement permet de concevoir des systèmes sur mesure présentant des propriétés mécaniques, morphologiques et fonctionnelles spécifiques, adaptées à l'application d'intérêt (Guarino, Iafisco, & Spriano, 2020).

Les propriétés d'un biomatériau sont liées à la fonction spécifique qu'il est destiné à remplir dans et/ou à la surface du corps humain. Afin d'assurer son efficacité et sa durabilité, plusieurs caractéristiques doivent être prises en compte :

- **Biocompatibilité** : il s'agit d'une exigence fondamentale, correspondant à la capacité du matériau à interagir avec les tissus biologiques sans provoquer de réponse immunitaire défavorable.
- **Compatibilité avec d'autres matériaux** : dans le cas d'implants composites ou de dispositifs multi-matériaux, une bonne compatibilité entre les composants est indispensable.
- **Facilité de mise en œuvre** : le matériau doit pouvoir être manipulé et intégré facilement dans un dispositif médical ou lors d'une intervention chirurgicale.
- **Géométrie et surface** : la morphologie, et la présence ou non d'un traitement de surface, peuvent jouer des rôles importants dans l'intégration tissulaire et la réponse cellulaire.

- **Propriétés chimiques** : la résistance à la corrosion, à la stérilisation et à l'irradiation, ainsi que la biodégradabilité, sont déterminantes, notamment selon la durée d'utilisation envisagée (temporaire ou permanente).
- **Propriétés mécaniques** : elles incluent la résistance aux contraintes, la déformation, la ductilité et l'élasticité, essentielles pour assurer la stabilité et l'intégrité structurelle du matériau.
- **Propriétés physiques** : la masse volumique, ainsi que la conductivité thermique et électrique, influencent le comportement du matériau dans son environnement d'implantation ou d'application.

Les biomatériaux peuvent être classés en quatre grandes catégories selon leur composition chimique :

- Les métaux et alliages métalliques ;
- Les céramiques ;
- Les polymères naturels ou synthétiques ;
- Les composites (Festas, Ramos, & Davim, 2020).

Le **Tableau 2.1** résume les avantages et inconvénients de chacune de ces catégories, tout en donnant des exemples et des applications de ceux-ci (Festas et al., 2020; Mahdi, Hassan, Al-Hasani, & Al-Jawher, 2024).

Tableau 2.1 Catégories de biomatériaux, leurs propriétés et leurs applications biomédicales.

Adapté de (Festas et al., 2020; Mahdi et al., 2024).

Classes	Avantages	Inconvénients / Limitations	Exemples	Applications
Métaux	- Résistance mécanique élevée - Bonne conductivité - Durabilité à long terme	- Possibilité de corrosion - Rigidité excessive - Faible élasticité comparée aux tissus	- Titane - Cobalt - Acier inoxydable	- Implants dentaires et orthopédiques - Prothèses articulaires
Céramiques	- Biocompatibilité élevée - Résistance à l'usure et à la corrosion - Inerte chimiquement	- Faible résistance à la fracture (fragilité) - Mise en forme complexe - Coût de fabrication élevé	- Hydroxyapatite - Alumine	- Implants osseux - Prothèses dentaires - Revêtement
Polymères	- Flexibilité et légèreté - Facilité de mise en forme - Coût abordable - Comportement mécanique comparable à celui des tissus biologiques	- Possibilité de dégradation avec le temps - Sensibilité à l'environnement	- Polyéthylène - Acide polylactique - Silicone	- Dispositifs de libération de médicaments - Sutures résorbables - Échafaudages
Composites	- Propriétés mécaniques adaptées sur mesure - Combinaison d'avantages de plusieurs matériaux - Possibilité d'imiter la structure des tissus naturels	- Fabrication complexe - Interface fragile - Difficile à stériliser	- Fibres de carbone - Verres bioactifs	- Implants orthopédiques renforcés - Matériaux osseux bioactifs - Applications dans les implants sur mesure

Parmi les matériaux polymériques présents dans ce tableau, les hydrogels en tant que biomatériaux ont été choisis pour répondre au cahier des charges de ce projet de maîtrise.

2.1.2 Les hydrogels : définition et classification

Les hydrogels ont été les premiers biomatériaux à avoir été considérés pour des applications biomédicales, et sont classés parmi les biomatériaux les plus prometteurs (Kopecek, 2007). Ce sont des réseaux tridimensionnels polymériques capables de retenir une quantité importante d'eau tout en maintenant leur structure – ce sont des solides « mous ». En raison de leur capacité à imiter les propriétés mécaniques et biologiques des tissus naturels, les hydrogels sont utilisés pour fournir des environnements propices à la croissance cellulaire, à la régénération des tissus et à la réparation des lésions. Leur biocompatibilité, leur flexibilité et leur similitude avec les tissus biologiques en font donc des candidats idéaux pour des applications dans le domaine du génie tissulaire, de la médecine régénérative, des implants et des pansements pour plaies.

Il existe plusieurs types d'hydrogels et ceux-ci peuvent être classés selon différents critères incluant l'origine des matériaux utilisés, la nature de la réticulation ou encore la structure de leur réseau 3D. En effet, ils peuvent être naturels ou synthétiques ; réticulés de façon chimique (liaison covalente) ou physique (ex. liaisons ioniques) ; homogènes, microporeux ou macroporeux ; et dégradables ou non dans l'organisme (Kopecek, 2007).

Les polymères naturels

Les polymères naturels sont des macromolécules issues de sources biologiques (végétaux, animaux, micro-organismes). La famille des polysaccharides fait partie des polymères naturels. Ils sont composés de nombreuses unités glucidiques reliées entre elles par des liaisons glycosidiques. Dans le contexte des hydrogels, ils sont souvent choisis pour leur **biocompatibilité**, **biodégradabilité**, **non-toxicité** et leur grande abondance car présents dans la nature. Par ailleurs, leur **biofonctionnalisation** est facilitée par la présence de nombreux groupes fonctionnels réactifs permettant le greffage de protéines. En effet, tous les polysaccharides possèdent des groupements hydroxyles, et certains présentent également des groupements carboxyles ou amines (BeMiller, 2014). Le **Tableau 2.2** résume les polymères naturels, leurs origines et propriétés utiles.

Tableau 2.2 Origine des polysaccharides et leurs caractéristiques principales

Polymère naturel	Origine	Propriétés utiles	Références
Acide hyaluronique	Tissus conjonctifs	Composé de la matrice extracellulaire	(Burdick & Prestwich, 2011)
Agarose	Algues rouges	Gélification réversible sensible à la température, propriétés mécaniques élevées	(Jiang et al., 2023)
Alginate	Algues brunes	Gélification facile avec des ions calcium	(Safi et al., 2022)
Carraghénane	Algues rouges	Gélification à température ambiante, propriétés bioactives (antibactérienne, antitumorales, antivirales, anticoagulantes, ...)	(Mirzaei, Esmkhani, Zallaghi, Nezafat, & Javanshir, 2023)
Chitosane	Carapaces de crustacés	Propriétés antibactériennes, antioxydantes et hémostatiques	(Ahmadi, Oveisi, Samani, & Amoozgar, 2015)
Cellulose	Plantes	Transformation en dérivés hydrosolubles faciles (comme carboxyméthylcellulose), bonne résistance mécanique	(Chang & Zhang, 2011)
Dextrane	Bactéries	Stabilité thermique, propriétés répulsives pour les cellules, poids moléculaires variables	(Díaz-Montes, 2021; Massia, Stark, & Letbetter, 2000)
Pectine	Fruits (pommes, agrumes)	Gélification rapide, stabilité thermique, capacité d'encapsulation	(Said, Olawuyi, & Lee, 2023)

Les hydrogels conçus à partir de polysaccharides présentent des propriétés mécaniques semblables aux tissus mous de l'organisme, leur donnant un avantage considérable dans leurs applications (Tiwari, Patil, & Bahadur, 2018). La plupart étant solubles dans l'eau, ils nécessitent une réticulation ou une combinaison avec d'autres matériaux pour former des échafaudages ou des hydrogels (Yang, Peng, Xiao, Xu, & Qian, 2022).

Les polymères synthétiques

Les polymères synthétiques sont des matériaux peu coûteux, obtenus par des procédés chimiques reproductibles et maîtrisés. Leur grande polyvalence et leur disponibilité dans une vaste gamme de poids moléculaires en font des matériaux attractifs. Certains présentent des propriétés de biocompatibilité et de biodégradabilité, ce qui les rend particulièrement intéressants pour la fabrication d'hydrogels. Les polymères synthétiques les plus répandus pour des applications biomédicales sont présentés dans le **Tableau 2.3** ci-dessous :

Tableau 2.3 Propriétés des principaux polymères synthétiques

Polymère synthétique	Propriétés utiles et applications	Références
Poly(ϵ-caprolactone) (PCL)	Hydrophobe et ne promeut pas l'adhésion cellulaire Utilisé comme implant à long terme ou pour favoriser la régénération de tissus durs tels que les os	(Malikmammadov, Tanir, Kiziltay, Hasirci, & Hasirci, 2018; Mondal, Griffith, & Venkatraman, 2016; Reddy, Ponnamma, Choudhary, & Sadasivuni, 2021; Stratton, Shelke, Hoshino, Rudraiah, & Kumbar, 2016)
Polyéthylène glycol (PEG)	Hydrophile, peu immunogénique Utilisé pour des implants et cathéters	(Reddy et al., 2021; Stratton et al., 2016)

Polyvinyl alcool (PVA)	Hydrophile, absence de propriété d'adhésion cellulaire Utilisé pour la régénération de cartilage et des os, cicatrisation des plaies ou libération contrôlée de médicaments	(A. Kumar & Han, 2017)
Polyuréthanes	Flexibles ou rigides Utilisé dans la fabrication de dispositifs en contact avec le sang, tels que les veines et artères artificielles ou les valves cardiaques	(Reddy et al., 2021)

Ces polymères sont couramment utilisés comme matériaux de base pour la fabrication d'échafaudages destinés à la culture cellulaire 3D, par exemple. En l'absence de structure 3D native, ils peuvent être structurés au préalable par des méthodes telles que, la bioimpression 3D ou l'électrofilage (J. Li et al., 2017; Liao et al., 2023; Shin et al., 2021). Comme ces polymères ne sont pas issus de la matrice extracellulaire (MEC), contrairement aux polymères naturels, ils ne possèdent pas naturellement de signaux biochimiques nécessaires à la croissance et à la différenciation cellulaire. Si l'adhésion cellulaire est un critère recherché, il est ainsi nécessaire de biofonctionnaliser ces matériaux pour leur conférer ces propriétés. Il est également crucial de s'assurer de l'élimination complète des solvants et réactifs chimiques potentiellement toxiques utilisés lors de leur synthèse, afin de garantir leur sécurité en application biomédicale.

2.1.3 Les caractéristiques optimales pour une application médicale

L'hydrogel doit répondre à des critères fondamentaux pour pouvoir être implanté dans un environnement biologique vivant. Tout d'abord, il faut que les matériaux choisis soient **biocompatibles** afin de préserver le bon fonctionnement de l'organisme, et éviter d'endommager les tissus biologiques environnants (Ratner, Hoffman, Schoen, & Lemons, 2004). Ensuite, ils doivent être **biodégradables** et **non-toxiques** pour favoriser l'intégration progressive des tissus implantés dans la MEC originale, et ne pas produire de substances nocives en cas de décomposition

progressive. En effet, ils ne doivent pas libérer de substances chimiques toxiques qui pourraient nuire aux cellules environnantes (Nair & Laurencin, 2007).

Pour réduire le risque d'activation excessive du système immunitaire contre le biomatériau lors de son implantation, il est essentiel que celui-ci soit composé de **matériaux non-immunogènes** et sans agents pathogènes. Ce critère est important car le but n'est pas de déclencher une réponse immunitaire contre celui-ci, mais de favoriser une intégration adéquate avec les tissus biologiques, minimiser les risques de rejet, et assurer un usage à long terme sans complications (Kasravi et al., 2023). Par ailleurs, il doit être stable dans des environnements physiologiques, résistant aux fluides corporels et biologiques, sans se dégrader prématurément ou se dissoudre.

De plus, selon l'application, il doit posséder une **résistance mécanique** suffisante (par exemple, pour les implants osseux ou les prothèses) tout en étant suffisamment flexible si nécessaire (par exemple, pour les implants vasculaires). Pour les tissus mous tels que les nerfs, les vaisseaux ou les muscles, le module de Young est de l'ordre du kPa, alors que pour les tissus durs comme les os, il peut aller jusqu'à l'ordre du MPa (J. Liu, H. Zheng, P. S. P. Poh, H.-G. Machens, & A. F. Schilling, 2015; Nemir & West, 2010).

La prochaine section se concentre sur les matériaux choisis pour répondre à la problématique présentée en dans le **CHAPITRE 1** – Introduction, à savoir le traitement des adhésions post-opératoires (POA).

2.2 Les polymères utilisés

2.2.1 La chitine et le chitosane

La chitine est un polymère naturel appartenant à la famille des polysaccharides, et le deuxième polysaccharide le plus abondant sur Terre, après la cellulose. Elle est formée de longues chaînes de *N*-acétylglucosamine, un dérivé du glucose. Ce biopolymère est insoluble dans l'eau, résistant et rigide, ce qui en fait un matériau de structure très efficace. On la retrouve principalement dans l'exosquelette des arthropodes (insectes, crustacés, arachnides), la paroi cellulaire des champignons, ou encore dans certains organismes marins comme les mollusques. Elle joue un rôle de protection mécanique et de soutien structural, comparable à la cellulose chez les plantes (Al

Sagheer, Al-Sughayer, Muslim, & Elsabee, 2009; Izadi, Asadi, & Bemani, 2025; Piekarska, Sikora, Owczarek, Jóźwik-Pruska, & Wiśniewska-Wrona, 2023).

Le principal inconvénient de la chitine, qui limite considérablement ses applications, réside dans son insolubilité dans l'eau et dans la majorité des solvants organiques usuels. Afin de surmonter cet inconvénient, la chitine subit généralement une désacétylation partielle, processus destiné à améliorer sa solubilité. Le produit obtenu à l'issue de cette modification est connu sous le nom de chitosane. La **Figure 2.1** illustre la réaction de désacétylation de la chitine afin d'obtenir le chitosane.

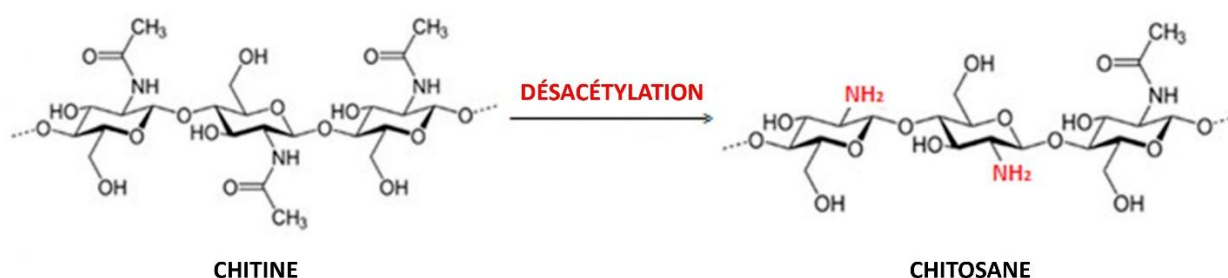


Figure 2.1 La réaction de désacétylation de la chitine. Le processus de désacétylation et les groupes aminés réactifs formés lors de celui-ci sont marqués en rouge. Adapté de Piekarska et al. (2023) CC BY 4.0

Le chitosane est ainsi le dérivé désacétylé de la chitine, dont il conserve une structure chimique très proche. La différence essentielle entre les deux réside dans leurs groupes fonctionnels : la chitine contient majoritairement des groupes acétamide, tandis que le chitosane présente majoritairement des groupes amine. Sur le plan structural, le chitosane (comme la chitine) est formé d'une alternance de deux unités : la N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) et la D-glucosamine (GlcN), réparties aléatoirement le long de la chaîne. La structure de la GlcNAc et la GlcN sont illustrées à la **Figure 2.2** (Kotena & Fattahi, 2020).

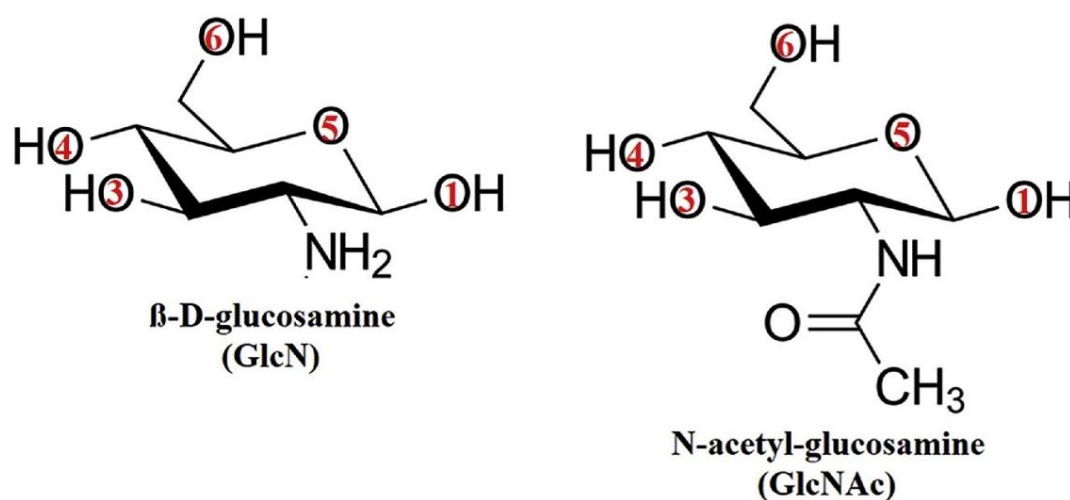


Figure 2.2 Structures chimiques de la β -d-glucosamine (2-amino-2-désoxy-d-glucose) et de la N-acétyl-d-glucosamine (2-acétamido-2-désoxy-d-glucose). Tiré de Kotena et al. (2020) Copyright © 2020 Elsevier Ltd.

La proportion relative de ces deux unités définit le degré de désacétylation (DDA) du chitosane. Le polymère est caractérisé également par son poids moléculaire, sa distribution de masses moléculaires et sa viscosité intrinsèque. En plus de la composition en GlcNAc et GlcN, leur organisation le long de la chaîne influence fortement les propriétés physicochimiques et biologiques du chitosane. Contrairement à la majorité des polysaccharides naturels, qui sont soit neutres (comme la cellulose, le dextrane, l'agarose ou l'amidon), soit chargés négativement (comme l'alginate, l'acide hyaluronique ou la pectine), le chitosane se distingue en étant le seul polysaccharide d'origine naturelle à charge positive (Díaz-Montes, 2022; Torres, Troncoso, Pisani, Gatto, & Bardi, 2019).

La solubilisation du chitosane est un phénomène complexe influencé par plusieurs paramètres physico-chimiques. L'un des facteurs majeurs est le DDA, qui reflète la proportion d'unités glucosamine (GlcN) par rapport aux unités N-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) dans le copolymère issu de la désacétylation de la chitine. Bien que théoriquement la distinction entre chitine et chitosane repose sur un seuil de 50 % de GlcN, en pratique, un DDA supérieur à 60 % est requis pour qu'un matériau soit considéré comme du chitosane, notamment en raison de sa solubilité dans une solution aqueuse d'acide acétique (par exemple, 1 % v/v). Cette solubilité est souvent utilisée

comme critère opérationnel pour différencier les deux polymères (de Alvarenga, de Oliveira, & Bellato, 2010; Rinaudo, 2006; Roberts & Roberts, 1992). Cette solubilité particulière constitue un enjeu majeur pour les applications du chitosane, car elle détermine directement les conditions dans lesquelles le polymère peut être manipulé ou incorporé dans des formulations. En effet, le chitosane est insoluble dans l'eau pure, les milieux alcalins, ainsi que dans les solvants organiques neutres comme l'éthanol ou l'acétone, ce qui limite considérablement ses possibilités d'utilisation. Toutefois, un chitosane faiblement désacétylé peut se dissoudre dans l'acide chlorhydrique à un pH compris entre 4.5 et 5. L'acide acétique à 0.1 M reste néanmoins le solvant de référence le plus couramment utilisé pour assurer sa mise en solution (Aranaz et al., 2021; Hamdine, Heuzey, & Bégin, 2005; Rinaudo, Pavlov, & Desbrieres, 1999).

La structure moins cristalline du chitosane par rapport à la chitine, ainsi que la présence de groupements amine libres (-NH_2), jouent un rôle déterminant dans sa solubilité. Ces fonctions amines peuvent être protonées (-NH_3^+) en milieu acide, conférant au polymère une charge positive qui favorise sa solubilisation dans des solvants légèrement acides. Toutefois, au-delà de son $\text{pK}_a \approx 6.5$, la déprotonation de ces groupes entraîne une perte de solubilité due à la diminution des répulsions électrostatiques (**Figure 2.3**) (Aranaz et al., 2021; Yaneva, Ivanova, Nikolova, & Tzanova, 2020).

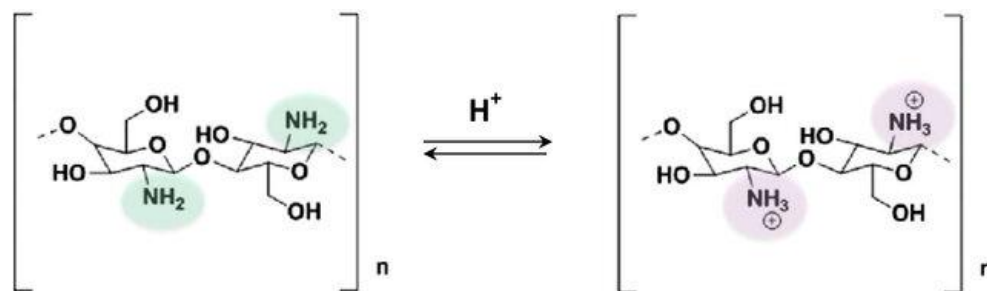


Figure 2.3 Protonation/déprotonation du chitosane. Tiré de Yaneva et al. (2020) CC BY 4.0

Outre le pH, la masse molaire du chitosane influence également sa solubilité : des oligomères à faible poids moléculaire sont généralement solubles sur une gamme de pH plus étendue, ce qui les rend intéressants pour des applications spécifiques. De même, la concentration ionique, la nature de l'acide utilisé, ainsi que la distribution des groupes acétyles sur la chaîne polymérique affectent les interactions inter-chaînes, telles que les liaisons hydrogènes entre groupes hydroxyles et les

interactions hydrophobes, modifiant la conformation des chaînes et la viscosité des solutions (Aranaz et al., 2021).

Enfin, le DDA, en plus d'affecter la solubilité, influence d'autres propriétés structurales telles que la flexibilité, la rigidité, ou encore la viscosité des solutions de chitosane. Ce paramètre peut être évalué par différentes méthodes analytiques, notamment la résonance magnétique nucléaire (RMN), la spectroscopie ultraviolet-visible (UV) ou la spectroscopie FTIR (Sánchez-Machado et al., 2024).

Le chitosane est aussi un polysaccharide biocompatible, biodégradable, non-toxique, non-immunogène, thermosensible et possède des propriétés antimicrobiennes. Grâce à toutes ces caractéristiques, les hydrogels à base de chitosane ont été largement étudiés pour des applications biomédicales, telles que le génie tissulaire et la délivrance de médicaments (M. N. V. R. Kumar, Muzzarelli, Muzzarelli, Sashiwa, & Domb, 2004; X. Liu, Ma, Mao, & Gao, 2011).

Finalement, le chitosane aide à l'hémostase, le processus biologique permettant de contrôler et d'arrêter le saignement après une blessure ou une lésion des vaisseaux sanguins. Il permet de maintenir l'intégrité du système circulatoire et de prévenir une perte sanguine excessive (Fan, Zeng, Zaldivar-Silva, Agüero, & Wang, 2023).

2.2.2 Le dextrane

Le dextrane est un polysaccharide naturel, principalement composé d'unités glucoses liés par des liaisons α -1,6, avec des ramifications en α -1,3. La **Figure 2.4** illustre la structure du dextrane. Ce polymère présente une variété de propriétés physico-chimiques et biologiques qui le rendent utile dans divers domaines, notamment dans les applications pharmaceutiques, biomédicales, alimentaires ou cosmétiques.

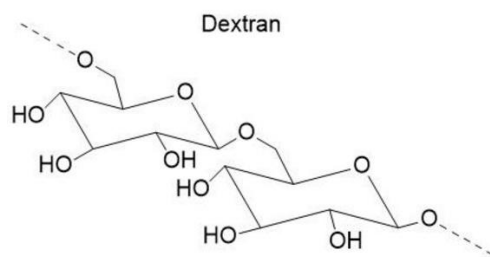


Figure 2.4 Structure chimique du dextrane, principalement composé d'unités de glucose.

Concernant ses propriétés physico-chimiques, le dextrane est soluble dans l'eau, ce qui facilite son incorporation et sa préparation dans des formulations liquides. Sa viscosité dépend de sa concentration et de son poids moléculaire. Lorsque le poids moléculaire est élevé, cela lui confère une viscosité plus élevée, ce qui est utile comme agent épaississant dans l'industrie alimentaire et cosmétique. Chimiquement neutre, le dextrane est non toxique, non immunogène et bien toléré par l'organisme. Il est utilisé comme support inerte pour la fixation ou l'encapsulation de principes actifs, et comme matrice dans des techniques de séparation (comme la chromatographie sur gel et la filtration). Le dextrane est également biocompatible et biodégradable grâce aux enzymes présents dans l'organisme, notamment par les dextranases. Cette caractéristique est essentielle pour son utilisation dans la conception de biomatériaux, de systèmes de libération de médicaments ciblés, ainsi qu'en chirurgie, pour limiter les effets secondaires à long terme (Díaz-Montes, 2021; Luanda & Badalamoole, 2023). Le fait que le dextrane soit un polymère inerte avec propriétés antiadhésives constitue un avantage dans les applications où l'adhésion cellulaire est indésirable. En revanche, dans le cas où de l'adhésion cellulaire est recherchée, il est possible de biofonctionnaliser le dextrane avec des peptides d'adhésion ou des facteurs de croissance afin de favoriser l'adhésion des cellules à sa surface (Noel et al., 2016; Oliverio et al., 2024).

Dans le domaine biomédical, le dextrane est un polysaccharide largement utilisé pour ses propriétés biocompatibles, hydrophiles et facilement modifiables chimiquement. Ses principales applications incluent :

- La production de nanoparticules pour la livraison ciblée de médicaments : le dextrane est utilisé comme matrice pour la fabrication de nanoparticules ou de conjugués macromoléculaires, capables de transporter des agents thérapeutiques (comme des agents anticancéreux, antibiotiques ou anti-inflammatoires) vers des tissus ou cellules spécifiques, tout en assurant une libération contrôlée et une protection du principe actif (Banerjee & Bandopadhyay, 2016; F. Chen, Huang, & Huang, 2020; Ramasundaram, Saravanakumar, Sobha, & Oh, 2022).
- La fabrication d'hydrogels pour la culture cellulaire, le génie tissulaire et la médecine régénératrice : le dextrane et ses dérivés peuvent former des hydrogels biodégradables servant de matrices tridimensionnelles pour la culture cellulaire, la régénération de tissus ou la libération locale d'agents thérapeutiques comme des médicaments. Ces matériaux

imitent l'environnement extracellulaire et favorisent l'adhésion, la prolifération et la différenciation des cellules (De Groot et al., 2001; Maia, Evangelista, Gil, & Ferreira, 2014; Sharma & Jagadeesh Chandra Bose, 2024).

- Les revêtements de surfaces biomédicales : ce polymère est utilisé pour recouvrir les surfaces de dispositifs médicaux afin de réduire l'adhésion non spécifique des protéines, limiter les réponses immunitaires et améliorer la biocompatibilité. Il peut également servir à fixer des ligands spécifiques pour le ciblage ou le diagnostic (Howell et al., 2016; D. Predoi, Iconaru, & Predoi, 2019; G. Predoi et al., 2021).
- Utilisation comme expanseur plasmatique : les solutions de dextrane peuvent être administrées par voie intraveineuse pour augmenter temporairement le volume plasmatique chez les patients en état de choc hypovolémique (perte de sang, brûlures graves, etc.). Elles agissent en élevant la pression oncotique, favorisant ainsi le retour des liquides vers la circulation sanguine (McCahon & Hardman, 2017; Teixeira, Van Sant, & Nielsen, 2023).
- Agent de contraste pour l'imagerie médicale : il peut être conjugué à des agents de contraste (ex. : fer, gadolinium) pour créer des nanoparticules utilisées en IRM ou en imagerie optique. Ces particules permettent une meilleure visualisation des tissus tumoraux, inflammatoires ou vasculaires, avec un ciblage amélioré et une élimination contrôlée (Osborne et al., 2012).
- Pansements pour la cicatrisation des plaies : des hydrogels de dextrane ont été développés pour accélérer la cicatrisation des plaies infectées en réduisant les niveaux d'inflammation. Ces pansements favorisent la guérison en inhibant l'inflammation et en réduisant les agents pathogènes au site de la plaie. Cette approche est particulièrement utile pour les plaies chroniques ou infectées (Sharma & Jagadeesh Chandra Bose, 2024; Zhao & Jalili, 2022).
- Barrière antiadhésive en chirurgie : des formulations de dextrane sont utilisées comme barrières d'anti-adhérences dans les interventions chirurgicales abdominales ou gynécologiques pour éviter les adhérences post-opératoires entre les tissus (Fatehi Hassanabad, Zarzycki, Jeon, Dundas, et al., 2021; J. Li et al., 2017; Schnüriger et al., 2011; Stapleton et al., 2021).

2.3 Système hybride à base de chitosane et de dextrane

Le chitosane et le dextrane sont deux polymères largement utilisés en application médicale en raison de leur excellente biocompatibilité et de leur biodégradabilité. Le chitosane est apprécié pour ses propriétés hémostatiques, antibactériennes et cicatrisantes, ce qui en fait un excellent candidat pour la régénération tissulaire, les pansements ou les systèmes d'administration de médicaments. Il peut également former des films, gels ou microsphères selon l'application souhaitée. Le dextrane est quant à lui utilisé pour ses propriétés antithrombotiques, hydratantes et sa capacité à former des hydrogels. Il est souvent employé comme vecteur de principes actifs ou dans la formulation de substituts plasmatiques. L'association de ces deux polymères permet d'obtenir des matériaux aux propriétés mécaniques et biologiques adaptées à des applications telles que les implants, les barrières antiadhérentes ou les systèmes de libération contrôlée. Leur caractère non toxique et leur origine naturelle renforcent leur intérêt dans le domaine biomédical. En raison de toutes ces caractéristiques, la combinaison du chitosane et du dextrane pour la conception d'hydrogels hybrides représente une approche prometteuse en vue d'applications biomédicales.

2.3.1 Techniques développées pour réticuler ces deux polymères

La réticulation d'hydrogels hybrides à base de chitosane et de dextrane a déjà été étudiée dans la littérature et plusieurs techniques existent.

La réticulation chimique entre ces deux biopolymères implique la formation de liaisons covalentes entre les chaînes polymériques, et a été réalisée en utilisant :

- **Réaction de base de Schiff :** Cette méthode repose sur la réaction entre les groupes amines du chitosane et les groupes aldéhydes du dextrane préalablement obtenus par oxydation au périodate, formant des imines. Elle permet une réticulation rapide sans l'utilisation d'agents de réticulation externes (Aziz et al., 2012; Cabral et al., 2014; Lauder et al., 2011; Lauder et al., 2012; G. Liu et al., 2009).
- **Méthode de cycloaddition azide-alkyne (réaction dite « click ») :** Cette approche implique la modification du chitosane et du dextrane avec des groupes azide et alcyne, respectivement, suivie d'une cycloaddition catalysée par le cuivre (Helin Li et al., 2020).

La réticulation physique repose quant à elle sur des interactions non covalentes, telles que :

- Les interactions électrostatiques : le chitosane est un polymère cationique (chargé positivement en milieu acide) tandis que certains dérivés du dextrane, comme le dextrane sulfate, portent des groupes sulfonates (chargés négativement quel que soit le pH de la solution). Cette complémentarité ionique permet de former des complexes polyélectrolytes (Carvalho et al., 2021; Delair, 2011; Hamman, 2010).

La technique du revêtements multicouches (« layer-by-layer ») consistant en l'adsorption alternée de solutions polycationique (chitosane en milieu acide) et polyanionique (dextrane sulfate) (F. Wang, Li, Tang, Huang, & Chen, 2020; Xu, Liu, Pranantyo, Neoh, & Kang, 2018).

Ces trois techniques de réticulation permettent de produire des hydrogels, mais pour avoir un réseau stable et permanent, la réticulation chimique est privilégiée.

2.3.2 La réticulation avec NHS/EDC, une nouvelle approche

Une approche peu connue mais potentiellement intéressante repose sur l'utilisation d'un carbodiimide (1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide, EDC) couplé avec le N-hydroxysuccinimide (NHS) en tant qu'agent de réticulation pour former des hydrogels de façon chimique. EDC et NHS sont des réactifs couramment utilisés pour lier de façon covalente des molécules contenant des groupes carboxyles (-COOH) à des molécules contenant des amines primaires déprotonées (-NH₂), formant ainsi des liaisons amides. Les applications les plus courantes de cette chimie sont la conjugaison de protéines et la fixation de biomolécules sur des surfaces (Bartczak & Kanaras, 2011; Keleştemur, Altunbek, & Culha, 2017; E. Y. Liu, Jung, & Yi, 2016). Lorsque cette chimie est utilisée, les sous-produits reportés sont des composés solubles et facile à éliminer : de l'urée substituée et du NHS. En effet, lorsque l'EDC active un acide carboxylique pour former un composé intermédiaire instable, qui est l'O-acylisourea, et si aucune amine ne réagit, celui-ci se dégrade par hydrolyse en une urée substituée (appelée EDU). Mais, en présence de NHS, cet intermédiaire est stabilisé en un ester NHS et permet de réagir avec une amine plus efficacement, et ainsi former une liaison amide. Ces deux sous-produits sont solubles dans l'eau et peuvent être facilement éliminés en faisant une purification ou des rinçages (Sionkowska, Kulka-Kamińska, Brudzyńska, Lewandowska, & Piwowarski, 2024; Vashist, 2012). De plus, ils ont été identifiés comme étant peu ou pas cytotoxiques, notamment dans une étude où des membranes de collagène sont réticulées avec à la chimie NHS/EDC pour la régénération osseuse (Ahn et al., 2020).

Pour pouvoir appliquer cette méthode de couplage chimique, il est nécessaire de fonctionnaliser le dextrane de manière à introduire des groupes acides carboxyliques sur sa chaîne polymérique. La carboxyméthylation du dextrane, une méthode bien établie, permet d'obtenir cette fonctionnalisation. Elle s'effectue généralement en milieu basique, typiquement en présence d'hydroxyde de sodium (NaOH), ce qui favorise la réaction entre les groupes hydroxyles du dextrane et l'acide bromoacétique ou chloroacétique. Cette réaction conduit à la substitution partielle des groupes hydroxyles par des groupes carboxyméthyles, conférant au polymère une certaine densité de groupes carboxyles sur les chaînes de dextrane (Benoît Liberelle, Fortier, & De Crescenzo, 2014). Le degré de carboxyméthylation (dcm), c'est-à-dire le nombre moyen de groupes carboxyméthyles introduits par unité de glucose, peut être modulé en ajustant les paramètres réactionnels tels que la concentration en réactifs, la température, ou encore la durée de la réaction. Ce paramètre joue un rôle clé, car il influence directement l'efficacité de l'activation ultérieure via NHS/EDC, ainsi que la densité de greffage sur le polymère.

Une autre étape clé pour l'utilisation de cette chimie est de s'assurer que le chitosane présente des amines majoritairement déprotonées ($-\text{NH}_2$). Cette condition est nécessaire, car le doublet non-liant de l'amine déprotonée permet l'attaque nucléophile de l'acide carboxylique du dextrane activé au NHS ($-\text{COONHS}$). Cependant, le chitosane ($\text{pK}_a \approx 6.5$) n'est soluble que dans des conditions acides, en lien avec la protonation de ses groupements amines ($-\text{NH}_3^+$). Au pH optimum pour la réaction NHS/EDC ($\text{pH} \approx 7-8$), le chitosane majoritairement déprotoné a tendance à précipiter. Dans notre groupe de recherche, il a été mis en valeur par Parès et al. (2024), que l'ajout de bicarbonate de sodium permet d'augmenter le pH de la solution au-delà du pK_a du chitosane sans le faire précipiter (Parès et al., 2024). Le bicarbonate de sodium, étant une base faible ($\text{pK}_b \approx 7.6$), permet de moduler progressivement le pH de la solution sans entraîner de changements trop soudains dans celle-ci, ce qui permet d'éviter la déprotonation brutale du chitosane, et réduit ainsi le risque de précipitation du chitosane dans des conditions à pH neutre (*Sodium Bicarbonate* | 144-55-8, s. d.). En revanche, lorsqu'une base forte comme l'hydroxyde de sodium (pK_b proche de 0) est utilisée, la solution de chitosane subit une déprotonation immédiate, ce qui entraîne une précipitation non contrôlée de celle-ci (Ernesto et al., 2023; L. Liu, Tang, Wang, & Guo, 2011).

C'est cette astuce qui a été exploitée afin de coupler, pour la première fois, du chitosane et dextrane carboxyméthylé via la chimie NHS/EDC, conduisant à la formation d'un hydrogel stable, biocompatible et potentiellement efficace pour la prévention des adhérences postopératoires.

2.4 Contrôle de l'interface entre l'hydrogel et le matériel biologique

L'interaction à l'interface entre l'hydrogel et les éléments biologiques (cellules, protéines) peut être modulée soit par la composition même du matériau, soit par l'incorporation de biomolécules telles que des peptides d'adhésion ou des facteurs de croissance. Les performances d'un biomatériau ne dépendent pas uniquement de sa composition chimique ou de ses propriétés mécaniques globales, mais aussi de la nature des interactions qui se développent à son interface avec les tissus vivants. Le contrôle de l'interface entre l'hydrogel et le matériel biologique joue un rôle dans l'intégration de ces matrices dans l'environnement extracellulaire. En effet, cette interface conditionne en grande partie l'intégration, la biocompatibilité, et la réponse des cellules envers l'hydrogel (T. Sun & Qing, 2011).

2.4.1 Interactions entre la MEC et le matériel biologique

La matrice extracellulaire (MEC) est par définition le matériau de support biologique créé par la nature. En effet, elle est conçue et fabriquée sur mesure par les cellules résidentes de chaque tissu et organe, et se trouve dans un état d'équilibre dynamique avec son microenvironnement. Les molécules qui la composent permettent aux cellules environnantes de communiquer entre elles et avec l'extérieur de ce microenvironnement. De ce fait, elle est considérée comme intrinsèquement biocompatible car c'est le matériel biologique, plus précisément les cellules du corps, qui la produise et la forme (Badylak, 2007). Les cellules sont constamment en communication avec la MEC grâce à ses intégrines, qui sont des récepteurs à adhésion cellulaire et qui font le pont entre les protéines de la MEC. Ces intégrines permettent aux cellules de détecter et d'interpréter les signaux biochimiques et mécaniques présents dans la matrice. Elles activent des voies de signalisation intracellulaire qui influencent des processus tels que la survie, la prolifération, la différenciation ou encore la migration cellulaire, et modifient aussi activement la structure de la MEC en sécrétant des enzymes de remodelage telles que les métalloprotéinases matricielles (MMPs). Cette communication bidirectionnelle est au cœur de l'homéostasie tissulaire (Katsumi, Naoe, Matsushita, Kaibuchi, & Schwartz, 2005; Lu, Takai, Weaver, & Werb, 2011).

Dans de nombreuses approches d'ingénierie tissulaire, le but est de reproduire ou d'imiter ces interactions complexes afin de guider le comportement cellulaire de manière contrôlée. Les biomatériaux y sont souvent fonctionnalisés avec des motifs spécifiques (comme des peptides

d'adhésion, notamment la séquence peptidique RGD) pour favoriser l'adhésion des cellules et leur intégration au matériau (V. B. Kumar, Tiwari, Finkelstein-Zuta, Rencus-Lazar, & Gazit, 2023).

Cependant, dans le cadre de ce mémoire, l'objectif visé est contraire : il s'agit de concevoir des surfaces biologiquement compatibles, mais non adhésives pour les cellules. Cette approche, qui peut sembler peu intuitive (la biocompatibilité est souvent liée à l'adhésion cellulaire), répond cependant à certaines applications biomédicales précises. En effet, dans certains cas, empêcher les cellules l'adhésion est un avantage, comme pour les dispositifs d'anti-adhérences post-chirurgicales, les barrières tissulaires temporaires, ou les supports de livraison de médicaments.

Ainsi, si les interactions entre la MEC et les biomatériaux restent essentielles à comprendre, elles doivent ici être envisagées sous un angle différent : non pas pour favoriser l'intégration cellulaire, mais comme un facteur à maîtriser pour limiter l'adhésion des cellules, tout en maintenant une compatibilité avec l'environnement biologique. Cela implique de concevoir des interfaces capables de résister à l'adsorption protéique ou à la reconnaissance cellulaire via les intégrines, tout en s'insérant naturellement dans les tissus.

2.4.2 Biofonctionnalisation de la surface des hydrogels

Dans les approches classiques de biofonctionnalisation, l'ajout de motifs biologiquement actifs (comme des peptides ou des facteurs de croissance) à la surface d'un matériau vise principalement à promouvoir l'adhésion et la croissance cellulaire. Dans notre cas, où l'adhésion cellulaire n'est pas recherchée, la biofonctionnalisation conserve toute sa pertinence, mais dans une optique différente : il s'agit ici de concevoir des matrices/surfaces biofonctionnelles non adhésives ou « fantômes » pour les cellules, capables d'interagir avec l'environnement biologique de manière contrôlée, sans déclencher de migration cellulaire.

Dans notre groupe de recherche, plusieurs études ont été réalisées pour favoriser l'adhésion cellulaire en biofonctionnalisant des surfaces (2D) et des structures tridimensionnelles (3D) avec des peptides ou des facteurs de croissance. En effet, des peptides d'adhésion et des facteurs de croissance ont été greffés sur du dextrane carboxyméthylé pour des applications en vascularisation (Noel et al., 2016). Pour des matrices 3D, des hydrogels ont été biofonctionnalisés avec des peptides d'adhésion (RGD) et des facteurs de croissance pour le transport de cellules ou applications en ingénierie tissulaire et en vascularisation des tissus (Oliverio et al., 2024; Riahi, Liberelle, Henry, & De Crescenzo, 2017).

En somme, il est possible de concevoir des surfaces présentant une spécificité élevée, soit pour favoriser l'adhésion cellulaire, soit au contraire pour l'inhiber, selon les besoins de l'application visée. Dans ce mémoire, une condition expérimentale avec biofonctionnalisation de la surface des hydrogels par du RGD sera analysé au niveau du comportement cellulaire.

2.5 Application de ces systèmes hybrides non modifiés ou décorés

Le comportement non-adhésif de certains hydrogels, qu'ils soient non modifiés ou porteurs de motifs d'adhésion cellulaire, ne constitue pas nécessairement une limite. Il peut être recherché dans certaines applications biomédicales où l'on souhaite limiter l'interaction cellulaire directe avec le matériau et avoir une surface résistante à l'adhésion cellulaire, comme pour la prévention des adhérences post-chirurgicales.

Les systèmes hybrides développés dans ce projet, des hydrogels à base de chitosane et de dextrane, offrent de telles perspectives. Ces polysaccharides naturels, biocompatibles et hydrophiles, peuvent être réticulés et biofonctionnalisés de manière contrôlée pour former des matrices modulables.

2.5.1 Prévention des adhérences péritonéales et abdominales

Les adhérences péritonéales sont des complications fréquentes après des interventions chirurgicales abdominales ou pelviennes. Elles résultent d'une réponse inflammatoire locale suivie de la formation de ponts fibreux anormaux entre les organes internes et la paroi abdominale. Elles sont observées chez des patients jusqu'à 90 % après une chirurgie abdominale (L. Sun et al., 2024). Ces adhérences, formées par des ponts fibreux entre tissus cicatriciels, peuvent entraîner douleurs chroniques, des occlusions intestinales, et l'infertilité (Fatehi Hassanabad, Zarzycki, Jeon, Deniset, et al., 2021). Le péritoine, la fine membrane séreuse qui tapisse la cavité abdominale et entoure les organes abdominaux, joue normalement un rôle de barrière protectrice et de régulation des fluides corporels. En cas de lésion, il peut cicatriser de façon désorganisée, favorisant la formation d'adhérences. La **Figure 2.5** illustre l'organisation de la cavité péritonéale et la **Figure 2.6** présente ainsi que l'apparence du tissu fibreux lorsqu'il forme des adhérences :

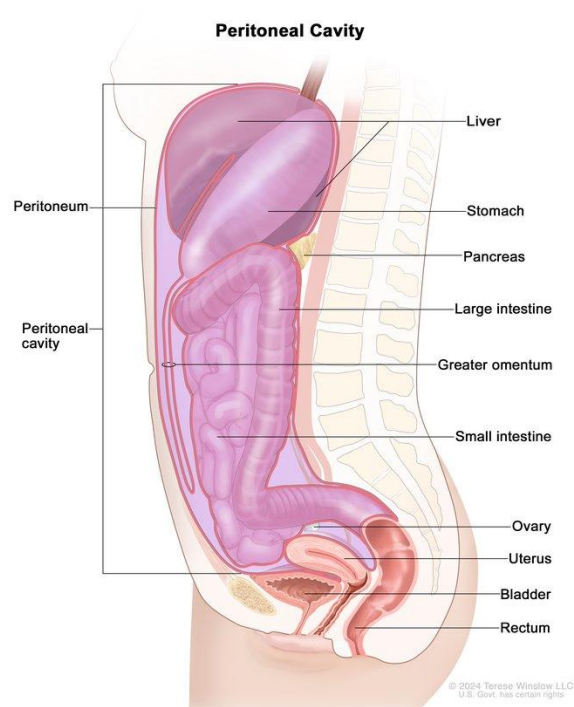


Figure 2.5 Cavité péritonéale, par Winslow, 2024. © 2024 par National Cancer Institute. Adapté avec permission.

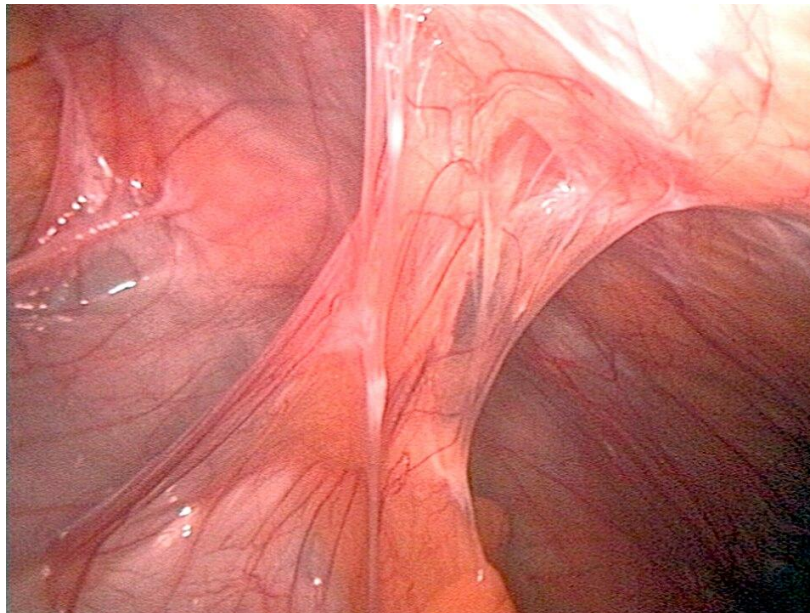


Figure 2.6 Adhérences après appendicectomie, par Hic et nunc, 2009, Wikimedia Commons. Image libre de droit.

Les techniques et méthodes utilisées/étudiées à ce jour pour prévenir ces adhérences sont :

I. Approches chirurgicales et techniques opératoires

L'une des premières lignes de prévention repose sur l'amélioration des techniques chirurgicales. La chirurgie mini-invasive (notamment la laparoscopie) est associée à un moindre traumatisme tissulaire, une réponse inflammatoire réduite et donc à une incidence plus faible d'adhérences (Szomstein, Menzo, Simpfendorfer, Zundel, & Rosenthal, 2006; Vetere et al., 2011). De plus, le respect des principes de manipulation atraumatique des tissus, la minimisation de la déshydratation péritonéale, l'hémostase rigoureuse et la réduction de la contamination par des corps étrangers (stérilisation) sont des mesures essentielles (Arung et al., 2011; Gumán-Valdivia-Gómez, Tena-Betancourt, & de Alva-Coria, 2019).

II. Barrières physiques antiadhérentes

Plusieurs dispositifs barrières ont été développés pour empêcher le contact direct entre les surfaces péritonéales lésées pendant la phase critique de cicatrisation (5 à 7 jours post-opératoires). Ces barrières peuvent être :

- Films ou feuilles biorésorbables (ex. Seprafilm® composé de sodium hyaluronane et de cellulose carboxyméthylée) appliqués entre les organes ou entre les organes et la paroi abdominale (J. Li et al., 2017; Liao et al., 2023).
- Hydrogels formant une couche protectrice temporaire (Liao et al., 2023).
- Systèmes de libération ciblée de médicaments : hydrogels injectables ou matrices polymériques libérant progressivement des substances actives (Du et al., 2019; Nie et al., 2023).

III. Approches pharmacologiques

L'utilisation de médicaments et/ou de molécules pour contrôler la réponse inflammatoire, la fibrinogénèse ou la fibrose, comprend notamment :

- Anti-inflammatoires (comme des corticostéroïdes) : réduisent l'inflammation initiale, mais leur efficacité clinique reste controversée (Arung et al., 2011; Sheng, Chen, Li, Zhang, & Zhang, 2023).

- Anticoagulants (comme héparine) : visent à limiter la formation de fibrine, substrat initial des adhérences, mais leur usage est limité par le risque de saignement (Arung et al., 2011).
- Thérapies à base de cytokines ou d'inhibiteurs de facteurs de croissance (ex. : TGF- β , VEGF) : afin de réguler les signaux moléculaires impliqués dans la réparation péritonéale (Atta, 2011; Kariya et al., 2018).

Ces stratégies, seules ou en combinaison, représentent des pistes prometteuses pour réduire l'incidence et la sévérité des adhérences post-opératoires. Dans ce mémoire, nous avons opté pour l'utilisation d'hydrogels en tant que barrière physique entre les tissus proches du lieu de l'opération chirurgicale. La **Figure 2.7** illustre le phénomène d'adhérences au niveau abdominal et la prévention de ces complications par l'isolation des tissus à l'aide d'un hydrogel en tant que barrière physique.

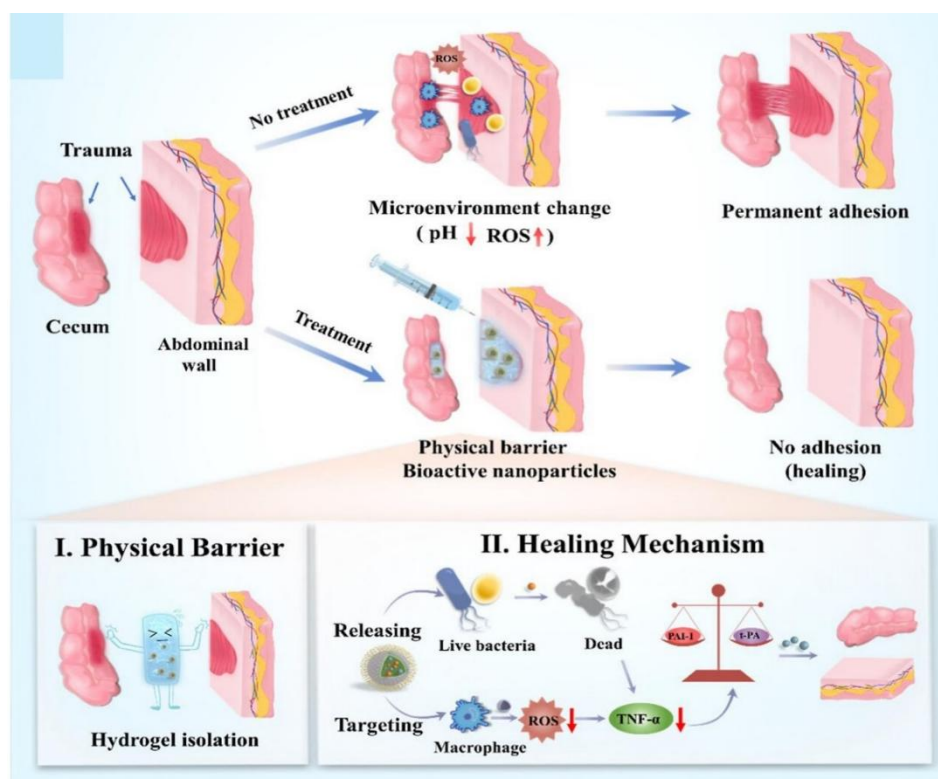


Figure 2.7 Schéma d'un modèle d'adhérence entre la paroi abdominale et le cæcum chez le rat, avec un traitement par hydrogel servant de barrière physique et libérant des médicaments à la demande de manière synchronisée. Adapté de Sun et al. (2024). Copyright © 2024, American Chemical Society.

L'introduction d'un hydrogel dans la zone ayant fait l'objet d'une intervention chirurgicale a montré des résultats encourageants. Dans le but de démontrer le potentiel des hydrogels élaborés dans ce mémoire, des essais *in vitro* ont été menés en sélectionnant une lignée cellulaire.

2.5.2 Le choix des cellules endothéliales vasculaires (HUVEC)

Dans le cadre de ce projet de recherche, le choix des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) repose sur leur capacité à mimer le comportement de l'endothélium vasculaire humain. Elles constituent un modèle de référence en ingénierie vasculaire pour évaluer les interactions entre les matériaux et les cellules adhérentes endothéliales, notamment en termes d'adhésion, de morphologie, de migration et de viabilité.

En utilisant les HUVEC comme outil de caractérisation biologique, il devient possible d'évaluer si les hydrogels développés sont susceptibles de supporter une colonisation cellulaire dans des cas où celle-ci serait souhaitée ou au contraire de repousser toute interaction cellulaire, comme dans le cas de barrières anti-adhérences.

2.5.3 Force et limite de ces systèmes

Les forces d'un système à base chitosane et de dextrane sont :

- Biocompatibilité et biodégradabilité : le chitosane et le dextrane sont dérivés de sources naturelles, bien tolérés *in vivo* (Dash, Chiellini, Ottenbrite, & Chiellini, 2011; Díaz-Montes, 2021; X. Liu et al., 2011).
- Capacité de résistance à l'absorption non spécifique : le dextrane limite l'adsorption protéique non spécifique, un facteur clé dans la réduction de l'adhésion cellulaire indésirable (Park et al., 2013).
- Adaptabilité chimique : par modification chimique (carboxyméthylation) et en variant la concentration en polymères, il est possible moduler la rigidité (Noel et al., 2016; Oliverio et al., 2024).
- Facilité d'application *in situ* : ces hydrogels peuvent être injectés ou appliqués en gel liquide qui se solidifie rapidement, réduisant la complexité chirurgicale (Du et al., 2019; Nie et al., 2023).

En revanche les limites de ces systèmes sont :

- Manque d'intégration tissulaire à long terme : En limitant l'adhésion cellulaire, ces hydrogels peuvent empêcher la régénération contrôlée du tissu si une réparation durable est souhaitée.
- Risques de mouvements : Sans fixation adéquate, le matériau peut se déplacer ou se fragmenter, compromettant son efficacité (Arung et al., 2011).

Ainsi, on comprend que les hydrogels représentent une solution adéquate pour le traitement de prévention des adhérences postopératoires et que le choix des HUVEC semble être une lignée cellulaire adéquate pour démontrer le comportement non-adhésif *in vitro* des hydrogels à base de chitosane et de dextrane.

CHAPITRE 3 HYPOTHÈSE DE RECHERCHE – OBJECTIFS SPÉCIFIQUES

Plusieurs chimies ont été développés pour produire des hydrogels à base de chitosane et de dextrane afin de prévenir les adhérences cellulaires. Cependant, certaines d'entre elles soulèvent des préoccupations, notamment en ce qui concerne l'apparition de réactions secondaires, la formation de sous-produits indésirables, ou encore l'utilisation de produits toxiques (Aziz et al., 2012; Cabral et al., 2014; Lauder et al., 2011; Lauder et al., 2012; G. Liu et al., 2009). Ainsi, ce projet vise à préparer des hydrogels composés de chitosane et de dextrane modifiés, tout en utilisant une chimie simple et polyvalente, sans réactions secondaires et produits dérivés indésirables et/ou toxiques.

« **Hypothèse de recherche** : Comme rapporté par Komoto et al. (2019) et Parès et al. (2024), l'ajout de bicarbonate de sodium permet d'obtenir un chitosane déprotoné, et sans précipitation lorsque mélangé en solution avec un polysaccharide anionique, tel que le dextrane. La réticulation subséquente du chitosane avec le dextrane via la chimie NHS/EDC conduit à des hydrogels clairs, stables, non adhésifs pour les cellules et adaptés mécaniquement aux tissus mous. »

L'objectif principal de ce projet de maîtrise est par conséquent de développer une chimie simple, sans sous-produits cytotoxiques et réactions secondaires indésirables, permettant d'obtenir des hydrogels homogènes, stables et modulables, à base de chitosane et de dextrane, tout en étant biocompatible, dotés de propriétés mécaniques similaires à celles des tissus mous, et présentant un comportement répulsif vis-à-vis des cellules.

Afin d'atteindre cet objectif, le projet a été découpé en 4 **sous-objectifs** :

- 1) Développer une chimie de réticulation covalente permettant de préparer des hydrogels homogènes en chitosane et en dextrane, ne produisant ni réaction secondaire, ni produits indésirables;
- 2) Développer des formulations pour des hydrogels dont les propriétés mécaniques sont comparables aux tissus mous (module de compression de l'ordre du kPa);
- 3) Moduler le temps de gélification en caractérisant les propriétés rhéologiques des solutions gélifiantes.
- 4) Évaluer le comportement des cellules *in vitro* sur les hydrogels produits.

CHAPITRE 4 ARTICLE 1 CHITOSAN AND CARBOXYMETHYLATED DEXTRAN HYDROGELS CROSSLINKED WITH NHS/EDC FOR PREVENTING POSTOPERATIVE ADHESIONS

Submitted article to journal *ACS Biomaterials Science & Engineering* on May 16th, 2025.

Vaiana Moreau,^{a,b} Benoît Liberelle,^a Faranak Baniahmad,^a Nick Virgilio,^{a,b} and Gregory De Crescenzo^{a}*

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

^b Department of Chemical Engineering, Centre de Recherche sur les systèmes Polymères et Composites à haute performance (CREPEC), Polytechnique Montréal, Montréal H3T 1J4, Québec, Canada.

* Corresponding author

ABSTRACT

Postoperative adhesions (POA) are a frequent complication arising after surgery, typically causing pain and inflammation. Additionally, the treatment of these adhesions leads to significant costs, creating a considerable financial strain on both patients and healthcare systems. To address this issue, we have developed fully biocompatible hydrogels composed of chitosan (CHI) and carboxymethylated dextran (CMD), crosslinked with NHS/EDC chemistry, as a surgical aid and physical barrier against POA. We tested a wide range of CHI:CMD mixtures for their gelling kinetics. Those were shown to be tuned with temperature, ranging from approx. 1 min at 37 °C, to over 30 min at 4 °C - making these hydrogels injectable and/or moldable. Ultimately, we showed that the crosslinking chemistry using NHS/EDC can be used with any biopolymer pair containing amino and carboxylic groups, making this approach accessible, well-defined and highly versatile for the preparation of hydrogels destined to the prevention of postoperative adhesions (POA), and for biomedical applications in general.

Keywords: Hydrogels, chitosan, dextran, polysaccharides, NHS/EDC, crosslinking.

4.1 Introduction

Postoperative adhesions (POA) are a common and significant complication associated with various surgeries. They are characterized as abnormal tissue growth; whereby fibrous tissue develops and attaches to nearby healthy organs. Adhesion bands can take various appearances, from thin fibrous layers between adjacent tissues to more complex formations that include fibrous tissue, blood vessels, and nerves (Arung et al., 2011). POA are a normal part of the healing process in the human body. However, they can lead to a range of undesirable post-operative complications, such as severe chronic pain, organ malfunction, and an increased need for further surgical interventions. These additional surgeries may include adhesiolysis, a procedure to remove the adhesions

themselves (Fatehi Hassanabad, Zarzycki, Jeon, Deniset, et al., 2021). POA can arise as a result of surgical trauma, inflammation, or infection and may restrict the normal motion or functions of organs, potentially endangering the patient's life (Fatehi Hassanabad, Zarzycki, Jeon, Dundas, et al., 2021; Liao et al., 2023). Such complications have been predominantly found in the abdominal region of the body after pelvic, peritoneal or thoracic surgeries (Fatehi Hassanabad, Zarzycki, Jeon, Deniset, et al., 2021).

Many treatments, methods and approaches have been developed to reduce and prevent POA. At present, the main strategies for preventing POA are based on physical barriers and/or pharmacological treatments. The use of a biomaterial as a physical barrier system remains a potential solution for controlling undesired adhesions. Polymer-based physical barriers have received considerable attention for their role in preventing the formation of fibrous tissue between healthy organs, by minimizing the connection of injured tissues during the healing process (Liao et al., 2023). Natural biopolymers, such as chitosan, hyaluronic acid, dextran or cellulose, and synthetic polymers such as poly(ethylene glycol), polylactide, poly(vinyl alcohol) or polyglycolide, have been tested for this application (J. Li et al., 2017). Polymeric biomaterials have also attracted great attention for their ability to act as both barriers and drug carriers, making them particularly effective in preventing POA (Liao et al., 2023).

Hydrogels have been identified as efficient physical barriers to prevent tissue adhesion, serving as a complement to surgical operations (G. Liu et al., 2009). Hydrogels are typically highly hydrated 3D networks of cross-linked polymer chains, forming a very soft solid with mechanical properties similar to soft tissues – they are capable of absorbing and retaining a large quantity of water or biological fluids, allowing them to mimic the extracellular matrix and ensuring a good integration near the tissues once in the body (M. Chen et al., 2025; Zhang & Khademhosseini, 2017).

Regarding the prevention of POA, hydrogels can be applied in the surgical cavity just after the main intervention. Of interest, they may perform several functions in addition to preventing adhesions, such as controlling bleeding and keeping tissues in their proper position.

In the last decades, hydrogels based on chitosan and dextran have been tested for the prevention of postoperative adhesions after different types of surgery, including in the ear, nose and throat, or in the abdominal region. These studies have demonstrated substantial reductions of POA within the surgical site (Aziz et al., 2012; Cabral et al., 2014; Lauder et al., 2011; Lauder et al., 2012; G. Liu et al., 2009). Chitosan (CHI) is a copolymer of glucosamine and N-acetylglucosamine units, derived from the deacetylation of chitin, known for its biocompatibility and biodegradability properties. Due to its significant hemostatic, antibacterial, and wound-healing properties, this material has found widespread application in the medical field (such as carriers for drug delivery, wound bandages or scaffolds for tissue regeneration). However, it is also recognized that chitosan ($pK_a \approx 6.5$) has limited solubility in neutral and basic media, which limits its application under physiological conditions (Aranaz et al., 2021; Di Martino, Sittinger, & Risbud, 2005; J. Li et al., 2017).

Dextran is a branched polysaccharide composed of glucose units, produced by certain bacteria such as *Leuconostoc* and *Streptococcus*, during the fermentation of sugars like sucrose. Dextran has many advantages for biomedical applications, including properties like biocompatibility, biodegradability, high solubility, low toxicity and non-immunogenicity (Hu, Lu, & Luo, 2021; J. Li et al., 2017). Dextran is also known for its low-fouling behavior, a quality that naturally prevents non-specific protein adsorption and inhibits cell adhesion. Consequently, dextran-based materials are excellent candidates for preventing POA (Liao et al., 2023).

Various groups (Aziz et al., 2012; Cabral et al., 2014; Lauder et al., 2011; Lauder et al., 2012; G. Liu et al., 2009) have developed chitosan-dextran hydrogels for POA applications. Their approach consisted first in modifying both natural polymers to obtain succinyl-chitosan and oxidized dextran (ODA). The added succinyl groups improved the solubility of chitosan in water and prevented it from precipitating when mixed with dextran. The remaining amino groups of chitosan were then involved in a crosslinking reaction with the aldehyde groups of ODA. The resulting hydrogel was reported to be biocompatible, non-cytotoxic and preventing pro-inflammatory immune response *in vivo*. Of great interest, these hydrogels demonstrated a significant reduction in the formation of intra-abdominal adhesions and in endoscopic sinus surgery. The authors acknowledged that the use of sodium periodate in ODA preparation may result in undesirable byproducts (e.g., sodium iodate or formic acid) and an unwanted over-oxidation of dextran. This over-oxidation reaction reduces the availability of aldehyde functionality and decreases the molecular weight of the dextran (Aziz et al., 2012; Cabral et al., 2014; Lauder et al., 2011; Lauder et al., 2012; G. Liu et al., 2009).

Other groups have also used the water-soluble and biocompatible N,O-carboxymethyl chitosan (NOCC) alone or in combination with ODA in hydrogels designed to prevent POA. NOCC and ODA can also create hydrogels by reacting together via a Schiff base-type reaction between the amino groups of NOCC and the aldehyde groups of ODA, similarly to the succinyl chitosan and ODA. As periodate-oxidized dextran is used, this formulation faces the same synthesis challenges in preparing ODA (Kennedy, Costain, McAlister, & Lee, 1996; Hongbin Li et al., 2021; J. Li et al., 2017; Lou et al., 2012).

Despite the constraints of biopolymer modifications, all these groups have demonstrated that chitosan-dextran hydrogels significantly reduce POA in intra-abdominal adhesions and endoscopic sinus surgery (Aziz et al., 2012; Cabral et al., 2014; Kennedy et al., 1996; Lauder et al., 2011;

Lauder et al., 2012; Hongbin Li et al., 2021; J. Li et al., 2017; G. Liu et al., 2009; Lou et al., 2012). Considering the substantial potential of chitosan-dextran hydrogels for treating POA issues, it would be desirable to develop a simple approach to crosslink chitosan and dextran without having to resort to complex or hard-to-control polymer modification steps. As such, we hypothesized that the amino groups of unmodified chitosan (CHI) could react with the carboxylic groups of carboxymethylated dextran (CMD) via the well-known, non-cytotoxic and simple N-hydroxysuccinimide (NHS) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) chemistry, yielding crosslinked chitosan-dextran hydrogels. While commonly used to produce collagen-based hydrogels (Grabska-Zielińska et al., 2021; Pieper et al., 2000; Wissink et al., 2001), the NHS/EDC crosslinking strategy has not yet been considered to prepare CHI-CMD hydrogels. One of the major challenges in the formation of CHI-CMD gels is the spontaneous precipitation following their combination in solution, when the pH is adjusted to reach optimal conditions for the NHS/EDC chemistry.

In this work, sodium bicarbonate is added to the polymer mixture to address the insolubility and precipitation issues, as demonstrated successfully for CHI and sodium alginate, an anionic polysaccharide (Komoto, Furuike, & Tamura, 2019; Parès et al., 2024). We also examine the impact of the reaction conditions, including CHI:CMD ratio, reaction temperature and pH, to investigate the swelling behavior, crosslinking rate and mechanical properties of the hydrogels. We finally evaluate the contribution of each polymer individually and their combination in preventing cell adhesion.

4.2 Experimental Section

4.2.1 Materials

Chitosan (CHI) grade 85/60/A1 was purchased from BioLog Heppe GmbH (Landsberg, Germany) (degree of deacetylation (DDA) of 85%; viscosity = 60 mPa·s @ 1% w/v in 1% acetic acid; Mn ranges from 50 to 100 kDa, as provided by the supplier). Dextran (Mw = 500 kDa) was obtained from Pharmacosmos (Holbaek, Denmark). Bromoacetic acid was purchased from Sigma-Aldrich Canada, Ltd. (Oakville, ON). Sodium hydroxide (NaOH, 99% purity), hydrochloric acid (HCl, 37.7% v/v), glacial acetic acid and ethanol (EtOH, 99.9%) were obtained from VWR International, Ltd. (Quebec, Canada) and used as received. Sodium bicarbonate (NaHCO₃, #S6014, 99.7% purity), N-hydroxysuccinimide (NHS, 98% purity), ethyl-N'-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC, 99+% purity), phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4, 10 mM, powder form), aminopropyltriethoxysilane (APTES, 99% purity), (3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (GOPS, purity ≥ 98%) and ethanolamine (EtA, purity ≥ 98%) were purchased from Sigma-Aldrich. Potassium hydroxide (KOH, technical grade) and isopropanol were obtained from Fisher Scientific (Alberta, Canada). Sodium alginate (SA) IL-6G grade was obtained from Kimica (Pain, Chile) and is characterized by a mannuronate-to-guluronate (M/G) ratio of 0.5, a viscosity range of 30–60 mPa·s, and a number-average molecular weight (Mn) of 67 ± 8 kDa (Safi et al., 2022). Milli-Q water (18.2 MΩ·cm; total organic compounds (TOC) = 4 ppb) was generated with a Millipore Gradient A10 purification system.

FreeStyle™ F17 Expression Medium (F17), succinimidyl 6-((beta-maleimidopropionamido) hexanoate) (SMPH), N-ε-Maleimidocaproic acid hydrazide (EMCH) and genipin (M_w = 226.23 g·mol⁻¹, purity > 98%) were supplied by ThermoFisher Scientific. The cysteine-terminated peptide CGGRGDS (RGD) was provided by EZBiolab (98%, N-terminal acetyl, C-terminal amide, New

Jersey, USA). Round glass coverslips (12 mm diameter and 0.09-0.12 mm thickness) were bought from Merlan (Ontario, Canada). 25-cm² and 75-cm² CellBind flasks as well as 24-well CellBind culture plates were purchased from Corning (New York, USA). Cloning cylinder molds were obtained from Millipore Sigma at 2 different sizes: small ones (inner diameter: 6.4 mm; height: 8 mm) and large ones (inner diameter: 9.8 mm; height: 11 mm).

4.2.2 Preparation of Carboxymethyl Dextran and Chitosan

Production of Carboxymethylated Dextran (CMD). Dextran T-500 was dissolved in 5 M NaOH solution at 4% w/v in a 50 mL falcon until complete dissolution (800 mg of dextran for 20 mL of 3 M NaOH solution). Then, 2.4 g of bromoacetic acid was added to this solution. The 50 mL falcon tube was closed with parafilm and sealed with aluminum foil under mild stirring overnight. The solution was next filtered six times using Amicon Ultra-15 with 10 kDa membrane centrifugal filter units (Merck Millipore, Tullagreen, Ireland) at $4000 \times g$ for 30 min, to withdraw any unreacted reagents. Finally, the CMD solution was freeze-dried and stored at 4 °C. CMD was next characterized by ¹H NMR at 50 °C in D₂O. The degree of carboxymethylation (dcm) was evaluated at 30% (Benoît Liberelle et al., 2014).

Purification of Chitosan (CHI). CHI was dissolved at 1% w/v in a 0.1 M HCl solution and sonicated until complete dissolution. The solution was filtered with PROGENE vacuum filtration units (polyether sulfone membrane, 0.22 µm pore size, Ultident Scientific, Quebec, Canada) and brought to a neutral pH, using 5 M NaOH before freeze-drying.

4.2.3 Production of CHI and CMD Hydrogels

First, freeze-dried CMD was dissolved at 2% w/v in Milli-Q water until complete dissolution. Then, 866.7 µL of NHS (0.1 M in Milli-Q water) and 866.7 µL of EDC (0.4 M in Milli-Q water) were added to 4 mL of the CMD solution and left at rest at 4 °C for 15 min. After NHS/EDC

addition, the CMD solution was at a concentration of 1.4 % w/v. Secondly, freeze-dried CHI was dissolved at 2% w/v in a 0.1 M HCl solution and sonicated until complete dissolution. Sodium bicarbonate (NaHCO_3) powder was then added to the CHI solution until a neutral pH was obtained (sodium bicarbonate addition ranging from 2% w/v to 4.5% w/v), followed by instantaneous vigorous stirring, degassing and sonicating; and finally stored at 4 °C in a refrigerator for 15 min.

Mixed CHI:CMD solutions were prepared at a total concentration of 1.6% w/v. The volumes of CHI and CMD solutions were adjusted to obtain the desired volumetric ratios and corresponding NH_2/COOH molar ratios (see **Table 4.1**).

Table 4.1 Impact of the CHI:CMD ratio and reaction conditions on hydrogel preparation.

Condition	CHI:CMD Ratio (%v/v)	NH_2/COOH Ratio	NHS/EDC	pH of CHI solution (adjusted by NaHCO_3)	Gelation
1	20:80	1.0	+	7.0 – 7.5	Yes
2	30:70	1.7	+	7.0 – 7.5	Yes
3	40:60	2.7	+	7.0 – 7.5	Yes
4	50:50	4.0	+	7.0 – 7.5	Yes
5	50:50	4.0	+	1.0 – 1.5 (without NaHCO_3)	No
6	50:50	4.0	+	7.0 – 7.5 (with NaOH)	No
7	50:50	4.0	-	7.0 – 7.5	No
8	60:40	6.0	+	7.0 – 7.5	Yes
9	70:30	9.3	+	7.0 – 7.5	Yes
10	80:20	15.9	+	7.0 – 7.5	Yes
11	90:10	35.9	+	7.0 – 7.5	Yes

Briefly, for a 50:50 %v/v CHI:CMD hydrogel (corresponding to condition 4 in Table 1), 4 mL of the CHI solution were added to the CMD-EDC/NHS solution (ca. 5.7 mL, 4 mL of CMD + 1.7 mL of NHS/EDC), followed by vortexing and sonicating. 850 μ L of the obtained solution was rapidly injected into a cloning cylinder mold (inner diameter: 9.8 mm; height: 11 mm). All molds were then stored in a humid incubator at 37 °C for 3 h to initiate the crosslinking reaction, and then let at room temperature for 24 h to complete the crosslinking process. Finally, the hydrogels were delicately removed from their molds.

4.2.4 Swelling Behavior in Water, PBS and Cell Culture Medium

The dimensions of all hydrogels were measured using an electronic micrometer immediately after removing the hydrogels from the molds. They were then stored for 3 days, either in Milli-Q water, PBS or F17 culture media. The volumetric swelling capacity (VSC) of the bulk hydrogels was calculated as follow (Equations 4.1 and 4.2).

$$V = \pi \times \frac{D^2}{4} \times h_0 \quad (4.1)$$

$$VSC = \frac{V_{final} - V_{initial}}{V_{initial}} \times 100 \quad (4.2)$$

where V is the hydrogel volume, and D and h are respectively the diameter and height/thickness of the hydrogel, V_{final} is the hydrogel volume after 3 days in either water, PBS or F17 medium, and $V_{initial}$ is the volume right after preparation. At least 5 hydrogels were tested for each condition.

4.2.5 Rheological Characterization

Gelation time and viscoelastic properties were measured using a stress-controlled Anton-Paar Physica MCR 501 commercial rheometer (Graz, Austria) with a cylindrical geometry (cup diameter: 18.066 mm and bob diameter: 16.66 mm) (C.-S. Wang, Virgilio, Wood-Adams, &

Heuzey, 2018) in order to monitor the gelling kinetics of CHI/CMD solutions. Dynamic time sweep measurements were performed at an angular velocity $\omega = 1$ rad/s and strain amplitude $\gamma_0 = 3\%$ for at least 1000 min and up to 4 days. Experiments at different CHI/CMD ratios were all carried out at 37 °C, whereas gelation time as a function of temperature was also investigated at a 1:1 %v/v CHI:CMD ratio, at 4 °C, 12 °C and 20 °C. For all measurements, a thin layer of low viscosity mineral oil was added on top of the solution in the geometry to prevent drying (this thin film does not impact the results). The storage (G') and loss (G'') moduli were recorded as a function of time to determine the gelation time t_{gel} , established at the crossover of G' and G'' (i.e. when $G' = G''$), over which $G' > G''$, until a plateau was reached, indicating gelation completion. For each condition, the experiment was performed at least 3 times.

4.2.6 Mechanical Characterization: Compression Modulus

Mechanical characterization was performed using a Mach-1 Mechanical Tester (Biomomentum, Laval, Canada, Actuator A400.25, load cell of 150 g, 20 mm diameter indenter) controlled by the Mach1Motion v3.1.3 software. The diameter of the indenter was selected to be slightly larger than the diameter of the gels. Compression tests were performed in 2 steps: (1) the indenter finds contact first with the hydrogel surface (set when a load of 0.25 g is recorded) at a speed of 25 $\mu\text{m/s}$; (2) a compression corresponding to a displacement of 275 μm at a speed of 50 $\mu\text{m/s}$ is applied. This speed and ramp were chosen to make sure the hydrogel did not break, and to reach a deformation of about 2-3%, respectively. The compression modulus was evaluated during the second step, the instrument recording the displacement (Δh in μm) and the applied load (G in kg) as a function of time at an acquisition rate of 0.1 s^{-1} . The strain applied (ε in %) and corresponding stress measured (σ in Pa) were calculated as follow (Equations 4.3 and 4.4):

$$\varepsilon = \frac{\Delta h}{h_0} \quad (4.3)$$

$$\sigma = \frac{G \times g}{\pi \times \frac{D^2}{4}} \quad (4.4)$$

where ε is the strain (in %), Δh is the deformation (or compression, in μm) at a certain time, h_0 the initial height (thickness, in μm) of the gel, G is the load measured by the instrument (in kg), g the standard gravity (in g, in m.s^{-2}) and D is the diameter of the gel (in μm). Compression stress (σ) was plotted as a function of strain (ε), and a linear regression was applied to extract the compression modulus. We assumed that at this small strain, the diameter did not change and remained constant. The compression modulus of each hydrogel was measured twice: before and after 3 days of immersion in aqueous solutions (water, PBS or F17).

4.2.7 Preparation of Glass Coverslips

Glass coverslips were used as cell culture support to evaluate the contribution of each polymer individually (2D surfaces grafted with the biopolymers) and their combination (3D hydrogels, i.e. thin hydrogel layers grafted on the surfaces) on cell adhesion. In order to covalently bound polymers and hydrogels on glass surfaces, glass coverslips were first silanized with (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) or (3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (GOPS) to expose amino or epoxy groups on their surfaces, respectively. As previously reported (Stil et al., 2023), glass coverslips were first cleaned in an alkaline bath (KOH-saturated isopropanol solution) overnight and then rinsed 3 times by soaking in Milli-Q water. Then, GOPS or APTES were deposited on the coverslips in gas phase overnight by adding 4-5 droplets of either silane coupling agent at ca. 3 cm from the glass coverslips in a 50 mL falcon. The coverslips were then placed in

an oven for 180 min at 110°C to chemically bind the silane molecules to the glass substrate. Finally, the modified coverslips were washed in ethanol and MilliQ water.

4.2.8 Attachment of CHI and CMD Polymers on Glass Surfaces (2D)

CHI and CMD polymers were grafted on GOPS-functionalized glass coverslips and on APTES-functionalized glass coverslips, respectively. For CHI grafting, the epoxy groups of GOPS reacted with the amino groups of CHI by covering the GOPS-functionalized coverslips with 200 μ L of a CHI solution (1 mg/mL in 0.1 M HCl) for 100 min. For CMD grafting, amino groups of APTES reacted with the carboxylic groups of CMD using NHS/EDC chemistry. For this purpose, 200 μ L of a CMD solution (2 mg/mL in Milli-Q water containing 40 mM EDC and 10 mM NHS) was deposited on APTES-functionalized coverslips for 30 min. Polymer-grafted coverslips were finally rinsed by soaking once in PBS and twice in Milli-Q water.

4.2.9 Attachment of Thin Hydrogel Films on Glass Surfaces (3D)

Two different hydrogel layers were attached on glass substrates. First, thin hydrogel films made of CHI and CMD were grafted onto APTES-functionalized glass coverslips by creating covalent bonds between the surface-exposed amino groups of APTES, and carboxylic acid groups of the gel, using NHS/EDC chemistry. To do so, 30 μ L of the gelling solution (corresponding to Condition 4 in Table 1) was deposited on the APTES-functionalized coverslips for 30 min and washed by soaking once in PBS and twice in Milli-Q water.

Second, a pristine CHI solution at 2 %w/v diluted in 0.1 M HCl was crosslinked with genipin (concentration of 0.05 %w/v). 30 μ L of this gelling solution were then deposited on GOPS-functionalized glass coverslips for 30 min, allowing the epoxy groups of GOPS to react with the amino groups of CHI. The coverslips were washed by soaking them in PBS (1 time), and in Milli-Q water (2 times).

4.2.10 RGD Functionalization of CMD-covered surfaces (2D) and Grafted Thin Hydrogels (3D)

CMD-covered glass coverslips and hydrogels were functionalized with the CGGRGD adhesion peptide using 2 different methods (2 different linkers).

For CHI hydrogels crosslinked with genipin (3D), succinimidyl 6-((beta-maleimidopropionamido) hexanoate) (SMPH) was used to link the thiol group of the cysteine-terminated peptide and the surface-exposed amino groups from CHI. 200 μ L of SMPH linker (1 mM in 1:9 ratio of DMSO:PBS) was deposited onto the hydrogels for 1 h. The surfaces were then rinsed by soaking in PBS solution (1 time) and Milli-Q water (2 times). Finally, 200 μ L of RGD (100 μ M dissolved in Milli-Q water) solution was added to the surfaces for 1 h and subsequently washed by soaking in PBS solution (1 time) and Milli-Q water (2 times).

N- ϵ -Maleimidocaproic acid hydrazide (EMCH) was used on CMD (2D) and on CHI:CMD hydrogels (3D) to link the thiol group of the cysteine-terminated peptide and the surface-exposed carboxymethylated groups from the CMD. The COOH groups were first activated using 100 μ L of 0.4 M EDC and 100 μ L of 0.1 M NHS was deposited onto the CMD surfaces and CHI:CMD hydrogels for 15 min and rinsed with MilliQ water (2 times). 200 μ L of EMCH linker (1 mM in 1:9 ratio of DMSO:PBS) was deposited onto the activated surfaces for 1 h. The surfaces were then rinsed by soaking in PBS solution (1 time) and Milli-Q water (2 times). 100 μ L of ethanolamine was finally deposited onto CMD (2D) and on the thin hydrogels (3D) to block the remaining activated COOH site. The surfaces were once again rinsed by soaking in PBS solution (1 time) and Milli-Q water (2 times). Finally, 200 μ L of RGD (100 μ M dissolved in Milli-Q water) solution was added to the surfaces for 1 h and subsequently washed by soaking in PBS solution (1 time) and Milli-Q water (2 times).

4.2.11 Cell Culture

a. Cell Adhesion Assays

HUVEC were cultured in Endothelial Growth Medium-2 (EGM-2) (Lonza, Massachusetts, USA; #CC-3162), composed of basal medium (EBM-2) (Lonza, Massachusetts, USA; #CC-3156) supplemented with antibiotics, fetal bovine serum (FBS, 2%), heparin, hydrocortisone, ascorbic acid, and growth factors (human Epidermal Growth Factor (hEGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Human Fibroblastic Growth Factor (hFGF-B), insulin-like growth factor (R3-IGF-1)) (SingleQuots supplement kit, Lonza, Massachusetts, USA; #CC-4176). The cells were maintained in a humidified incubator (37 °C, 5% CO₂). The culture medium was changed every 2 days, and cells were used between passages 3 and 5.

b. Cell Adhesion Assays

2D and 3D-modified coverslips were sterilized in 70% v/v aqueous ethanol and then washed 3 times with Milli-Q water and inserted in a 24-well plate. 50 000 cells were seeded on top of all surfaces. For that purpose, a small cloning cylinder (I.D: 6.4 mm; H: 8 mm) was placed in each well before adding the cells inside it (ca. 200 µL) for 24 h. Cloning cylinders were used to ensure that the cells adhere to the top of the coverslip and not underneath it. Surfaces were next gently washed once with sterile PBS (pH 7.4) and incubated for 30 min with basal media to remove poorly attached cells. Following this, wells were rinsed another time with PBS before adding complete medium prior to imaging.

c. Cell Imaging

Cells on coverslips were imaged with an EVOS M5000 Imaging System (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at a magnification of 10 $\times$.

4.3 Results

4.3.1 Production of CHI/CMD Hydrogels

To prepare chitosan/dextran hydrogels, dextran chains were first modified to incorporate carboxylic acid functionalities (**Figure 4.1A**). Carboxymethyl ($-\text{CH}_2\text{-COOH}$) groups were introduced by the reaction of bromoacetic acid with the $-\text{OH}$ groups of dextran chains. Of interest, this reaction produces carboxymethylated dextran (CMD) without degrading the polysaccharidic backbone, unlike methods relying on periodate oxidation (Heinze, Liebert, Heublein, & Hornig, 2006; Benoit Liberelle et al., 2010). The carboxylic acid groups of CMD were then linked to chitosan (CHI) using EDC and NHS as coupling agents (**Figure 4.1B**). More specifically, NHS-activated CMD reacted with the amino groups of CHI to form stable amide bonds. This crosslinking reaction resulted in clear and homogeneous hydrogels.

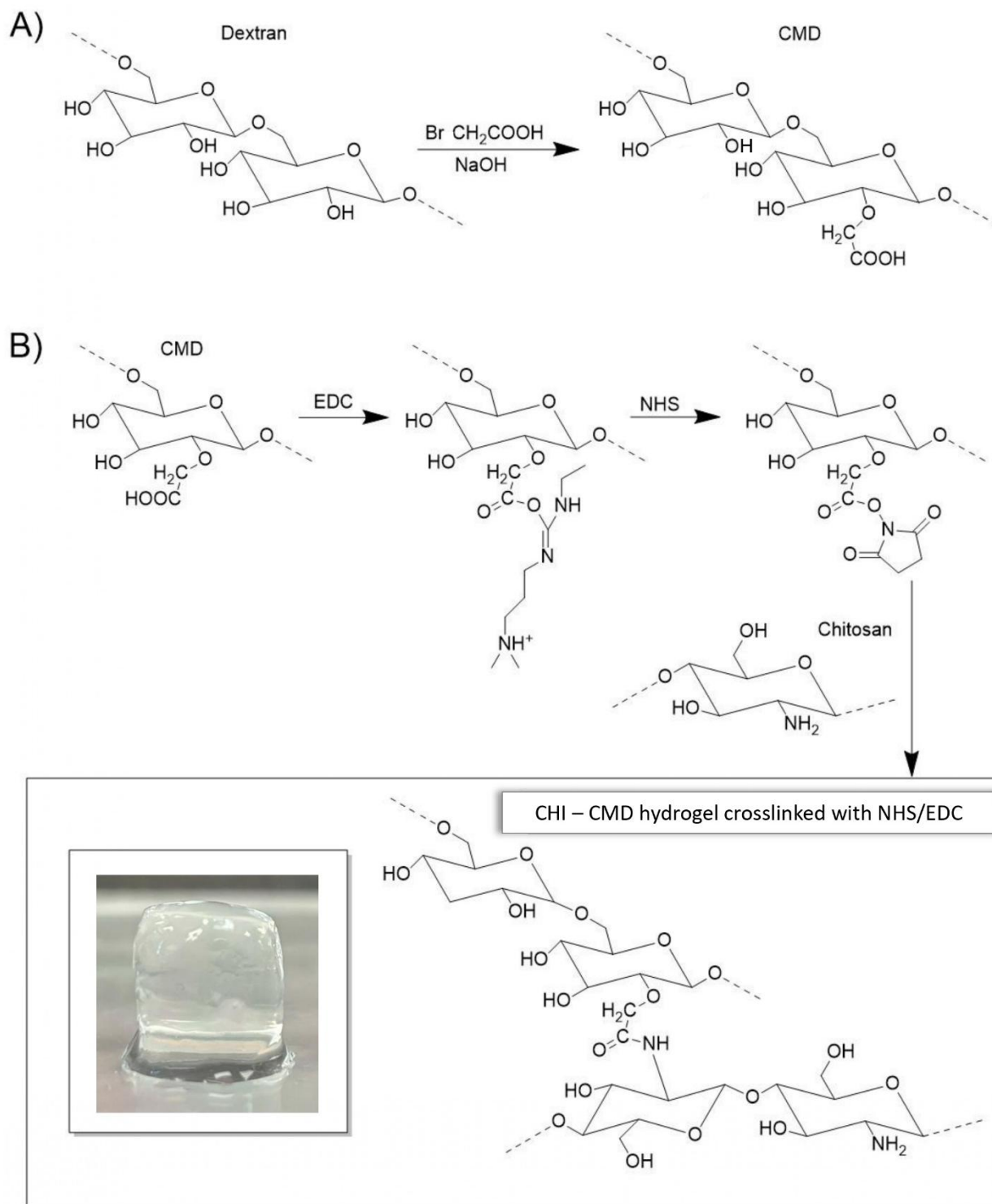


Figure 4.1 (A) Synthesis of carboxymethylated dextran (CMD) with bromoacetic acid; (B) Crosslinking reaction of CMD and chitosan (CHI), using EDC/NHS chemistry.

Hydrogel formation was first investigated by mixing 4 mL of 2% w/v of CHI solution with 4 mL of a 2% w/v CMD solution that was activated with 1.7 mL of EDC/NHS. The volume ratio of CHI and activated CMD solution was varied from 20:80 to 90:10, i.e. NH_2/COOH molar ratio ranging from 1 to 35.9 (Table 1), while the CHI+CMD:NHS/EDC ratio was kept constant at 8:1.7 v/v. After a reaction time of 3 h at 37 °C and 24 h at room temperature, all systems containing NHS/EDC and prepared with a CHI solution at pH 7.0-7.5 (pH adjusted with the addition of sodium bicarbonate) resulted in gel formation (**Table 4.1**, conditions 1-4 and 8-12).

The influence of some reaction parameters - i.e. presence of NHS/EDC, pH adjustment using NaHCO_3 - was assessed for the 50:50 ratio of CHI:CMD. In the absence of NHS/EDC (Table 1, condition 7), the combination of CHI and CMD did not result in gelation. NHS/EDC do indeed act as crosslinking agents required for the formation of hydrogels. Without pH adjustment using NaHCO_3 in the CHI solution (pH 1-1.5; **Figure 4.7**; **Table 4.1**, condition 5), or when the pH was adjusted at 7-7.5 with NaOH instead of NaHCO_3 (**Table 4.1**, condition 6), no gelation was observed when activated CMD was added. To ensure complete dissolution of CHI, it is essential to significantly protonate the amino groups of CHI ($\text{pK}_a \approx 6.5$) (Aranaz et al., 2021; Thakur & Thakur, 2014). For this reason, CHI is initially dissolved in an acidic solution (pH 1-1.5). However, the NHS/EDC-mediated crosslinking reaction requires unprotonated amino groups. When NaOH was used to increase the pH, CHI precipitated (**Table 4.1**, condition 6). On the contrary, when NaHCO_3 was added to the CHI solution, a pH of 7-7.5 was reached without CHI precipitation (**Table 4.1**, condition 4), as recently reported (Komoto et al., 2019; Parès et al., 2024). Finally, when NaHCO_3 was used to adjust the CHI solution at a pH superior to 8, no gelation was observed (data not shown).

The swelling behavior was analyzed by comparing the dimensions of hydrogels right after the crosslinking reaction performed in cloning cylinder, and after a 3-day immersion in Milli-Q water, PBS or F17 cell culture medium. **Figure 4.2A** shows the resulting hydrogels, from the 30:70 to 80:20 volume ratios of CHI:CMD. The pink color of the gels displayed in the third row is due to the pH indicator of the F17 medium. Mixtures corresponding to CMD solution volume ratios above 70% produced very soft and delicate hydrogels that were difficult to handle. In contrast, hydrogels prepared at lower CMD solution volume ratios (50% and less) were stiffer and simple-to-manipulate materials. **Figure 4.2B** presents the volumetric swelling capacity (V_{SC}) as a function of the CHI:CMD volume ratio and type of immersion solution. The V_{SC} was generally smaller when hydrogels were immersed for 3 days in PBS and F17 culture medium compared to Milli-Q water. This behavior was observed for all CHI:CMD ratio and can be explained by the presence of salts in buffered PBS and F17 solutions. The screening of charges inside the hydrogel can indeed decrease the V_{SC} . In addition, increasing the CHI:CMD volume ratio led to a decrease in the V_{SC} . This trend is probably caused by the poorer solubility of CHI, and the resulting lower charge density compared to CMD at nearly neutral pH.

Overall, **Figure 4.2** demonstrates that EDC and NHS effectively crosslink mixtures of polysaccharides bearing complementary carboxylic acid and amino groups, allowing the formation of clear hydrogels over a wide range of CHI and CMD compositions.

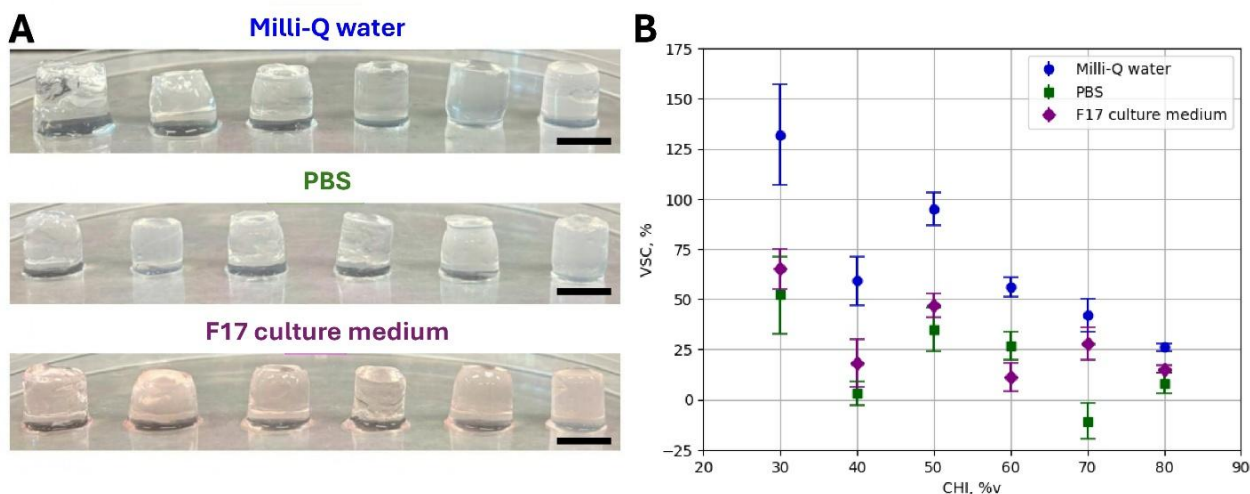


Figure 4.2 (A) Hydrogels after 3 days of immersion in Milli-Q water, PBS and F17 cell culture media, at CHI:CMD volume ratios varying from 30:70 (left) to 80:20 (right), by increment of 10. Scale bars: 1 cm. (B) Evolution of the volumetric swelling capacity (VSC) as a function of the CHI volume ratio ($n = 5$).

4.3.2 Gelling Kinetics

Rheological tests were carried out to monitor the gelling kinetics of CHI:CMD hydrogels with varying volume ratios of 20:80 to 90:10. The storage modulus (G') and the loss modulus (G'') were monitored over time to characterize the gelation time, defined as the moment when G' surpasses G'' , signaling the onset of soft solid behavior (Winter & Chambon, 1986).

The rheological tests conducted at 37 °C at a 50:50 CHI:CMD volume ratio revealed a very fast gelation time, as G' was already higher than G'' at $t = 1$ min (**Figure 4.3A**). This behavior was also observed at all compositions (**Figure 4.8**). The gelation time at 37 °C was therefore shorter than the mixing time of the two polymer solutions plus the time needed to pour it into the rheometer (about 3.5 min total). At all CHI:CMD compositions, G' consistently ranged from 167 Pa to 294

Pa after 1000 min (**Figure 4.9**). For all compositions, the ratio of G' over G'' after 1000 min showed a strong gel behavior ($G' \gg G''$).

As illustrated in **Figure 4.3B** for the 50:50 composition, the crossover between G' and G'' increased as the temperature decreased. More precisely, the first complete gel network was obtained after 4, 13 and 37 min for gelations performed at 20, 12 and 4°C, respectively (Figure 3B and Figure 3C). The activation energy E_{gel} for a given CHI:CMD ratio can be calculated with the Arrhenius equation (**Equation 4.5**), allowing to control the gelation time by adjusting the temperature (**Figure 4.3D**, for a 50:50 CHI:CMD volume ratio):

$$\ln(t_{gel}) = \ln(A) + \frac{E_{gel}}{R} \left(\frac{1}{T} \right) \quad (4.5)$$

where t_{gel} represents the gelation time, A is a constant, E_{gel} is the gelation activation energy, R is the universal gas constant, and T is the temperature during the gelling process. A linear fit of the data in **Figure 4.3D** yields an activation energy $E_{gel} = 14.8$ J/mol, with the constant $A = 2442$. With these values, a relatively precise gelation time t_{gel} can be calculated as a function of temperature, a practical feature when considering the process or application for which the gel is employed.

At 37 °C, the gelation time is too short to be precisely measured. In addition, G' did not reach a stable and clear plateau value even after 1000 min at 20 °C and 37 °C, in contrast to the crosslinking reactions realized 4 °C and 12 °C (as shown **Figure 4.3A** and **Figure 4.3B**). This observation can be explained by the increasing temperature, which leads to the continuous formation of crosslink points.

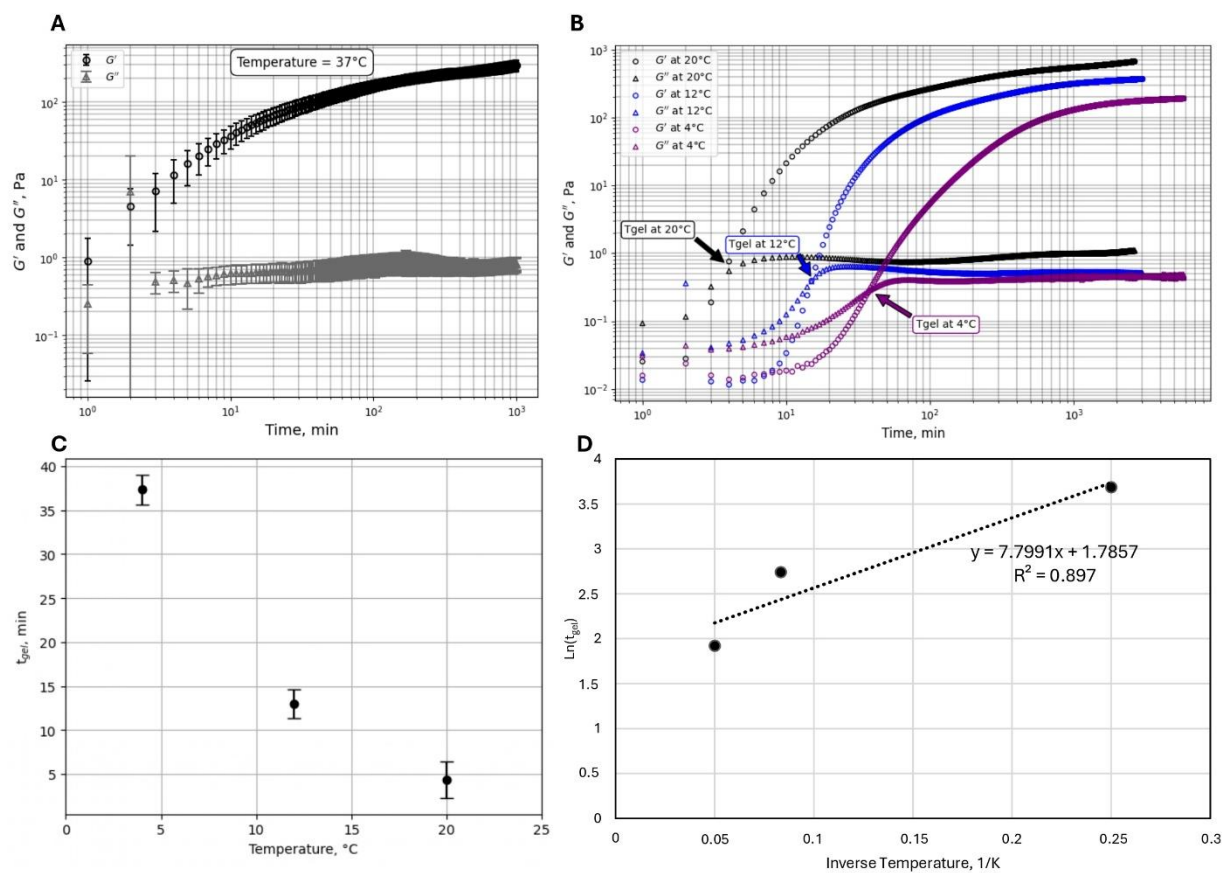


Figure 4.3 Storage modulus (G') and loss modulus (G'') as a function of time for a 50:50 CHI:CMD volume ratio at (A) 37 °C ($n = 5$) and (B) 20, 12 and 4 °C ($n = 1$). Evolution of the gelation time (t_{gel}) for a 50:50 ratio as a function of temperature: (C) t_{gel} vs Temperature and (D) $\ln(t_{gel})$ vs $1/T$ to determine the activation energy.

4.3.3 Mechanical Characterization

The compression modulus for six bulk hydrogel formulations (ranging from 30 %v/v CHI to 80 %v/v of initial CHI solution) was determined (final compressive strain ε between 2.2% and 3.3%). The compression modulus was measured right after unmolding the gels (**Figure 4.4A**), and after 3 days of storage either in ultrapure water (**Figure 4.4B**), PBS (**Figure 4.4C**), or F17 culture medium (**Figure 4.4D**). Five hydrogels were tested for each condition.

Right after unmolding the gels, the mean value of the compression modulus ranges from 490 Pa to 1350 Pa, with the minimum at 40 %v/v of CHI and the maximum at 60 %v/v of CHI. The results also display a gradual trend of increasing modulus as the composition in CHI increases, although it is not perfectly monotonous. Comparable results and trends are also observed after 3 days of storage in all three tested liquid media. In Milli-Q water and F17 culture medium, the minimum modulus value is observed at 30% %v/v and 40 %v/v of CHI, and the maximum at 60 %v/v of CHI, ranging from 440 Pa to 1520 Pa. In PBS, after 3 days, the maximum is reached at 70 %v/v CHI (1720 Pa), and the minimum at 30 %v/v CHI (660 Pa). These moduli are compatible for applications involving soft tissues such as blood vessels, muscles, or nerves, as they are in the range of ≈ 1 kPa (J. Liu, H. Zheng, P. S. Poh, H.-G. Machens, & A. F. Schilling, 2015). One additional observation is that the gel with 30 %v/v CHI was very fragile and difficult to handle due to its large amount of absorbed fluid after 3 days.

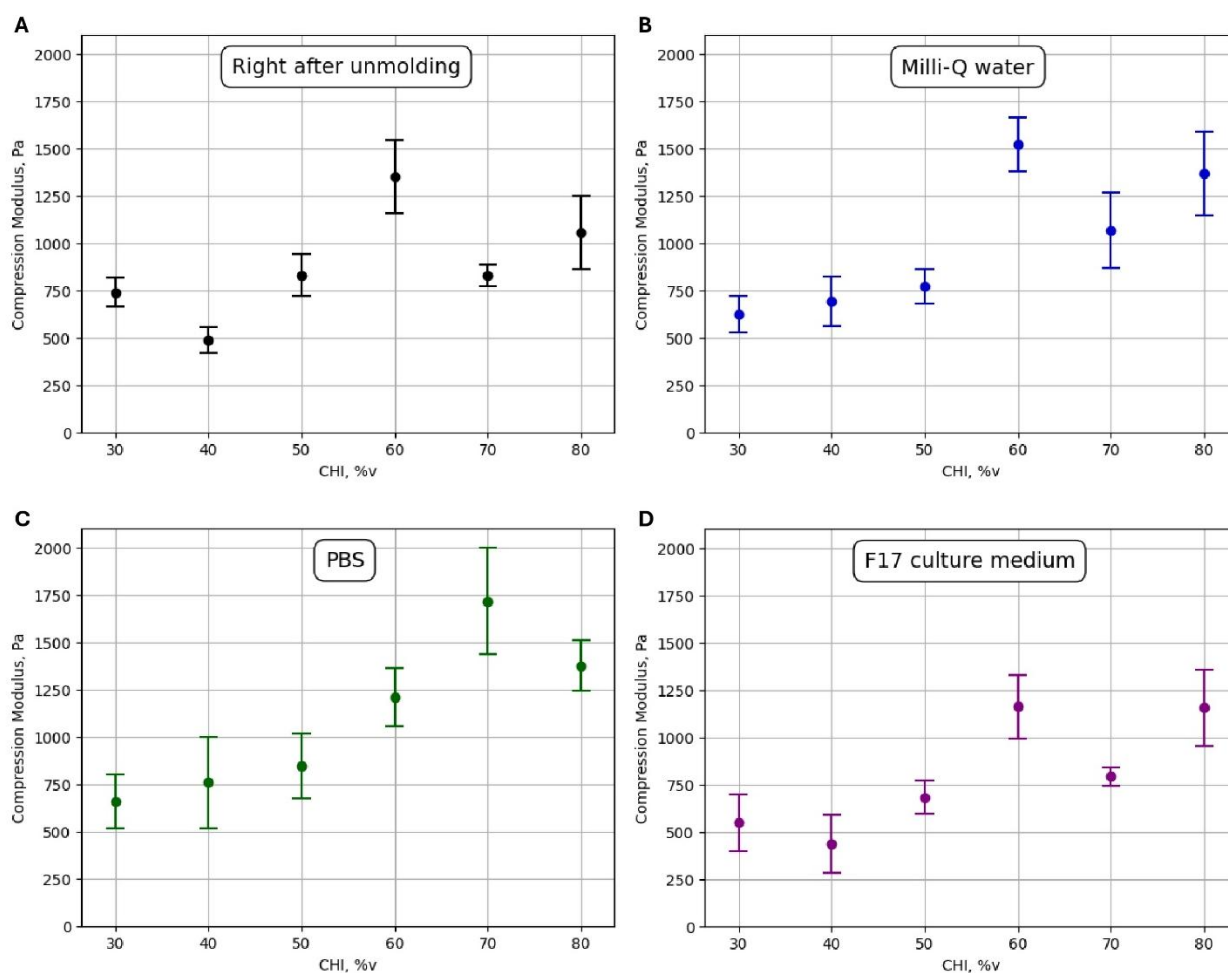


Figure 4.4 Compression modulus of hydrogels, for composition ranging from 30 %v/v to 80 %v/v CHI solution. The mechanical characterization was performed (A) right after unmolding or after 3 days in (B) water, (C) PBS 1X and (D) F17 culture medium.

After a month, all the hydrogels displayed a stable behavior and showed no visible alterations (such as swelling or shrinking). No obvious physical changes were observed either by visual inspection or manual manipulation (data not shown).

4.3.4 Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) Behavior on 2D and 3D Surfaces

HUVEC are endothelial cells, known to easily adhere and proliferate on surfaces. In this work, HUVEC were used to assess the potential of CHI or CMD alone, and their combination (as

crosslinked hydrogels), to prevent cell adhesion. Culture assays were performed on polymer-functionalized glass coverslips (2D cell culture) and on thin hydrogel films grafted on the glass coverslips (3D cell cultures, 50:50 volume ratio CHI:CMD). HUVECs behavior on 2D and 3D were compared after a 24 h adhesion time and 2 rinsing steps to remove poorly attached cells (**Figure 4.5**). Moreover, the most common peptide motif responsible for cell adhesion to the extracellular matrix, namely the RGD sequence, was used to evaluate its potential to counteract the adhesion-preventing effect of hydrogels. Four different conditions were studied for 2D glass coverslips surfaces: HUVEC on (A) pristine CellBind wells (positive control), (B) covalently-grafted CMD, (C) covalently-grafted CHI, (D) RGD peptides covalently-grafted on CMD. For 3D thin hydrogels, 2 conditions were assessed: (E) pristine CHI:CMD gel films and (F) RGD peptides grafted on hydrogels.

HUVECs showed high adhesion on CellBind wells (condition A) and no adhesion on CMD-covered surfaces (condition B). (A) and (B) were used as positive and negative controls, respectively, as CellBind-type surfaces are known to promote cell adhesion while CMD surfaces act as low-fouling surfaces (Benoit Liberelle et al., 2010). On CHI-covered surfaces (condition C), HUVECs showed adhesion and proliferation rates comparable to the positive control (A). The ability of the RGD motif to promote cell adhesion was confirmed by comparing the cell behavior of HUVECs on CMD surfaces (no adhesion, condition B) with that on RGD-decorated CMD surfaces (condition D). These results confirmed that CHI and RGD peptides grafted on 2D surfaces are both cell adhesion promoters, as previously reported (Di Lisa et al., 2022; Pierschbacher & Ruoslahti, 1984; Riahi et al., 2017). HUVECs did not show any cell adhesion on 3D thin CHI:CMD hydrogels alone, and even when exposing grafted RGD peptides (Conditions E and F, respectively). It is noticeable that RGD peptides failed to enhance cell adhesion on CHI:CMD-based hydrogels.

As supplementary comparison, HUVECs did not adhere on hydrogels films composed of CHI alone (2 %w/v) crosslinked with genipin (**Figure 4.11**) (Moura, Figueiredo, & Gil, 2007; Muzzarelli, 2009). This final result demonstrated that CMD is not solely responsible for HUVEC adhesion failure on hydrogel films.

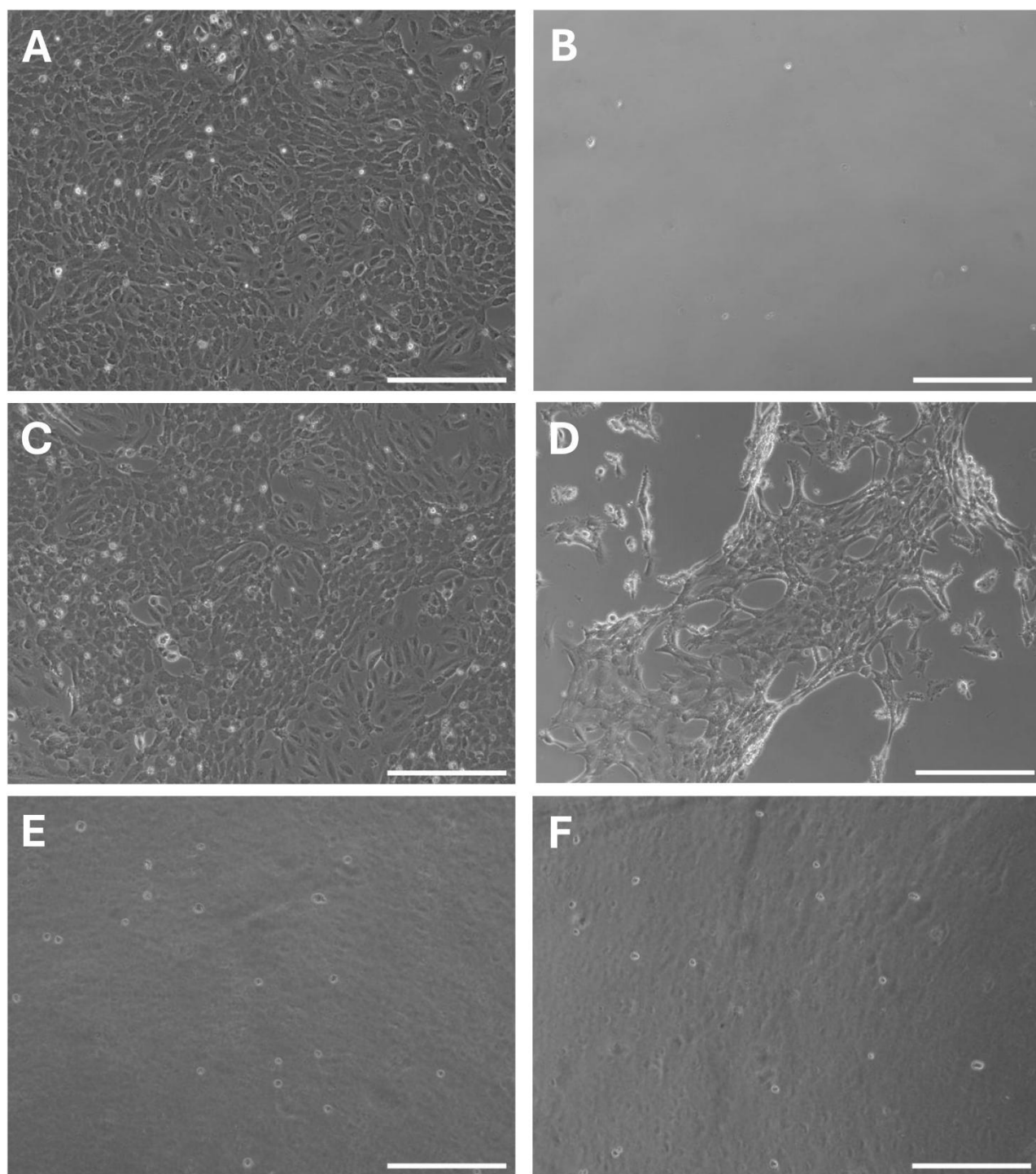


Figure 4.5 Representative optical microscopy images of HUVECs adhesion after 24 h on (A) CellBind well, (B) CMD-covered glass surfaces, (C) CHI-covered glass surfaces, (D) RGD peptide

on CMD covered glass surfaces, (E) 50:50 volume ratio CHI:CMD hydrogel, and (F) 50:50 volume ratio CHI:CMD hydrogel functionalized with RGD peptide. Scale bars: 300 μm .

4.4 Discussion

This work demonstrates that chitosan (CHI) and carboxymethylated dextran (CMD), two polysaccharides bearing opposite positive (protonated amine groups) and negative (deprotonated carboxyl groups) charges, respectively, can be mixed in solution and chemically crosslinked to form homogeneous hydrogels – i.e. without uncontrolled precipitation. The process involves two key steps: (1) The solubility of CHI is extended at higher pH with the addition of sodium bicarbonate, which also prevents its uncontrolled association with CMD; (2) Covalent crosslinking is achieved between the amino groups of CHI and the carboxyl groups of CMD, that are initially activated using the NHS/EDC chemistry. This method exclusively employs biobased and/or biocompatible reagents. It does not produce toxic by-products or undesired side-reactions. To the best of our knowledge, this is the first time that such an approach has been employed to create oppositely charged polysaccharide hydrogels.

We further demonstrated that the gelation time was rapid for all volume ratios tested at 37 °C. The 50:50 CHI:CMD volume ratio was then chosen for analyzing the effect of temperature on gelation kinetics. The results showed that it is possible to precisely control the gelation time with an Arrhenius type-equation. The ability to control the gelation time and kinetics provides versatility, depending on the targeted application. For example, when CHI and CMD solutions have a temperature of 37 °C, the gelation is very fast producing injectable hydrogels, such as those shown in **Figure 4.6A** for a 50:50 CHI:CMD mixture (CMD solution in yellow, CHI solution in red, and mixture in orange when both solutions are mixed in the syringe). Conversely, cooling the solutions before use allows the hydrogels to be molded into various shapes. For example, macroporous

CHI:CMD hydrogels (50:50 CHI:CMD volume ratio) were prepared by injecting the mixture at 4 °C into macroporous, thermally sensitive hydrosoluble polyvinyl alcohol (PVA) molds developed in our group (**Figure 4.6B**; mold diameter: 1 cm; thickness: 0.4 cm; average pore size: 200 μm with fully interconnected porosity) (Delattre et al., 2025; Kabbara, Gancheva, Gazil, & Virgilio, 2016). After 5 min of gelation time at 37 °C, followed by an overnight rest at room temperature, the PVA molds were extracted in water heated at 70 °C, resulting in the creation of macroporous CHI:CMD hydrogels, as shown in **Figure 4.6B**.

Figure 4.4 shows that the compression modulus typically increases with the CHI content in the mixture, while maintaining a constant total polysaccharide content to 2 %w/v (excluding NHS/EDC volume). To examine the impact of CMD composition, hydrogels were prepared by combining equal volumes of a 2 %w/v CHI solution with CMD solutions of increasing mass concentration, ranging from 2 to 10 %w/v. **Figure 4.6C** shows that doubling the CMD concentration from 2 %w/v to 4 %w/v yields a modulus twice as high (from 711 to 1478 Pa), which then plateaus for further increase in CMD concentration. Unfortunately, we were not able to increase the concentration of CHI (for the molecular weight that we selected) above 2 %w/v because we encountered difficulties preparing homogeneous hydrogels due to high solution viscosity.

By varying the volume ratio between CHI and CMD, from 20:80 to 80:20, we created hydrogels with a wide range of compositions (Table 1). **Figure 4.6D** demonstrates, using a genipin-based colorimetric reaction, that amino groups remained accessible in the CHI:CMD hydrogels even after crosslinking, regardless of composition. Genipin, an active iridoid glycoside derived from the fruit of *Gardenia jasminoides*, reacts with the primary amines to produce dark-blue pigments (Ramos-de-la-Peña, Renard, Montañez, de la Luz Reyes-Vega, & Contreras-Esquivel, 2016). In our work,

it is used to crosslink chitosan, as demonstrated in Section 4.2.9 and 4.3.4 (Muzzarelli, 2009). In **Figure 4.6D**, all gels were initially approximately 6 mm in diameter and 8 mm thick. As the volume ratio of CHI increased, significant gel contraction was observed following the reaction with genipin. This is most likely due to an increased crosslinking density and a decrease in CHI solubility due to the consumption of amine groups. Remaining amino groups of CHI offer opportunities for post-gel modification, including the addition of biologically active molecules (peptides or growth factors).

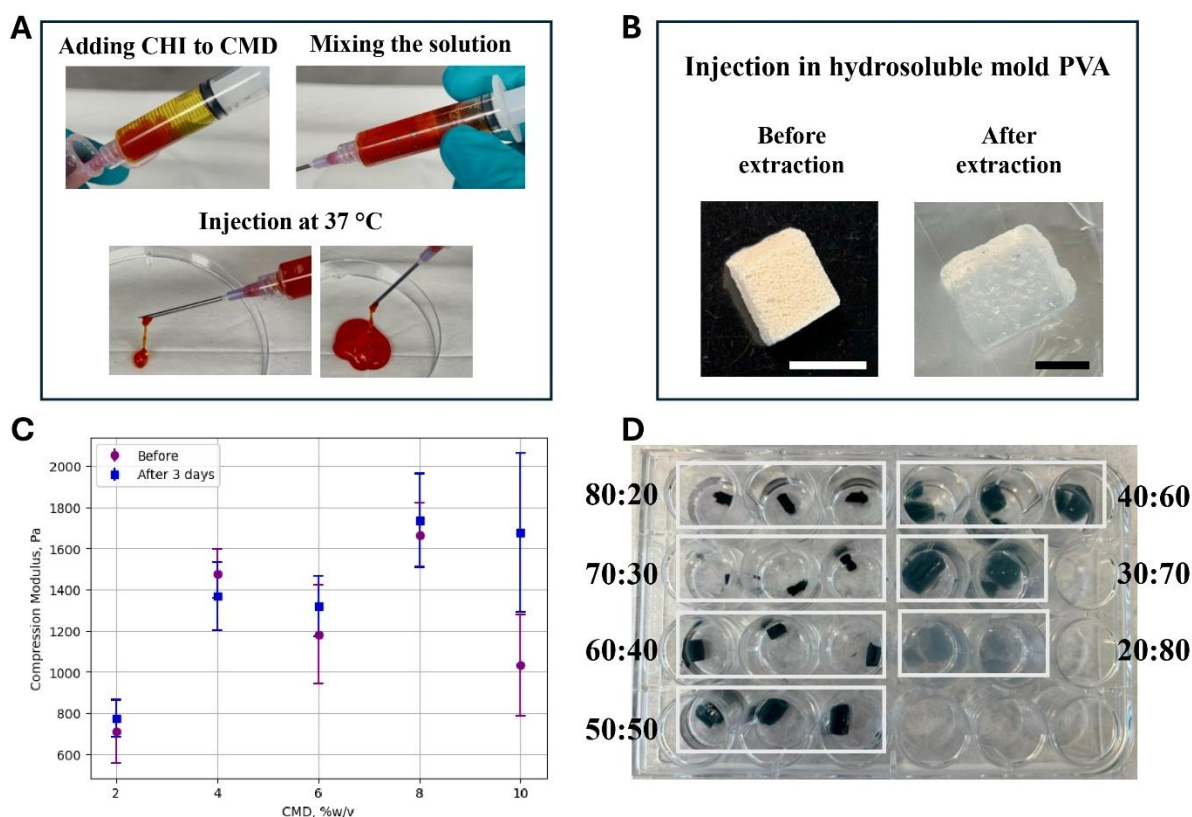


Figure 4.6 Gelation of 50:50 volume ratio CHI:CMD at 37 °C in a syringe; (B) Preparation of macroporous hydrogel using a macroporous PVA mold; (C) Compression modulus at equal volumes of CHI (2 %w/v) and CMD (increasing mass concentration from 2 to 10% w/v) ; (D)

Remaining amino groups in CHI after gel formation revealed by the genipin colorimetric marker, for different CHI:CMD volumetric compositions (%v/v).

Afterwards, we replaced CMD with sodium alginate (SA), a natural polysaccharide derived from brown seaweed, which also contains carboxylic acid groups. SA (2 %w/v) was activated with NHS/EDC and combined with a 2 %w/v CHI solution to successfully produce clear, homogeneous hydrogels (**Figure 4.12**). Gelation time was faster than for CHI:CMD gels most probably because SA contains many more carboxylic acid groups compared to the produced CMD (dcm $\approx$ 30%). As previously observed with CMD (**Table 4.1**), SA combines poorly with CHI, yielding uncontrolled precipitates. However, the addition of NaHCO_3 to the CHI solution prevents precipitation when the CHI and SA solutions were mixed together (L. Liu et al., 2011; Parès et al., 2024). Of interest, the gelation time can be further modulated by decreasing the NHS/EDC concentration and by cooling the two polymer solutions before mixing (data not shown). This demonstrates that a variety of polysaccharides bearing carboxylic acid groups can be used with control on gelation.

The *in vitro* cell assays clearly demonstrated that there were significant differences in adhesion between cells on glass surfaces exposing a grafted layer of CHI or RGD on CMD (2D), compared to cells on thin hydrogel films made from the same polysaccharides (3D), with and without RGD functionalization (**Figure 4.5**). Cells do not adhere to the hydrogel surfaces, regardless of the presence of the RGD adhesive peptide. One possible explanation for these results is that the polysaccharide coating on glass surfaces (2D) is much denser than the polysaccharide in hydrated gels (3D). Future studies could focus on the polysaccharide characteristics in the hydrogel, such as their mass concentration, the crosslinking density, and the number of functional groups per chain. This would help determine how the repellent properties of CHI:CMD gels are affected by the hydration of the gel and the availability of anchor points for the cells.

Interestingly, we found that cells adhered and proliferated directly onto the glass coverslip, adjacent to the gel layer, as shown in **Figure 4.13**. This suggests that the CHI:CMD hydrogels, when placed in a surgical cavity, will not interfere with the cell normal behavior of nearby tissues. It will merely act as a physical barrier to prevent postoperative adhesion (POA). This hypothesis could be confirmed with *in vivo* studies.

4.5 Conclusion

In this work, clear and homogeneous hydrogels composed of chitosan (CHI) and carboxymethylated dextran (CMD) were produced through direct crosslinking with the well-known and easy-to-use NHS/EDC chemistry. This strategy induced the formation of amide bonds between the amine groups of CHI and carboxylic groups of CMD. To prevent the undesired precipitation of CHI and CMD during mixing, sodium bicarbonate was added to the initial CHI solution. This allows for the preparation of hydrogels over a wide CHI:CMD composition range. At a total content of 2% w/v polysaccharide (excluding the volume of NHS/EDC), the compression modulus of the hydrogels was similar to that of soft tissues at ≈ 1 kPa. They were also stable over a period of at least one month in a variety of fluids, including water, PBS and F17 cell culture medium.

The gelling time can be finely regulated by adjusting the temperature, from ca. 1 min at 37 °C to over half an hour at 4 °C. This versatility allows for a wide range of applications, including rapid-curing injectable gels and moldable gels that require delayed gelation. The presence of remaining reactive amino groups after crosslinking, as evidenced by the use of genipin, indicates that further modifications and functionalization are possible. Furthermore, hydrogels were also generated by replacing CMD with sodium alginate, a well-known anionic polysaccharide also bearing carboxylic groups, demonstrating the flexibility of our approach.

The CHI:CMD hydrogels prepared in this work, with or without RGD cell-binding peptides, all demonstrate remarkable non-adhesive cell properties, as shown *in vitro* with HUVECs. As a result, the CHI:CMD hydrogels presented a great potential as preventative materials against postoperative adhesion (POA). Future *in vivo* studies will examine the hydrogel behavior in animal model (integration into the body, absence or reduction of adhesion), as the studied crosslinking method offers a promising avenue for creating advanced functional implants, such as those for wound healing, drug delivery and regenerative therapies.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The following files are available free of charge.

Insolubility of chitosan, complementary rheology analyses, complementary cells assays, crosslinking with sodium alginate.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Gregory De Crescenzo - Department of Chemical Engineering, Polytechnique Montréal,
Montréal H3T 1J4, Québec, Canada.

Email: gregory.decrescenzo@polymtl.ca

Author Contributions

Vaiana Moreau: Conceptualization, Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Writing - Original Draft, Visualization. **Faranak Baniahmad:** Methodology, Investigation. **Benoît Liberelle:** Methodology, Validation, Writing - Review & Editing. **Nick Virgilio:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Validation, Writing - Review & Editing. **Gregory De Crescenzo:** Conceptualization, Methodology, Validation, Resources, Funding acquisition, Writing - Original Draft, Writing – Review & Editing, Supervision.

ACKNOWLEDGMENT

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) through the NSERC-CREATE PrEEmiuM program (V.M., F.B.), the NSERC Discovery Grant (N.V.) and the TransMedTech Institute (NanoBio Technology Platform) and its main funding partner, the Canada First Research Excellence Fund (B.L.). The authors extend their gratitude Chi Yuan Chang and Lydia Simard (Department of Biomedical Engineering, Polytechnique Montréal) for their assistance with cell culture and laboratory support, Matthieu Gauthier (CREPEC) for his guidance in rheology and laboratory support, Prof. Marc Lavertu and Anik Chevrier (Department of Chemical Engineering, Polytechnique Montréal) for providing access to their EVOS microscope, and Cédric Malveau and Natalie Baho for the NMR team (Department of Chemistry, Université de Montréal) for their assistance with NMR measurements. The authors would also like to thank Cherine Marie Diab for the help in the preparation of the materials and Lisa Delattre for providing the water-soluble molds made of PVA.

4.6 SI Supporting Information



Figure 4.7 Formation of precipitates when the CHI solution (without addition of NaHCO_3) is mixed with CMD at pH 1-1.5.

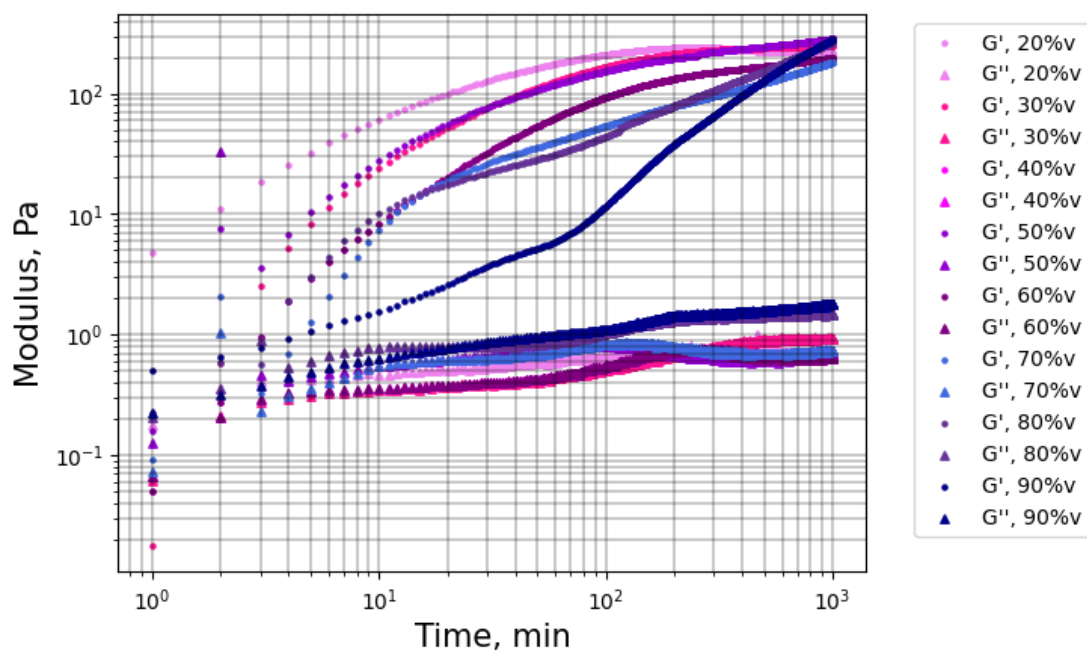


Figure 4.8 Evolution of G' and G'' as a function of time and at different CHI solution composition (%v/v), for CHI:CMD hydrogels, at 37 °C.

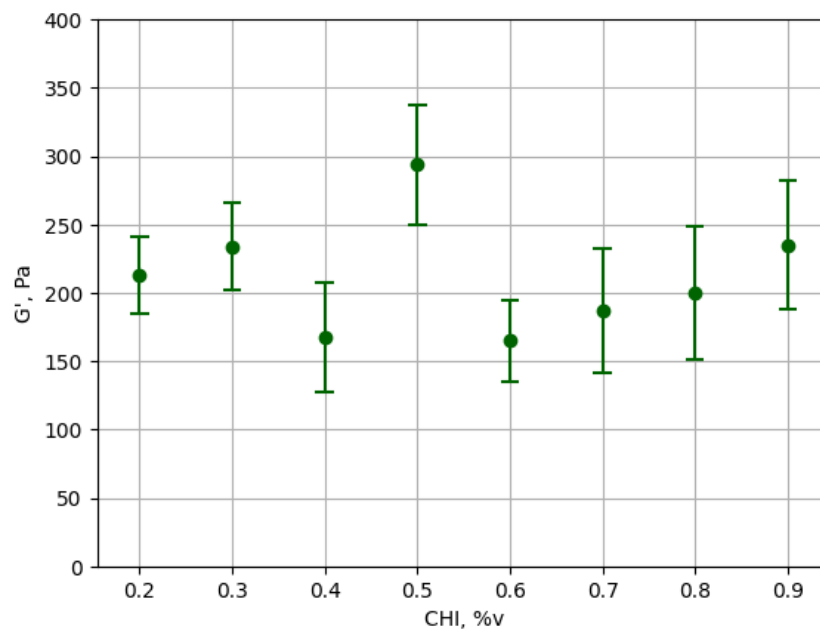


Figure 4.9 Evolution of storage modulus (G') as a function of CHI solution composition in %v/v.

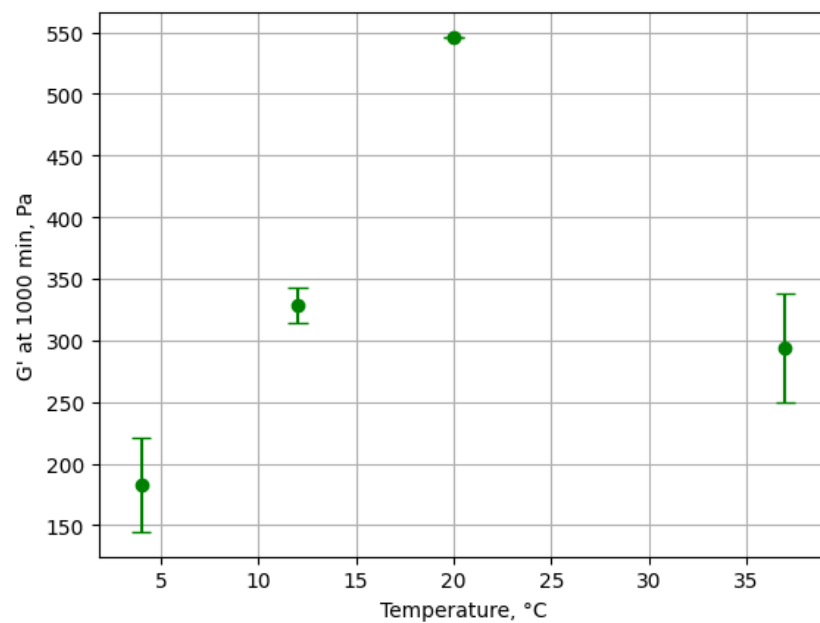


Figure 4.10 G' reported at 1000 min for a 50:50 volume ratio CHI:CMD at different temperatures.

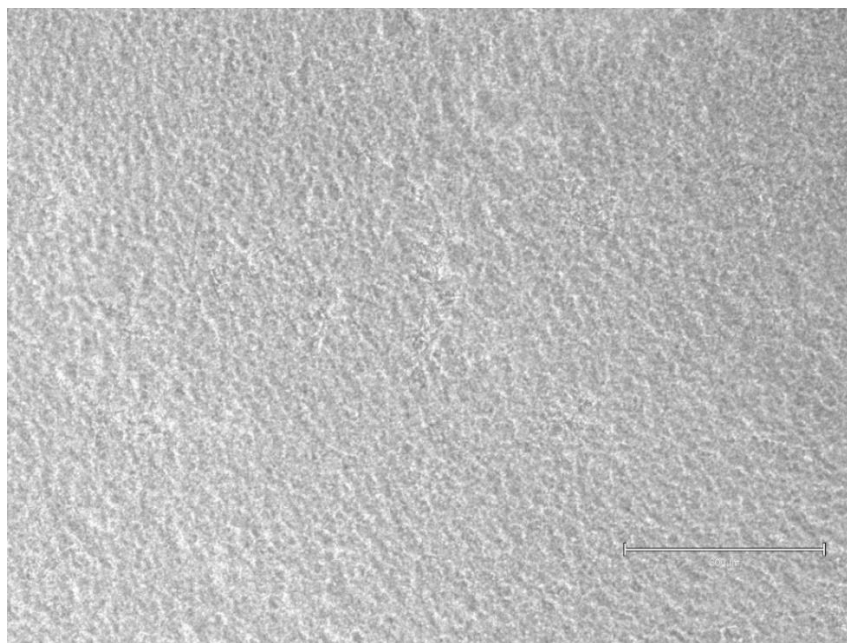


Figure 4.11 Image of the 2% w/v CHI gel crosslinked with genipin showing no HUVECs attachment, scale bar: 300 μm .



Figure 4.12 Gelation of sodium alginate (SA) and chitosan at 50:50 volume ratio SA:CMD, using EDC/NHS crosslinking chemistry. CMD was substituted with SA to display the versatility of our approach to produce clear and stable hydrogels.

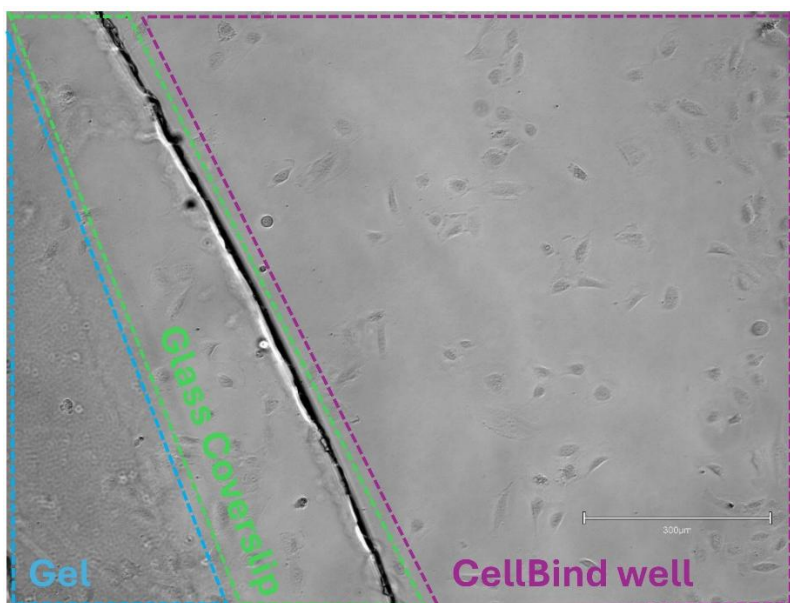


Figure 4.13 Image of the HUVECs growing on the glass coverslip next to the 50:50 volume ratio CHI:CMD gel grafted on glass surfaces. Note that this image shows the edge of the round glass coverslip (with gel on the left side) and the CellBind well surface.

CHAPITRE 5 DISCUSSION GÉNÉRALE

Ce projet de maîtrise avait pour but de concevoir des hydrogels à base de polysaccharides, principalement le chitosane et le dextrane, dans le but de prévenir les adhérences postopératoires – des complications fréquentes survenant après une intervention chirurgicale, en particulier au niveau de la cavité abdominale. La réticulation entre ces deux polymères a déjà été étudiée selon différentes approches : en modifiant les chaînes polymériques du chitosane pour le rendre soluble dans des solutions à pH neutre, et en oxydant le dextrane afin d'introduire des groupements aldéhydes permettant un couplage chitosane/dextrane par des réactions de Schiff (Aziz et al., 2012; Cabral et al., 2014; Lauder et al., 2011; Lauder et al., 2012; G. Liu et al., 2009). Cependant, ces réactions de modifications des polymères présentent des inconvénients, notamment la formation de sous-produits cytotoxiques et la destruction partielle du dextrane (clivage) lors de l'oxydation du dextrane. Malgré cela, les hydrogels obtenus par ces méthodes ont montré des résultats prometteurs en termes d'efficacité pour la prévention des adhérences postopératoires.

Pour éviter de recourir à des polymères transformés par des voies de synthèses complexes, nous avons développé une nouvelle stratégie de réticulation. Celle-ci repose sur la carboxyméthylation du dextrane, permettant l'introduction de groupements fonctionnels carboxyles (-COOH). Cette méthode vise à conserver une bonne réactivité chimique pour la formation de l'hydrogel, tout en éliminant la génération de sous-produits indésirables et la perte de contrôle sur le poids moléculaire du dextrane.

Les premiers essais ont porté sur l'utilisation de NHS/EDC en tant qu'agents de réticulation. Tout d'abord, une quantité en excès de NHS et de EDC (deux réactifs complémentaires dilués dans de l'eau Milli-Q) a été testée selon deux protocoles :

- a. La quantité de NHS/EDC (sous forme aqueuse) a été ajoutée à une solution homogène de dextrane carboxyméthylé + chitosane à $\text{pH} \approx 7$ (avec du bicarbonate de sodium), à une concentration totale de 10 mg/mL (excluant la dilution avec NHS/EDC) et à un ratio volumique de 50 :50 (CHI:DCM).
- b. La quantité de NHS/EDC a été ajoutée à une solution de dextrane carboxyméthylé uniquement et à une concentration de 10 mg/mL (excluant la dilution avec NHS/EDC), puis une pause de 10 – 15 min a été observée avant l'ajout d'une solution de chitosane à $\text{pH} \approx 7$ (avec du bicarbonate de sodium) à une concentration

de 10 mg/mL (excluant la dilution avec NHS/EDC) et à un ratio volumique de 50 :50 (CHI:DCM).

Ces résultats préliminaires ont démontré qu'il est préférable d'attendre que l'agent de réticulation ait le temps de réagir avec les acides carboxyliques du dextrane avant d'ajouter les amines propres au chitosane. En effet, nous avons observé que la solution du protocole (a.) n'avait pas gélifié et était restée sous forme liquide. L'hypothèse émise a été que les acides carboxyliques du dextrane doivent d'abord être activées avec NHS/EDC avant d'ajouter les amines du chitosane. Ainsi, tous les essais suivants ont été réalisés en laissant un temps d'attente de 15 min avant d'ajouter la solution avec de chitosane – protocole b. La concentration en NHS/EDC a été maintenue fixe pour l'ensemble de l'étude de ce projet de recherche. La concentration en polymères (chitosane et dextrane) a elle aussi été étudiée en gardant le ratio volumique de 50:50 (CHI:DCM) constant. Des solutions de 10 mg/mL, 20 mg/mL et 30 mg/mL ont été testées et la concentration de 20 mg/mL a été retenue, car les gels produits à 10 mg/mL étaient plus fragiles, et la dissolution du chitosane à des concentrations de 30 mg/ml devenait difficile en raison de sa viscosité. Ainsi, 20 mg/mL a semblé être un bon compromis.

Ensuite, la deuxième étape a été axée sur l'effet du pH de la solution de chitosane sur la gélification, mais aussi pour prévenir sa précipitation. Pour ce faire, une gamme de quantité massique de bicarbonate de sodium (NaHCO_3) a été étudié. En effet, le NaHCO_3 joue un rôle à deux niveaux : d'une part, il permet d'ajuster le pH de la solution de chitosane vers des pH neutres à basiques ; d'autre part, il limite la précipitation non contrôlée des complexes chitosane-dextrane, comme le suggère le mécanisme présenté par Parès et al. (2024). Ces deux aspects sont essentiels pour pouvoir utiliser le chitosane avec la chimie NHS/EDC. De ce fait, des concentrations allant de 41 mg/mL à 55 mg/mL de NaHCO_3 dans du chitosane à 20 mg/mL ont permis d'ajuster le pH à 7.0 et 8.0 sans précipitation (la concentration à atteindre dans une solution de chitosane à 20 mg/mL a été déterminée antérieurement dans l'étude faite par Parès et al. (2024)). Les résultats ont démontré que l'ajout d'une quantité de bicarbonate de sodium située entre 41 mg/mL et 50 mg/mL (pH de 7 et 7.5, respectivement), permettait d'obtenir une gélification de la solution de CHI et DCM en présence de NHS/EDC (comme indiqué dans le **Table 4.1**, Condition 4). En revanche, à pH 8.0 et au-delà, aucune gélification n'a été observé dans les mêmes conditions. L'explication concernant la non-gélification reste encore incertaine. Pour conclure, cette étude de l'effet du pH sur la gélification a permis de déterminer un intervalle de concentration en NaHCO_3 à ajouter à une

solution 20 mg/mL de chitosane, ce qui offre une certaine tolérance vis-à-vis de la précision lors des pesées expérimentales.

Les hydrogels produits dans cette étude sont associés à 3 des 6 stratégies présentées dans la **Figure 1.2**. En effet, ceux-ci sont considérés comme :

- Des barrières physiques pour empêcher l'interconnexion de tissus adjacents anormalement prolifératifs ;
- Des surfaces idéales pour réduire l'adhésion due à l'utilisation de matériaux antiadhésifs (« antifouling ») tel que le dextrane ;
- Des biomatériaux capables de prévenir l'apparition d'hématomes grâce aux propriétés hémostatiques du chitosane.

Le fait de combiner 3 stratégies pour la conception de biomatériaux pour prévenir les POA semble déjà prévenir au moins en partie ces adhérences. Cependant, pour améliorer cette prévention, il serait aussi intéressant de bonifier les biomatériaux en y ajoutant d'autres aspects du diagramme de la **Figure 1.2**, comme l'emploi d'agents anti-inflammatoires incorporés dans l'hydrogel pour réduire la réponse immunitaire et favoriser une meilleure intégration du biomatériau *in vivo*.

Le phénomène de non-adhésion cellulaire observé *in vitro* est une caractéristique particulière des hydrogels développés dans cette étude. Il est remarquable qu'aucune adhésion de cellules n'a été observée, même dans des conditions optimisées pour l'adhérence (hydrogels recouverts de peptides d'adhésion de type RGD, **Figure 4.5F**). Cette propriété répulsive des hydrogels vis-à-vis des cellules s'est révélée pertinente dans le cadre des POA.

Tel que mentionné à la **Section 4.4** et présenté à la **Figure 4.12**, cette chimie de réticulation avec NHS/EDC semble être polyvalente pour produire des hydrogels à partir d'autres polymères comportant les deux groupements fonctionnels acides carboxyliques d'une part et des amines d'autre part. L'étude ouvre ainsi la voie vers la production d'autres hydrogels hybrides. Il faudra cependant en vérifier les propriétés mécaniques et rhéologiques afin de maîtriser ce nouveau système.

Pour finir, il est intéressant d'observer que la température de gélification (**Figure 4.3B** et **Figure 4.3C**) permet de moduler les applications possibles dans le domaine médical, à savoir la production d'hydrogels à implanter dans le patient ou l'injection sous forme liquide sur les zones à traiter.

CHAPITRE 6 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Ce projet de maîtrise a permis de développer une nouvelle chimie de réticulation pour produire des hydrogels avec du chitosane et du dextrane carboxyméthylé par l'utilisation de la chimie NHS/EDC, afin de prévenir les adhérences postopératoires. Tout d'abord, une formulation a été testée à température ambiante avec un ratio volumique de 50% de CHI et 50% de DCM (excluant la dilution faite par le volume ajouté de NHS/EDC). Puis elle a été développée pour différents ratios volumiques en CHI et DCM afin de voir l'effet de la composition sur les propriétés de ces hydrogels, en lien avec le premier objectif spécifique. Ensuite, ces hydrogels à différents ratios volumiques ont été caractérisés en termes de propriétés mécaniques et rhéologiques, et la température a été un paramètre de contrôle clé pour réguler le temps de gélification, permettant de produire des hydrogels injectables ou de leur donner une forme. Cette caractérisation remplit le deuxième et troisième objectif spécifique de ce mémoire. Enfin, le dernier volet de ce projet portait sur la culture de cellules où des HUVEC ont été utilisées pour vérifier la non-adhésion *in vitro* sur l'hydrogel. Une étude connexe a été réalisée avec des peptides d'adhésion (RGD), favorisant l'adhésion cellulaire, greffés à la surface des hydrogels et aucune adhésion de cellule n'a été observée. L'hydrogel développé semble donc robuste pour application dans les POA. Ce dernier volet a permis de remplir le quatrième et dernier objectif spécifique. Cette approche innovante, polyvalente et simple à mettre en place permet de fabriquer des plateformes 3D, réticulées chimiquement avec divers polymères contenant des fonctions carboxyles et amines.

Pour poursuivre ce projet, voici des recommandations qui pourraient être envisagées :

- Étudier des chitosanes de poids moléculaires et de DDA différents, et des dextrans de poids moléculaires différents : le chitosane est un polymère d'origine naturelle dont les propriétés physico-chimiques (telles que solubilité, viscosité, charge, capacité de gélification) varient en fonction de son DDA et de son poids moléculaire. Il en est de même pour le dextrane carboxyméthylé, où le dcm et le poids moléculaire influencent certains paramètres (charge, viscosité et capacité de gélification par exemple). En étudiant des gammes variées de CHI et de DCM, il serait possible de faire varier les propriétés des hydrogels formés. Cette étude permettrait de sélectionner d'autres combinaisons pertinentes pour des applications biomédicales spécifiques, notamment en fonction des contraintes mécaniques ou biologiques attendues *in vivo*.

- Appliquer cette chimie de réticulation à d'autres types de polymères carboxylés (naturels et/ou synthétiques), tels que gélatine, acide hyaluronique, PEG fonctionnalisé. Cela permettrait de moduler le comportement cellulaire (adhésion, prolifération, différenciation) pour répondre à différents besoins biomédicaux. Une caractérisation fine sera également nécessaire pour évaluer les nouvelles matrices en termes de structure, de stabilité, de fonctionnalité, de rigidité, etc. Cela ouvre la voie à des systèmes hybrides multifonctionnels, adaptés à des cibles thérapeutiques variées.
- Valider ces systèmes dans la perspective d'application dans des modèles *in vivo* : après l'étude *in vitro*, il est indispensable de les tester *in vivo* afin d'évaluer leur biocompatibilité, biodégradation et réponse immunitaire. Ces essais pourraient débiter sur des modèles animaux simples (souris, rats) et permettre également d'identifier d'éventuels défauts et d'adapter les formulations pour un usage clinique ultérieur, au besoin.
- Étudier ce système pour d'autres types d'applications biomédicales comme le développement de pansements pour la cicatrisation des plaies : les hydrogels développés dans ce mémoire sont non-adhésif pour les cellules et pourraient agir comme une barrière physique protectrice qui évite l'ancrage cellulaire indésirable, tout en conservant les fonctions essentielles d'un pansement. Cela offrirait au projet une orientation translatrice vers des produits médicaux à fort impact.
- Utiliser ces hydrogels pour encapsuler des principes actifs et libérer de façon contrôlée et ciblée des médicaments dans le corps : l'encapsulation de molécules actives dans les hydrogels représente un axe de recherche intéressant, notamment pour la délivrance ciblée et prolongée de médicaments. Il conviendrait d'étudier la cinétique de libération des principes actifs en fonction des caractéristiques du réseau de polymères, mais aussi d'examiner les interactions éventuelles entre le matériau et la substance encapsulée. Ce système pourrait notamment être exploité dans le traitement localisé de cancers ou de maladies inflammatoires.

RÉFÉRENCES

- Abdessamed, B. (2018). Chapitre 1 -Notions générales sur les biomatériaux. In (pp. 1-37).
- Ahmadi, F., Oveisi, Z., Samani, S. M., & Amoozgar, Z. (2015). Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Research in pharmaceutical sciences*, 10(1), 1-16.
- Ahn, J.-J., Kim, H.-J., Bae, E.-B., Cho, W.-T., Choi, Y., Hwang, S.-H., Jeong, C.-M., & Huh, J.-B. (2020). Evaluation of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide cross-linked collagen membranes for guided bone regeneration in beagle dogs. *Materials*, 13(20), 4599.
- Al Sagheer, F., Al-Sughayer, M., Muslim, S., & Elsabee, M. (2009). Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. *Carbohydrate Polymers*, 77(2), 410-419.
- 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.
- Arung, W., Meurisse, M., & Detry, O. (2011). Pathophysiology and prevention of postoperative peritoneal adhesions. *World journal of gastroenterology: WJG*, 17(41), 4545.
- Atta, H. M. (2011). Prevention of peritoneal adhesions: a promising role for gene therapy. *World journal of gastroenterology: WJG*, 17(46), 5049.
- Aziz, M. A., Cabral, J. D., Brooks, H. J., Moratti, S. C., & Hanton, L. R. (2012). Antimicrobial properties of a chitosan dextran-based hydrogel for surgical use. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 56(1), 280-287.
- Badylak, S. F. (2007). The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials*, 28(25), 3587-3593.
- Banerjee, A., & Bandopadhyay, R. (2016). Use of dextran nanoparticle: A paradigm shift in bacterial exopolysaccharide based biomedical applications. *International journal of biological macromolecules*, 87, 295-301.
- Bartczak, D., & Kanaras, A. G. (2011). Preparation of peptide-functionalized gold nanoparticles using one pot EDC/sulfo-NHS coupling. *Langmuir*, 27(16), 10119-10123.
- BeMiller, J. N. (2014). Polysaccharides. In *eLS*.
- Buia, A., Stockhausen, F., & Hanisch, E. (2015). Laparoscopic surgery: a qualified systematic review. *World journal of methodology*, 5(4), 238.
- Burdick, J. A., & Prestwich, G. D. (2011). Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Advanced materials*, 23(12), H41-H56.
- Cabral, J. D., Roxburgh, M., Shi, Z., Liu, L., McConnell, M., Williams, G., Evans, N., Hanton, L. R., Simpson, J., & Moratti, S. C. (2014). Synthesis, physiochemical characterization, and biocompatibility of a chitosan/dextran-based hydrogel for postsurgical adhesion prevention. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 25, 2743-2756.
- Carvalho, S. G., Dos Santos, A. M., Silvestre, A. L. P., Meneguim, A. B., Ferreira, L. M. B., Chorilli, M., & Gremião, M. P. D. (2021). New insights into physicochemical aspects

- involved in the formation of polyelectrolyte complexes based on chitosan and dextran sulfate. *Carbohydrate Polymers*, 271, 118436.
- Chang, C., & Zhang, L. (2011). Cellulose-based hydrogels: Present status and application prospects. *Carbohydrate Polymers*, 84(1), 40-53.
- Chen, F., Huang, G., & Huang, H. (2020). Preparation and application of dextran and its derivatives as carriers. *International journal of biological macromolecules*, 145, 827-834.
- Chen, M., Liu, J., Lin, J., Zhuang, K., Shan, Y., Tiwari, S., Jiang, L., & Zhang, J. (2025). Progress in Polysaccharide-Based Hydrogels for Preventing Postoperative Adhesions: A Review. *Gels*, 11(3), 188.
- Dash, M., Chiellini, F., Ottenbrite, R. M., & Chiellini, E. (2011). Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in polymer science*, 36(8), 981-1014.
- de Alvarenga, E. S., de Oliveira, C. P., & Bellato, C. R. (2010). An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, 80(4), 1155-1160.
- De Groot, C. J., Van Luyn, M. J., Van Dijk-Wolthuis, W. N., Cadée, J. A., Plantinga, J. A., Den Otter, W., & Hennink, W. E. (2001). In vitro biocompatibility of biodegradable dextran-based hydrogels tested with human fibroblasts. *Biomaterials*, 22(11), 1197-1203.
- Delair, T. (2011). Colloidal polyelectrolyte complexes of chitosan and dextran sulfate towards versatile nanocarriers of bioactive molecules. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 78(1), 10-18.
- Delattre, L., Lassus, A., De Crescenzo, G., Faucheux, N., Lauzon, M.-A., Paquette, B., Girard, M., & Virgilio, N. (2025). Thermally Sensitive and Tunable Water-Soluble Polymer Molds for the Preparation of Porous Hydrogels. *Polymer*, 128695.
- Di Lisa, D., Muzzi, L., Pepe, S., Dellacasa, E., Frega, M., Fassio, A., Martinoia, S., & Pastorino, L. (2022). On the way back from 3D to 2D: Chitosan promotes adhesion and development of neuronal networks onto culture supports. *Carbohydrate Polymers*, 297, 120049. doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120049>
- Di Martino, A., Sittering, M., & Risbud, M. V. (2005). Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering. *Biomaterials*, 26(30), 5983-5990.
- Díaz-Montes, E. (2021). Dextran: sources, structures, and properties. *Polysaccharides*, 2(3), 554-565.
- Díaz-Montes, E. (2022). Polysaccharides: Sources, characteristics, properties, and their application in biodegradable films. *Polysaccharides*, 3(3), 480-501.
- Du, X., Liu, Y., Wang, X., Yan, H., Wang, L., Qu, L., Kong, D., Qiao, M., & Wang, L. (2019). Injectable hydrogel composed of hydrophobically modified chitosan/oxidized-dextran for wound healing. *Materials Science and Engineering: C*, 104, 109930.
- Ernesto, J. V., de Macedo Gasparini, Í., Corazza, F. G., Mathor, M. B., da Silva, C. F., Leite-Silva, V. R., Andreo-Filho, N., & Lopes, P. S. (2023). Physical, chemical, and biological characterization of biodegradable chitosan dressing for biomedical applications: Could sodium bicarbonate act as a crosslinking agent? *Materials Chemistry and Physics*, 301, 127636.

- Fan, P., Zeng, Y., Zaldivar-Silva, D., Agüero, L., & Wang, S. (2023). Chitosan-based hemostatic hydrogels: The concept, mechanism, application, and prospects. *Molecules*, 28(3), 1473.
- Fatehi Hassanabad, A., Zarzycki, A. N., Jeon, K., Deniset, J. F., & Fedak, P. W. (2021). Post-operative adhesions: a comprehensive review of mechanisms. *Biomedicines*, 9(8), 867.
- Fatehi Hassanabad, A., Zarzycki, A. N., Jeon, K., Dundas, J. A., Vasanthan, V., Deniset, J. F., & Fedak, P. W. (2021). Prevention of post-operative adhesions: a comprehensive review of present and emerging strategies. *Biomolecules*, 11(7), 1027.
- Festas, A., Ramos, A., & Davim, J. (2020). Medical devices biomaterials—A review. *Proceedings of the institution of mechanical engineers, part L: Journal of Materials: Design and Applications*, 234(1), 218-228.
- Grabska-Zielińska, S., Sionkowska, A., Carvalho, Â., & Monteiro, F. J. (2021). Biomaterials with potential use in bone tissue regeneration—collagen/chitosan/silk fibroin scaffolds cross-linked by EDC/NHS. *Materials*, 14(5), 1105.
- Guarino, V., Iafisco, M., & Spriano, S. (2020). 1 - Introducing biomaterials for tissue repair and regeneration. In V. Guarino, M. Iafisco, & S. Spriano (Eds.), *Nanostructured Biomaterials for Regenerative Medicine* (pp. 1-27): Woodhead Publishing.
- Gumán-Valdivia-Gómez, G., Tena-Betancourt, E., & de Alva-Coria, P. (2019). Postoperative abdominal adhesions: pathogenesis and current preventive techniques. *World J Surg Surgical Res.* 2018; 1, 1008.
- Hamdine, M., Heuzey, M.-C., & Bégin, A. (2005). Effect of organic and inorganic acids on concentrated chitosan solutions and gels. *International journal of biological macromolecules*, 37(3), 134-142.
- Hamman, J. H. (2010). Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems. *Marine Drugs*, 8(4), 1305-1322.
- Heinze, T., Liebert, T., Heublein, B., & Hornig, S. (2006). Functional polymers based on dextran. *Polysaccharides II*, 199-291.
- Howell, C., Sandeman, S., Zheng, Y., Mikhalovsky, S., Nikolaev, V., Sakhno, L., & Snezhkova, E. (2016). New dextran coated activated carbons for medical use. *Carbon*, 97, 134-146.
- Hu, Q., Lu, Y., & Luo, Y. (2021). Recent advances in dextran-based drug delivery systems: From fabrication strategies to applications. *Carbohydrate Polymers*, 264, 117999.
- Izadi, H., Asadi, H., & Bemani, M. (2025). Chitin: a comparison between its main sources. *Frontiers in Materials*, 12, 1537067.
- Jiang, F., Xu, X.-W., Chen, F.-Q., Weng, H.-F., Chen, J., Ru, Y., Xiao, Q., & Xiao, A.-F. (2023). Extraction, modification and biomedical application of agarose hydrogels: a review. *Marine Drugs*, 21(5), 299.
- Kabbara, M., Gancheva, T., Gazil, O., & Virgilio, N. (2016). Preparation of Porous Organogels Using Water Soluble Polymer Templates. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 217(18), 2081-2088.
- Kariya, T., Nishimura, H., Mizuno, M., Suzuki, Y., Matsukawa, Y., Sakata, F., Maruyama, S., Takei, Y., & Ito, Y. (2018). TGF- β 1-VEGF-A pathway induces neoangiogenesis with

- peritoneal fibrosis in patients undergoing peritoneal dialysis. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 314(2), F167-F180.
- Kasravi, M., Ahmadi, A., Babajani, A., Mazloomnejad, R., Hatamnejad, M. R., Shariatzadeh, S., Bahrami, S., & Niknejad, H. (2023). Immunogenicity of decellularized extracellular matrix scaffolds: a bottleneck in tissue engineering and regenerative medicine. *Biomaterials research*, 27(1), 10.
- Katsumi, A., Naoe, T., Matsushita, T., Kaibuchi, K., & Schwartz, M. A. (2005). Integrin activation and matrix binding mediate cellular responses to mechanical stretch. *Journal of Biological Chemistry*, 280(17), 16546-16549.
- Keleştemur, S., Altunbek, M., & Culha, M. (2017). Influence of EDC/NHS coupling chemistry on stability and cytotoxicity of ZnO nanoparticles modified with proteins. *Applied Surface Science*, 403, 455-463.
- Kennedy, R., Costain, D. J., McAlister, V. C., & Lee, T. D. (1996). Prevention of experimental postoperative peritoneal adhesions by N, O-carboxymethyl chitosan. *Surgery*, 120(5), 866-870.
- 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.
- Kopecek, J. (2007). Hydrogel biomaterials: a smart future? *Biomaterials*, 28(34), 5185-5192. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.07.044
- Kotena, Z. M., & Fattahi, A. (2020). Comparison of acidity and metal ion affinity of D-Glucosamine and N-acetyl-D-glucosamine, a DFT study. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 98, 107612.
- Kumar, A., & Han, S. S. (2017). PVA-based hydrogels for tissue engineering: A review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 66(4), 159-182.
- Kumar, M. N. V. R., Muzzarelli, R. A. A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., & Domb, A. J. (2004). Chitosan Chemistry and Pharmaceutical Perspectives. *Chemical reviews*, 104(12), 6017-6084. doi:10.1021/cr030441b
- Kumar, V. B., Tiwari, O. S., Finkelstein-Zuta, G., Rencus-Lazar, S., & Gazit, E. (2023). Design of functional RGD peptide-based biomaterials for tissue engineering. *Pharmaceutics*, 15(2), 345.
- Lauder, C. I., Garcea, G., Strickland, A., & Maddern, G. J. (2011). Use of a modified chitosan–dextran gel to prevent peritoneal adhesions in a rat model. *Journal of Surgical Research*, 171(2), 877-882.
- Lauder, C. I., Strickland, A., & Maddern, G. J. (2012). Use of a modified chitosan–dextran gel to prevent peritoneal adhesions in a porcine hemicolectomy model. *Journal of Surgical Research*, 176(2), 448-454.
- Li, H., Li, X., Jain, P., Peng, H., Rahimi, K., Singh, S., & Pich, A. (2020). Dual-degradable biohybrid microgels by direct cross-linking of chitosan and dextran using azide–alkyne cycloaddition. *Biomacromolecules*, 21(12), 4933-4944.

- Li, H., Wei, X., Yi, X., Tang, S., He, J., Huang, Y., & Cheng, F. (2021). Antibacterial, hemostasis, adhesive, self-healing polysaccharides-based composite hydrogel wound dressing for the prevention and treatment of postoperative adhesion. *Materials Science and Engineering: C*, 123, 111978.
- Li, J., Feng, X., Liu, B., Yu, Y., Sun, L., Liu, T., Wang, Y., Ding, J., & Chen, X. (2017). Polymer materials for prevention of postoperative adhesion. *Acta biomaterialia*, 61, 21-40.
- Liao, J., Li, X., & Fan, Y. (2023). Prevention strategies of postoperative adhesion in soft tissues by applying biomaterials: based on the mechanisms of occurrence and development of adhesions. *Bioactive Materials*, 26, 387-412.
- Liberelle, B., Boucher, C., Chen, J., Jolicoeur, M., Durocher, Y., & De Crescenzo, G. (2010). Impact of epidermal growth factor tethering strategy on cellular response. *Bioconjugate chemistry*, 21(12), 2257-2266.
- Liberelle, B., Fortier, C., & De Crescenzo, G. (2014). Enhanced ELISA based on carboxymethylated dextran coatings. *Cytokine Bioassays: Methods and Protocols*, 39-47.
- Liu, E. Y., Jung, S., & Yi, H. (2016). Improved protein conjugation with uniform, macroporous poly (acrylamide-co-acrylic acid) hydrogel microspheres via EDC/NHS chemistry. *Langmuir*, 32(42), 11043-11054.
- Liu, G., Shi, Z., Kuriger, T., Hanton, L., Simpson, J., Moratti, S., Robinson, B., Athanasiadis, T., Valentine, R., & Wormald, P. (2009). *Synthesis and characterization of chitosan/dextran-based hydrogels for surgical use*. Paper presented at the Macromolecular symposia.
- Liu, J., Zheng, H., Poh, P. S., Machens, H.-G., & Schilling, A. F. (2015). Hydrogels for engineering of perfusable vascular networks. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15997-16016.
- Liu, J., Zheng, H., Poh, P. S. P., Machens, H.-G., & Schilling, A. F. (2015). Hydrogels for Engineering of Perfusable Vascular Networks. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15997-16016. Retrieved from <https://www.mdpi.com/1422-0067/16/7/15997>
- Liu, L., Tang, X., Wang, Y., & Guo, S. (2011). Smart gelation of chitosan solution in the presence of NaHCO₃ for injectable drug delivery system. *International journal of pharmaceutics*, 414(1-2), 6-15.
- Liu, X., Ma, L., Mao, Z., & Gao, C. (2011). Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Repair and Regeneration. In R. Jayakumar, M. Prabakaran, & R. A. A. Muzzarelli (Eds.), *Chitosan for Biomaterials II* (pp. 81-127). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Lou, W., Zhang, H., Ma, J., Zhang, D., Liu, C., Wang, S., Deng, Z., Xu, H., & Liu, J. (2012). In vivo evaluation of in situ polysaccharide based hydrogel for prevention of postoperative adhesion. *Carbohydrate Polymers*, 90(2), 1024-1031.
- Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M., & Werb, Z. (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(12), a005058.

- Luanda, A., & Badalamoole, V. (2023). Past, present and future of biomedical applications of dextran-based hydrogels: A review. *International journal of biological macromolecules*, 228, 794-807.
- Mahdi, N., Hassan, A., Al-Hasani, F., & Al-Jawher, W. (2024). Classification Of Biomaterials and Their Applications. *Journal Port Science Research*, 7, 281-299. doi:10.36371/port.2024.3.7
- Maia, J., Evangelista, M. B., Gil, H., & Ferreira, L. (2014). Dextran-based materials for biomedical applications. *Res Signpost*, 37661, 31-53.
- Malikmammadov, E., Tanir, T. E., Kiziltay, A., Hasirci, V., & Hasirci, N. (2018). PCL and PCL-based materials in biomedical applications. *Journal of Biomaterials science, Polymer edition*, 29(7-9), 863-893.
- Massia, S. P., Stark, J., & Letbetter, D. S. (2000). Surface-immobilized dextran limits cell adhesion and spreading. *Biomaterials*, 21(22), 2253-2261.
- McCahon, R., & Hardman, J. (2017). Pharmacology of plasma expanders. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 18(8), 418-420.
- Mirzaei, A., Esmkhani, M., Zallaghi, M., Nezafat, Z., & Javanshir, S. (2023). Biomedical and environmental applications of carrageenan-based hydrogels: a review. *Journal of Polymers and the Environment*, 31(5), 1679-1705.
- Mondal, D., Griffith, M., & Venkatraman, S. S. (2016). Polycaprolactone-based biomaterials for tissue engineering and drug delivery: Current scenario and challenges. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 65(5), 255-265.
- Moura, M. J., Figueiredo, M. M., & Gil, M. H. (2007). Rheological study of genipin cross-linked chitosan hydrogels. *Biomacromolecules*, 8(12), 3823-3829.
- Muzzarelli, R. A. (2009). Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*, 77(1), 1-9.
- Nair, L. S., & Laurencin, C. T. (2007). Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in polymer science*, 32(8-9), 762-798.
- Nemir, S., & West, J. L. (2010). Synthetic materials in the study of cell response to substrate rigidity. *Annals of biomedical engineering*, 38, 2-20.
- Nie, L., Wei, Q., Sun, M., Ding, P., Wang, L., Sun, Y., Ding, X., Okoro, O. V., Jiang, G., & Shavandi, A. (2023). Injectable, self-healing, transparent, and antibacterial hydrogels based on chitosan and dextran for wound dressings. *International journal of biological macromolecules*, 233, 123494.
- Noel, S., Fortier, C., Murschel, F., Belzil, A., Gaudet, G., Jolicoeur, M., & De Crescenzo, G. (2016). Co-immobilization of adhesive peptides and VEGF within a dextran-based coating for vascular applications. *Acta biomaterialia*, 37, 69-82.
- Oliverio, R., Liberelle, B., Patenaude, V., Moreau, V., Thomas, E., Virgilio, N., Banquy, X., & De Crescenzo, G. (2024). Cofunctionalization of Macroporous Dextran Hydrogels with Adhesive Peptides and Growth Factors Enables Vascular Spheroid Sprouting. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 10(8), 5080-5093.

- Osborne, E. A., Atkins, T. M., Gilbert, D. A., Kauzlarich, S. M., Liu, K., & Louie, A. Y. (2012). Rapid microwave-assisted synthesis of dextran-coated iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging. *Nanotechnology*, 23(21), 215602.
- Parès, L., Naasri, S., Delattre, L., Therriault, H., Liberelle, B., De Crescenzo, G., Lauzon, M.-A., Faucheux, N., Paquette, B., & Virgilio, N. (2024). Macroporous chitosan/alginate hydrogels crosslinked with genipin accumulate and retain glioblastoma cancer cells. *RSC advances*, 14(48), 35286-35304.
- Park, J. Y., Yeom, J., Kim, J. S., Lee, M., Lee, H., & Nam, Y. S. (2013). Cell-repellant dextran coatings of porous titania using mussel adhesion chemistry. *Macromolecular bioscience*, 13(11), 1511-1519.
- Piekarska, K., Sikora, M., Owczarek, M., Jóźwik-Pruska, J., & Wiśniewska-Wrona, M. (2023). Chitin and chitosan as polymers of the future—obtaining, modification, life cycle assessment and main directions of application. *Polymers*, 15(4), 793.
- Pieper, J., Hafmans, T., Veerkamp, J., & Van Kuppevelt, T. (2000). Development of tailor-made collagen–glycosaminoglycan matrices: EDC/NHS crosslinking, and ultrastructural aspects. *Biomaterials*, 21(6), 581-593.
- Pierschbacher, M. D., & Ruoslahti, E. (1984). Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*, 309(5963), 30-33.
- Predoi, D., Iconaru, S. L., & Predoi, M. V. (2019). Dextran-coated zinc-doped hydroxyapatite for biomedical applications. *Polymers*, 11(5), 886.
- Predoi, G., Ciobanu, C. S., Iconaru, S. L., Predoi, D., Dregheci, D. B., Groza, A., Barbuceanu, F., Cimpeanu, C., Badea, M.-L., & Barbuceanu, S.-F. (2021). Preparation and characterization of dextran coated iron oxide nanoparticles thin layers. *Polymers*, 13(14), 2351.
- Ramasundaram, S., Saravanakumar, G., Sobha, S., & Oh, T. H. (2022). Dextran sulfate nanocarriers: design, strategies and biomedical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 355.
- Ramos-de-la-Peña, A. M., Renard, C. M., 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, 37-49.
- Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., & Lemons, J. E. (2004). *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*: Elsevier.
- Reddy, M. S. B., Ponnammma, D., Choudhary, R., & Sadasivuni, K. K. (2021). A Comparative Review of Natural and Synthetic Biopolymer Composite Scaffolds. *Polymers*, 13(7), 1105. Retrieved from <https://www.mdpi.com/2073-4360/13/7/1105>
- Riahi, N., Liberelle, B., Henry, O., & De Crescenzo, G. (2017). Impact of RGD amount in dextran-based hydrogels for cell delivery. *Carbohydrate Polymers*, 161, 219-227.
- Rinaudo, M. (2006). Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in polymer science*, 31(7), 603-632.
- Rinaudo, M., Pavlov, G., & Desbrieres, J. (1999). Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer*, 40(25), 7029-7032.

- Roberts, G. A., & Roberts, G. A. (1992). Preparation of chitin and chitosan. *Chitin chemistry*, 54-84.
- Safi, C., Solano, A. G., Liberelle, B., Therriault, H., Delattre, L., Abdelkhalek, M., Wang, C., Bergeron-Fortier, S., Moreau, V., & De Crescenzo, G. (2022). Effect of chitosan on alginate-based macroporous hydrogels for the capture of glioblastoma cancer cells. *ACS Applied Bio Materials*, 5(9), 4531-4540.
- Said, N. S., Olawuyi, I. F., & Lee, W. Y. (2023). Pectin hydrogels: Gel-forming behaviors, mechanisms, and food applications. *Gels*, 9(9), 732.
- Sánchez-Machado, D. I., López-Cervantes, J., Escárcega-Galaz, A. A., Campas-Baypoli, O. N., Martínez-Ibarra, D. M., & Rascón-León, S. (2024). Measurement of the degree of deacetylation in chitosan films by FTIR, ¹H NMR and UV spectrophotometry. *MethodsX*, 12, 102583.
- Schnüriger, B., Barmparas, G., Branco, B. C., Lustenberger, T., Inaba, K., & Demetriades, D. (2011). Prevention of postoperative peritoneal adhesions: a review of the literature. *The American Journal of Surgery*, 201(1), 111-121.
- Sharma, S., & Jagadeesh Chandra Bose, K. (2024). Biomedical Applications of Dextran. *Biopolymers for Biomedical Applications*, 219-251.
- Sheng, M., Chen, Y., Li, H., Zhang, Y., & Zhang, Z. (2023). The application of corticosteroids for pathological scar prevention and treatment: current review and update. *Burns & Trauma*, 11, tkad009.
- Shin, C. S., Cabrera, F. J., Lee, R., Kim, J., Ammassam Veetil, R., Zaheer, M., Adumbumkulath, A., Mhatre, K., Ajayan, P. M., & Curley, S. A. (2021). 3D-bioprinted inflammation modulating polymer scaffolds for soft tissue repair. *Advanced materials*, 33(4), 2003778.
- Sionkowska, A., Kulka-Kamińska, K., Brudzyńska, P., Lewandowska, K., & Piwowarski, Ł. (2024). The influence of various crosslinking conditions of EDC/NHS on the properties of fish collagen film. *Marine Drugs*, 22(5), 194.
- Stapleton, L. M., Lucian, H. J., Grosskopf, A. K., Smith, A. A., Totherow, K. P., Woo, Y. J., & Appel, E. A. (2021). Dynamic hydrogels for prevention of post-operative peritoneal adhesions. *Advanced Therapeutics*, 4(3), 2000242.
- Stil, A., Liberelle, B., Guadarrama Bello, D., Lacomme, L., Arpin, L., Parent, P., Nanci, A., Dumont, É. C., Ould-Bachir, T., & Vanni, M. P. (2023). A simple method for poly-D-lysine coating to enhance adhesion and maturation of primary cortical neuron cultures in vitro. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 17, 1212097.
- Stratton, S., Shelke, N. B., Hoshino, K., Rudraiah, S., & Kumbar, S. G. (2016). Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering. *Bioactive Materials*, 1(2), 93-108.
- Sun, L., Li, X., Hao, L., Dong, Y., Zhou, L., Zhao, J., Ye, W., & Jiang, R. (2024). Microenvironment-Responsive Hydrogel Enclosed with Bioactive Nanoparticle for Synergistic Postoperative Adhesion Prevention. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 16(44), 60933-60947.
- Sun, T., & Qing, G. (2011). Biomimetic smart interface materials for biological applications. *Advanced materials*, 23(12), H57-H77.

- Szomstein, S., Menzo, E. L., Simpfendorfer, C., Zundel, N., & Rosenthal, R. J. (2006). Laparoscopic lysis of adhesions. *World journal of surgery*, 30, 535-540.
- Teixeira, J. P., Van Sant, L. M., & Nielsen, N. D. (2023). Pharmacology and clinical use of plasma expanders. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 24(7), 421-427.
- Thakur, V. K., & Thakur, M. K. (2014). Recent advances in graft copolymerization and applications of chitosan: a review. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2(12), 2637-2652.
- Tiwari, S., Patil, R., & Bahadur, P. (2018). Polysaccharide based scaffolds for soft tissue engineering applications. *Polymers*, 11(1), 1.
- Torres, F. G., Troncoso, O. P., Pisani, A., Gatto, F., & Bardi, G. (2019). Natural polysaccharide nanomaterials: an overview of their immunological properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20), 5092.
- Vashist, S. K. (2012). Comparison of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide based strategies to crosslink antibodies on amine-functionalized platforms for immunodiagnostic applications. *Diagnostics*, 2(3), 23-33.
- Vetere, P. F., Lazarou, G., Mondesir, C., Wei, K., Khullar, P., & Ogden, L. (2011). Strategies to minimize adhesion formation after surgery. *JSLs: Journal of the Society of Laparoendoscopic Surgeons*, 15(3), 350.
- 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.
- Wang, F., Li, J., Tang, X., Huang, K., & Chen, L. (2020). Polyelectrolyte three layer nanoparticles of chitosan/dextran sulfate/chitosan for dual drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 190, 110925.
- Winter, H. H., & Chambon, F. (1986). Analysis of linear viscoelasticity of a crosslinking polymer at the gel point. *Journal of rheology*, 30(2), 367-382.
- Wissink, M., Beernink, R., Pieper, J., Poot, A., Engbers, G., Beugeling, T., Van Aken, W., & Feijen, J. (2001). Immobilization of heparin to EDC/NHS-crosslinked collagen. Characterization and in vitro evaluation. *Biomaterials*, 22(2), 151-163.
- Xu, G., Liu, P., Pranantyo, D., Neoh, K.-G., & Kang, E.-T. (2018). Dextran-and chitosan-based antifouling, antimicrobial adhesion, and self-polishing multilayer coatings from pH-responsive linkages-enabled layer-by-layer assembly. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 6(3), 3916-3926.
- Yaneva, Z., Ivanova, D., Nikolova, N., & Tzanova, M. (2020). The 21st century revival of chitosan in service to bio-organic chemistry. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 34(1), 221-237.
- Yang, Q., Peng, J., Xiao, H., Xu, X., & Qian, Z. (2022). Polysaccharide hydrogels: Functionalization, construction and served as scaffold for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 278, 118952.
- Zhang, Y. S., & Khademhosseini, A. (2017). Advances in engineering hydrogels. *Science*, 356(6337), eaaf3627.

Zhao, Y., & Jalili, S. (2022). Dextran, as a biological macromolecule for the development of bioactive wound dressing materials: A review of recent progress and future perspectives. *International journal of biological macromolecules*, 207, 666-682.