

Développement d'un hydrogel riche en oxygène pour la thérapie cellulaire

par

Élisabeth POIRIER

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE
COMME EXIGENCE PARTIELLE À L'OBTENTION DE
LA MAÎTRISE AVEC MÉMOIRE EN GÉNIE DES TECHNOLOGIES DE
LA SANTÉ
M. Sc. A.

MONTREAL, LE 23 JUILLET 2026

ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC



Élisabeth Poirier, 2026



Cette [licence Creative Commons CC BY-NC-ND 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) signifie qu'il est permis de diffuser, d'imprimer ou de sauvegarder sur un autre support une partie ou la totalité de cette œuvre à condition de créditer l'auteur, que ces utilisations soient faites à des fins non commerciales et que le contenu de l'œuvre n'ait pas été modifié.

PRÉSENTATION DU JURY
CE MÉMOIRE A ÉTÉ ÉVALUÉ
PAR UN JURY COMPOSÉ DE :

Mme Sophie Lerouge, directrice de mémoire
Département de génie mécanique à l'École de technologie supérieure

Mme Nicola Hagemeister, présidente du jury
Département de génie des systèmes à l'École de technologie supérieure

Mme Claudiane Ouellet-Plamondon, membre du jury
Département de génie de la construction à l'École de technologie supérieure

IL A FAIT L'OBJET D'UNE SOUTENANCE DEVANT JURY ET PUBLIC

LE 16 JUILLET 2026

À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE

REMERCIEMENTS

Je remercie ma directrice de recherche Sophie Lerouge pour sa confiance et la latitude qu'elle m'a accordée tout au long du projet afin que je puisse explorer, au meilleur de mes connaissances, ce sujet plein de défis et d'apprentissages qui ont été des plus formateurs. Un grand merci à Baptiste Marin pour son support très généreux dans les expériences avec les OT-I ce qui comprend entre autres la collecte de rates de souris, la formation et l'accompagnement dans l'isolation des OT-I, l'opération du cytomètre, le traitement des résultats sur FlowJo et ses réponses à mes nombreuses questions. Merci également à Pamela Thébault et au laboratoire Lapointe pour les PBMCs et les anticorps et à Mélanie Borie et au laboratoire Noiseux pour m'avoir fourni le système de purge (cellules). Un énorme merci à Aurélie Cleret-Buhot pour sa grande gentillesse, ses enseignements et son accompagnement dans la prise d'images au microscope confocal. Merci à Sylvie Gervais pour son aide précieuse dans les analyses statistiques. Merci à Victor Brial pour la formation sur le FTIR et Hamza Sofiane Meddas, sur le MEB de table. Merci à Ehsan Tolouei pour la formation sur HighScore Plus et pour la prise d'images avec le MEB haute résolution. Un grand merci à Mohammad Saadati pour les acquisitions au XRD et au MEB haute résolution et pour ses précieux conseils et son support. Merci à Julie Bertucceli pour son travail sur les programmes du rhéomètre utilisés dans ces travaux et pour son grand cœur. Merci à Maria De La Cruz pour m'avoir guidée et avoir répondu à mes mille et un questionnements en lien avec la sécurité et les produits chimiques. Un grand merci également aux membres présents et passés du BBF pour leur gentillesse et leur support ainsi qu'aux étudiants ayant pris le temps de me former et de répondre à mes questions. Enfin, le plus grand merci est pour ma famille, mon phare dans les beaux jours comme dans les tempêtes, qui a su me redonner du courage quand il n'en restait plus et qui a cru en moi lorsque j'étais seule et que je n'y croyais plus.

Je remercie les organismes ayant octroyé un financement pour ce projet/ I wish to acknowledge the financial support of: le Fonds de recherche du Québec (FRQ) (<https://doi.org/10.69777/341338>), le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG)/the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (596787-2024) et le réseau ThéCell.

Développement d'un hydrogel riche en oxygène pour la thérapie cellulaire

Élisabeth POIRIER

RÉSUMÉ

Les matrices injectables pourraient améliorer la thérapie cellulaire adoptive du cancer en livrant et maintenant des lymphocytes T et des cytokines directement au site tumoral contrairement au traitement intraveineux traditionnel. Cependant, le manque d'oxygène dans les matrices avant l'angiogenèse limite la survie et la prolifération des cellules et donc l'efficacité de cette approche. Ce projet est une première étape en vue d'oxygéner un hydrogel de chitosane pour la thérapie cellulaire grâce au peroxyde de calcium (CaO_2). Il s'est divisé en deux objectifs.

Le premier objectif consistait à identifier un modèle cellulaire pour tester l'hydrogel oxygéné. L'effet de l'hypoxie sur les cellules T encapsulées dans les matrices (sans CaO_2) a été évalué sur deux lignées différentes par des essais *live/dead*, d'activité métabolique et des analyses cytométriques. Selon les cas, l'hypoxie semblait diminuer la viabilité et la prolifération mais promouvoir l'activation, le phénotype mémoire centrale (et effecteur) et l'épuisement.

Le second objectif consistait à développer et évaluer l'efficacité d'une approche pour oxygéner l'hydrogel grâce au CaO_2 . Ce peroxyde a été recouvert d'hydroxyapatite dans du tampon phosphate afin d'obtenir un relargage d'oxygène constant et prolongé dans la matrice au lieu du *burst release* caractéristique du CaO_2 . Changer les paramètres de recouvrement a grandement affecté le relargage des produits et la morphologie/nature du recouvrement. Le profil de relargage idéal n'a pas été obtenu, mais les résultats suggèrent que recouvrir à 50°C et augmenter la concentration de particules dans le gel sont des paramètres prometteurs. Des méthodes de détection de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène relagués du CaO_2 ont aussi été mises au point.

En conclusion, ce projet était une première étape importante dans le développement d'une matrice oxygénée afin d'améliorer la survie et la prolifération des cellules encapsulées. D'autres thérapies cellulaires pourraient bénéficier de cette matrice oxygénée.

Mots-clés : hypoxie, peroxyde de calcium, hydrogel, thérapie cellulaire

Development of an oxygen-rich hydrogel for cell therapy

Élisabeth POIRIER

ABSTRACT

Injectable scaffolds have the potential to improve the adoptive cell therapy treatment by delivering and maintaining T lymphocytes and cytokines at the tumor site unlike traditional intravenous treatments. However, the lack of oxygen in the scaffold before angiogenesis occurs limits cell survival and proliferation and hence the efficacy of this approach. This project is a first step toward oxygenating a chitosan hydrogel scaffold for cell therapy using calcium peroxide (CaO_2). It was divided into two objectives.

The first objective aimed to identify a cell model to test the oxygen-rich hydrogel. The effects of hypoxia on T cells encapsulated in scaffolds (without CaO_2) were evaluated for two different cell lines using live/dead and metabolic activity assays and cytometry analyses. In some cases, hypoxia seemed to decrease cell viability and proliferation but promote activation, central memory (and effector) phenotype and exhaustion.

The second objective aimed to develop and evaluate the efficacy of an approach to oxygenate hydrogels with CaO_2 . The peroxide was coated with hydroxyapatite in phosphate buffer to obtain a constant and prolonged oxygen release in the scaffold instead of the intrinsic burst release of CaO_2 . Changing the coating parameters greatly impacted the product release and the morphology/nature of the coating. The ideal release profile could not be obtained but coating at 50°C and increasing the particle concentration in the gel were promising parameters according to the results. Detection methods for oxygen and hydrogen peroxide released from CaO_2 were also investigated.

In conclusion, this project was an important first step in the development of an oxygen-rich scaffold to improve the survival and the proliferation of encapsulated cells. This scaffold could also benefit other cell therapies.

Keywords: hypoxia, calcium peroxide, hydrogel, cell therapy

TABLE DES MATIÈRES

	Page
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE	5
1.1 Biomatériaux : les matrices.....	5
1.1.1 Les matrices en bref.....	5
1.1.2 Cahier des charges	6
1.1.3 Utilisation des matrices pour l'administration des cellules – avantages et limitations	6
1.1.4 Les hydrogels de chitosane	7
1.1.4.1 Chitosane comme biomatériau.....	7
1.1.4.2 Processus de gélification des hydrogels de chitosane thermosensibles.....	8
1.2 La thérapie cellulaire.....	10
1.2.1 Définition	10
1.2.2 Thérapie cellulaire adoptive: une méthode d'immunothérapie contre le cancer	10
1.2.2.1 Définition	10
1.2.2.2 Avantages de la thérapie cellulaire adoptive locale et rôle des matrices	12
1.3 Rôle et effets de l'oxygène sur les cellules	13
1.3.1 Accès limité à l'oxygène dans les matrices	13
1.3.2 Hypoxie et cellules immunitaires.....	14
1.4 Méthodes pour oxygéner les matrices.....	19
1.4.1 Transporteurs d'oxygène : perfluorocarbones et hémoglobines.....	19
1.4.2 Générateurs d'oxygène : peroxydes solides.....	20
1.4.3 Peroxyde de calcium	22
1.4.3.1 Réaction en milieu aqueux et production de peroxyde d'hydrogène et d'oxygène.....	22
1.4.3.2 Applications	25
1.4.3.3 Limitations du CaO ₂ et solutions	26
1.5 Hydroxyapatite.....	29
1.5.1 Propriétés et formation.....	30
1.5.2 Facteurs influençant le processus de formation de l'hydroxyapatite.....	31
1.6 Résumé de la littérature, problématique et objectifs du projet	32
CHAPITRE 2 MÉTHODOLOGIE	37
2.1 Préparation des hydrogels de chitosane	37
2.1.1 Préparation de la solution de chitosane.....	37
2.1.2 Préparation de l'agent gélifiant.....	37
2.1.3 Fabrication des hydrogels	38
2.1.4 Modifications au processus de fabrication des hydrogels.....	39

2.2	Culture cellulaire, essais de viabilité/activité métabolique, cytométrie.....	39
2.2.1	Culture hypoxique des cellules	40
2.2.2	Essais <i>live/dead</i> et d'activité métabolique	40
2.2.3	Expériences avec les cellules Jurkat	41
2.2.4	Expériences avec les cellules OT-I.....	43
2.3	Processus de recouvrement du CaO ₂ dans le tampon phosphate.....	45
2.3.1	Préparation du tampon phosphate.....	45
2.3.2	Recouvrement des particules de CaO ₂	45
2.3.3	Paramètres étudiés dans les expériences avec CaO ₂	46
2.4	Quantification du relargage d'H ₂ O ₂ et d'O ₂ produits par les hydrogels encapsulant les particules de CaO ₂	52
2.4.1	Relargage de l'H ₂ O ₂	52
2.4.2	Relargage de l'O ₂	54
2.5	Caractérisation des particules de CaO ₂ recouvertes de phosphate de calcium	55
2.5.1	Microscopie électronique à balayage.....	56
2.5.2	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier	57
2.5.3	Diffraction des rayons X.....	57
2.5.4	Effet des particules sur le pH des solutions et hydrogels.....	57
2.5.5	Rhéologie	58
2.6	Statistiques	59
CHAPITRE 3 RÉSULTATS.....		61
3.1	Objectif 1 : Caractérisation du comportement des cellules immunitaires en hypoxie.....	61
3.1.1	Marquage des cellules cultivées dans la chambre hypoxique.....	61
3.1.2	Cellules Jurkat : effet de la culture hypoxique en milieu faible en sérum sur la viabilité et l'activité métabolique	62
3.1.3	Cellules PBMCs : effet du stress hypoxique sur la viabilité et l'activité métabolique.....	66
3.1.4	Cellules OT-I : effet du stress hypoxique sur la viabilité, l'activité métabolique, la prolifération, l'activation et l'épuisement	66
3.2	Objectif 2 : Développement de méthodes pour la caractérisation et l'optimisation des particules de CaO ₂ , recouvertes d'HAp, relarguant du H ₂ O ₂ et de l'O ₂ pour l'oxygénation des matrices	76
3.2.1	Effet de l'ajout de CaO ₂ dans la solution d'hydrogel sur le pH.....	76
3.2.2	Effet de la présence des particules sur les propriétés mécaniques des hydrogels.....	78
3.2.3	Commentaires préalables sur le protocole de mise en hypoxie et de mesure d'oxygène	79
3.2.4	Effet du processus de recouvrement sur le relargage de produits.....	80
3.2.5	Effet de la présence du gel sur le relargage d'H ₂ O ₂ et d'O ₂	83
3.2.6	Effet de la présence de la catalase dans les hydrogels	84
3.2.7	Effet de la molarité du tampon phosphate	86
3.2.8	Effet de la nature de la solution au-dessus de l'hydrogel	86
3.2.9	Effet de la température.....	87

3.2.10	Effet du temps d'agitation dans le tampon phosphate	89
3.2.11	Effet du pH du tampon phosphate	93
3.2.12	Effet du ratio Ca/P lors du recouvrement	95
3.2.13	Effet de la température de séchage	98
3.2.14	Effet de la concentration des particules dans les hydrogels (relargage d'O ₂ seulement)	99
CHAPITRE 4 DISCUSSION		103
4.1	Objectif 1 : Caractérisation du comportement des cellules immunitaires en hypoxie.....	103
4.1.1	Cellules T Jurkat	103
4.1.2	Cellules T CD8 ⁺ murines (OT-I)	104
4.1.3	Limitations	105
4.1.4	Résumé et recommandations	105
4.2	Objectif 2 : Développement de méthodes pour la caractérisation et l'optimisation des particules de CaO ₂ , recouvertes d'HAp, relarguant du H ₂ O ₂ et de l'O ₂ pour l'oxygénation des matrices	106
4.2.1	Tendances de relargage observées dans ce projet.....	109
4.2.2	Difficultés à situer les travaux avec ceux de la littérature et critères de relargage d'une matrice oxygénée « idéale ».....	112
4.2.3	Paramètres prometteurs.....	114
4.2.4	Limitations	114
4.2.5	Résumé et recommandations	117
CONCLUSION.....		121
ANNEXE I	COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE ET CONDITIONS DE CULTURE AVANT ENCAPSULATION.....	123
ANNEXE II	PROTOCOLE OT-I : INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES	125
ANNEXE III	PLAN D'ANALYSE STATISTIQUE.....	127
ANNEXE IV	MARQUAGE DES CELLULES JURKAT HYPOXIQUES AVEC L'HypoxiTRAK™	129
ANNEXE V	VIABILITÉ ET ACTIVITÉ MÉTABOLIQUE DES CELLULES JURKAT NON ENCAPSULÉES.....	131
ANNEXE VI	VIABILITÉ ET ACTIVITÉ MÉTABOLIQUE DES CELLULES PBMCs ENCAPSULÉES ET NON ENCAPSULÉES – RÉSULTATS ET DISCUSSION	133
ANNEXE VII	VIABILITÉ DES CELLULES OT-I NON ENCAPSULÉES.....	137

ANNEXE VIII	pH DE LA SOLUTION D'HYDROGEL CONTENANT DES PARTICULES RECOUVERTES OU NON ET DU PBS QUI RECOUVRE LES GELS.....	139
ANNEXE IX	COURBES DE RELARGAGE D'O ₂ OBTENUES AVEC LA MÉTHODE INITIALE (#1) DE MISE EN HYPOXIE (RÉSULTATS NON FIABLES)	141
ANNEXE X	RECOUVREMENT DANS L'EAU ULTRA PURE VS TAMPON PHOSPHATE	143
ANNEXE XI	MOLARITÉ DU TAMPON PHOSPHATE LORS DU RECOUVREMENT.....	145
ANNEXE XII	EFFET DE LA NATURE DE LA SOLUTION AU-DESSUS DE L'HYDROGEL.....	147
ANNEXE XIII	MEB - PARTICULES RECOUVERTES DANS DIFFÉRENTES CONDITIONS DE RECOUVREMENT	149
ANNEXE XIV	SPECTRES FTIR.....	153
ANNEXE XV	RELARGAGE D'H ₂ O ₂ SELON LA TEMPÉRATURE DE SÉCHAGE DES PARTICULES.....	155
	LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	157

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 2.1	Paramètres modifiés dans le processus de recouvrement du CaO_2 et nom des échantillons correspondants*47
Tableau 2.2	Extensions utilisées dans R et RStudio60
Tableau 4.1	Résultats globaux des effets engendrés par les modifications au processus de recouvrement des particules de CaO_2 et des conditions de « culture » des hydrogels contenant les particules sur les profils de relargage des produits (H_2O_2 et O_2)107

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1.1	Exemple de matrice cellulaire contenant des substances utiles (jaunes) à l'application5
Figure 1.2	Chaines de chitosane (1) protonées après dissolution dans l'acide (2). Déprotonation et précipitation des chaines après l'ajout d'une base (3a) ou gélification, après l'ajout de l'agent gélifiant, par déprotonation graduelle et organisation des chaines en 3D (3b)9
Figure 1.3	Collecte, culture et réadministration des cellules T d'un patient pour la thérapie cellulaire adoptive11
Figure 1.4	Hydrogel de chitosane thermogélifié <i>in situ</i> libérant des cellules T près de la tumeur afin de la détruire (basé sur les travaux de Cunningham et al. (2023)). Gauche : comportement idéal, droite : comportement d'après les observations pratiques13
Figure 1.5	Lorsque la matrice est trop éloignée des vaisseaux sanguins ou trop épaisse une partie ou même l'entièreté peut devenir anoxique (sans O ₂). Présentation d'un gradient hypothétique d'O ₂ dans la matrice allant de l'anoxie à la physioxie14
Figure 1.6	Résumé de la revue de la littérature sur les effets de l'hypoxie sur les cellules T18
Figure 1.7	Résumé des principaux concepts en lien avec le CaO ₂ présentés dans ce chapitre29
Figure 1.8	Schéma hypothétique du recouvrement poreux d'hydroxyapatite à la surface des particules de CaO ₂ . Le ralentissement de la réaction entre l'eau et le CaO ₂ permettrait un relargage de produits plus faible mais prolongé au lieu du <i>burst release</i>35
Figure 2.1	Fabrication des hydrogels de chitosane avec cellules (option 1) ou avec particules de CaO ₂ (option 2 avec ou sans catalase (cat.))38
Figure 2.2	Schéma des tests cellulaires39
Figure 2.3	Processus de mise en hypoxie des cellules40
Figure 2.4	Plan de plaques pour les essais <i>live/dead</i> (gauche) et d'activité métabolique (droite). Neuf paires de plaques sont préparées car chaque condition d'O ₂ pour chaque <i>time point</i> requiert une paire. Les mêmes

	cellules ne sont donc pas suivies au cours du temps. Orange : milieu à 10% sérum, vert : milieu à 1% sérum. Rond plein : gel sans cellules, losanges : cellules seules contrôles, hachuré : cellules encapsulées42
Figure 2.5	Plan de plaque des tests avec HypoxiTRAK™. Rose : 0 nM, bleu : 50 nM, losanges : cellules Jurkat seules, hachuré : cellules encapsulées. <i>Time points</i> considérés (en hypoxie et normoxie) : jours 1, 3 et 7. Six plaques sont préparées (une par <i>time point</i> et par condition d'O ₂).....43
Figure 2.6	Processus général de recouvrement du CaO ₂ dans le tampon phosphate basé sur les travaux de Tomioka et al. (2023)46
Figure 2.7	Relargage d'H ₂ O ₂ et d'O ₂ en hypoxie des hydrogels encapsulant des particules de CaO ₂ (relargages détectés dans deux plaques distinctes pour chaque espèce).....52
Figure 2.8	Processus général pour la quantification du H ₂ O ₂ relargué des gels encapsulant les particules de CaO ₂ ayant subi différents processus de recouvrement.....53
Figure 2.9	Mesure de l'oxygène relargué par les hydrogels encapsulant des particules de CaO ₂ en hypoxie à l'aide de l'oxygénomètre et de la fibre optique. A : sonde de température, B : oxygénomètre, C : fibre optique, D : capteur d'oxygène et E : gel en hypoxie55
Figure 2.10	Techniques de caractérisation des particules après recouvrement.....56
Figure 2.11	pH de l'agent gélifiant (1), de la solution d'hydrogel (2) et du PBS (3) en présence du CaO ₂58
Figure 3.1	Activité métabolique des cellules Jurkat encapsulées dans des hydrogels sur 14 jours en fonction du milieu (faible en sérum (1%) ou régulier (10%)) et de la concentration en oxygène (hypoxie (< 1 % O ₂) ou normoxie). Effet de l'hypoxie en milieu pauvre en sérum (a) ou en milieu régulier (b). Effet du milieu en hypoxie (c) ou normoxie (d). Milieu changé à chaque 2 – 3 jours. *, **, *** p < 0,05, 0,01, 0,001 respectivement. a, b et c : Student's T-test à chaque <i>time point</i> et d : aligned rank transform (ART) ANOVA et contrastes. N=2, n=8.....63
Figure 3.2	Essais <i>live/dead</i> des cellules Jurkat encapsulées dans des hydrogels sur 14 jours en hypoxie ou normoxie, dans du milieu faible en sérum ou régulier (données des jours 0 et 14 non présentées, vert = cellules vivantes et rouge = cellules mortes). Milieu changé à chaque 2 – 3 jours. Échelle : 200 µm. N=2, n=4.....64

Figure 3.3	Activité métabolique des cellules OT-I encapsulées dans des hydrogels sur 7 jours en hypoxie ou normoxie. Milieu régulier changé à chaque 2 – 3 jours. ART ANOVA et contrastes. N=2, n=6.....67
Figure 3.4	Essais <i>live/dead</i> des cellules OT-I encapsulées dans des hydrogels sur 7 jours en hypoxie ou normoxie (données du jour 0 non présentées, vert = cellules vivantes et rouge = cellules mortes). Milieu régulier changé à chaque 2 – 3 jours. Échelle : 200 μ m. N=2, n=468
Figure 3.5	Signal CFSE des OT-I non encapsulés (vivants) et encapsulés (vivants+morts) en hypoxie (rouge) et en normoxie (bleu) aux jours 3 et 7 (prolifération). N=1, n=1.....70
Figure 3.6	Expression du CD25 et du CD44/CD62L des OT-I non encapsulés (vivants) et encapsulés (vivants+morts) en hypoxie (rouge) et en normoxie (bleu) aux jours 3 et 7 (activation/phénotype). N=1, n=172
Figure 3.7	Expression du LAG-3, TIM-3 et PD-1 des OT-I non encapsulés (vivants) et encapsulés (vivants+morts) en hypoxie (rouge) et en normoxie (bleu) aux jours 3 et 7 (épuisement). N=1, n=1.....74
Figure 3.8	Évolution du pH pendant 10 min après l'ajout de particules dans l'agent gélifiant. Gauche : CPO (particules non recouvertes), droite : CPO_ctrl (particules recouvertes). *, **, *** p < 0,05, 0,01, 0,001 respectivement. Gauche : Student's T-test pour tous les <i>time points</i> (sauf 1 à 3 min : Mann-Whitney) et droite : ART ANOVA et contrastes (tous les <i>time points</i>). N=1, n=3.....77
Figure 3.9	Modules de perte (G'') et de stockage (G') des hydrogels thermogélifiants encapsulant des particules recouvertes (CPO_ctrl) ou non (CPO) et avec ou sans catalase (cat). La bande grise marque la zone où la température augmente de 22 à 37°C. Les courbes pâles indiquent la présence de catalase. Courbes représentatives pour chaque condition. N=1, n=378
Figure 3.10	Gauche : concentration quotidienne d'H ₂ O ₂ relargué des hydrogels dans le PBS en normoxie sur 7 jours en fonction de la présence d'un recouvrement. Comparaison entre CPO (aucun recouvrement) et CPO_ctrl (recouvert dans du tampon phosphate). Droite : agrandissement sur les données des jours 3 à 7. Student's T-tests (pour tous les <i>time points</i>). N=1, n=381
Figure 3.11	Spectres FTIR des particules de CPO commercial, CPO_ctrl (recouvert d'HAp) et HAp commercial. Spectres normalisés à 1044 cm ⁻¹ , CPO normalisé à 1482 cm ⁻¹ . L'HAp et le CPO_ctrl possèdent tous les pics du phosphate qui sont absents pour le CPO.....82

Figure 3.12	Concentration d' H_2O_2 (a) et d' O_2 (b) (contrôle négatif soustrait) relargués en hypoxie sur 7 jours. Comparaison entre les relargages de particules seules ou encapsulées dans des hydrogels. Gauche : CPO (non recouvert), droite : CPO_ctrl (recouvert). Données au jour 0 collectées après 3,5 heures au lieu de 3 heures. Student's T-test pour tous les <i>time points</i> (sauf jour 1 (H_2O_2) et 0 ₁ (O_2 -CPO_ctrl) : Mann-Whitney). N=1, n=384
Figure 3.13	Gauche : effet de la catalase (cat) sur la concentration quotidienne d' H_2O_2 relargué des hydrogels contenant du CPO (non recouvert) dans le PBS en hypoxie sur 7 jours. Student's T-test pour tous les <i>time points</i> (sauf jour 1: Mann-Whitney). N=1, n=3. Droite : concentration d' O_2 relargué en hypoxie sur 7 jours dans les hydrogels CPO et CPO_cat. N=1, n=185
Figure 3.14	Effet de la catalase (cat) sur la concentration quotidienne, dans le PBS en hypoxie sur 7 jours, d' H_2O_2 relargué des hydrogels chargés en particules recouvertes (CPO_ctrl). Student's T-test (pour tous les <i>time points</i>). N=1, n=386
Figure 3.15	Gauche : concentration quotidienne d' H_2O_2 relargué des hydrogels dans le PBS en hypoxie sur 7 jours en fonction de la température de recouvrement des particules, soit 4°C (CPO_4), température pièce (CPO_RT), 37°C (CPO_ctrl) et 50°C (CPO_50). Droite : agrandissement sur les données des jours 3 à 7. One-way ANOVA pour tous les <i>time points</i> (sauf jours 0 et 3 : Kruskal-Wallis). N=1, n = 387
Figure 3.16	(a) Spectres FTIR des particules de CPO commercial (aucun recouvrement) et des particules recouvertes à 50°C (CPO_50), 37°C (CPO_ctrl) et 4°C (CPO_4) normalisés à 1044 cm^{-1} (CPO normalisé à 1482 cm^{-1}). Images obtenues du MEB par électrons rétrodiffusés à 15 kV des particules (b) CPO_ctrl et (c) CPO_4. Échelle : 30 μm88
Figure 3.17	Gauche : concentration quotidienne d' H_2O_2 relargué des hydrogels dans le PBS en hypoxie sur 7 jours en fonction du temps passé par les particules dans le tampon phosphate lors du recouvrement, soit 1 min (CPO_1min) ou 60 min (CPO_ctrl). Droite : agrandissement sur les données des jours 3 à 7. Student's T-test (pour tous les <i>time points</i>). N=1, n = 390
Figure 3.18	(a) Concentration d' O_2 relargué dans les hydrogels en hypoxie sur 7 jours en fonction du temps passé par les particules dans le tampon phosphate lors du recouvrement, soit 1 min (CPO_1min) ou 60 min (CPO_ctrl). N=1, n = 1. (b) Spectres FTIR des particules de CPO commercial (aucun recouvrement) et du CPO avec différentes durées

	de recouvrement (1 à 60 min) normalisés à 1044 cm^{-1} (CPO normalisé à 1482 cm^{-1})91
Figure 3.19	Spectres XRD des particules de CPO commercial (aucun recouvrement) et du CPO avec différentes durées de recouvrement (1 à 60 min (CPO_ctrl))91
Figure 3.20	Gauche : concentration quotidienne d' H_2O_2 relargué des hydrogels dans le PBS en hypoxie sur 7 jours en fonction du pH du tampon phosphate lors du recouvrement, soit CPO_pH5, CPO_ctrl (pH 7) et CPO_pH11. Droite : agrandissement sur les données des jours 3 à 7. One-way ANOVA pour tous les <i>time points</i> (sauf jours 0, 2 et 6 : Kruskal-Wallis). N=1, n=394
Figure 3.21	(a) Concentration d' O_2 relargué dans les hydrogels en hypoxie sur 7 jours en fonction du pH du tampon phosphate lors du recouvrement, soit CPO_pH5, CPO_ctrl (pH 7) et CPO_pH11. N=1, n=1. (b) Spectres FTIR des particules de CPO commercial (aucun recouvrement), CPO_pH5, CPO_ctrl et CPO_pH11 normalisés à 1044 cm^{-1} (CPO normalisé à 1482 cm^{-1} , CPO_pH5 non normalisé)94
Figure 3.22	Gauche : concentration quotidienne d' H_2O_2 relargué des hydrogels dans le PBS en hypoxie sur 7 jours en fonction du ratio Ca/P dans le tampon phosphate, soit Ca/P = 0,14 (CPO_ctrl) et Ca/P = 1 à 2. Droite : agrandissement sur les données des jours 3 à 7. One-way ANOVA pour tous les <i>time points</i> (sauf jour 5 : Kruskal-Wallis). N=1, n=396
Figure 3.23	(a) Concentration d' O_2 relargué dans les hydrogels en hypoxie sur 7 jours en fonction du ratio Ca/P dans le tampon phosphate, soit Ca/P = 0,14 (CPO_ctrl) et Ca/P = 1 à 2. N=1, n=1. (b) Spectres FTIR des particules de CPO (aucun recouvrement) et du CPO recouvert à différents ratios Ca/P normalisés à 1044 cm^{-1} (CPO normalisé à 1482 cm^{-1})97
Figure 3.24	(a) Concentration d' O_2 relargué dans les hydrogels en hypoxie sur 7 jours en fonction de la température de séchage des particules après le recouvrement, soit température pièce (CPO_dRT) et 70°C (CPO_ctrl). N=1, n=2. (b) Image obtenue du MEB par électrons rétrodiffusés à 15 kV des particules CPO_dRT. Échelle : 30 μm98
Figure 3.25	Concentration d' O_2 relargué dans les hydrogels en hypoxie sur 7 jours en fonction de la concentration dans le gel de particules (a) non recouvertes (CPO) et (b) recouvertes (CPO_ctrl). Données au jour 0 ₃ collectées après 1 heure au lieu de 3 heures. 500 μL de gel par puit au

lieu de 200 μ L. One-way ANOVA pour tous les *time points* (sauf a
jours 1 à 3 : Kruskal-Wallis). N=1, n=3100

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ACP	Phosphate de calcium amorphe (<i>amorphous calcium phosphate</i>)
ACT	Thérapie cellulaire adoptive (<i>adoptive cell therapy</i>)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANOVA	Analyse de variance (<i>analysis of variance</i>)
ART	Transformation des rangs alignés (<i>aligned rank transform</i>)
BGP	β -glycérophosphate disodique hydraté
BSA	Albumine de sérum bovin (<i>bovine serum albumin</i>)
Ca^{2+}	Ion calcium
CaCO_3	Formule moléculaire du carbonate de calcium
CaO_2	Formule moléculaire du peroxyde de calcium
Ca(OH)_2	Formule moléculaire de l'hydroxyde de calcium
Ca/P	Ratio calcium/phosphore
$\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$	Agrégat de Posner
$\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6(\text{H}_2\text{O})_{30}$	Forme hydratée de l'agrégat de Posner
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	Formule moléculaire de l'hydroxyapatite
CAR	Récepteur antigénique chimérique (<i>chimeric antigen receptor</i>)
CAR-T	Lymphocytes T à récepteur antigénique chimérique (<i>chimeric antigen receptor T cells</i>)
CDHA	Hydroxyapatite déficient en calcium (<i>calcium-deficient hydroxyapatite</i>)
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
CHO-S	Ovarienne de hamster chinois (<i>Chinese hamster ovary</i>)
Cl^-	Ion chlorure
CO_2	Formule moléculaire du dioxyde de carbone
CO_3^{2-}	Ion carbonate
CPO	Peroxyde de calcium (<i>calcium peroxide</i>)
CTLA-4	Protéine 4 associée aux lymphocytes T cytotoxiques (<i>cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4</i>)
Cu	Cuivre
3D	Trois dimensions
DDA	Degré de désacétylation
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
EDX	Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (<i>energy-dispersive X-ray spectrometry</i>)
EthD-1	Éthidium homodimère-1
F^-	Ion fluorure

FACS	Tri de cellules marquées par fluorescence (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FBS	Sérum de veau fœtal (<i>fetal bovine serum</i>)
FDA	<i>Food & Drug Administration</i>
Fe ²⁺	Ion ferreux
Fe ³⁺	Ion ferrique
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
G'	Module de stockage
G''	Module de perte
GelMA	Gélatine méthacrylée
GLUT1, GLUT3	Transporteurs de glucose 1, 3
H ⁺	Ion hydrogène
HAp	Hydroxyapatite
HBOC	Transporteur d'oxygène à base d'hémoglobine (<i>hemoglobin-based oxygen carrier</i>)
HCl	Formule moléculaire de l'acide chloridrique
HCO ₃ ⁻	Ion hydrogénocarbonate
HIF	Facteur induit par l'hypoxie (<i>hypoxia-inducible factor</i>)
H ₂ O ₂	Formule moléculaire du peroxyde d'hydrogène
HPO ₄ ²⁻	Ion hydrogénophosphate
IFN-γ	Interféron gamma
IL-2, IL-7, IL-10, IL-15	Interleukine-2, 7, 10, 15
K ⁺	Ion potassium
KBr	Formule moléculaire du bromure de potassium
LAG-3	Gène 3 d'activation des lymphocytes (<i>lymphocyte activation gene 3</i>)
MEB	Microscopie/microscope électronique à balayage
MFI	Intensité moyenne de fluorescence (<i>mean fluorescence intensity</i>)
Mg ²⁺	Ion magnésium
MgO ₂	Formule moléculaire du peroxyde de magnésium
MSC	Cellule souche mésenchymateuse (<i>mesenchymal stem cell</i>)
N ₂	Formule moléculaire de l'azote gazeux
-NH ₂	Groupe amine
-NH ₃ ⁺	Groupe amine protonée
Na ⁺	Ion sodium
(Na ₂ CO ₃) ₂ •3H ₂ O ₂	Formule moléculaire du percarbonate de sodium
NaH ₂ PO ₄	Formule moléculaire du dihydrogénophosphate de sodium
Na ₂ HPO ₄	Formule moléculaire de l'hydrogénophosphate de disodium

NaOH	Formule moléculaire de l'hydroxyde de sodium
norm.	Normalisé
O ₂	Formule moléculaire de l'oxygène gazeux
O ₂ ²⁻	Ion peroxyde
-OH	Groupe hydroxyle
OH ⁻	Ion hydroxyde
OT-I	Cellules T CD8 ⁺ de souris
PBMC	Cellule mononucléée du sang périphérique (<i>peripheral blood mononucleated cell</i>)
PBS	Tampon phosphate salin (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCL	Polycaprolactone
PD-1	Protéine 1 de la mort cellulaire programmée (<i>programmed cell death protein-1</i>)
PD-L1	Ligand de la mort programmée-1 (<i>programmed death ligand-1</i>)
PEG	Polyéthylène glycol
PFC	Perfluorocarbène
PFOB	Bromure de perfluorooctyle (<i>perfluorooctyl bromide</i>)
PFTBA	Perfluorotributylamine
pH	Potentiel hydrogène
PLGA	Acide polylactique-co-glycolique (<i>poly(lactic-co-glycolic acid)</i>)
PO ₄ ³⁻	Ion phosphate
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SHC	Hydrogénocarbonate de sodium (<i>sodium hydrogen carbonate</i>)
SIINFEKL	Peptide de la protéine ovalbumine
SPC	Percarbonate de sodium (<i>sodium percarbonate</i>)
Sr ²⁺	Ion strontium
T-ALL	Leucémie aiguë lymphoblastique de type T (<i>T cell acute lymphoblastic leukemia</i>)
TCR	Récepteur de cellules T (<i>T cell receptor</i>)
TIL	Lymphocyte infiltrant la tumeur (<i>tumor infiltrating lymphocyte</i>)
TIM-3	Protéine 3 contenant un domaine immunoglobuline et mucine des lymphocytes T (<i>T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3</i>)
XRD	Diffraction des rayons X (<i>X-ray diffraction</i>)

Les abréviations, sigles ou acronymes provenant de l'anglais sont définis dans les deux langues sauf si une traduction en français n'est pas disponible.

LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS DE MESURE

A	Ampère
atm	Atmosphère (pression)
c	Centi-
cm ⁻¹	Nombre d'ondes (1/centimètre)
Da	Dalton
g	Gramme
k	Kilo-
L	Litre
m	Milli-
m	Mètre
M	mol/L
min	Minute
mol	Mole
m/v	Masse/volume
n	Nano-
°	Degré
°C	Degré Celsius
p	Pico-
ppm	Parties par million
sec	Seconde
tr/min	Tours par minute
U	Unité
UI	Unité internationale
V	Volt
v/v	Volume/volume
μ	Micro-

INTRODUCTION

La thérapie cellulaire vise à traiter différentes maladies, tissus endommagés et autres affections par l'administration locale ou systémique de cellules chez le patient (Cunningham et al., 2023; El-Kadiry, Rafei, & Shammaa, 2021; Pirsadeghi et al., 2024). Il s'agit d'un domaine en plein essor et aux résultats prometteurs mais encore sujet à améliorations. Entre autres, l'utilisation de matrices, des biomatériaux biocompatibles et biodégradables encapsulant des cellules et d'autres composés utiles au traitement (Cunningham et al., 2023; Han et al., 2022; O'Brien, 2011), permet de livrer et de concentrer les cellules au site cible et ainsi d'en améliorer la rétention (Haddad-Mashadrizesh et al., 2022), la survie et la fonction (Kim et al., 2020). Parmi les différentes sortes de matrices on retrouve les hydrogels, plus particulièrement les hydrogels thermosensibles de chitosane qui peuvent s'injecter et gélifier *in situ* (Assaad, Maire, & Lerouge, 2015). Dans le cadre de la thérapie cellulaire adoptive (ACT), une thérapie cellulaire contre le cancer, ces hydrogels peuvent encapsuler des cellules T immunitaires afin de les livrer auprès de la tumeur à traiter (Cunningham et al., 2023). Chez la souris, ces gels ont permis une réduction de la croissance de la tumeur, mais l'effet était de courte durée probablement à cause d'une mortalité cellulaire importante au cœur de la matrice (Cunningham et al., 2023). L'accès à l'oxygène est généralement limité dans les matrices avant l'angiogenèse (Rouwkema, Rivron, & van Blitterswijk, 2008). Or, l'oxygène joue un rôle important pour la survie, la prolifération, la différenciation et la fonction des cellules T (Gropper et al., 2017). L'hypothèse principale de ce projet est qu'oxygéner le gel pourrait améliorer l'efficacité du traitement et qu'une approche prometteuse pour le faire est d'utiliser le peroxyde de calcium (CaO_2) qui relargue de l'oxygène au contact de l'eau (Wang et al., 2016). Toutefois, son relargage se fait sous forme de *burst release* (Wang et al., 2016), ce qui n'est pas souhaité puisque les cellules ont besoin d'une source constante et prolongée d'oxygène avant l'angiogenèse. Afin de limiter la réaction avec l'eau, Tomioka, Fujita, Groll, et Matsusaki (2023) ont proposé un recouvrement formé spontanément d'hydroxyapatite autour du CaO_2 ne requérant aucun solvant organique contrairement aux recouvrements polymériques (Suvarnapathaki, Nguyen, Gouloupoulos, Lantigua, & Camci-Unal, 2021). Or, le profil de relargage de l'oxygène peut être optimisé davantage afin d'atteindre un relargage constant et continu.

La problématique de ce travail concerne donc l'absence d'apport constant, prolongé et contrôlé d'oxygène aux cellules immunitaires encapsulées pour l'ACT qui pourrait expliquer en partie la faible viabilité observée dans la matrice de Cunningham et al. (2023). L'objectif à long terme concerne le développement d'un hydrogel de chitosane riche en oxygène pour la thérapie cellulaire. Le premier objectif de cette maîtrise consiste à caractériser la réponse de cellules immunitaires au stress hypoxique afin de sélectionner un modèle pour vérifier les effets des matrices riches en oxygène. À cet effet, des cellules immunitaires encapsulées en hypoxie, et provenant de deux lignées différentes, sont considérées dans des essais *live/dead* et d'activité métabolique. Des analyses de cytométrie sur l'activation, la prolifération et l'épuisement sont effectuées dans certains cas. Le second objectif consiste à développer des méthodes pour oxygéner les matrices ainsi qu'à évaluer l'efficacité de ces méthodes. L'objectif à long terme est que ces matrices puissent relarguer de façon constante et contrôlée l'oxygène sur plusieurs jours. Ainsi, des méthodes de détection de l'oxygène et du peroxyde d'hydrogène sont mises au point. Des particules de CaO_2 sont recouvertes d'hydroxyapatite et les paramètres de recouvrement sont modifiés afin d'observer les effets sur les courbes de relargage d'oxygène et de peroxyde d'hydrogène une fois encapsulées dans le gel pendant 7 jours. Des analyses morphologiques et chimiques sont également effectuées sur les particules.

Le système visant à utiliser le CaO_2 , recouvert selon une méthode novatrice, afin d'oxygéner un gel de chitosane pour l'ACT locale est, au meilleur de notre connaissance, une contribution originale qui n'a pas encore été explorée. Ce travail a mené à deux présentations par affiche. L'une était à l'occasion de la conférence annuelle du réseau de thérapie cellulaire ThéCell (2024) où un prix de présentation a été remporté. L'autre était lors de la conférence annuelle de la Société Canadienne des Biomateriaux (2025). Les principales limitations du projet, soit le faible nombre de répétitions et de répliques, sont une conséquence du manque de temps causé par les nombreux protocoles qui ont dû être développés et optimisés. Les résultats de ces travaux sont donc préliminaires (aucune conclusion définitive ne peut être émise) et de l'optimisation est encore requise pour la détection de l'oxygène et pour obtenir un profil de relargage adéquat.

Ce rapport se divise en quatre chapitres. Le premier concerne la revue de littérature qui couvre les principaux concepts de ce projet incluant les matrices, la thérapie cellulaire, les effets de l'oxygène sur les cellules T, les différentes approches pour oxygéner les matrices et enfin l'hydroxyapatite. Le second chapitre présente la méthodologie des différentes préparations, expériences et analyses effectuées dont les résultats sont présentés dans le troisième chapitre. Enfin, le quatrième chapitre fait des liens entre les concepts introduits dans la revue de littérature et les résultats et discute de ces derniers avant de conclure.

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Biomatériaux : les matrices

1.1.1 Les matrices en bref

Les matrices (Figure 1.1) sont des systèmes à base de biomatériaux et sont employées dans diverses applications. Bien qu'elles soient au cœur de l'ingénierie tissulaire, elles peuvent également être utilisées comme véhicules dans différentes thérapies pour livrer *in vivo* des médicaments, des protéines, des acides nucléiques (thérapie génique) et des cellules (thérapie cellulaire) (Cunningham et al., 2023; Han et al., 2022; O'Brien, 2011). Lorsqu'elle contient des cellules, la matrice doit fournir un environnement favorable à la survie, la prolifération, la migration et la différenciation des cellules qu'elle contient et/ou des cellules de l'hôte (Keane & Badylak, 2014). Souvent, la dégradation du biomatériau permet la libération graduelle de médicaments (Rambhia & Ma, 2015) ou pour éliminer la matrice à long terme (Keane & Badylak, 2014).

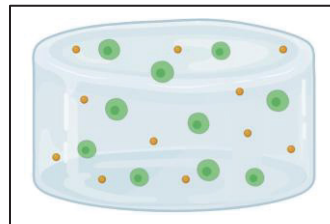


Figure 1.1 Exemple de matrice cellulaire contenant des substances utiles (jaunes) à l'application

Créé avec BioRender.com

Parmi les différents matériaux de fabrication des matrices on retrouve ceux d'origine naturelle (alginate, chitosane, soie, collagène) et synthétique (acide polylactique, acide polylactique-co-glycolique (PLGA), acide glycolique, polyéthylène glycol (PEG), polyéthylène téréphtalate) (Keane & Badylak, 2014; O'Brien, 2011). Le premier groupe présente une meilleure

biocompatibilité que le second mais aussi une plus grande variabilité (Keane & Badylak, 2014; O'Brien, 2011). Les matrices peuvent prendre la forme de structures solides implantées chirurgicalement ou de solutions injectables (Han et al., 2022). Il peut s'agir de fibres électrofilées, de structures obtenues par impression 3D, de matrices extracellulaires décellularisées ou d'hydrogels (Chan & Leong, 2008). Les hydrogels, matériaux composés majoritairement d'eau encapsulée dans un réseau polymérique 3D, sont des matrices injectables prometteuses et considérées dans de nombreuses applications (Moratti & Cabral, 2017).

1.1.2 Cahier des charges

Les matrices doivent posséder certaines caractéristiques générales lorsqu'elles contiennent des cellules, et ce, peu importe l'application. En effet, afin de pleinement remplir sa fonction, la matrice doit avant tout être biocompatible, ce qui implique aucune réaction adverse avec l'hôte mais aussi une participation active et positive dans la réponse cellulaire (Keane & Badylak, 2014). Les matrices biodégradables doivent avoir des produits de dégradation non toxiques (O'Brien, 2011) et la vitesse de dégradation doit être ajustée de manière à ce que la matrice puisse remplir les fonctions attendues tout au long du traitement (Keane & Badylak, 2014). De plus, les propriétés physiques telles que l'osmolalité et le pH doivent être physiologiques (Monette, Ceccaldi, Assaad, Lerouge, & Lapointe, 2016) et une matrice injectable contenant des cellules doit être fortement hydratée (Guyot & Lerouge, 2018). Enfin, la présence de pores interconnectés permet la prolifération cellulaire, la vascularisation et les échanges de nutriments, de gaz et de déchets (O'Brien, 2011). Un des gaz importants est l'oxygène dont la présence en quantité suffisante s'avère un paramètre important dans la réponse cellulaire (voir section 1.3.2).

1.1.3 Utilisation des matrices pour l'administration des cellules – avantages et limitations

L'utilisation de matrices peut être avantageuse dans l'administration locale des cellules *in vivo* puisqu'injecter des cellules dans une simple solution saline (sans matrice) au site cible s'avère

moins efficace en ce qui concerne la survie et la rétention cellulaire (Kim, Ku, Cho, Han, & Kim, 2025). En effet, encapsuler les cellules dans des matrices permet une meilleure rétention des cellules au site cible comme le montre l'hydrogel injectable à base de chitosane d'Haddad-Mashadrizheh et al. (2022) pour la rétention de cellules souches mésenchymateuses (MSCs) humaines dans le foie. Une meilleure survie et fonction cellulaire ont été observées par Kim et al. (2020) avec leur matrice injectable à base de gélatine encapsulant des MSCs murines pour la réparation des dommages causés par les infarctus du myocarde. De plus, la matrice pourrait protéger les cellules encapsulées du système immunitaire de l'hôte comme lors de la transplantation d'îlots de Langerhans (Weber, Cheung, & Anseth, 2007). Toutefois, répondre à toutes les exigences du cahier des charges et produire une matrice qui assure une interaction et une réponse cellulaire adéquates demeure un défi (Echeverria Molina, Malollari, & Komvopoulos, 2021). Enfin, **l'apport en nutriments et en oxygène par la formation de vaisseaux sanguins dans la matrice peut s'avérer long voire inexistant** (section 1.3.1).

1.1.4 Les hydrogels de chitosane

1.1.4.1 Chitosane comme biomatériau

La chitine est un polysaccharide naturel constitué des unités N-acétyle-D-glucosamine et est retrouvée, entre autres, dans la carapace des crustacés (Roberts, 1992; Saputra & Andreas, 2025). Le chitosane est obtenu lorsqu'une partie des groupes acétyles de la chitine sont remplacés par des groupements amines ($-NH_2$) en milieu alcalin (Saputra & Andreas, 2025; Torgal, Subramani, & Manian, 2025). Le chitosane est constitué des unités D-glucosamine et de N-acétyle-D-glucosamine (Harugade, Sherje, & Pethe, 2023; Torgal et al., 2025) et les groupements hydroxyles ($-OH$) et $-NH_2$ peuvent servir de sites pour la modification chimique du polysaccharide afin d'améliorer ses propriétés (Harugade et al., 2023; Saputra & Andreas, 2025). Sa masse moléculaire se situe entre 50 – 2000 kDa (Chenite, Buschmann, Wang, Chaput, & Kandani, 2001) et la fraction des groupements amines remplaçant les groupements acétyles s'exprime en degré de désacétylation (DDA) qui peut varier entre 40% et 98% (Chenite et al., 2001). Le DDA et la masse moléculaire influencent les propriétés mécaniques et la dégradabilité des gels de chitosane (Chenite et al., 2000).

Le chitosane est employé dans de nombreux domaines biomédicaux, notamment dans l'administration de médicaments, dans la guérison des plaies, comme biocapteur et dans l'ingénierie tissulaire (Saputra & Andreas, 2025; Torgal et al., 2025). Sa popularité s'explique entre autres par sa biocompatibilité et sa biodégradabilité qui est surtout opérée par l'activité enzymatique (lysosomes) et qui peut prendre des jours à des mois à s'effectuer (Jennings, 2017). Ce cation adhère aux tissus généralement anioniques (Chenite et al., 2000) et possède également des activités antibactériennes en compromettant l'intégrité des membranes anioniques des bactéries ainsi que la réplication de leur ADN (Saputra & Andreas, 2025; Torgal et al., 2025; Xue et al., 2026). Il peut aussi agir comme antioxydant en donnant des hydrogènes en présence d'espèces réactives de l'oxygène (Saputra & Andreas, 2025). Le chitosane présente des activités anti-inflammatoires et pro-guérison de plaies en stimulant la présence de macrophages et le relargage de cytokines (Harugade et al., 2023). Enfin, les polysaccharides naturels peuvent montrer des propriétés anticancers en arrêtant la prolifération et en causant la mort par apoptose des cellules cancéreuses tout en prévenant la propagation du cancer par métastases (Zong, Cao, & Wang, 2012).

Le chitosane peut s'employer sous forme d'hydrogel et il existe différentes méthodes pour générer ce réseau 3D (Hong et al., 2024). Les hydrogels thermosensibles (liquides à température pièce) sont avantageux puisqu'ils peuvent s'administrer par simple injection et se gélifier au site cible sous l'effet de la température (Assaad et al., 2015; Chenite et al., 2000).

1.1.4.2 Processus de gélification des hydrogels de chitosane thermosensibles

La dissolution du chitosane en solution acide (pH maximal $\sim 6,2$ (Chenite et al., 2001)) se fait grâce à la protonation des groupes $-\text{NH}_2$ en $-\text{NH}_3^+$ qui confère aux chaînes de chitosane une charge positive et qui résulte en la domination des forces électrostatiques de répulsion entre deux couches qui séparent les chaînes (Figure 1.2 étapes 1 et 2) (Chenite et al., 2001; Lavertu, Fillion, & Buschmann, 2008). Si une base est ajoutée et que le pH $> 6,2$ (Figure 1.2 étape 3a), la déprotonation des chaînes s'effectue aussitôt, les forces d'attraction entre les chaînes dominent et le chitosane précipite (Chenite et al., 2001). Si une base faible (agent gélifiant)

comme le glycérophosphate est plutôt employée (Figure 1.2 étape 3b), une partie des groupes amines sont déprotonés mais les groupes -NH_3^+ restant peuvent se lier avec la partie négative du phosphate du glycérophosphate, laissant le glycérol entraver le rapprochement des chaînes (Chenite et al., 2001; Supper et al., 2013). Ainsi, puisque les interactions entre les chaînes sont difficiles, le chitosane demeure dissous jusqu'à un pH de $\sim 7,2$ qui se situe dans les conditions physiologiques (Chenite et al., 2001; Supper et al., 2013). Lorsque cette solution est chauffée, l'hydrogel se forme grâce à la déprotonation graduelle et homogène des chaînes de chitosane causée par le changement de pKa avec la chaleur (Lavertu et al., 2008). Les chaînes peuvent donc interagir davantage, les forces d'attraction (ponts hydrogène, forces van der Waals, interactions hydrophobes) dominent alors sur les forces de répulsion et la solution se gélifie (Chenite et al., 2001; Lavertu et al., 2008; Supper et al., 2013). La température à laquelle cette gélification se produit est marquée par l'augmentation soudaine du module de stockage (G') lors d'un balayage rhéologique en température (Assaad et al., 2015). Plus la solution d'hydrogel a un pH élevé (7,2), plus la température de gélification est basse (37°C) (Chenite et al., 2001).

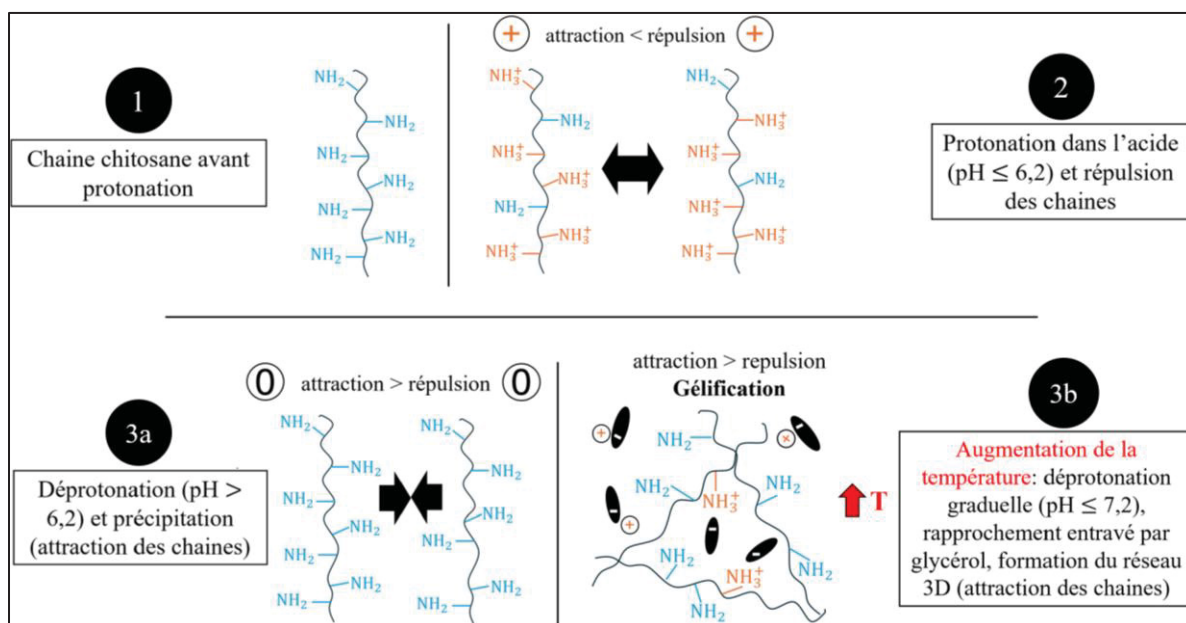


Figure 1.2 Chaînes de chitosane (1) protonées après dissolution dans l'acide (2). Déprotonation et précipitation des chaînes après l'ajout d'une base (3a) ou gélification, après l'ajout de l'agent gélifiant, par déprotonation graduelle et organisation des chaînes en 3D (3b)

Les hydrogels faits à l'aide de bases faibles telles que le glycérophosphate mais aussi le tampon phosphate ont de pauvres propriétés mécaniques (Assaad et al., 2015). L'ajout d'hydrogénocarbonate de sodium (SHC) a permis d'atteindre des valeurs de G' et des modules de Young en compression significativement supérieurs tout en maintenant une vitesse de gélification élevée (Assaad et al., 2015). Le SHC permet également d'obtenir une solution d'hydrogel dont l'osmolalité et le pH se situent dans les valeurs physiologiques (Assaad et al., 2015). Toutefois, la présence du glycérophosphate permet de stabiliser le pH de la solution puisque le SHC relargue du dioxyde de carbone (CO_2) après la neutralisation des groupements protonés (Assaad et al., 2015). En bref, les hydrogels de chitosane permettent non seulement une administration minimalement invasive, mais puisqu'ils possèdent plusieurs attributs du cahier des charges des matrices, ces biomatériaux ont été considérés notamment pour la thérapie cellulaire (Cunningham et al., 2023).

1.2 La thérapie cellulaire

1.2.1 Définition

La thérapie cellulaire consiste à administrer des cellules chez un patient afin de combattre une maladie (El-Kadiry et al., 2021), de remplacer des cellules défectueuses, de régénérer des tissus ou de traiter d'autres conditions (Pirsadeghi et al., 2024). Les études proposent différents types cellulaires pouvant être employés dans divers domaines (Agulnick et al., 2015; Shi et al., 2020; Takahashi, 2020; Zhou et al., 2014) et les cellules utilisées peuvent être des cellules souches ou spécialisées et de source allogène ou autologue (El-Kadiry et al., 2021).

1.2.2 Thérapie cellulaire adoptive: une méthode d'immunothérapie contre le cancer

1.2.2.1 Définition

La thérapie cellulaire contre le cancer, soit la thérapie cellulaire adoptive, permet d'utiliser des cellules autologues qui sont récupérées (Figure 1.3 – 1a, 1b, 2), parfois modifiées (Figure 1.3 – 2'), et multipliées *ex vivo* (Figure 1.3 – 3) avant d'être réadministrées au patient (Figure 1.3

– 4a, 4b) afin d'améliorer la réponse antitumorale (Albarrán et al., 2024). Les cellules immunitaires telles que les cellules T, les cellules tueuses naturelles, les macrophages et les cellules dendritiques (pour les vaccins) peuvent être employées (Du, Yan, Xue, Zhong, & Dong, 2023).

La thérapie cellulaire par lymphocytes T à récepteur antigénique chimérique (CAR-T), approuvée par la *Food & Drug Administration* (FDA) aux États-Unis pour certains cas (Food & Drug Administration, 2017, 2025) consiste à modifier par transduction les cellules T récupérées du patient avec les CARs (Zhang, Liu, Zhong, & Zhang, 2017) (Figure 1.3 – 2') afin d'améliorer la reconnaissance des antigènes cibles et ainsi détruire les cellules cancéreuses qui les expriment (Sternier & Sternier, 2021). Les cellules tueuses naturelles CAR et les macrophages CAR ont également été développés (Du et al., 2023). Un autre moyen d'améliorer la reconnaissance des antigènes est en modifiant génétiquement les récepteurs de cellules T (TCR) des lymphocytes T du patient (Figure 1.3 – 2') (He et al., 2025). Enfin, il est possible de récupérer des cellules TIL (*tumor infiltrating lymphocyte*) directement de la tumeur du patient, de les multiplier et de les réadministrer afin de restimuler l'attaque contre les cellules cancéreuses (Figure 1.3 – 1b, 2, 3, 4a) (Amaria et al., 2025).

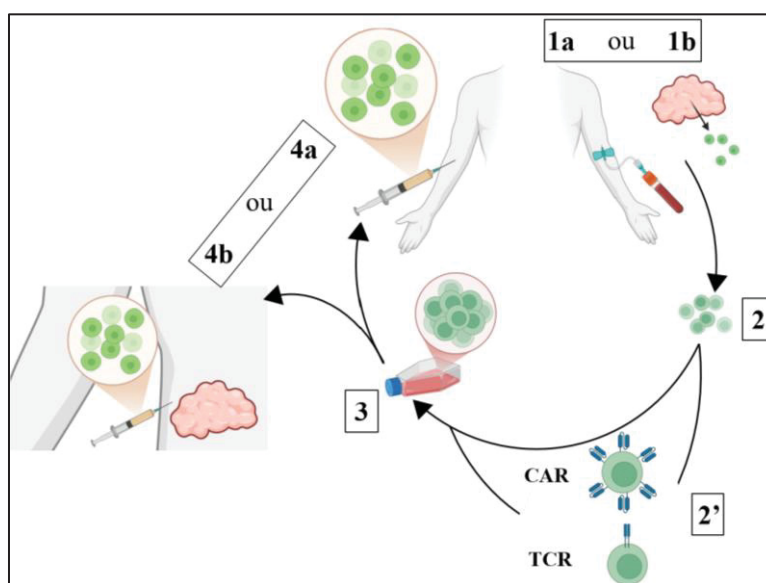


Figure 1.3 Collecte, culture et réadministration des cellules T d'un patient pour la thérapie cellulaire adoptive

1.2.2.2 Avantages de la thérapie cellulaire adoptive locale et rôle des matrices

La thérapie cellulaire adoptive (ACT) s'effectue par injection systémique intraveineuse (Figure 1.3 – 4a) mais cette approche comporte certaines limitations telles que l'expansion longue et coûteuse (en personnel et en ressources) des cellules du patient (Golchin, 2021) ainsi que l'injection intraveineuse potentiellement toxique d'interleukine-2 (IL-2) qui accompagne le traitement (Parisi et al., 2020). Les matrices ont été proposées afin de localiser le traitement au site cible et ainsi améliorer son efficacité en résolvant certaines de ces limitations (Cunningham et al., 2023). Par exemple, une matrice d'alginate « tout-en-un » où les cellules mononuclées de sang périphérique (PBMCs), les vecteurs viraux et d'autres composés sont présents afin d'activer, de transduire, de faire proliférer et de libérer des cellules CAR-T *in vivo* tout en réduisant à moins d'un jour le temps entre la collecte des cellules et la réadministration au patient (Agarwalla et al., 2022). De plus, des matrices d'alginate encapsulant des cellules CAR-T et des stimulants de gènes interféron sont proposées afin de créer un « vaccin *in situ* » grâce aux antigènes restant après la résection de la tumeur et des cellules présentatrices d'antigènes de l'hôte (Smith et al., 2017). Une matrice d'acide hyaluronique contenant des cellules CAR-T, de l'IL-15 et des anticorps anti-PD-L1 (*programmed death ligand-1*) pour la thérapie d'inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (Hu et al., 2021) ainsi que des hydrogels injectables de chitosane – PEG encapsulant des CAR-T capables de reconnaître l'antigène ganglioside GD2 des cellules cancéreuses du rétinoblastome chez la souris (Wang et al., 2020) sont également étudiés. En bref, ces travaux montrent que la matrice permet non seulement de retenir les cellules au site cible, mais présente aussi différentes options afin de renforcer le traitement par ACT avec l'ajout d'interleukines, d'anticorps et d'autres substances utiles à la réponse antitumorale. Toutefois, une matrice idéale pour l'application n'a pas encore été mise au point.

L'équipe du Pr. Sophie Lerouge, en collaboration avec celle du Pr. Réjean Lapointe, a développé un hydrogel de chitosane encapsulant des cellules T pour l'ACT locale (Figure 1.3 – 4b). L'équipe avait d'abord montré le potentiel du gel à l'aide d'un test de migration par *Transwell* (Monette et al., 2016) où des TILs encapsulés dans l'hydrogel ont pu proliférer,

s'activer, relarguer des cytokines et migrer graduellement hors du gel pour attaquer les cellules cancéreuses au bas des puits. L'efficacité du gel a ensuite été testée *in vivo* dans un modèle murin de tumeur sous-cutanée (Cunningham et al., 2023). Une réduction de la croissance tumorale presque aussi importante que pour le traitement intraveineux a été observée, et ce, malgré le nombre inférieur de cellules. Toutefois, très peu de cellules sont présentes au centre du gel après une semaine ce qui suggère soit un échappement rapide et/ou une mort cellulaire par manque de nutriments, d'oxygène ou encore d'IL-2 (Cunningham et al., 2023) (voir Figure 1.4). L'hypothèse à la base de ce projet est que cette mortalité rapide pourrait être liée au manque d'oxygène pour les cellules, et donc qu'une matrice riche en oxygène pourrait améliorer l'efficacité du traitement d'ACT locale avec hydrogel en améliorant la survie et la prolifération des cellules encapsulées. L'effet de l'hypoxie sur les cellules est détaillé ci-dessous.

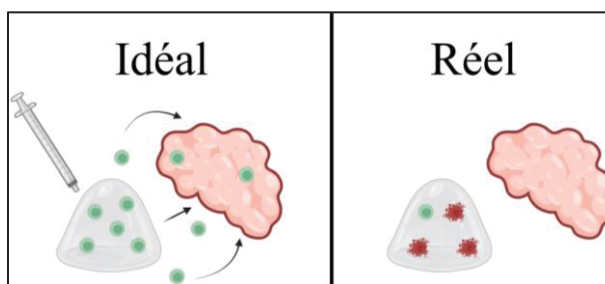


Figure 1.4 Hydrogel de chitosane thermogélifié *in situ* libérant des cellules T près de la tumeur afin de la détruire (basé sur les travaux de Cunningham et al. (2023)). **Gauche** : comportement idéal, **droite** : comportement d'après les observations pratiques

Créé avec BioRender.com

1.3 Rôle et effets de l'oxygène sur les cellules

1.3.1 Accès limité à l'oxygène dans les matrices

La formation des vaisseaux sanguins peut se produire à un peu plus de 200 μm par jour (Clark & Clark, 1939), ce qui peut s'avérer un long processus selon la taille de la matrice à vasculariser. De plus, les vaisseaux formés doivent être fonctionnels, ce qui peut s'avérer complexe (Mastrullo, Cathery, Velliou, Madeddu, & Campagnolo, 2020). Les cellules encapsulées dépendent alors de la diffusion de l'oxygène des vaisseaux environnants afin de

répondre à leurs besoins, ce qui représente une distance de diffusion d'environ 100 – 200 μm dans un tissu ou une matrice située directement à côté du vaisseau (Rouwkema et al., 2008). Les matrices ayant une épaisseur supérieure ou étant loin des vaisseaux risquent de former des zones pauvres en oxygène où les cellules seront en hypoxie (Figure 1.5) (Rouwkema et al., 2008). L'hypoxie survient lorsque la présence d'oxygène est inférieure à la quantité retrouvée dans les conditions physioxiques normales (physioxie), ce qui correspond donc à différents niveaux d'oxygène selon le type cellulaire et le tissu (Wiebe & Machulla, 1999). Cette condition peut entraîner la cellule à modifier ses activités et son métabolisme afin d'assurer sa survie (Wiebe & Machulla, 1999). L'anoxie est l'absence complète d'oxygène (Figure 1.5) (Wiebe & Machulla, 1999). Enfin, bien que les cellules soient souvent cultivées en normoxie ($\sim 20\%$ oxygène (O_2)), les conditions physioxiques (Figure 1.5) sont bien plus faibles en oxygène ($\sim 5\%$ O_2) (McKeown, 2014). Dans le cas des organes lymphatiques (souris), la concentration en oxygène peut même descendre jusqu'à $0,5\%$ O_2 (Caldwell et al., 2001) et le thymus représente l'un des organes les plus hypoxiques (Ohta et al., 2011).

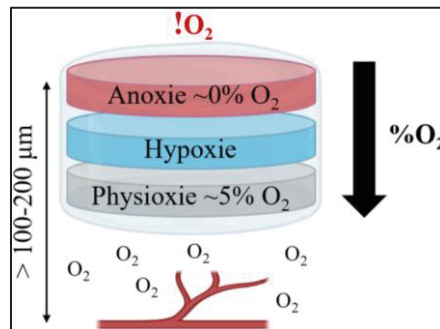


Figure 1.5 Lorsque la matrice est trop éloignée des vaisseaux sanguins ou trop épaisse une partie ou même l'entière peut devenir anoxique (sans O_2). Présentation d'un gradient hypothétique d' O_2 dans la matrice allant de l'anoxie à la physioxie

Créé avec BioRender.com

1.3.2 Hypoxie et cellules immunitaires

Facteurs induits par l'hypoxie : La réponse cellulaire à l'hypoxie est complexe et implique souvent la famille des facteurs induits par l'hypoxie (HIFs), des facteurs de transcription ciblant certains gènes utiles dans ces conditions pauvres en oxygène (Tao, Barbi, & Pan, 2015). Le complexe de transcription HIF se forme par dimérisation de l'HIF-1 β avec l'HIF-1 α (ou

l'HIF-2 α) (Weidemann & Johnson, 2008). Le facteur HIF-1 β est produit et présent en continu dans le noyau cellulaire (Weidemann & Johnson, 2008). La stabilisation de l'HIF-1 α dépend toutefois de la disponibilité en oxygène. Lorsque présent en quantité suffisante, l'oxygène permet l'hydroxylation de l'HIF-1 α par les enzymes à domaine prolyl hydroxylase (Tao et al., 2015). L'HIF-1 α hydroxylé subit ensuite une polyubiquitination par la protéine von Hippel-Lindau, ce qui initie la dégradation protéasomique du facteur (Tao et al., 2015). Toutefois, un apport pauvre en oxygène empêche l'hydroxylation de l'HIF-1 α qui se stabilise et qui entre alors dans le noyau cellulaire afin de se combiner avec l'HIF-1 β et commencer la transcription de certains gènes cibles (Tao et al., 2015).

Réponse des cellules T à l'hypoxie : chez ces cellules, la stabilisation de l'HIF-1 α en hypoxie peut jouer un rôle, par exemple, sur la production de cytokines (Lukashev et al., 2006) ainsi que sur les récepteurs et certaines activités cellulaires (Doedens et al., 2013). La concentration du facteur augmente également avec l'intensité de l'expérience hypoxique (Cunha et al., 2023). Toutefois, malgré son implication importante dans la réponse hypoxique, il n'est pas le seul intervenant comme en témoignent les ≤ 270 protéines surexprimées probablement sans l'intervention de l'HIF (Ross, Rollings, & Cantrell, 2021).

Bien que les cellules T soient naturellement exposées aux conditions faibles en oxygène (moins que les cellules tueuses naturelles mais plus que les cellules B) (Ohta et al., 2011), l'hypoxie stimule la réduction de la phosphorylation oxydative des cellules ainsi qu'une transition vers la glycolyse (Doedens et al., 2013; Gropper et al., 2017). Cela implique une augmentation des protéines pour le transport du glucose, soit GLUT1 (Cunha et al., 2023) ou GLUT3 (Byrnes et al., 2022) et de lactate-déshydrogénase A (Cunha et al., 2023). L'hypoxie pourrait toutefois diminuer les taux de consommation d'oxygène et d'acidification extracellulaire ainsi que l'adénosine triphosphate produite (Liu et al., 2020) comme les augmenter (Cunha et al., 2023). Cette divergence pourrait s'expliquer par des différences dans les protocoles et les temps d'incubation en hypoxie. Les effets sur le récepteur CD25 sont également mitigés puisque certains observent une augmentation (Cunha et al., 2023; Vuillefroy de Silly et al., 2015) tandis que d'autres, une diminution du CD25 et des récepteurs de costimulation (Byrnes et al., 2022).

Dans le cas de Caldwell et al. (2001), davantage de cellules CD8⁺/CD25⁺ ont été observées en normoxie, mais ces cellules en hypoxie possédaient un plus grand nombre de récepteurs CD25 et étaient environ sept fois plus lytiques que leur contrepartie normoxique. La hausse de la cytotoxicité et de la fonction effectrice des cellules T se fait grâce à l'augmentation de la perforine (Ross et al., 2021), de certains granzymes (Cunha et al., 2023; Doedens et al., 2013; Ross et al., 2021) et d'interféron gamma (IFN- γ) (Cunha et al., 2023; Nakagawa et al., 2015). Toutefois, les effets de l'hypoxie pour certains ont plutôt résulté en une diminution ou un maintien de l'une ou plusieurs de ces protéines (Caldwell et al., 2001; Liu et al., 2020). L'augmentation de la cytokine immunosuppressive IL-10 (Ross et al., 2021; Vuillefroy de Silly et al., 2015) a également été rapportée.

L'hypoxie stimulerait la différenciation et les fonctions des phénotypes effecteur ou effecteur mémoire (Cunha et al., 2023; Ross et al., 2021), comme en témoigne la présence de cellules CD44^{hi} et CD62L^{lo} (Cunha et al., 2023; Gropper et al., 2017). De plus, Cunha et al. (2023) ont effectué un ACT avec des OT-I dans un modèle murin de tumeur sous-cutanée et ont constaté que les cellules T préconditionnées en hypoxie ont permis de réduire la croissance tumorale initiale et ont présenté *in vitro* une meilleure cytotoxicité et réponse à la restimulation. Une meilleure réponse antitumorale grâce à l'hypoxie a également été rapportée ailleurs (Gropper et al., 2017).

Les études sont majoritairement unanimes sur l'effet limitant de l'hypoxie sur la prolifération (Byrnes et al., 2022; Gropper et al., 2017; Liu et al., 2020; Ross et al., 2021), bien que Cunha et al. (2023) aient observé une prolifération forte et inattendue *in vivo* des OT-I conditionnés en hypoxie et injectés pour l'ACT. Quant à la viabilité, les effets de l'hypoxie semblent être absents (Byrnes et al., 2022; Gropper et al., 2017) ou limitants (Caldwell et al., 2001; Kim et al., 2008).

De plus, les études rapportant une augmentation du caractère cytotoxique des cellules T en hypoxie observent également une augmentation de certains récepteurs inhibiteurs (Cunha et al., 2023) soit : CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*), TIM-3 (*T cell*

immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3), LAG-3 (*lymphocyte activation gene 3*) et PD-1 (*programmed cell death protein-1*) (Doedens et al., 2013; Gropper et al., 2017; Ross et al., 2021). Ces récepteurs sont également des marqueurs d'épuisement, un état où la réponse antitumorale et cytotoxique des cellules T est moindre (Jiang, Li, & Zhu, 2015).

Enfin, l'effet combiné, par exemple, de l'hypoxie à un manque de glucose et/ou de sérum peut limiter la production de certaines cytokines immunosuppressives ou antitumorales et influencer l'expression de certains récepteurs cellulaires (Davern et al., 2023). De plus, Scharping et al. (2021) ont constaté que des OT-I hypoxiques continuellement stimulés tendaient vers une différenciation épuisée, augmentaient les molécules co-inhibitrices et les gènes associés à l'épuisement et diminuaient la production de cytokines et la réponse aux antigènes.

Pour conclure, les changements liés, par exemple, aux activités cellulaires, à la production de protéines et à la différenciation peuvent survenir après seulement une journée passée en hypoxie (Cunha et al., 2023). Certaines disparités entre les résultats de la littérature pourraient s'expliquer par les différences entre les protocoles, les temps d'incubation et le % d'oxygène en hypoxie. Un résumé des effets de l'hypoxie se trouve dans la Figure 1.6. La matrice développée dans ce projet a pour but d'assurer la survie et la prolifération des cellules T encapsulées dans la matrice afin qu'elles puissent graduellement migrer hors du gel pour s'attaquer à la tumeur. **Puisque la prolifération (et parfois la viabilité) peut être réduite et l'épuisement, augmenté en cas de déficit d'oxygène, il est crucial d'oxygéner la matrice pour assurer une réponse cellulaire adéquate.**

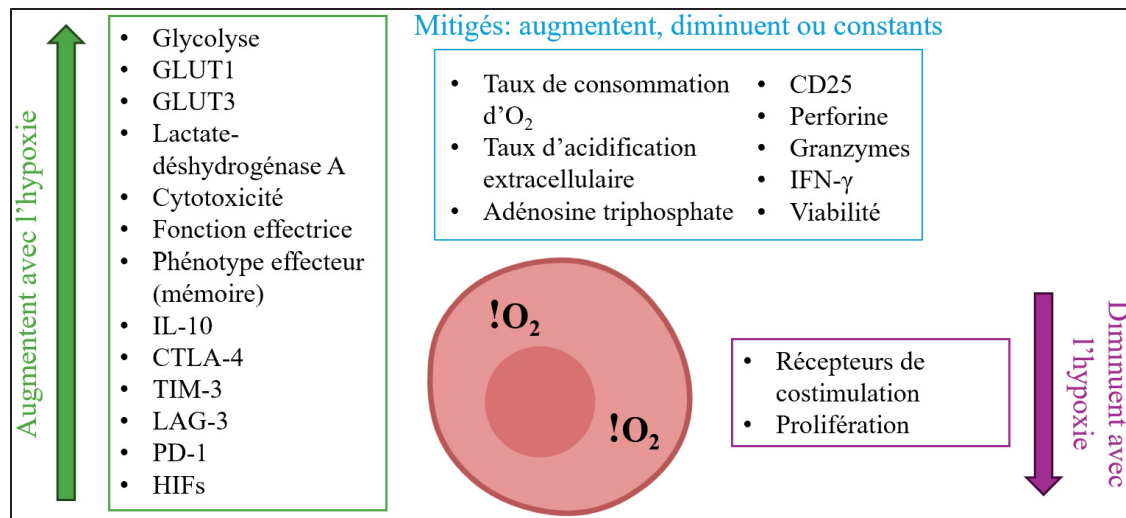


Figure 1.6 Résumé de la revue de la littérature sur les effets de l'hypoxie sur les cellules T

Créé avec BioRender.com

Types cellulaires étudiés dans le cadre de ce projet

i) Cellules Jurkat : Ces cellules T humaines sont immortalisées et proviennent d'un cas de leucémie aiguë lymphoblastique de type T (T-ALL) (Wilson et al., 2025). Elles ont été utilisées dans plusieurs travaux de recherche, incluant ceux sur la signalisation cellulaire du TCR (Abraham & Weiss, 2004) malgré certaines mutations importantes (Gioia, Siddique, Head, Salomon, & Su, 2018). Les cellules T-ALL en hypoxie ralentiraient leur cycle cellulaire, cesseraient leur prolifération, favoriseraient la glycolyse et seraient plus sujettes à l'apoptose (Fahy et al., 2021). L'HIF-1α jouerait un rôle important et, une fois de retour en condition non hypoxique, les cellules T-ALL survivantes pourraient recommencer à proliférer (Fahy et al., 2021). Zou et al. (2013) auraient plutôt observé une augmentation de la prolifération des cellules Jurkat en hypoxie sur trois jours grâce à la voie de signalisation Notch1 activée par l'HIF-1α.

ii) Cellules OT-I : Ces cellules T CD8⁺ proviennent de souris transgéniques où le TCR est modifié afin de permettre la reconnaissance d'un peptide (SIINFEKL) de la protéine ovalbumine (Wright, Murray, Crispe, & Pierce, 2005).

1.4 Méthodes pour oxygéner les matrices

1.4.1 Transporteurs d'oxygène : perfluorocarbones et hémoglobines

Différentes approches sont proposées dans la littérature pour oxygéner les matrices. Parmi celles-ci on retrouve les transporteurs perfluorocarbones (PFCs) et hémoglobines. Ils ont permis d'améliorer l'oxygénation des hydrogels (Jiang et al., 2024) et ont été considérés comme substituts aux globules rouges/sang (Mystkowska, Prokopczyk, & Łysik, 2024; Stowell, Levin, Spiess, & Winslow, 2001; Yuki et al., 2021).

Perfluorocarbones : Dans la revue de Jägers, Wrobeln, et Ferenz (2021), les molécules de la famille des PFCs comprennent une chaîne principale d'atomes de carbone surtout liés à des atomes de fluore. Ces molécules non miscibles ni dans l'eau, ni dans les lipides sont volumineuses et créent de nombreux espaces vacants entre elles permettant ainsi d'emmagasinier une grande quantité d'oxygène (Jägers et al., 2021). Par exemple, le bromure de perfluorooctyle (PFOB) peut contenir 44 mmol/L à 1 atm, 0°C ce qui est environ 20x plus que l'eau (Lowe, Davey, & Power, 1998). Le relargage de l'oxygène contenu dans les solutions de PFCs se fait de façon linéaire en fonction de la pression partielle de l'oxygène (Spahn, 2000). Différents travaux ont considéré les PFCs pour améliorer l'apport en oxygène (Maillard et al., 2012; White, Godsey, & Bhatia, 2014; Wijekoon, Fountas-Davis, & Leipzig, 2013). Par exemple, Ma et al. (2013) utilisent le perfluorotributylamine (PFTBA) avec des hydrogels de fibrine comme matrices pour les cellules de Schwann en hypoxie. Khattak, Chin, Bhatia, et Roberts (2007) utilisent des billes d'hydrogel d'alginate contenant soit du PFTBA ou du PFOB pour la culture de cellules humaines de carcinome hépatocellulaire.

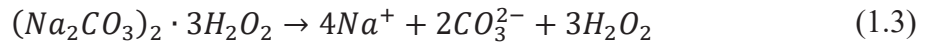
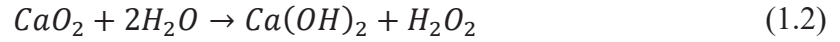
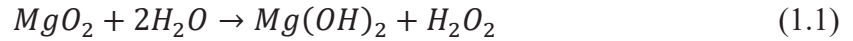
Hémoglobines : Les hémoglobines sont des protéines contenant des hèmes centrés d'un atome de fer permettant la liaison à une molécule d'oxygène (Decker & van Holde, 2011a). Selon le type d'organisme, les hémoglobines peuvent être intracellulaires ou extracellulaires (Decker & van Holde, 2011b). Différentes études portent sur le développement d'hémoglobines pour transporter l'oxygène (HBOCs) (Pacheco et al., 2023; Roamcharern et al., 2019; Q. Wang et al., 2017; Zhang et al., 2012). Par exemple, l'hémoglobine extracellulaire

M201 (HEMOXCell® (Hemarina)) obtenue à partir du vers marin *Nereis virens* (Lemaire et al., 2023) peut lier jusqu'à 156 molécules d'oxygène (Zal, Green, Lallier, Vinogradov, & Toulmond, 1997) et possède une activité similaire à l'enzyme superoxyde dismutase (Rousselot et al., 2006) ainsi qu'une meilleure stabilité que les hémoglobines intracellulaires retirées des globules rouges (Muzzelo, Neely, Shah, Abdulmalik, & Elmer, 2018). Elle a montré des effets bénéfiques dans la culture des cellules CHO-S (*Chinese hamster ovary*) (Le Pape et al., 2015) et MSCs humaines (Le Pape et al., 2017; Le Pape et al., 2018). Toutefois, la durée de l'étude est parfois courte (Rodriguez-Brotons et al., 2016) et certaines études cultivent les cellules *in vitro* en normoxie, donnant ainsi la possibilité à l'hémoglobine de se recharger en oxygène. Lorsqu'en hypoxie, l'hémoglobine peut toutefois être combinée à des générateurs d'oxygène comme le peroxyde de calcium (CaO_2) afin d'améliorer, par exemple, la survie d'îlots de Langerhans (Mouré et al., 2019).

Pour conclure, les PFCs présentent certaines limitations telles que des complications potentielles au niveau des poumons et du sang, une biocompatibilité parfois inadéquate et l'ajout de surfactants (De, Jee, & Park, 2024). Certains risques associés aux HBOCs (surtout ceux à base d'hémoglobines humaines et bovines) sont l'oxydation de l'hème en condition de stress oxydatif menant à la formation de radicaux libres néfastes (Meng et al., 2018), la dissociation de l'hémoglobine posant un risque pour certains organes (Jahr, MacKinnon, Baum, & Alayash, 2025) et le *scavenging* de l'oxyde nitrique (Gladwin, Crawford, & Patel, 2004). Ces limitations sont surtout associées à l'utilisation des transporteurs comme substituts de sang. Enfin, les transporteurs d'oxygène ne peuvent se recharger en oxygène lorsqu'utilisés avec des cellules exposées à des conditions prolongées d'hypoxie. C'est pourquoi les peroxydes solides sont avantageux.

1.4.2 Générateurs d'oxygène : peroxydes solides

Les peroxydes inorganiques solides sont des réactifs qui génèrent du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et de l'oxygène par l'hydrolyse de l'eau selon les équations (1.1) à (1.4) (Camci-Unal, Alemdar, Annabi, & Khademhosseini, 2013; Wang et al., 2023) :



Ils agissent donc comme des générateurs d'oxygène plutôt que des transporteurs. Parmi ces peroxydes, on retrouve le peroxyde de magnésium (MgO_2), le CaO_2 et le percarbonate de sodium (SPC) ayant la formule $(Na_2CO_3)_2 \cdot 3H_2O_2$. Le H_2O_2 peut également être utilisé mais sa forme liquide complique sa manipulation et le contrôle du relargage d'oxygène (Ashammakhi et al., 2020).

Le profil et la cinétique de relargage de l'oxygène par ces trois peroxydes solides ont été comparés dans l'étude de Waite, Bonner, et Autenrieth (1999) et ils ont constaté que le temps requis pour générer la moitié de la quantité totale d'oxygène relarguée pour chaque peroxyde était en secondes (18 sec) pour le SPC, minutes (12,6 min) pour le CaO_2 et jours (18,4 jours) pour le MgO_2 . Les auteurs proposent également que des capsules d'hydroxyde de calcium ($Ca(OH)_2$) ou de magnésium pourraient se former à la surface des particules de CaO_2 ou de MgO_2 , ayant eux-mêmes une faible solubilité et une dissolution lente, ce qui pourrait limiter la réaction avec l'eau (Waite et al., 1999).

Le CaO_2 est un choix populaire pour l'oxygénation des matrices (Lee, Kim, Kim, & Song, 2025; Liu et al., 2021; Suvarnapathaki et al., 2021) en partie à cause de sa pureté commerciale (~60 – 80%) supérieure à celle du MgO_2 (~15 – 25%) (Cassidy & Irvine, 1999), et son usage dans plusieurs domaines (Jin & Wang, 2025). Il a été choisi pour ce projet et sera présenté à la section suivante. Bien que moins populaires, le MgO_2 et le SPC sont également employés dans divers domaines incluant l'ingénierie tissulaire (Camci-Unal et al., 2013; White, Irvine, & Woolard, 1998; Zhou, Qian, Chen, Zhang, & Zhou, 2023). Il est à noter que le relargage d'oxygène lent par le MgO_2 n'a pas été observé dans toutes les études (Bhattacharjee et al., 2026; Zhu, Qin, Zhang, Radian, & Long, 2021).

Peroxyde de magnésium : Le MgO_2 a été employé comme nanoparticules recouvertes de PEG encapsulées dans des microparticules de polymère recouvertes de catalase afin d'améliorer, sur 7 jours (5% O_2), la viabilité de MSCs humaines ajoutées sur un hydrogel de fibrine, d'alginate oxydé et de polymère dans lequel les particules étaient encapsulées (Maleki, Karimi-Soflou, & Karkhaneh, 2025). Haixia et al. (2024) ont plutôt utilisé un mélange de polycaprolactone (PCL)/nanohydroxyapatite/ MgO_2 pour faire une grille 3D recouverte de polydopamine afin de stimuler la régénération de l'os et combattre les cellules cancéreuses d'ostéosarcome. Le relargage d'oxygène atteint un maximum après ~5 jours avant de graduellement redescendre et rejoindre le contrôle après un total de 2 – 3 semaines (Haixia et al., 2024).

Percarbonate de sodium : Le SPC est également considéré dans quelques études comme source d'oxygène pour les matrices. Par exemple, des cellules souches de pulpe dentaire ont pu adhérer, proliférer et se différencier sur des fibres électrofilées d'alcool polyvinylique et de PCL contenant du SPC (Samanipour et al., 2023). Toutefois, seules les données de relargage d'oxygène au jour 14 sont fournies. Le SPC a également été encapsulé dans un film de PLGA afin de réduire, sur trois jours, la nécrose d'un rabat de peau ischémique de souris sous lequel le film était implanté (Harrison, Eberli, Lee, Atala, & Yoo, 2007). De plus, ce film a relargué presque tout l'oxygène théoriquement possible sur ~70 heures dont la majorité s'est effectué pendant les 24 premières heures.

1.4.3 Peroxyde de calcium

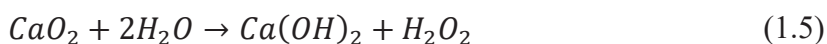
1.4.3.1 Réaction en milieu aqueux et production de peroxyde d'hydrogène et d'oxygène

Le peroxyde de calcium est un agent oxydant dont la structure orthorhombique, déterminée l'aide d'un algorithme génétique, comprend des atomes de calcium, chacun formant des liaisons de coordination avec huit atomes d'oxygène (Zhao, Nguyen, Wang, & Ho, 2013). Le CaO_2 produit, en milieu aqueux, de l'oxygène, du H_2O_2 et du Ca(OH)_2 . Deux mécanismes

réactionnels expliquant l'obtention de ces produits à partir du CaO_2 sont retrouvés dans la littérature.

Mécanisme #1 : L' H_2O_2 produit à partir du CaO_2 se décompose et relargue de l' O_2

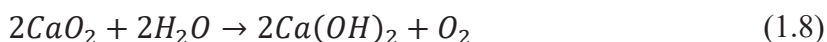
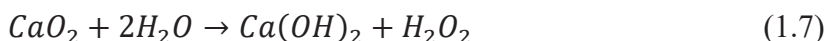
Plusieurs sources réfèrent au mécanisme détaillé par les équations (1.5) et (1.6) (Aghajanpour et al., 2022; Farris, Rindone, & Grayson, 2016; Mohseni-Vadeghani, Karimi-Soflou, Khorshidi, & Karkhaneh, 2021; Suvarnapathaki et al., 2021).



Le CaO_2 produit du H_2O_2 en milieu aqueux (équation (1.5)) et ce H_2O_2 se décompose ensuite pour libérer de l' O_2 (équation (1.6)). Ainsi, le mécanisme #1 suggère que l' H_2O_2 est un intermédiaire nécessaire à l'obtention de l' O_2 mais cette hypothèse est réfutée par le mécanisme #2.

Mécanisme #2 : L' H_2O_2 et l' O_2 sont obtenus directement à partir du CaO_2

L'étude menée par Wang et al. (2016) sur la cinétique du relargage de l' O_2 et de l' H_2O_2 à partir du CaO_2 supporte plutôt le mécanisme suivant où les réactions présentées par les équations (1.7) et (1.8) se dérouleraient en parallèle et se compétitionneraient pour le réactif CaO_2 :



Dans cette étude, les courbes de relargage de chacun des produits suivent un profil similaire, soit un relargage important (*burst release*) survenant environ deux à dix heures après l'ajout du CaO_2 dans la solution aqueuse (selon les conditions de température et de pH). Le relargage prendrait ensuite fin lorsque le CaO_2 serait complètement dissous. Les courbes de relargage de l' O_2 et de l' H_2O_2 surviennent simultanément et prennent donc fin au même moment (Wang et al., 2016).

i) Processus de formation de l'H₂O₂ : Selon Wang et al. (2016), le CaO₂ se dissout d'abord dans l'eau et relargue des ions calcium (Ca²⁺) et peroxydes (O₂²⁻). Un pH acide augmente la dissolution du CaO₂. Les ions hydrogène (H⁺) présents en solution se lient aux ions peroxydes et forment l'H₂O₂ (Wang et al., 2016). Xue, Rajic, Chen, Lyu, et Alshawabkeh (2018) ont électrolysé de l'eau, contenant du sulfate de sodium et du CaO₂, afin de générer des ions H⁺ à l'anode (pH plus acide donc dissolution plus rapide du CaO₂) et des ions hydroxydes (OH⁻) à la cathode. La production d'H₂O₂ était moins importante à la cathode qu'à l'anode, puisqu'une compétition pour les ions H⁺ entre les ions peroxyde du CaO₂ dissout et les ions OH⁻ de la cathode limitait le rendement d'H₂O₂ dans le catholyte (Xue, Rajic, et al., 2018). Concernant l'effet du pH sur la dissolution du CaO₂, Northup et Cassidy (2008) ont observé un délai de plus de deux mois pour dissoudre le CaO₂ dans une solution à pH 12 – 13 (aucune production d'H₂O₂ détectée), mais seulement 4 heures à pH 6 (82% d'H₂O₂ produit par rapport à la quantité totale théorique d'H₂O₂ pouvant être libérée). L'étude cinétique de Wang et al. (2016) affirme également que la réaction donnée par l'équation (1.7) est d'ordre pseudo-zéro, puisque la vitesse à laquelle l'H₂O₂ est relargué dépend de la vitesse à laquelle le CaO₂ se dissout (étape cinétiquement limitante) plutôt que de la concentration initiale de CaO₂. En bref, le H₂O₂ serait formé à partir des ions H⁺ et O₂²⁻ en solution à la suite de la dissolution du CaO₂. Le pH et la température peuvent influencer le rendement d'H₂O₂ (Wang et al., 2016).

ii) Processus de formation de l'O₂ : Selon Wang et al. (2016), l'O₂ serait formé directement à partir du CaO₂ (également supporté par Lee et al. (2014)). Selon Jin et Wang (2025), l'O₂ serait libéré suite au bris des liaisons O – O lors du contact du CaO₂ avec l'eau. Wang et al. (2016) suggèrent également que la réaction de l'équation (1.8) serait du pseudo-premier ordre (augmentation de la vitesse de production de l'O₂ avec l'augmentation de la concentration de CaO₂) et que l'O₂ serait obtenu à partir des particules solides de CaO₂ en solution. Ils ont aussi constaté que l'augmentation du pH ou de la température augmentait la production d'O₂.

Enfin, ils ont conclu que l'oxygène ne provenait majoritairement pas de la dégradation du H₂O₂ mais plutôt directement du CaO₂ d'après les courbes de relargage des deux produits qui se terminent en même temps et qui sont affectées de manière opposée à la suite d'un changement

de pH ou de température. Ils ont aussi observé un relargage plus important d'O₂ initialement mais ce relargage diminue ensuite lorsque celui du H₂O₂ commence (Wang et al., 2016). Le relargage d'O₂ se produirait donc en parallèle avec celui du H₂O₂.

1.4.3.2 Applications

Sciences environnementales, traitement des eaux et du sol, retrait du phosphore : Certains systèmes comprenant du CaO₂ se sont révélés prometteurs pour la décontamination (Mosmeri, Alaie, Shavandi, Dastgheib, & Tasharrofi, 2017; Xue, Lu, et al., 2018) ainsi que pour la réoxygénation (F. Zhang et al., 2019) des eaux souterraines. Le relargage d'oxygène peut aussi stimuler leur bioréhabilitation par les microorganismes (Wu, Chang, & Lin, 2015; Yeh, Wang, Chang, & Shih, 2018) et le CaO₂ permet de lutter contre les cyanobactéries (Wang, Zheng, Huang, Hu, & Zhu, 2021; Xin et al., 2020) et contre la pollution du sol (Oba et al., 2021). Enfin, le CaO₂ peut être employé afin de lutter contre l'eutrophisation en précipitant, sous forme d'hydroxyapatite, le phosphate contenu dans les plans d'eau (Cho & Lee, 2002).

Traitement des tumeurs cancéreuses par nanoparticules de CaO₂ : Des systèmes de CaO₂ ont été étudiés, par exemple, pour l'oxygénation des tumeurs à l'aide d'un recouvrement polymérique dégradable en pH acide (Sheng et al., 2017) ou pour la chimiothérapie grâce à l'apport en oxygène d'une capsule de lipides contenant du CaO₂ et de la cisplatine (He et al., 2019). Le relargage d'H₂O₂ par des systèmes de CaO₂ peut également être exploité pour le traitement des tumeurs (Gao et al., 2019) ou pour améliorer la *chemodynamic therapy* et la *gas therapy* (Wang et al., 2024).

Biomatériaux et CaO₂ : Le CaO₂ est employé comme générateur d'oxygène dans de nombreux travaux. Plusieurs s'y intéressent pour la régénération de l'os (Aleemardani, Solouk, Akbari, & Moeini, 2023; Daneshmandi & Laurencin, 2020; Xu et al., 2024; Yin et al., 2024). D'autres utilisent le CaO₂ dans le domaine de la guérison des plaies (N. Li et al., 2024; Lin et al., 2025; Singh et al., 2023) comme l'hydrogel hyperoxique à base de gélatine de Park et Park (2018). Le CaO₂ est également utilisé pour oxygéner les îlots du pancréas encapsulés (Lee et

al., 2018; Liang et al., 2021) comme le cryogel à base de collagène de Razavi et al. (2020). Enfin, la viabilité de cellules cardiaques encapsulées dans un hydrogel de gélatine méthacrylée (GelMA) en hypoxie a été améliorée grâce à l'ajout de CaO_2 (Alemdar et al., 2017). Dans ces études, le CaO_2 a permis un relargage efficace d'oxygène et certaines rapportent qu'il aurait même permis d'améliorer la survie, la cellularisation des matrices et la fonction des cellules. Ces travaux ne sont pas les seuls à utiliser le CaO_2 pour générer de l'oxygène puisque ce peroxyde (plus pur que le MgO_2 commercial) est employé par plusieurs équipes comme mentionné dans la section 1.4.2. Par conséquent, **le CaO_2 a été choisi pour oxygéner les hydrogels dans ce mémoire** puisqu'il semble prometteur selon les résultats rapportés dans la littérature.

1.4.3.3 Limitations du CaO_2 et solutions

Malgré son potentiel de relargage d'oxygène important, le CaO_2 possède certaines limitations. Elles portent entre autres sur la production potentiellement cytotoxique d' H_2O_2 et le relargage initial intense et rapide de l' O_2 .

Limitation #1 : Production cytotoxique d' H_2O_2

Problème : Le H_2O_2 peut causer des dommages, voir la mort cellulaire, lorsque sa concentration dépasse un seuil maximal. Ce seuil dépend, entre autres, du type cellulaire et de la durée d'exposition au H_2O_2 . Une concentration de 20 – 100 μM (0,8 – 4 pmol/cellule) peut endommager l'ADN de MSCs ainsi que tuer des cellules souches pluripotentes induites et des cellules érythroleucémiques humaines K-562 (Zenin et al., 2022). Dans le cas des cellules T humaines, des dommages à l'ADN ont même été détectés après seulement 15 min d'exposition à 2,5 μM H_2O_2 et une exposition de 24 heures à des concentrations > 50 μM a menée à la mort de la majorité des cellules T (Versteyhe et al., 2013). Le H_2O_2 peut se décomposer en présence d'ions ferreux (Fe^{2+}) suivant la réaction de Fenton et ainsi générer des radicaux libres qui causent des dommages cellulaires (Ighodaro & Akinloye, 2018). Par conséquent, il est important de suivre et de réduire les concentrations d' H_2O_2 sous le niveau cytotoxique dans les matrices oxygénées par le CaO_2 afin d'éviter les effets néfastes sur les cellules.

Solution (décomposition de l' H_2O_2 et production d' O_2) : Afin de réduire la concentration d' H_2O_2 , la catalase, une enzyme de la famille des oxydoréductases (Cárdenas-Moreno, González-Bacerio, García Arellano, & del Monte-Martínez, 2023), peut être employée pour décomposer la molécule. Cette enzyme possède quatre hèmes, chacun comprenant de la porphyrine et du fer (Tao, Raffel, Souid, & Goodisman, 2009). Pour la décomposition du H_2O_2 , Chelikani, Fita, et Loewen (2004) proposent que l'hème de la catalase soit oxydé par une molécule d' H_2O_2 afin de former un complexe qui serait ensuite réduit par une deuxième molécule d' H_2O_2 . Chaque enzyme serait donc récupérée et les produits seraient l'eau et l' O_2 (Chelikani et al., 2004). La catalase décompose le H_2O_2 à une vitesse d'une micromole d' H_2O_2 par unité de catalase par minute (à 25°C, pH 7) (Millipore Sigma, s.d.).

Plusieurs matrices avec du CaO_2 ont eu recours à la catalase de foie bovin (Kang, Park, & Park, 2019; Lee et al., 2025; Toftdal et al., 2021; Zou et al., 2024) et la meilleure manière d'incorporer l'enzyme serait en l'encapsulant avec le CaO_2 dans la matrice (Willemen et al., 2022). Enfin, des alternatives à la catalase seraient des nanoparticules de dioxyde de manganèse (Tootoonchi, Hashempour, Blackwelder, & Fraker, 2017) ou encore la vitamine C, un antioxydant (Zhao et al., 2021).

Limitation #2 : *Burst release* d' O_2

Problème : La courbe de relargage de l' O_2 à partir du CaO_2 montre une libération initiale intense et rapide (*burst release*) qui décline ensuite drastiquement. Par exemple, le % d' O_2 relargué par des hydrogels de GelMA encapsulant 3% de CaO_2 est passé de ~80% à ~25% en 24 heures avant de descendre graduellement à moins de 10% après 7 jours en hypoxie (Zou et al., 2021). Ce *burst release* doit être remplacé par un profil de relargage constant d'oxygène sur quelques semaines en attendant l'angiogenèse et son apport en nutriments essentiels. De plus, l'hyperoxie peut causer des dommages aux cellules par la production de superoxydes (Mantell, Horowitz, Davis, & Kazzaz, 1999).

Solution (recouvrement du CaO₂)

i) Recouvrement de polymère : Une approche populaire retrouvée dans la littérature consiste à recouvrir les particules de CaO₂ créant ainsi une barrière perméable avec l'eau afin de ralentir et contrôler le relargage d'oxygène. Plusieurs systèmes emploient les polymères hydrophobes comme matériau de recouvrement. Ainsi, des microsphères de PLGA encapsulant du CaO₂ ont été incorporées à un hydrogel à base d'oligopeptides pour augmenter la concentration d'O₂ et éliminer le *burst release* initial (Liu et al., 2021). Un autre polymère fréquemment employé est le PCL (Ghaffari-Bohlouli et al., 2023; Xu et al., 2024; Zhang, Kiratiwongwan, & Shen, 2020). Hassan et al. (2023) emploient des hydrogels de GelMA contenant du silicate et des microparticules de CaO₂ recouvertes de PCL pour stimuler l'ostéogénèse de MSCs humaines à l'aide de l'oxygène relargué. Suvarnapathaki et al. (2021) utilisent également une matrice de GelMA avec des microparticules de CaO₂ encapsulées dans du PCL et ont observé un relargage croissant d'O₂ en hypoxie jusqu'au jour 21 où la concentration était environ six fois supérieure au contrôle hypoxique en absence de cellules.

Emploi de solvants organiques cancérigènes avec les polymères : Les travaux employant des recouvrements polymériques cités ci-dessus ont recours à des solvants organiques tels que le chloroforme ou le dichlorométhane afin de dissoudre les polymères synthétiques (PCL, PLGA). Toutefois, ces solvants potentiellement toxiques et/ou cancérigènes peuvent poser d'importants risques pour la santé (American Chemical Society, 2019, 2024). La FDA suggère les limites suivantes dans les produits pharmaceutiques : chloroforme = 0,6 mg/jour, ≤ 60 ppm dans max. 10 g de produit administré/jour et dichlorométhane = 6 mg/jour, ≤ 600 ppm dans max. 10 g de produit administré/jour (Food & Drug Administration & ICH, 2018). Ainsi, la détection des traces de solvants (ex : par chromatographie en phase gazeuse) doit être effectuée afin de s'assurer que la matrice respecte les concentrations prescrites (Picco et al., 2023). Il serait donc préférable de considérer d'autres recouvrements afin d'éviter ces solvants.

ii) Recouvrement d'hydroxyapatite : Plutôt que d'encapsuler le CaO₂ dans un polymère, Tomioka et al. (2023) ont investigué un recouvrement d'hydroxyapatite formé spontanément

à la surface du CaO_2 . Cette méthode consiste simplement à mélanger de la poudre de CaO_2 à du tampon phosphate pendant une heure à 37°C . Les particules sont ensuite récupérées et incorporées à une solution d'hydrogel de gélatine (avec catalase). Une concentration plus élevée en phosphate permet un relargage d'oxygène en hypoxie plus long et un *burst release* initial plus faible grâce à un recouvrement plus important. Ainsi, dans les meilleures conditions, la courbe de relargage d' O_2 après recouvrement suit toujours la tendance du CaO_2 pur mais présente un *burst release* initial plus faible et un relargage plus long d'environ sept jours (Tomioka et al., 2023). Il a donc été possible de recouvrir les particules de CaO_2 sans l'utilisation de solvants organiques. Cette approche novatrice semble donc particulièrement prometteuse pour l'application du présent projet de maîtrise. La section suivante présente plus en détail l'hydroxyapatite et les phosphates de calcium. Un résumé des principaux concepts concernant le CaO_2 est présenté dans la Figure 1.7.

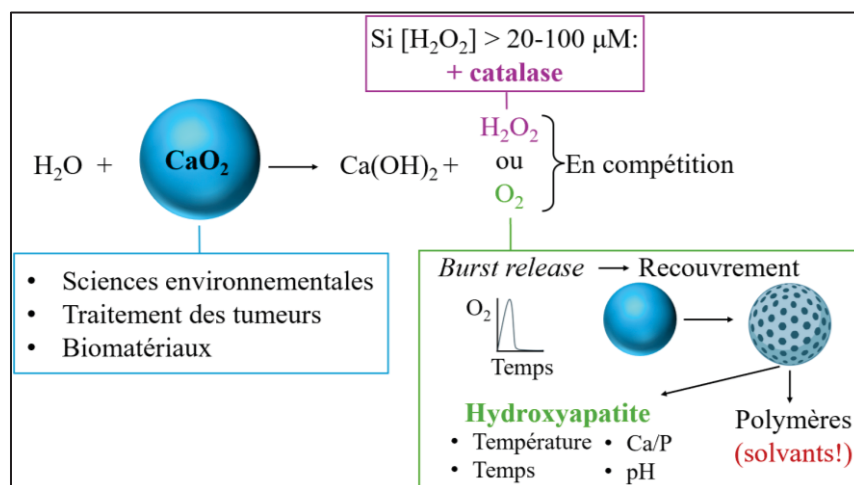


Figure 1.7 Résumé des principaux concepts en lien avec le CaO_2 présentés dans ce chapitre
Créé avec BioRender.com

1.5 Hydroxyapatite

L'hydroxyapatite et les phosphates de calcium sont souvent retrouvés dans les domaines de la dentisterie, des os et de la régénération de ce tissu (Mondal et al., 2023). Cette section se concentre toutefois sur le processus de formation de ce phosphate de calcium puisque, dans

l'étude de Tomioka et al. (2023) et dans le présent projet, l'hydroxyapatite (HAp) est plutôt employée comme recouvrement servant à contrôler les échanges entre l'eau et le CaO_2 .

1.5.1 Propriétés et formation

Propriétés et structure : L'HAp est un phosphate de calcium biocompatible (Kattimani, Kondaka, & Lingamaneni, 2016) de formule moléculaire $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ et de ratio calcium/phosphore (Ca/P) = 1,67 (Uskoković & Uskoković, 2011). Toutefois, des substitutions d'ions peuvent survenir dans sa structure, menant à des composés plus complexes tels que $(\text{Ca},\text{Z})_{10}(\text{PO}_4,\text{Y})_6(\text{OH},\text{X})_2$ où $\text{Z} : \text{Na}^+, \text{Mg}^{2+}, \text{K}^+, \text{Sr}^{2+}$; $\text{Y} : \text{CO}_3^{2-}, \text{HPO}_4^{2-}$ et $\text{X} : \text{Cl}^-, \text{F}^-$ (Uskoković & Uskoković, 2011). La résorption de l'HAp cristalline en milieu biologique peut parfois s'échelonner sur plusieurs années (Tonino, van der Wal, Heyligers, & Grimm, 2009). Cependant, les substitutions d'ions peuvent raccourcir ce processus (Xiao, Sonny Bal, & Rahaman, 2016).

Processus de formation : Plusieurs équipes suggèrent que l'HAp soit formée à partir d'une phase intermédiaire de phosphate de calcium amorphe (ACP) (Boskey & Posner, 1973; Stämmeier, Purgstaller, Hippler, Mavromatis, & Dietzel, 2018; Ucar et al., 2019). Du et al. (2013) proposent des mécanismes réactionnels où les ions Ca^{2+} en solution formeraient des complexes avec les molécules d'eau. Toutefois, des ions phosphate pourraient remplacer ces molécules d'eau et les complexes qui en résultent pourraient subir une déprotonation. La substitution de l'eau par les ions phosphate se poursuivrait et un même ion phosphate pourrait lier deux complexes. La liaison de complexes peut mener à la formation de $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6(\text{H}_2\text{O})_{30}$ (forme hydratée de l'agrégat de Posner $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$) qui pourrait être à la base de la formation de l'ACP. L'ACP se transformerait ensuite en HAp par la formation d' OH^- coordonnés et par la libération d'ions hydrogénophosphate (HPO_4^{2-}) à la suite du transfert d'un proton d'une molécule d'eau coordonnée à un ion phosphate (PO_4^{3-}) coordonné (Du et al., 2013).

Méthodes de synthèse : L'HAp peut être produite selon plusieurs méthodes, soit par la synthèse à l'état solide, mécano-chimique, hydrothermale, par hydrolyse, par combustion ou

par pyrolyse (Mohd Pu'ad et al., 2020). La synthèse de l'HAp peut aussi s'effectuer en milieu alcalin à température $< 100^{\circ}\text{C}$ par précipitation chimique où une solution contenant du calcium est mélangée avec une solution de phosphate afin de générer un précipité. Ce précipité (HAp) est ensuite vieilli, lavé et séché (Mohd Pu'ad et al., 2020). Ces étapes sont semblables à celles proposées par Tomioka et al. (2023) pour leur recouvrement spontané d'HAp sur les particules de CaO_2 mélangées à du tampon phosphate à 37°C puis lavées et séchées.

1.5.2 Facteurs influençant le processus de formation de l'hydroxyapatite

La morphologie, la taille, la cristallinité et la phase (type de phosphate de calcium) sont certaines caractéristiques du produit pouvant être influencées, entre autres, par la température, le pH, le ratio Ca/P, la concentration des ions Ca^{2+} et le temps de vieillissement (*aging*) (Figure 1.7). Les travaux cités ci-dessous présentent ces relations et ont utilisé la précipitation comme méthode de synthèse de l'HAp.

Température : Zhu et al. (2011) ont obtenu des particules aux morphologies sphériques, filamenteuses ou sous forme de plaquettes ou de feuillets selon la température de synthèse (25 , 40 , 60 ou 80°C) ou le temps d'agitation ($2,5$, $3,5$ ou 4 heures). D'autres équipes ont plutôt obtenu des particules sous forme d'aiguilles (Lazić, Zec, Miljević, & Milonjić, 2001; Zou et al., 2017) ou de petits bâtonnets (Kothapalli, Wei, Legeros, & Shaw, 2005). La taille et la cristallinité des particules ont tendance à augmenter lorsque la température passe de $22 - 25^{\circ}\text{C}$ à $70 - 95^{\circ}\text{C}$ (Lazić et al., 2001; Zou et al., 2017) bien que des observations contraires aient également été rapportées sur la taille (Lee, Lee, Lee, Heo, & Kim, 2020). Al-Qasas et Rohani (2005) ont constaté une diminution de la taille en passant de 25 à 45°C (augmentation de la nucléation) et la tendance inverse en passant de 55 à 85°C (augmentation de l'agglomération). Lee et al. (2020) ont proposé que de l'HAp déficient en calcium (CDHA) serait formé lorsque la température de synthèse par précipitation chimique est de 25°C mais que de l'hydroxyapatite stœchiométrique serait obtenue lorsque la synthèse s'effectue à 90°C (ratio Ca/P = $1,67$, pH synthèse = 10 ou 11).

Temps : Le temps de vieillissement, quant à lui, peut avoir un effet notable sur le degré de cristallinité de l'HAp (Saharudin, Shariffuddin, Nordin, & Ismail, 2019).

pH : Différents phosphates de calcium peuvent être obtenus selon le pH utilisé durant la synthèse et plus d'une phase peuvent coexister pour un même pH (Chuprunov et al., 2020). Thomas, Rajendran, et Subramanian (2023) ont effectué la synthèse à 200°C et ont obtenu de la monétite à pH 5, de la monétite et l'HAp à pH 7 et l'HAp à pH 10. De plus, en variant le pH de synthèse (de 10 à 11,3) et le ratio Ca/P (1,67 à 2,2) à 25°C, Lee et al. (2020) ont proposé que du CDHA soit formé à pH 10 (tous ratios Ca/P) et 11 ($\text{Ca/P} \leq 1,8$) mais que de l'HAp serait obtenue dans les autres conditions expérimentales de pH et de Ca/P. Al-Qasas et Rohani (2005) ont également constaté que l'effet du pH pouvait être affecté par la concentration d'ions Ca^{2+} . Mekmene et al. (2009) ont obtenu quant à eux de l'apatite déficiente en calcium pour tous les pH (6,7 à 9,5) et les ratios Ca/P initiaux (1,0 à 2,0) avec une cristallinité décroissante lorsque le pH augmente.

En résumé, puisque chaque équipe utilise des conditions différentes pour synthétiser l'HAp, il est difficile de faire ressortir une tendance générale sur l'effet de la température, du temps, du pH et du ratio Ca/P. Toutefois, cette section a pu mettre en évidence l'importance de ces paramètres dans la synthèse de l'HAp.

1.6 Résumé de la littérature, problématique et objectifs du projet

Résumé de la littérature (principaux concepts liés au présent projet) : Le chitosane et ses hydrogels possèdent d'intéressantes caractéristiques qui en font des matrices de choix afin de libérer localement des cellules T pour l'ACT. Oxygéner ces gels pourrait améliorer la viabilité et la prolifération des cellules qui y sont encapsulées. De plus, des cellules hypoxiques pourraient s'épuiser plus rapidement puisque l'hypoxie augmente la cytotoxicité et la fonction effectrice. Cette étude s'est tournée vers le générateur d'oxygène CaO_2 plutôt que les transporteurs pour combler les besoins en oxygène puisque ces derniers ne peuvent se recharger lorsqu'en hypoxie et qu'ils pourraient poser certains risques pour la santé. L'emploi

du CaO_2 dans de nombreux domaines, incluant les matrices, fait de lui un sujet d'étude populaire et bien caractérisé comme en témoigne les travaux de Wang et al. (2016). Le mécanisme de relargage d' O_2 et d' H_2O_2 qu'ils proposent a été utilisé dans la présente étude puisqu'il est issu d'une analyse cinétique approfondie qui a été effectuée dans des conditions semblables à celles des présents travaux. La présente étude s'est également inspirée du processus de recouvrement développé par Tomioka et al. (2023) pour recouvrir le CaO_2 à cause de son protocole simple et sans espèces toxiques/cancérogènes. Toutefois, afin d'améliorer la courbe de relargage d' O_2 , des paramètres tels que le pH, le ratio Ca/P, la température et la durée ont été modifiés puisqu'ils ont d'importants effets sur l'HAp produit qui pourrait, à son tour, influencer l'exposition du CaO_2 à l'eau et donc la génération d' O_2 et d' H_2O_2 .

Problématique : La problématique concerne donc l'absence d'apport constant, prolongé et contrôlé d'oxygène aux cellules immunitaires encapsulées dans l'hydrogel ce qui pourrait affecter leur viabilité et leur prolifération et donc l'efficacité du traitement par ACT locale.

Objectifs : Ce projet a pour but à long terme d'oxygéner un hydrogel injectable de chitosane thermosensible avec des particules de CaO_2 recouvertes d'HAp dans le contexte de l'ACT pour fournir l'oxygène nécessaire aux cellules immunitaires encapsulées. Les présents travaux se divisent en deux objectifs principaux subdivisés en sous-objectifs :

i) Objectif 1 (sans CaO_2): Caractériser la réponse de cellules T, encapsulées ou non dans un hydrogel, à un stress hypoxique afin de trouver un modèle cellulaire approprié.

- **Sous-objectif 1.1 :** Déterminer l'effet de l'hypoxie et/ou d'un milieu faible en sérum sur la viabilité et l'activité métabolique des cellules afin d'imiter les conditions faibles en oxygène et en nutriments de la matrice dans l'environnement *in vivo* avant l'apparition de vaisseaux sanguins. Les tests seront effectués sur les cellules Jurkat et OT-I en hypoxie et normoxie sur 7+ jours.
- **Sous-objectif 1.2 :** Vérifier si l'hypoxie a également un effet sur la prolifération, l'activation et l'épuisement des cellules OT-I sur 7 jours par analyses cytométriques.

- **Sous-objectif 1.3** : Cultiver différentes lignées de cellules immunitaires (Jurkat et OT-I) et sélectionner la lignée montrant des différences significatives importantes entre la réponse hypoxique et normoxique afin d'utiliser ce modèle pour vérifier les effets des matrices riches en oxygène (développées dans l'objectif 2) sur le stress hypoxique des cellules.

ii) Objectif 2 (sans cellules): Développer et évaluer l'efficacité des méthodes de détection de produits et de recouvrement de CaO_2 afin de proposer une première approche pour l'oxygénation des hydrogels.

- **Sous-objectif 2.1** : Mettre au point une méthode de mesure d' O_2 et d' H_2O_2
- **Sous-objectif 2.2** : Optimiser le processus de recouvrement du CaO_2 afin d'obtenir un relargage d'oxygène constant et réglable selon les besoins (Figure 1.8). Pour ce faire il faut :
 - Modifier les paramètres dans le processus de recouvrement
 - Évaluer les profils de relargage d' H_2O_2 et d' O_2 produits par les particules recouvertes et encapsulées dans les hydrogels
 - Caractériser les particules obtenues (microscopie électronique à balayage (MEB), spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), diffraction des rayons X (XRD))
- **Sous-objectif 2.3** : Évaluer par rhéologie les effets de l'ajout des particules de CaO_2 dans les hydrogels sur les propriétés mécaniques de la matrice.

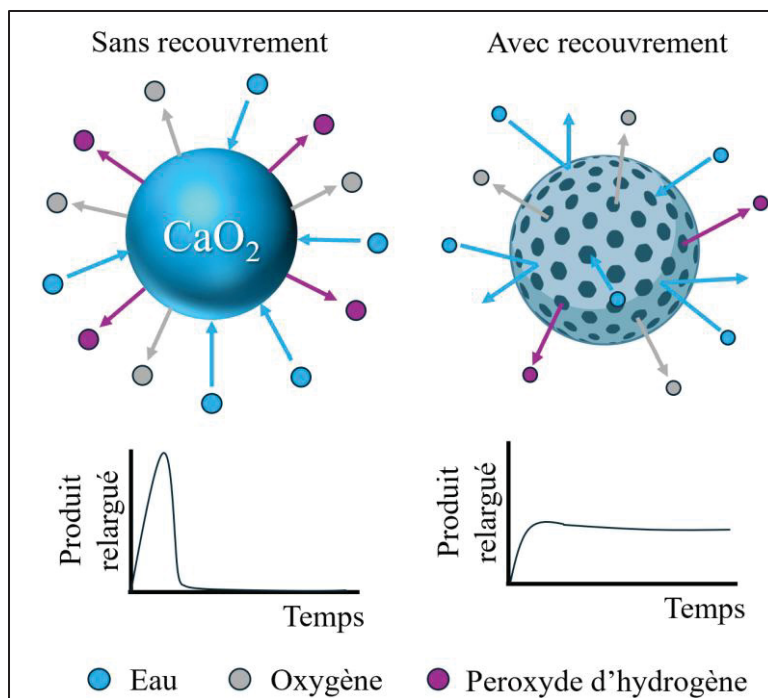


Figure 1.8 Schéma hypothétique du recouvrement poreux d'hydroxyapatite à la surface des particules de CaO_2 . Le ralentissement de la réaction entre l'eau et le CaO_2 permettrait un relargage de produits plus faible mais prolongé au lieu du *burst release*

Créé avec BioRender.com

CHAPITRE 2

MÉTHODOLOGIE

Cette section présente la fabrication des hydrogels de chitosane ainsi que la culture, l'encapsulation et les différents essais cellulaires. Enfin, elle détaille le processus de recouvrement des particules de peroxyde de calcium (CaO_2) ainsi que les méthodes de quantification du relargage de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'oxygène (O_2) et de caractérisation des particules.

2.1 Préparation des hydrogels de chitosane

2.1.1 Préparation de la solution de chitosane

Le chitosane utilisé (TM4737, ChitoClear, Primex, Islande) possède une masse moléculaire moyenne de $255\,400 \pm 2524$ g/mol (déterminée par chromatographie sur gel au laboratoire du Pr. Lavertu, École Polytechnique) et un degré de désacétylation de 89% (déterminé par résonance magnétique nucléaire ^1H). Une solution de chitosane à 2,67% (m/v) est obtenue en mélangeant, à l'aide d'un agitateur mécanique (Heidolph, Allemagne), le chitosane à 100 mL d'acide chlorhydrique (HCl) 0,12 M pendant 3 heures à ~ 800 tr/min. La solution est couverte pour éviter l'évaporation. Elle est ensuite transférée dans des fioles de 10 mL (Thermo Scientific, Chine) et stérilisée à 121°C pendant 20 min puis conservée à 4°C . Pour vérifier l'uniformité entre les lots, des mesures de pH et de viscosité sont effectuées après chaque préparation.

2.1.2 Préparation de l'agent gélifiant

L'agent gélifiant est composé de 0,5 M β -glycérophosphate disodique hydraté (BGP) (Sigma-Aldrich, États-Unis) et 0,375 M d'hydrogénocarbonate de sodium (SHC) (Supelco, Allemagne). Le BGP est d'abord complètement dissous dans de l'eau ultra pure sous agitation magnétique. Le SHC est ensuite ajouté et la solution est agitée pendant deux heures afin

d'assurer la dissolution complète de la poudre et de libérer le dioxyde de carbone (CO_2) produit. Le volume est ajusté au volume désiré et la solution est maintenue à température pièce pendant deux heures pour permettre l'échappement du CO_2 . L'agent gélifiant se conserve à 4°C et sa stérilisation pour les expériences cellulaires se fait par filtration ($0,22\ \mu\text{m}$) sous une enceinte de sécurité biologique.

2.1.3 Fabrication des hydrogels

L'hydrogel est préparé en mélangeant les solutions mères de chitosane, d'agent gélifiant et de milieu de culture de cellules Jurkat à une fraction volumique de 3 : 1 : 1, afin d'obtenir une composition finale de 1,6% (m/v) chitosane et 0,1 M BGP/0,075 M SHC. Le processus général est présenté dans la Figure 2.1. La solution de chitosane 2,67% (seringue A) est mélangée à l'agent gélifiant 0,5 M BGP/0,375 M SHC (seringue B). Les deux seringues sont reliées par un connecteur deux voies de type luer lock. Après 10 allers-retours à un rythme de 150 battements par minute, le mélange C résultant est mélangé au milieu de culture (seringue D) suivant les mêmes étapes. Enfin, 200 μL de la solution d'hydrogel (seringue E) sont ajoutés dans les puits des plaques 24 puits. La solution est ensuite gélifiée à 37°C pendant 7 min avant d'ajouter, selon l'expérience, 1 mL de PBS ou de milieu de culture sur les hydrogels.

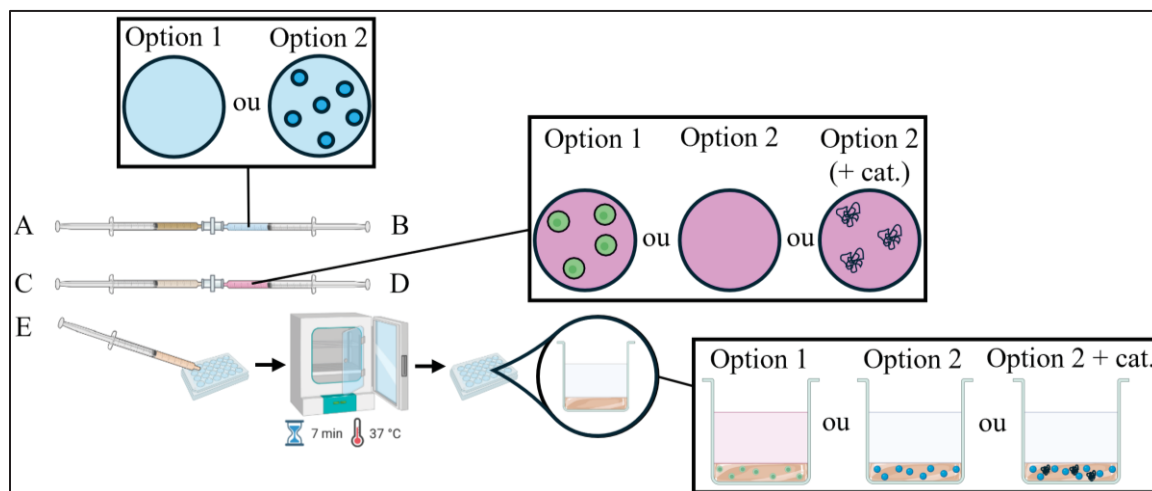


Figure 2.1 Fabrication des hydrogels de chitosane avec cellules (option 1) ou avec particules de CaO_2 (option 2 avec ou sans catalase (cat.))

2.1.4 Modifications au processus de fabrication des hydrogels

Option #1 – Pour les expériences cellulaires (sans CaO_2) : Le contenu de la seringue D est remplacé par la suspension cellulaire à la concentration désirée et des interleukines peuvent également être ajoutées selon le type de cellules. Le gel est recouvert du milieu de culture approprié (ANNEXE I, Tableau-A I-1).

Option #2 – Pour les expériences avec le peroxyde de calcium (sans cellules) : Les particules de CaO_2 (préparées à la section 2.3.2) sont mélangées à l'agent gélifiant (seringue B) et si la catalase est présente, cette enzyme en poudre est dissoute dans le milieu de culture (seringue D). L'ajout de ces produits se fait immédiatement avant de charger les solutions dans les seringues. Le gel est recouvert de PBS.

2.2 Culture cellulaire, essais de viabilité/activité métabolique, cytométrie

Suivant l'encapsulation de la Figure 2.1, les tests cellulaires s'effectuent en hypoxie et en normoxie selon le processus général montré dans la Figure 2.2. Des cellules non encapsulées sont aussi considérées.

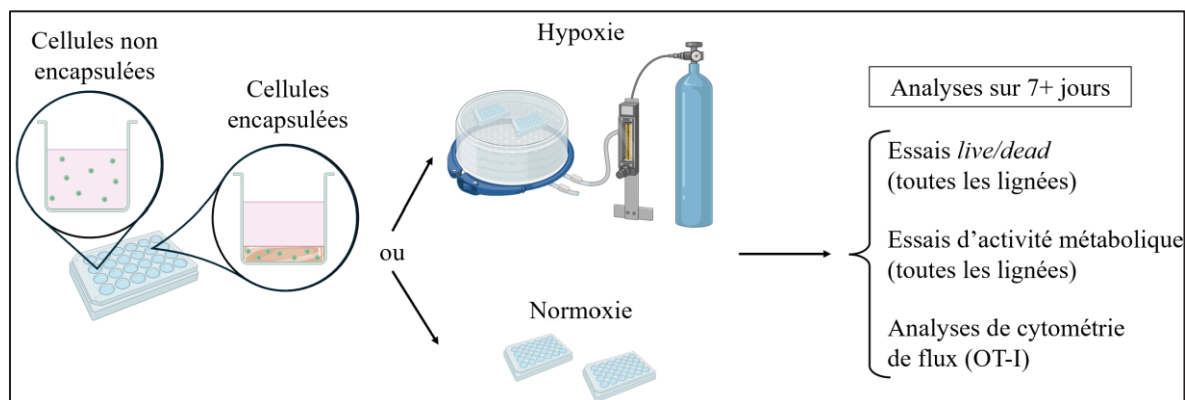


Figure 2.2 Schéma des tests cellulaires

Créé avec BioRender.com

2.2.1 Culture hypoxique des cellules

Certaines expériences requièrent la culture des cellules en hypoxie. Le processus est illustré dans la Figure 2.3. En bref, les plaques contenant les cellules encapsulées (et contrôles) sont placées dans une chambre hypoxique (STEMCELL Technologies, Canada) qui est ensuite purgée pendant 10 min à 15 – 20 L/min avec un mélange de 5% CO₂ + 95% d'azote gazeux (N₂). Les tubes d'entrée et de sortie de gaz sont ensuite scellés et la chambre est placée dans l'incubateur à 37°C.



Figure 2.3 Processus de mise en hypoxie des cellules

Créé avec BioRender.com

2.2.2 Essais *live/dead* et d'activité métabolique

Essais *live/dead* : La calcéine AM (Invitrogen, États-Unis) est utilisée pour marquer les cellules vivantes et l'éthidium homodimère-1 (EthD-1) (Invitrogen, États-Unis), les cellules mortes. En bref, la calcéine AM est hydrolysée dans les cellules vivantes en calcéine (fluorescente, émet dans le vert) par les estérases (Thermo Fisher Scientific, 2020). L'EthD-1 (fluorescent, émet dans le rouge) entre dans les cellules aux parois endommagées et les marque en se liant à leur ADN (Thermo Fisher Scientific, s.d.–a). Les cellules sont incubées pendant 45 min à 37°C (sans lumière) avec une solution de coloration (DMEM : F12 contenant 2 µM de calcéine AM et 5,5 µM d'EthD-1). Les échantillons sont imagés en mode fluorescence (Revolve microscope, Echo, États-Unis) à 470/40 nm (excitation, vivantes) et 560/40 nm (excitation, mortes).

Activité métabolique : La résazurine (bleue) (Biotium, États-Unis) est utilisée afin d'évaluer la viabilité, prolifération ou activité des cellules grâce à la réduction de ce composé en résorufine (fluorescente, rose) par les cellules vivantes (O'Brien, Wilson, Orton, & Pognan, 2000). Des cellules en grand nombre ou métaboliquement très actives mèneront à une plus grande réduction de la résazurine. En bref, le milieu est retiré des puits des échantillons et des contrôles et est remplacé par une solution de milieu complet contenant 10% (v/v) de résazurine. Les plaques sont incubées pendant 3 heures à 37°C sans lumière. La solution de chaque puit est ensuite récupérée en triplicata et la fluorescence est mesurée à 540 nm (excitation) et 615 nm (émission) par un lecteur de plaque (VANTastar, BMG Labtech, Allemagne). Les gels sans cellules servent à soustraire le signal de fond des cellules encapsulées et la solution de coloration sans cellule, à soustraire celui des cellules seules.

*Pour la composition des milieux de culture et étapes préencapsulation, voir ANNEXE I, Tableau-A I-1.

Le logiciel Fiji (Schindelin et al., 2012) a été employé dans ce projet.

2.2.3 Expériences avec les cellules Jurkat

Effet de l'hypoxie et du milieu faible en sérum : Les cellules sont encapsulées dans les hydrogels à 2 million/mL de gel (densité déterminée à la suite d'une expérience préliminaire sur 14 jours comparant différentes densités cellulaires (données non présentées)). Les puits de cellules seules contrôles contiennent 1 mL de milieu avec 100 000 cellules. Les milieux utilisés (1 vs 10% sérum), les échantillons et les répliques sont indiqués dans la Figure 2.4. La moitié des plaques sont mises en hypoxie et l'autre, directement dans l'incubateur à 37°C en normoxie. Le milieu est changé aux 2 – 3 jours durant les 7 premiers jours et à chaque jour (normoxie) ou deux jours (hypoxie) pour les 7 jours suivants (consommation plus importante de milieu à ce moment). Enfin, des essais *live/dead* et d'activité métabolique sont effectués aux jours 0 (minimum 1 heure après la préparation des gels, en normoxie seulement), 3, 7, 11 et 14.

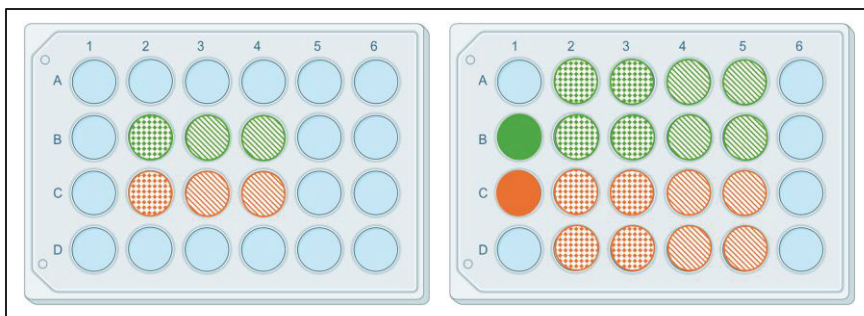


Figure 2.4 Plan de plaques pour les essais *live/dead* (**gauche**) et d'activité métabolique (**droite**). Neuf paires de plaques sont préparées car chaque condition d'O₂ pour chaque *time point* requiert une paire. Les mêmes cellules ne sont donc pas suivies au cours du temps.

Orange : milieu à 10% sérum, vert : milieu à 1% sérum. Rond plein : gel sans cellules, losanges : cellules seules contrôles, hachuré : cellules encapsulées

Créé avec BioRender.com

Coloration des cellules hypoxiques : Afin de confirmer l'état hypoxique des cellules dans la chambre à hypoxie, le marqueur HypoxiTRAK™ (BioStatus, Royaume-Uni), émettant dans le rouge lointain, est utilisé. Ce composé entre dans les cellules vivantes et est réduit dans les cellules hypoxiques en métabolites qui s'accumulent en fonction du temps et des conditions d'O₂ ce qui augmente le signal (BioStatus, 2023). Il est ajouté au milieu de culture au jour 0 ainsi qu'à chaque changement de milieu pendant 7 jours. Les concentrations 30, 50, 100, 130 et 150 nM dans le milieu ont été testées (basées selon les propositions du fabricant), mais 50 nM a été sélectionné puisqu'il fournit un signal suffisant sur 7 jours. Les échantillons ci-dessous sont considérés (Figure 2.5). Les images ont été prises en fluorescence avec le microscope confocal à disque rotatif (Zeiss AxioObserver, Allemagne) à 639 nm (excitation rouge lointain).

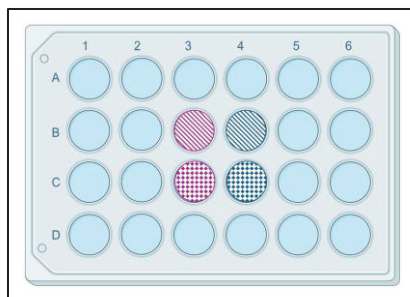


Figure 2.5 Plan de plaque des tests avec HypoxiTRAK™. Rose : 0 nM, bleu : 50 nM, losanges : cellules Jurkat seules, hachuré : cellules encapsulées. *Time points* considérés (en hypoxie et normoxie) : jours 1, 3 et 7. Six plaques sont préparées (une par *time point* et par condition d'O₂)

Créé avec BioRender.com

Selon le fabricant, une cellule marquée indique qu'elle est ou **a été** en état hypoxique puisqu'une cellule peut conserver son signal même si elle n'est plus hypoxique (R. Edward, communication personnelle, 1^{er} mars 2024). Enfin, l'HypoxiTRAK™ **arrête la prolifération** des cellules marquées (BioStatus, 2023).

2.2.4 Expériences avec les cellules OT-I

Isolation/stimulation : Les cellules T CD8⁺ (OT-I) sont isolées à partir de rates de souris mâles et femelles (lignée : C57BL/6-Tg(TcraTcrb)1100Mjb/Crl) obtenues à l'animalerie du Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CrCHUM) conformément au protocole d'éthique CIPA numéro 2I23012SLs. Les cellules sont stimulées pendant 48 heures en présence d'anti-CD3, d'anti-CD28 et d'interleukines et ensuite 24 heures avec seulement les interleukines. Un résumé du protocole d'isolation se trouve dans l'ANNEXE II.

Essais *live/dead* et activité métabolique : Les OT-I sont encapsulés à 3 millions de cellules/mL de gel. Cette densité choisie cadre avec les valeurs trouvées dans la littérature (Suraiya et al., 2022). La densité des OT-I seuls contrôles est de 540 000 cellules/mL de milieu (même nombre de cellules dans les puits contrôles que dans les puits avec gel). Les procédures

d'encapsulation, de culture en hypoxie, et d'essais *live/dead* et d'activité métabolique sont semblables à celles des Jurkat avec quelques différences: des interleukines sont ajoutées à la suspension cellulaire lors de l'encapsulation, seul du milieu complet (+ IL-2/IL-7) est utilisé pour couvrir les gels, les essais se font aux jours 0, 3 et 7. Pour les essais d'activité métabolique : des triplicatas sont utilisés pour les cellules encapsulées tandis qu'un seul puit est utilisé pour les cellules seules contrôles et de l'IL-2/IL-7 sont ajoutées à la solution de résazurine.

Tri de cellules marquées par fluorescence (FACS) : L'analyse de la prolifération (CFSE), l'activation/phénotype (CD25, CD44, CD62L) et l'épuisement (TIM-3, LAG-3, PD-1) des OT-I se fait à l'aide de la cytométrie de flux. Elle se fait sur les cellules encapsulées et non encapsulées, en hypoxie et en normoxie, aux jours 0 (seulement la suspension cellulaire en normoxie), 3 et 7. Le carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) (Sigma-Aldrich, États-Unis) permet de suivre la prolifération des cellules grâce au carboxyfluorescein (fluorescent) qui se lie à certaines molécules intracellulaires (Quah & Parish, 2010). Le nombre de cycles de prolifération peut donc être déterminé en suivant la diminution du signal puisqu'à chaque division cellulaire, la moitié des molécules marquées sont transférées à chacune des cellules filles (Quah & Parish, 2010). Au jour 0, le CFSE est incubé 15 min à 37°C sans lumière dans la suspension cellulaire à une concentration de 1 μ M. Après l'ajout de FBS et un changement de milieu, la suspension cellulaire peut être utilisée pour l'encapsulation. Il est à noter que les cellules utilisées pour vérifier l'activation et l'épuisement ne sont pas marquées au CFSE afin d'éviter le chevauchement des spectres avec les autres marqueurs. Aux jours 3 et 7, les cellules sont libérées des hydrogels en brisant ces derniers manuellement. La procédure se trouve dans l'ANNEXE II. Les cellules seules contrôles et libérées, ainsi que les billes de compensation, sont ensuite colorées (voir ANNEXE II) et analysées au cytomètre (BD FACSymphony A3, États-Unis). Les données sont analysées avec le logiciel FlowJo™ v10.9.0 (BD Life Sciences, États-Unis).

2.3 Processus de recouvrement du CaO_2 dans le tampon phosphate

2.3.1 Préparation du tampon phosphate

Le tampon phosphate 100 mM pH 7 est préparé en dissolvant de l'hydrogénophosphate de disodium (Na_2HPO_4) (Sigma-Aldrich, Allemagne) et du dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4) (Sigma-Aldrich, Suisse) dans de l'eau ultra pure sous agitation. Le pH de la solution est ajusté à l'aide de pastilles d'hydroxyde de sodium (NaOH) (VWR Chemicals BDH, États-Unis) et le tampon est conservé à 4°C. La même procédure est employée pour préparer des tampons phosphate à 500 mM pH 7, 100 mM pH 5 et 100 mM pH 11 en ajustant les masses de Na_2HPO_4 et de NaH_2PO_4 ainsi que la quantité de pastilles d' NaOH afin d'obtenir la molarité et le pH désirés (voir section 2.3.3 pour la justification de ces solutions). Pour préparer des tampons à 13,9 mM pH 7 (pour le recouvrement avec ratio calcium/phosphore (Ca/P) = 1), 8,3 mM pH 7 (Ca/P = 1,67) et 6,9 mM pH 7 (Ca/P = 2), du tampon 100 mM pH 7 est d'abord préparé puis dilué avec de l'eau ultra pure afin d'obtenir la molarité souhaitée (voir section 2.3.3).

2.3.2 Recouvrement des particules de CaO_2

Le processus de recouvrement, basé sur les travaux de Tomioka et al. (2023), se trouve dans la Figure 2.6. La poudre de CaO_2 (75%, 200 *mesh*, Sigma-Aldrich, Allemagne) (A) est ajoutée au tampon phosphate 100 mM pH 7 (B) à une concentration de 1 mg/mL. La solution est couverte et agitée dans un bain-marie à 37°C (C) pendant une heure (D). Le tampon phosphate est ensuite retiré par centrifugation à 4000 tr/min pendant 3 min (E) et les particules récupérées sont lavées à trois reprises à l'eau ultra pure (F). Les particules (G) sont ensuite séchées à 70°C (H) *overnight* (I) avant d'être aliquotées (J). Le processus de recouvrement est généralement effectué quelques jours avant l'encapsulation des particules. Les particules sont alors ajoutées à l'agent gélifiant (K) pour préparer les hydrogels selon la Figure 2.1. **Il est à noter que les conditions fournies dans cette section sont pour le recouvrement contrôle (CPO_ctrl) et constituent les conditions de base qui seront modifiées.** De plus, la poudre de CaO_2

commercial utilisée comprend également de l'hydroxyde de calcium ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) et du carbonate de calcium (CaCO_3).

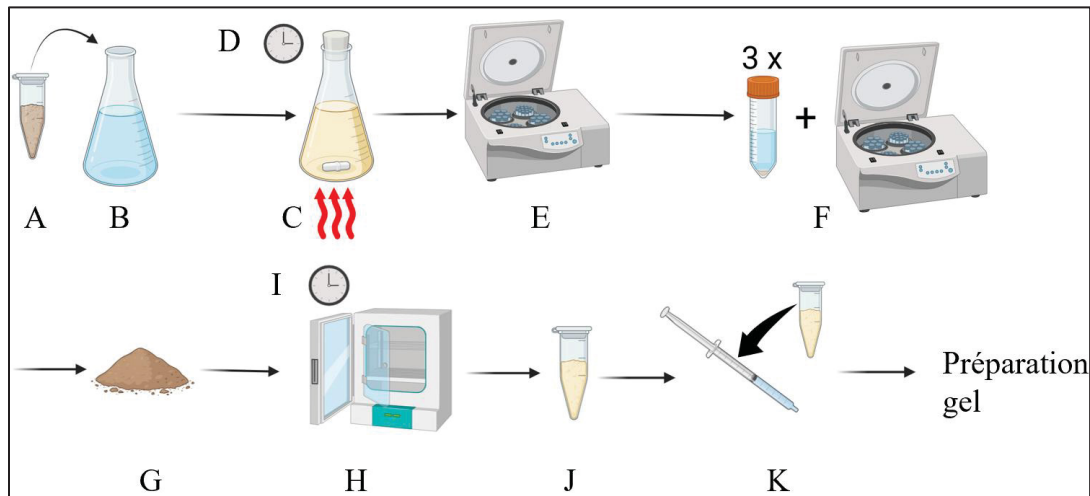


Figure 2.6 Processus général de recouvrement du CaO_2 dans le tampon phosphate basé sur les travaux de Tomioka et al. (2023)

Créé avec BioRender.com

2.3.3 Paramètres étudiés dans les expériences avec CaO_2

Cette section présente les différents paramètres du processus de recouvrement général modifiés un par un afin d'observer leurs effets sur le relargage d' H_2O_2 et d' O_2 (section 2.4) et d'optimiser le recouvrement. Certaines expériences modifient plutôt les conditions d'encapsulation ou de « culture » des hydrogels. Toutes les expériences avec CaO_2 sont sans cellules et l'encapsulation des particules se fait selon la méthode de la section 2.1. Les lettres A à J mentionnées se réfèrent à la Figure 2.6. Deux contrôles sont retrouvés, soit i) CaO_2 non recouvert (CPO) et ii) CaO_2 recouvert avec les paramètres contrôles (CPO_ctrl). Le Tableau 2.1 liste les paramètres de recouvrement du CPO_ctrl ainsi que chaque paramètre modifié accompagné du nom de l'échantillon correspondant.

Tableau 2.1 Paramètres modifiés dans le processus de recouvrement du CaO₂ et nom des échantillons correspondants*

# ligne	Nom échantillon	Paramètre modifié par rapport au contrôle (CPO_ctrl)	Valeur du paramètre
1	CPO	Aucun recouvrement	---
2	CPO_ctrl	Concentration de CaO ₂ dans le tampon	1 mg CaO ₂ /mL tampon
		Tampon phosphate utilisé	100 mM pH 7 (Ca/P = 0,14)
		Temps d'agitation	1 heure
		Température d'agitation	37°C
		Température de séchage <i>overnight</i>	70°C
		Concentration des particules dans le gel**	10 mg particules/mL gel
		Concentration de catalase dans le gel**	0 U de catalase par mL de gel
		Solution sur l'hydrogel**	PBS
		Volume de gel par puit**	200 µL
3	CPO_H ₂ O	Tampon phosphate utilisé	Eau ultra pure
4	CPO_500		500 mM, pH 7
5	CPO_pH5		100 mM, pH 5
6	CPO_pH11		100 mM, pH 11
7	CPO_CaP1		~13,9 mM, pH 7 (Ca/P = 1)
8	CPO_CaP_1.67		~ 8,3 mM, pH 7 (Ca/P = 1,67)
9	CPO_CaP2		~6,9 mM, pH 7 (Ca/P = 2)
10	CPO_seul	Aucun recouvrement, présence du gel	Sans gel
11	CPO_ctrl_seul	Présence du gel	Sans gel
12	CPO_cat	Aucun recouvrement, concentration de catalase dans le gel**	1000 – 2500 U de catalase par mL de gel
13	CPO_ctrl_cat	Concentration catalase dans le gel**	1000 – 2500 U de catalase par mL de gel
14	CPO_MQ	Solution sur l'hydrogel**	Eau ultra pure

# ligne	Nom échantillon	Paramètre modifié par rapport au contrôle (CPO_ctrl)	Valeur du paramètre
15	CPO_CM		Milieu complet Jurkat
16	CPO_4	Température d'agitation	4°C
17	CPO_RT		Température pièce
18	CPO_50		50°C
19	CPO_1min	Temps d'agitation	1 min
20	CPO_5min		5 min
21	CPO_15min		15 min
22	CPO_30min		30 min
23	CPO_120min		120 min
24	CPO_dRT	Température de séchage <i>overnight</i>	Température pièce
25	CPO500 ou CPOctrl500_0mg/mL	Concentration des particules dans le gel, volume de gel par puit**	0 mg particules/mL gel, 500 µL gel par puit
26	CPO500_1mg/mL		1 mg/mL, 500 µL
27	CPO500 ou CPOctrl500_10mg/mL		10 mg/mL, 500 µL
28	CPO500 ou CPOctrl500_30mg/mL		30 mg/mL, 500 µL
29	CPOctrl500_60mg/mL		60 mg/mL, 500 µL

*Un seul paramètre est modifié à la fois (donc les autres paramètres du CPO_ctrl restent les mêmes)

**Paramètre pertinent uniquement lorsque le gel est employé (détection H₂O₂ et O₂)

Effet du processus de recouvrement : Le processus de recouvrement comprend plusieurs étapes pouvant influencer les profils de relargage. Entre autres, la période d'agitation du CaO₂ dans le tampon (étapes A à D) pourrait mener à la libération d'H₂O₂ et d'O₂. Le processus de recouvrement présenté dans la Figure 2.6 est donc répété en remplaçant toutefois le tampon phosphate en B par de l'eau ultra pure afin d'évaluer les effets de ce recouvrement sans la présence du phosphate. Les échantillons considérés sont : CPO, CPO_ctrl et CPO_H₂O (Tableau 2.1, lignes 1 à 3).

Effet de la présence du gel sur le relargage d'H₂O₂ et d'O₂ : Des tests ont été effectués avec ou sans la présence de l'hydrogel afin de vérifier les effets de ce dernier sur le profil de relargage des produits. Les échantillons considérés sont : CPO, CPO_ctrl (encapsulés) et CPO_seul, CPO_ctrl_seul (non encapsulés) (Tableau 2.1, lignes 1, 2, 10, 11).

Effet de la présence de la catalase dans les hydrogels : Comme mentionné à la section 1.4.3.3, le CaO₂ peut relarguer des concentrations cytotoxiques de H₂O₂ pouvant nuire à la viabilité cellulaire. Puisque la catalase peut réduire ces concentrations, l'enzyme a été encapsulée dans les hydrogels, s'agissant là de la meilleure façon de l'ajouter (voir section 1.4.3.3). La catalase de foie bovin (Sigma-Aldrich, États-Unis) sous forme de poudre est encapsulée dans les hydrogels de chitosane selon la méthode de la section 2.1.4 (option #2) afin de vérifier ses effets sur les concentrations quotidiennes d'H₂O₂ et d'O₂ relargués. La concentration de catalase a été déterminée expérimentalement. Les échantillons considérés sont: CPO, CPO_cat, CPO_ctrl et CPO_ctrl_cat (Tableau 2.1, lignes 1, 12, 2 et 13). Les particules et la catalase sont encapsulées dans des gels. Les CPO et CPO_cat sont encapsulés à 2,5 mg/mL de gel.

Effet de la molarité du tampon phosphate : Tomioka et al. (2023) ont constaté que, comparé au CaO₂ recouvert dans du tampon phosphate de 100 mM, celui recouvert dans du tampon de 500 mM avait un *burst release* moindre et un relargage plus long d'environ six jours. Le processus général de recouvrement est donc répété en modifiant uniquement la molarité du tampon en B. Les échantillons considérés sont : CPO_ctrl et CPO_500 (Tableau 2.1, lignes 2 et 4).

Effet de la nature de la solution au-dessus de l'hydrogel : Les ions phosphates contenus dans le PBS couvrant les hydrogels conservés à 37°C pourraient continuer le processus de recouvrement même une fois les particules encapsulées dans les gels. De plus, ces hydrogels serviront éventuellement à cultiver les cellules dans du milieu de culture et ce milieu contient plusieurs ions dont les carbonates pouvant mener à un recouvrement de carbonate de calcium amorphe sur les particules de CaO₂ (Tomioka, Fujita, & Matsusaki, 2024). Il est donc

important de vérifier l'effet de la nature de la solution couvrant l'hydrogel sur le relargage des produits du CaO_2 . Pour ces tests, tous les gels contiennent des particules recouvertes avec les paramètres contrôles et les échantillons considérés sont : CPO_ctrl, CPO_MQ et CPO_CM (Tableau 2.1, lignes 2, 14 et 15).

Effet de la température : La température est un facteur important à considérer durant la synthèse de l'hydroxyapatite (HAp) (voir section 1.5.2). Le recouvrement a donc été effectué en modifiant la température en C pour 4°C, température pièce et 50°C. Les recouvrements à 4°C et température pièce (étapes A à D) sont faits sans bain-marie. Le premier est effectué dans une chambre froide à température contrôlée afin d'analyser les effets de basses températures. Le second est laissé à température pièce. Le recouvrement à 50°C (avec bain-marie) permet de vérifier les effets de températures supérieures à 37°C sans provoquer une évaporation trop importante du tampon qui augmenterait la pression dans la fiole fermée par un bouchon. De plus, cette température se situe dans la même gamme (22 – 95°C) que celle étudiée pour la précipitation de l'HAp (section 1.5.2). Les échantillons considérés sont : CPO_4, CPO_RT, CPO_ctrl et CPO_50 (Tableau 2.1, lignes 16, 17, 2 et 18).

Effet du temps d'agitation dans le tampon phosphate : Différents temps d'agitation du CaO_2 dans le tampon phosphate (en D) ont été sélectionnés afin de vérifier si le relargage de produits augmente avec la diminution du temps de contact entre les particules et le phosphate. Les échantillons considérés sont : CPO_1min, CPO_5min, CPO_15min, CPO_30min, CPO_ctrl et CPO_120min (Tableau 2.1, lignes 19 à 22, 2 et 23).

Effet du pH du tampon phosphate : Comme mentionné à la section 1.5.2, le pH est un facteur important dans la synthèse de l'HAp puisqu'il peut affecter la nature et la cristallinité du phosphate de calcium formé. Par conséquent, le pH du tampon phosphate en B a été modifié et les échantillons considérés sont : CPO_pH5, CPO_ctrl et CPO_pH11 (Tableau 2.1, lignes 5, 2 et 6).

Effet du ratio Ca/P lors du recouvrement : La section 1.5.2 mentionne également que le ratio Ca/P est un facteur important puisqu'il peut affecter la nature du phosphate de calcium formé. Pour changer les ratios Ca/P, la molarité du tampon phosphate a été modifiée afin de maintenir la concentration 1 mg CaO₂/mL tampon constante (volume suffisant pour maintenir les particules en suspension). Ainsi, la concentration de calcium (du CaO₂) demeure constante tandis que celle du phosphore est diminuée. Les échantillons considérés sont : CPO_ctrl, CPO_CaP1, CPO_CaP1.67 et CPO_CaP2 (Tableau 2.1, lignes 2 et 7 à 9).

Effet de la température de séchage : Afin de vérifier si le séchage des particules à 70°C *overnight* résulte en un vieillissement plus important que lorsqu'elles sont séchées à température pièce, les particules humides en G sont versées sur un papier filtre (Ahlstrom, Finlande) en suspension dans un bécher et laissées *overnight* sous la hotte chimique pour évaporer l'eau. Les échantillons considérés sont: CPO_dRT et CPO_ctrl (Tableau 2.1, lignes 24 et 2).

Effet de la concentration des particules dans les hydrogels : Afin de voir l'effet de la concentration des particules sur les courbes de relargage, des concentrations élevées allant de 0 à 30 (CPO) ou 60 (CPO_ctrl) mg/mL ont été considérées. Pour ces tests, tous les gels contiennent des particules recouvertes avec les paramètres contrôles mais le volume de gel par puit est augmenté à 500 µL au lieu de 200 µL afin de mieux voir les effets. Les échantillons considérés sont : CPO500_0mg/mL, CPO500_1mg/mL, CPO500_10mg/mL et CPO500_30mg/mL pour le CPO et CPOctrl500_0mg/mL, CPOctrl500_10mg/mL, CPOctrl500_30mg/mL et CPOctrl500_60mg/mL pour le CPO_ctrl (Tableau 2.1, lignes 25 à 29).

Dans les **tests de détection d'H₂O₂ et d'O₂**, le nom des échantillons du Tableau 2.1 indiquent des systèmes de **particules recouvertes et encapsulées dans les gels** (sauf si indication contraire mentionnée dans le Tableau 2.1) tandis que pour les **tests de caractérisation** où le gel n'est pas présent (ex. MEB, FTIR, XRD), ces noms désignent les **particules recouvertes**

seulement (aucun gel présent). Les noms du Tableau 2.1 informent donc sur le paramètre modifié lors du recouvrement (pour le CPO, il n'y a pas de recouvrement).

2.4 Quantification du relargage d' H_2O_2 et d' O_2 produits par les hydrogels encapsulant les particules de CaO_2

Cette section présente les méthodes utilisées pour quantifier les relargages d' H_2O_2 et d' O_2 des particules encapsulées dans les hydrogels de chitosane avec ou sans catalase (Figure 2.7) après le processus de la Figure 2.1. Les particules de CaO_2 sont recouvertes suivant les différentes conditions expérimentales de recouvrement présentées à la section 2.3.3, sont encapsulées dans les hydrogels et les profils de relargage des produits sont comparés.

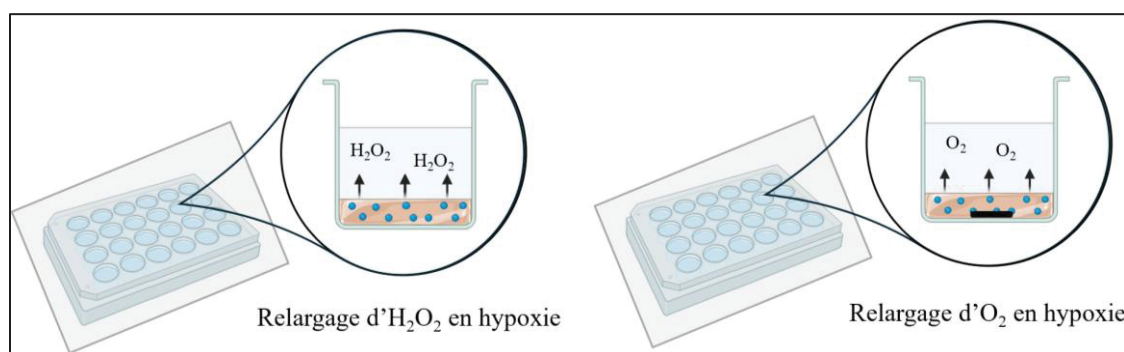


Figure 2.7 Relargage d' H_2O_2 et d' O_2 en hypoxie des hydrogels encapsulant des particules de CaO_2 (relargages détectés dans deux plaques distinctes pour chaque espèce)

Créé avec BioRender.com

2.4.1 Relargage de l' H_2O_2

Collecte des échantillons d' H_2O_2 relargué des hydrogels en hypoxie : L' H_2O_2 est mesuré afin d'observer le profil de relargage et de déterminer si la concentration quotidienne produite par les gels dépasse le niveau cytotoxique. Les hydrogels contenant les particules sont préparés suivant la procédure de la section 2.1 (option #2, section 2.1.4). Pour les tests avec les particules non encapsulées, la même masse de particules par puit que pour les gels est utilisée et les particules sont suspendues dans 1,2 mL de PBS (même volume que 1 mL de PBS avec 200 μL de gel). Le schéma général des étapes pour la collecte des échantillons et la

quantification de leur contenu en H_2O_2 est présenté dans la Figure 2.8. Une fois les gels préparés, les plaques sont mises dans un sac de thermoscellage (FoodSaver®, États-Unis) qui est ensuite scellé aux deux extrémités et deux ouvertures de 2 – 3 cm sont créées (entrée et sortie du gaz). Le sac est purgé d'azote gazeux pendant 5 min (A) avant d'être scellé à nouveau et conservé à 37°C créant ainsi une chambre hypoxique. Le sac est ouvert à chaque *time point* et le processus en (A) est répété après chaque collecte d'échantillons. Concernant les échantillons, le gel encapsulant les particules libère du H_2O_2 qui se retrouve dans le PBS au-dessus du gel. Un échantillon de 300 μL est collecté (B) et conservé à -80°C (C). Le PBS restant est retiré et remplacé par 1 mL de PBS frais (D). Ces étapes sont répétées quotidiennement du jour 0 (3 heures après la préparation du gel) au jour 7 inclusivement pour tous les gels. Concernant l'expérience sur l'effet de la nature de la solution au-dessus de l'hydrogel, les mêmes étapes sont effectuées mais du PBS, de l'eau ultra pure ou du milieu de culture de Jurkat est utilisé pour couvrir les gels.

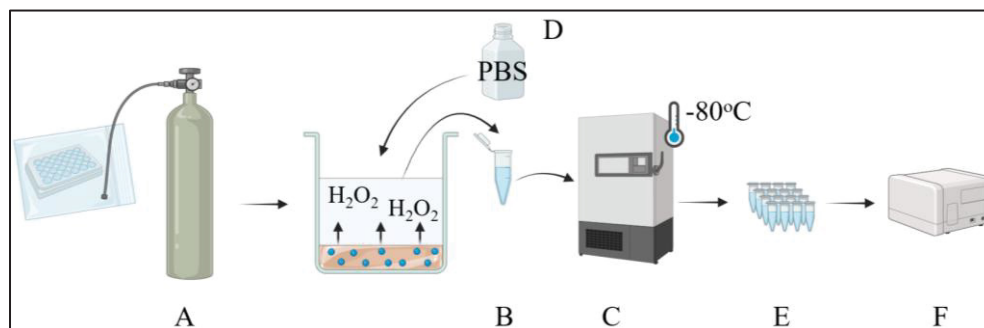


Figure 2.8 Processus général pour la quantification du H_2O_2 relargué des gels encapsulant les particules de CaO_2 ayant subi différents processus de recouvrement

Créé avec BioRender.com

Quantification de la concentration d' H_2O_2 relargué : Après 7 jours, les échantillons de PBS sont décongelés (E) et leur contenu en H_2O_2 est analysé à l'aide de la trousse de détection du H_2O_2 (Pierce™ Quantitative Peroxide Assay Kit (Aqueous), Thermo Scientific, États-Unis) (F) suivant les instructions du fabricant. En bref, les échantillons, ainsi que des standards préparés par dilution en série d'une solution d' H_2O_2 , sont mélangés à un *working reagent* dans une plaque de 96 puits selon un facteur de dilution approprié. Après 20 min d'incubation, l'absorbance de chaque échantillon est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaque (Varioskan

LUX, Thermo Scientific, États-Unis) à 595 nm et la concentration d' H_2O_2 est déterminée grâce à la courbe standard. Selon le fabricant, le *working reagent* contient, entre autres, du sorbitol, de l'acide sulfurique, des ions ferreux Fe^{2+} et de l'orange de xylénol. Les ions Fe^{2+} sont oxydés à l'aide des radicaux peroxydes issus de la réaction entre le H_2O_2 des échantillons et le sorbitol. Un complexe violet, formé d'ions ferriques (Fe^{3+}) et d'orange de xylénol, obtenu dans le milieu acide sert ensuite dans la mesure d'absorbance (Thermo Fisher Scientific, s.d.–b).

2.4.2 Relargage de l' O_2

Le profil de relargage de l' O_2 est obtenu à l'aide de capteurs d'oxygène (PreSens Precision Sensing GmbH, Allemagne) placés au fond des puits. Les hydrogels sont ensuite préparés et mis en hypoxie suivant la même procédure que celle de la section 2.4.1. La prise de mesure se fait à l'aide d'un oxygénomètre connecté à une sonde de température et une fibre optique placée directement sous le capteur (PreSens Precision Sensing GmbH, Allemagne) (voir Figure 2.9). En bref, selon le fabricant, la fibre optique excite les substances luminescentes du capteur qui perdent ensuite leur énergie lors de la collision avec des molécules d'oxygène. Une grande concentration d'oxygène résulte donc en une diminution plus importante du signal luminescent envoyé à l'oxygénomètre et la concentration d' O_2 est déterminée selon ce signal (PreSens, s.d.). Afin de réduire les risques de contamination bactérienne, le sac de thermoscellage est ouvert après le dernier time point du jour 0 (soit 0₃) et le PBS des puits est remplacé afin de retirer une partie du milieu ayant servi dans la préparation des hydrogels et s'étant diffusé dans le PBS. Les plaques sont remises en hypoxie et le sac n'est plus réouvert par la suite. Tout au long de l'expérience, la plaque n'est pas retirée du sac de thermoscellage lors de la prise de mesure, puisqu'il est transparent. Des mesures sont prises avant (jour 0₁) et après (jour 0₂) la gélification, 3 heures plus tard (jour 0₃) et à tous les jours jusqu'au jour 7 inclusivement. Les mesures d' H_2O_2 et d' O_2 ne sont pas effectuées sur les mêmes puits. L'unité de mesure pour l'oxygène est le % afin d'être cohérent avec les valeurs d' O_2 rapportées en physiologie qui ne sont pas exprimées en unité de pression (McKeown, 2014).

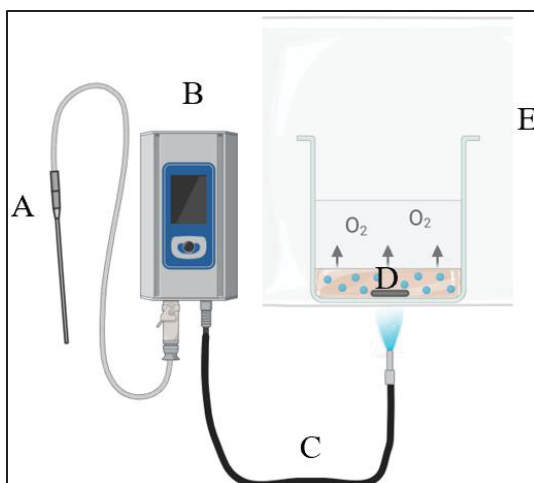


Figure 2.9 Mesure de l'oxygène relargué par les hydrogels encapsulant des particules de CaO₂ en hypoxie à l'aide de l'oxygénomètre et de la fibre optique. A : sonde de température, B : oxygénomètre, C : fibre optique, D : capteur d'oxygène et E : gel en hypoxie

Créé avec BioRender.com

2.5 Caractérisation des particules de CaO₂ recouvertes de phosphate de calcium

L'effet de chaque paramètre modifié sur la morphologie et la composition des particules a été caractérisé (Figure 2.10) après le séchage *overnight* (Figure 2.6 H et I). La morphologie du recouvrement a été imagée à l'aide du microscope électronique à balayage (MEB) et l'analyse chimique des particules a été effectuée à l'aide de la spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (EDX), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et la diffraction des rayons X (XRD). Des mesures de pH après l'ajout de CaO₂ ont été effectuées à différents moments lors de la préparation des gels (à cause du relargage de Ca(OH)₂) et les propriétés des gels avec particules (et catalase) ont été caractérisées par rhéologie.

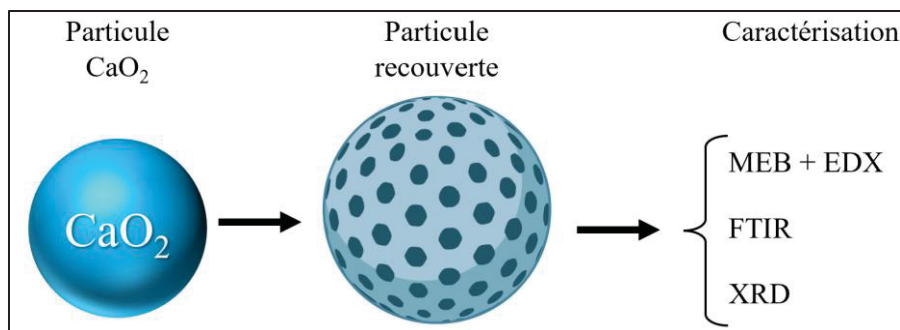


Figure 2.10 Techniques de caractérisation des particules après recouvrement

Créé avec BioRender.com

2.5.1 Microscopie électronique à balayage

MEB de table : Une fine couche de particules est déposée sur un adhésif double-face de carbone monté sur un porte-échantillon. L'échantillon est ensuite recouvert d'une couche d'or de 20 nm par pulvérisation (30 mA pendant 2 min, Sputter Coating Quorum K550X, Royaume-Uni). Tous les échantillons sont imagés et analysés chimiquement par EDX avec le MEB de table (Hitachi High-Tech TM3000, Japon) à 15 kV. L'analyse EDX se fait avec Esprit Compact v.2.3 et Esprit v.2.6 (Bruker, États-Unis). Les analyses chimiques se font soit par points ou par cartographie. Le TM3000 ne comprend pas de détecteur à électrons secondaires donc les images sont celles des électrons rétrodiffusés. Les échantillons suivants sont considérés : CPO, CPO_ctrl, CPO_4, CPO_50, CPO_1min, CPO_5min, CPO_pH5, CPO_pH11, CPO_CaP1,67 et CPO_dRT.

MEB haute résolution : Certains échantillons sont analysés avec le MEB SU8200 (Hitachi High-Tech, Japon). La même préparation pour les échantillons que pour le MEB de table est utilisée, mais un recouvrement de platine de 4 nm est plutôt choisi (30 mA, 4 min, Sputter Coating Quorum Q150T, Royaume-Uni). L'acquisition se fait à 0,5 kV (pour limiter le chargement de l'échantillon) et les images sont celles des électrons secondaires. Les échantillons suivants sont considérés : CPO, CPO_ctrl, CPO_1min, CPO_1min séché à température pièce.

2.5.2 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier

Un échantillon de ~ 1 mg de particules est mélangé avec 150 mg de poudre de bromure de potassium (KBr) qualité FTIR (Sigma-Aldrich, Chine). Le mélange est broyé finement et chargé dans une presse hydraulique afin de former des pastilles qui seront installées dans le FTIR en transmission (Spectrum Two, PerkinElmer, États-Unis). Les spectres sont collectés entre 400 et 4000 cm^{-1} et une pastille de KBr est utilisée pour définir le *background*. Pour le traitement des données (PerkinElmer Spectrum IR v.10.6.2, PerkinElmer, États-Unis), la ligne de *background* des échantillons est d'abord ajustée manuellement et, si possible, le spectre est normalisé avec son pic le plus intense. Pour les échantillons comprenant du phosphate de calcium, le pic à 1044 cm^{-1} est utilisé tandis que pour le CaO_2 commercial, le pic à 1482 cm^{-1} est choisi. Les échantillons considérés sont CPO, CPO_ctrl, HAp, CPO_4, CPO_50, CPO_1min à CPO_120 min, CPO_pH5, CPO_pH11, CPO_CaP1, CPO_CaP1,67 et CPO_CaP2.

2.5.3 Diffraction des rayons X

Les échantillons de ~ 50 mg sont chargés dans la cavité du porte-échantillon (cristal de silicium avec zéro diffraction) qui est ensuite installé dans le diffractomètre à rayons X (XRDynamic 500, Anton Paar, Autriche). L'analyse se fait entre 20° et 70° par pas de $0,01^\circ$ avec une source de cuivre (Cu) $K\alpha$. L'analyse des spectres se fait dans HighScore Plus version 4.6a (PANalytical, Pays-Bas) et la base de données utilisée est la PDF-5+ 2025 (ICDD, États-Unis). Les échantillons considérés sont CPO, CPO_1min, CPO_5min et CPO_ctrl.

2.5.4 Effet des particules sur le pH des solutions et hydrogels

L'effet de la présence de CPO ou de CPO_ctrl sur le pH de l'agent gélifiant, de la solution d'hydrogel et du PBS recouvrant les hydrogels (Figure 2.11) est évalué à l'aide du pH-mètre portatif LAQUAtwin (Horiba, Japon). **Pour l'agent gélifiant** : les mesures de pH sont prises à chaque minute pendant 10 min en déposant environ $0,5 - 1\text{ mL}$ de solution dans le pH-mètre et en agitant légèrement entre les mesures. La concentration de particules dans l'agent gélifiant

est la même que lors de la préparation des gels. Les échantillons considérés sont : agent gélifiant, agent gélifiant + CPO et agent gélifiant + CPO_ctrl. Des triplicatas sont mesurés pour chaque échantillon. **Pour la solution d'hydrogel** : la même procédure est utilisée en considérant cette fois la solution d'hydrogel avant qu'elle ne gélifie (Figure 2.1 E). Les mesures sont faites à température pièce. **Pour le PBS** : des hydrogels contrôles ou encapsulant du CPO ou CPO_ctrl sont préparés et le pH du PBS qui les recouvre est mesuré aux jours 0 (3 heures après la préparation), 3, 5 et 7 (correspondant aux changements de milieu des expériences cellulaires). Le PBS est changé après chaque *time point* et les gels sont maintenus à 37°C en hypoxie.

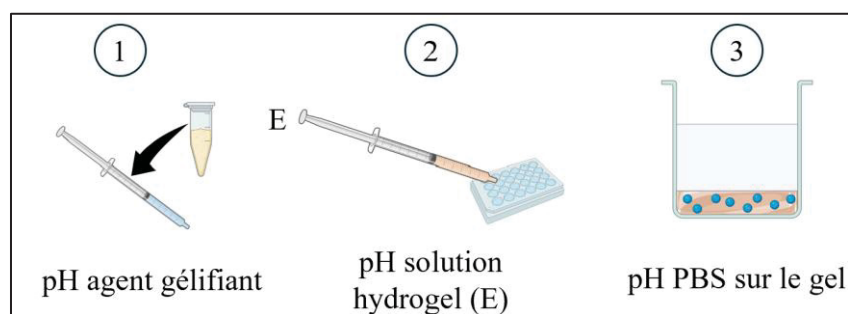


Figure 2.11 pH de l'agent gélifiant (1), de la solution d'hydrogel (2) et du PBS (3) en présence du CaO_2

Créé avec BioRender.com

2.5.5 Rhéologie

La cinétique de gélification et les propriétés mécaniques des hydrogels thermogélifiants, avec ou sans particules et avec ou sans catalase sont étudiées à l'aide du rhéomètre MCR 302e (Anton Paar, Autriche) en utilisant la géométrie plan/plan de 25 mm de diamètre (Anton Paar, Autriche). Un test de balayage en temps pendant 45 min à 37°C (fréquence 1 Hz, 1% déformation) est effectué où l'échantillon est d'abord « réinitialisé » pendant 2 min à 22°C avant d'augmenter la température à 37°C en 30 sec. Les modules de perte (G'') et de stockage (G') sont déterminés et de l'huile minérale est employée pour éviter que l'échantillon ne s'évapore durant les tests. Les contrôles/échantillons suivants ont été considérés : Gel sans et avec catalase (_cat), CPO sans ou avec catalase, CPO_ctrl sans ou avec catalase. La

concentration des particules dans les gels est de 10 mg/mL et la concentration de catalase est la même que celle de la section 2.3.3.

2.6 Statistiques

Dans ce rapport les données sont d'abord analysées par two-way ANOVA si les conditions de variances égales et de résidus distribués normalement sont respectées. Dans le cas contraire, un aligned rank transform (ART) ANOVA est effectué (le nombre de valeurs aberrantes dans les données ne doit pas dépasser 10%). Si des interactions sont détectées entre les deux facteurs, l'analyse est divisée en one-way ANOVA (version non paramétrique : Kruskal-Wallis ou Friedman (pour les mesures répétées)) ou en Student's T-tests (version non paramétrique : Mann-Whitney) en considérant un facteur à la fois. Le Tableau-A III-1, ANNEXE III détaille les différents tests statistiques effectués. Les analyses statistiques ont été effectuées sur R v.4.5.2 (R Core Team, 2025) et RStudio v.2025.9.2.418 (Posit Team, 2025) en utilisant les extensions du Tableau 2.2. Il est à noter que le nombre d'échantillons (n) (indiqué dans la légende des graphiques des résultats) demeure faible et que les statistiques effectuées aident à comprendre et interpréter les données obtenues mais pour pouvoir généraliser les résultats, des tests supplémentaires sont requis. $0,05 \geq p > 0,01$: *, $0,01 \geq p > 0,001$: ** et $0,001 \geq p$: ***.

Tableau 2.2 Extensions utilisées dans R et RStudio

Extension	Version	Références
tidyverse	2.0.0	(Wickham et al., 2019)
car	3.1.3	(Fox & Weisberg, 2019)
e1071	1.7.16	(Meyer, Dimitriadou, Hornik, Weingessel, & Leisch, 2024)
sur	1.0.4	(Harel, 2020)
sasLM	0.10.7	(Bae, 2025)
qqplotr	0.0.7	(Almeida, Loy, & Hofmann, 2018)
rstatix	0.7.3	(Kassambara, 2025)
ARTool	0.11.2	(Kay, Elkin, Higgins, & Wobbrock, 2025)
emmeans	2.0.0	(Lenth & Piaskowski, 2025)
lme4	1.1.38	(Bates, Maechler, Bolker, & Walker, 2015)
PMCMRplus	1.9.12	(Pohlert, 2024)
ggbreak	0.1.6	(Xu et al., 2021)
reporter	1.4.5	(Bosak & Huang, 2025)
patchwork	1.3.2	(Pedersen, 2025)

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

Le CHAPITRE 3 se divise en deux parties suivant les deux objectifs principaux de ce projet. La première partie présente les effets du stress hypoxique sur la réponse des cellules immunitaires. La seconde partie se concentre entre autres sur l'optimisation du processus de recouvrement du peroxyde de calcium (CaO_2).

3.1 Objectif 1 : Caractérisation du comportement des cellules immunitaires en hypoxie

Les cellules étudiées sont les cellules Jurkat et les lymphocytes T murins (OT-I). Les cellules mononuclées de sang périphérique (PBMCs) (sans isolation des cellules T) ont également été considérées. La viabilité et l'activité métabolique ont été déterminées pour chacune de ces lignées soumises au stress hypoxique. Dans le cas des Jurkat, l'effet de l'hypoxie en milieu riche et faible en sérum a été comparé. Pour les OT-I, l'effet de l'hypoxie sur l'activation, la prolifération et l'épuisement a été évalué par cytométrie de flux.

3.1.1 Marquage des cellules cultivées dans la chambre hypoxique

La méthode de marquage des cellules hypoxiques avec l'HypoxiTRAKTM a été mise au point. Ce marqueur a été utilisé afin de vérifier l'état hypoxique des cellules Jurkat encapsulées ou non dans des gels et cultivées pendant 7 jours dans la cloche à hypoxie. Il a permis de confirmer que les cellules normoxiques contrôles demeurent normoxiques tout au long de l'expérience et que les cellules hypoxiques sont bien hypoxiques puisque l'intensité du signal augmente avec le temps (cumulatif des expériences hypoxiques) durant les 7 jours en culture, et ce, dès le jour 1. La cloche à hypoxie semble donc conférer un environnement hypoxique adéquat aux cellules. Pour plus de détails sur l'analyse et les images obtenues, voir l'ANNEXE IV.

3.1.2 Cellules Jurkat : effet de la culture hypoxique en milieu faible en sérum sur la viabilité et l'activité métabolique

L'effet de l'hypoxie, combinée ou non à une faible concentration de nutriments, a été vérifié sur les cellules Jurkat. Les résultats d'activité métabolique (Figure 3.1) et de viabilité (Figure 3.2) des Jurkat encapsulées sont présentés ci-dessous. Les résultats d'activité métabolique (Figure-A V-1) et de viabilité (Figure-A V-2) des cellules Jurkat **non encapsulées** contrôles se trouvent dans l'ANNEXE V.

Il est à noter que toutes les analyses *live/dead* dans ce travail sont qualitatives et approximatives puisque les cellules T sont non adhérentes et peuvent former des agrégats en 3D ce qui complique leur quantification. Les images sélectionnées se veulent le plus représentatives possible de l'ensemble des images prises dans les différents réplicas. Pour les Jurkat, le même *background* est utilisé pour les images des cellules seules contrôles mais il a dû être ajusté pour chaque image dans le cas des cellules encapsulées puisque les gels contenant un grand nombre de cellules (soit aux jours 11 et 14) présentent un signal *live/dead* très faible qui serait majoritairement perdu si le même *background* était employé. Toutefois, les mêmes temps d'exposition et intensité de la lampe ont été utilisés pour toutes les images. Les images de la Figure 3.2 sont prises approximativement au centre des puits où le gel est le plus mince afin de pouvoir bien distinguer les cellules. Dans le cas des cellules contrôles de la Figure-A V-2, il est possible que les cellules mortes aient été retirées des puits lors des changements de milieu ce qui influence le nombre total de cellules observées et le ratio cellules vivantes et mortes (ce qui est également vrai pour les autres types cellulaires). Les essais d'activité métabolique et *live/dead* pour toutes les lignées cellulaires de ce projet ont été effectués deux fois ($N = 2$) et la tendance observée était similaire entre ces deux expériences mais la valeur des données de fluorescence pour les tests métaboliques n'était pas dans le même ordre de grandeur à cause d'un changement d'équipement. Ainsi seules les données d'une des expériences sont présentées.

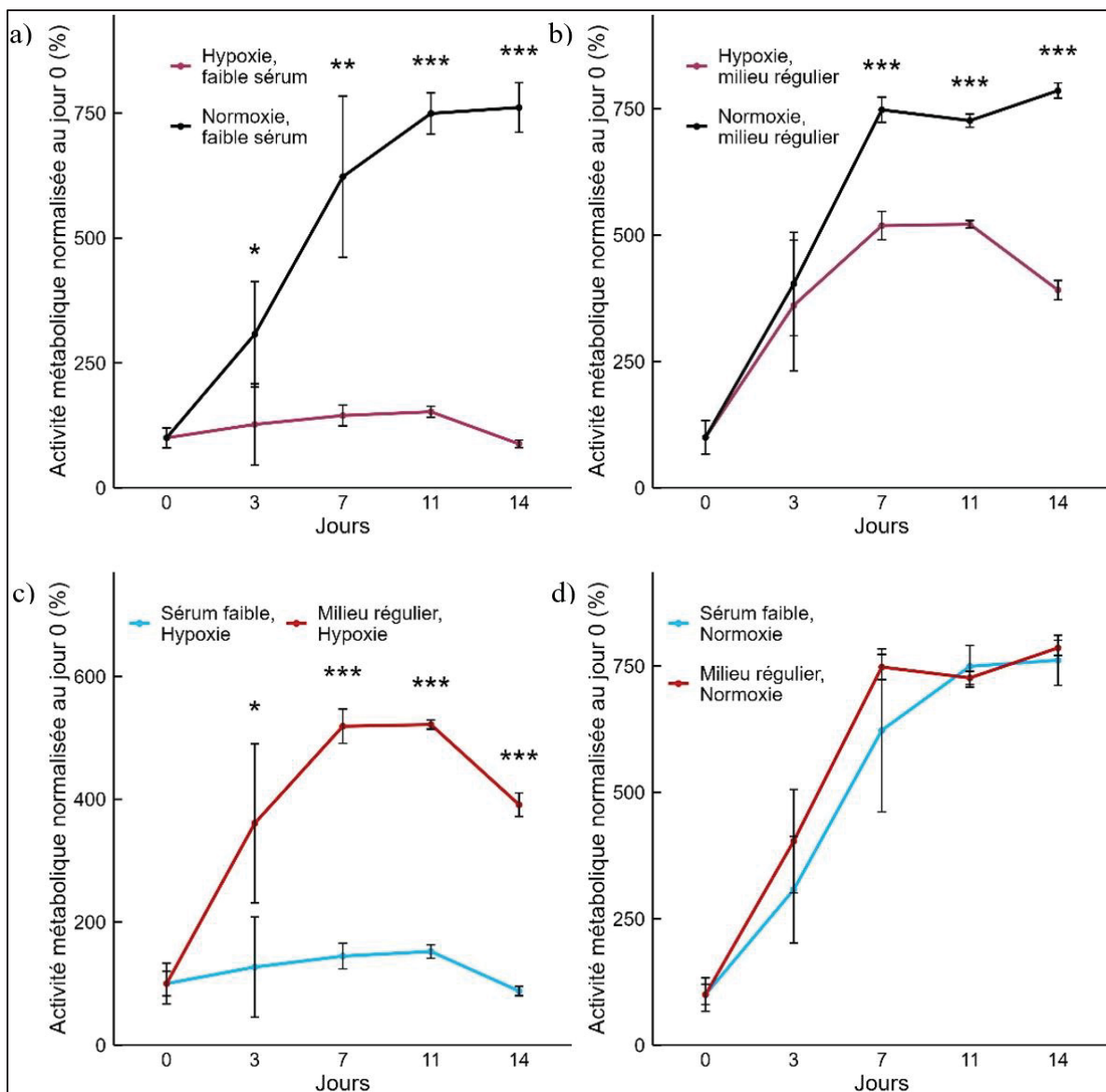


Figure 3.1 Activité métabolique des cellules Jurkat encapsulées dans des hydrogels sur 14 jours en fonction du milieu (faible en sérum (1%) ou régulier (10%)) et de la concentration en oxygène (hypoxie (< 1 % O₂) ou normoxie). Effet de l'hypoxie en milieu pauvre en sérum (a) ou en milieu régulier (b). Effet du milieu en hypoxie (c) ou normoxie (d). Milieu changé à chaque 2 – 3 jours. *, **, *** p < 0,05, 0,01, 0,001 respectivement. a, b et c : Student's T-test à chaque *time point* et d : aligned rank transform (ART) ANOVA et contrastes. N=2, n=8

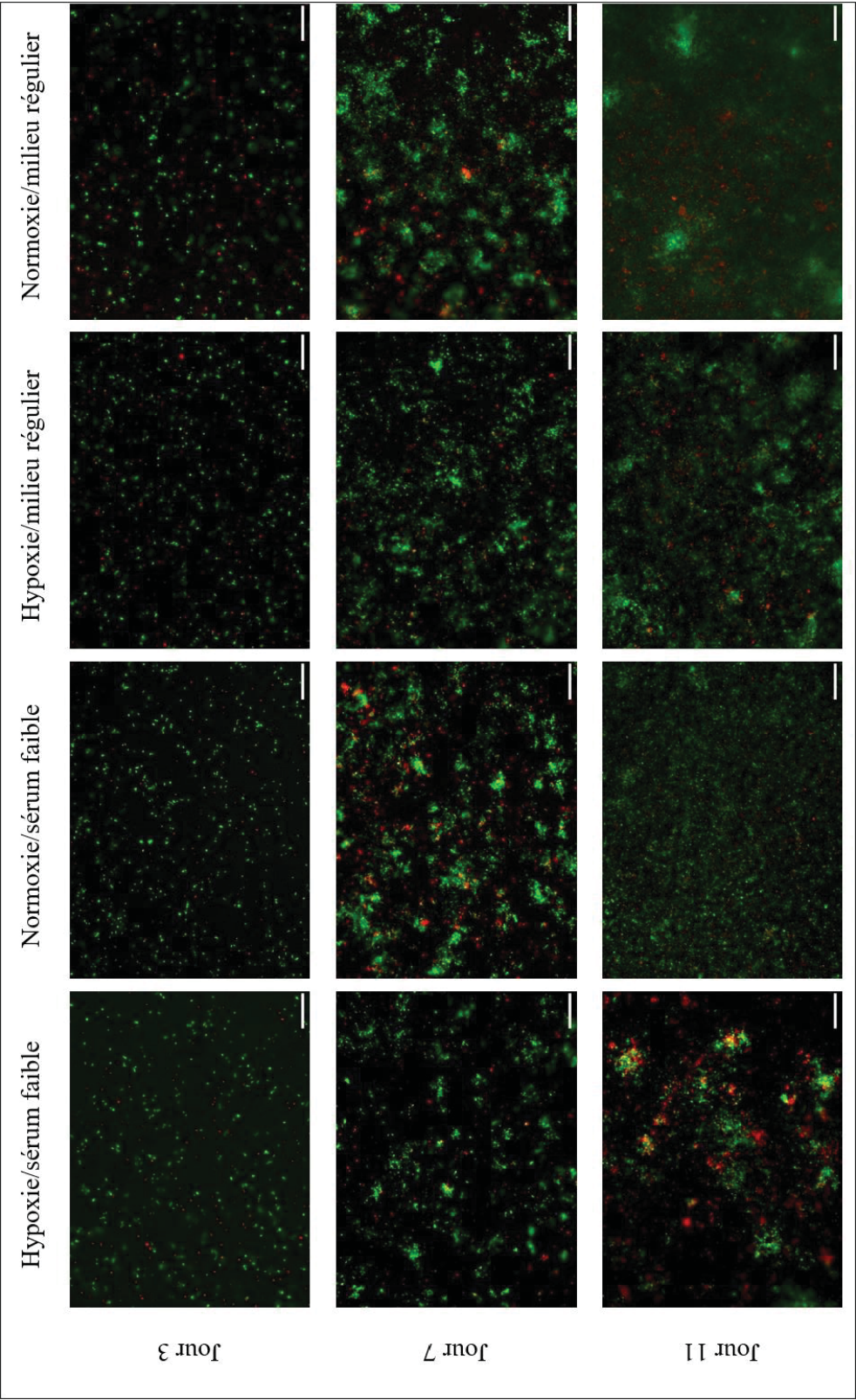


Figure 3.2 : Essais *live/dead* des cellules Jurkat encapsulées dans des hydrogels sur 14 jours en hypoxie ou normoxie, dans du milieu faible en sérum ou régulier (données des jours 0 et 14 non présentées, vert = cellules vivantes et rouge = cellules mortes). Milieu changé à chaque 2 – 3 jours. Échelle : 200 μm . N=2, n=4

Effet de l'hypoxie

i) En milieu contenant peu de nutriments (sérum 1%) : La courbe d'activité métabolique en condition normoxique est significativement supérieure à celle hypoxique dès le jour 3 (Figure 3.1a). En normoxie, l'activité augmente fortement jusqu'au jour 11, ce qui suggère une importante prolifération cellulaire et/ou activité, avant de se stabiliser. En hypoxie, seule une faible augmentation jusqu'au jour 11 est observée. Les images des essais *live/dead* (Figure 3.2 sérum faible) confirment une plus faible prolifération cellulaire en hypoxie ainsi qu'une mortalité supérieure, en particulier à partir du jour 11. Malgré certaines différences, des résultats similaires sont obtenus sur les cellules non encapsulées contrôles (voir ANNEXE V) : les tendances des courbes d'activité métabolique ressemblent à celles des cellules encapsulées. Les cellules en hypoxie voient leur viabilité diminuer avec le temps avec approximativement 50% de cellules mortes au jour 14. Pour les cellules en normoxie, une intense prolifération entre les jours 3 et 7 ainsi que 7 et 11 est observée (cellules empilées et signal diffus, image du jour 11 à côté de cet amas diffus) ainsi qu'une bonne viabilité jusqu'au jour 14. En résumé, l'hypoxie semble diminuer la prolifération, la viabilité et/ou l'activité métabolique.

ii) En milieu régulier (sérum 10%) : Les deux courbes d'activité métabolique (Figure 3.1b) se distancient à partir du jour 7 où la courbe hypoxique devient significativement inférieure à celle normoxique ce qui pourrait témoigner d'une baisse/ralentissement dans la prolifération en hypoxie. Dans les deux cas, les courbes augmentent jusqu'au jour 7 avant de se stabiliser puis de redescendre en condition hypoxique. Les résultats *live/dead* (Figure 3.2 milieu régulier) sont majoritairement en accord avec les essais métaboliques montrant une similarité dans le nombre de cellules et la viabilité entre les conditions hypoxiques et normoxiques au jour 3 et une viabilité similaire avec toutefois moins de cellules en hypoxie au jour 7. Le passage du jour 7 à 11 est marqué par une importante prolifération dans le cas normoxique dont le signal devient diffus à cause du grand nombre de cellules. Au jour 14, la fraction de cellules mortes est importante dans les deux conditions. Malgré certaines différences, les cellules non encapsulées contrôles suggèrent des conclusions semblables à celles avec les hydrogels. En résumé, les conditions hypoxiques semblent ralentir la prolifération des cellules mais les effets sont moins importants qu'avec le sérum 1%.

Effet de la concentration de sérum dans le milieu

Les mêmes données ont été analysées en comparant cette fois les résultats en milieu pauvre et riche en sérum. **En hypoxie**, la concentration en sérum influence fortement l'activité métabolique (Figure 3.1c) tandis qu'aucune différence n'est observée **en normoxie** (Figure 3.1d). Les essais *live/dead* (Figure 3.2) suggèrent que le sérum 10% (milieu régulier) augmente la prolifération et la viabilité en hypoxie. En normoxie, une importante prolifération est constatée dans les deux cas, bien qu'elle soit légèrement ralentie avec 1% sérum surtout à partir du jour 11. Malgré certaines différences, les cellules seules contrôles supportent des conclusions semblables. En résumé, une diminution du sérum dans le milieu de culture réduit la prolifération et la viabilité en hypoxie.

3.1.3 Cellules PBMCs : effet du stress hypoxique sur la viabilité et l'activité métabolique

Des essais *live/dead* et d'activité métabolique ont également été effectués avec des PBMCs. Les résultats obtenus se trouvent dans l'ANNEXE VI. Puisque la viabilité et l'activité métabolique des cellules se sont révélées être très faibles en hypoxie et en normoxie, il n'est pas possible de voir si l'hypoxie a un effet sur la réponse cellulaire. Ce modèle ne peut donc pas être considéré comme modèle cellulaire potentiel pour tester les futures matrices riches en oxygène dans ce mémoire.

3.1.4 Cellules OT-I : effet du stress hypoxique sur la viabilité, l'activité métabolique, la prolifération, l'activation et l'épuisement

Les résultats d'activité métabolique (Figure 3.3) et de viabilité (Figure 3.4) des cellules OT-I encapsulées sont présentés ci-dessous. Les résultats de viabilité (Figure-A VII-1) des cellules OT-I **non encapsulées** contrôles se trouvent dans l'ANNEXE VII. Il est à noter que le *background* et les conditions d'imagerie du *live/dead* ont dû être ajustés pour chaque image puisque l'intensité du signal émis par les cellules était très faible et les images présentées sont prises au centre des puits. Seul du milieu avec 10 % sérum a été utilisé.

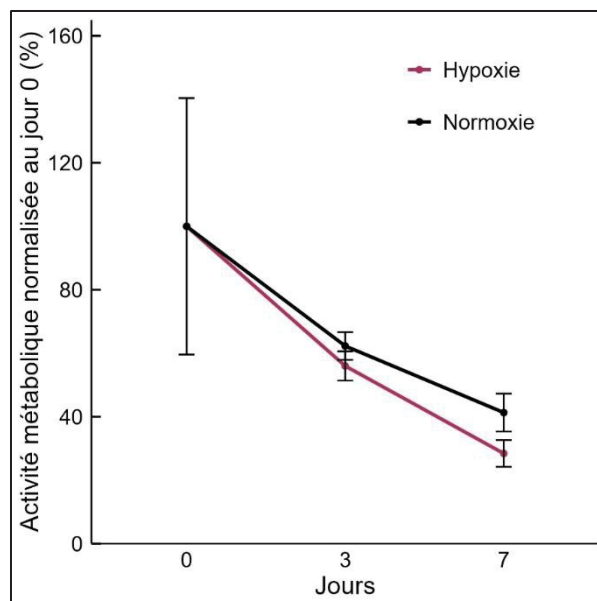


Figure 3.3 Activité métabolique des cellules OT-I encapsulées dans des hydrogels sur 7 jours en hypoxie ou normoxie. Milieu régulier changé à chaque 2 – 3 jours. ART ANOVA et contrastes. N=2, n=6

L'analyse de l'activité métabolique des OT-I montre que, contrairement aux Jurkat, cette dernière diminue avec le temps à la fois en normoxie et en hypoxie (Figure 3.3). Bien que la baisse en hypoxie semble plus marquée, aucune différence significative n'a été obtenue entre les deux conditions d'oxygène. Cette diminution en fonction du temps suggère une baisse potentielle dans l'activité cellulaire, la prolifération et/ou une augmentation de la mort cellulaire. L'importante déviation standard au jour 0 serait causée par une distribution non homogène des cellules entre les puits malgré les nombreux mélanges avec les seringues lors de la préparation des gels. Le nombre de mélanges pourrait être augmenté pour réduire ces déviations mais la viabilité des cellules risque alors d'être affectée négativement. Une évaluation visuelle du *live/dead* ne suggère aucune augmentation claire du nombre de cellules entre les jours 3 et 7 ni de différence importante entre les conditions hypoxiques et normoxiques (Figure 3.4). On observe une fraction faible de cellules mortes mais ces images peuvent être trompeuses puisqu'elles ont été prises dans la partie très mince des gels au centre des puits (il est possible que les cellules mortes aient été retirées lors des changements de milieu). En effet, une fraction importante de cellules mortes est observée dans la partie

périphérique plus épaisse des gels dans les deux conditions (données non présentées) et cette fraction augmente entre les jours 3 et 7, ce qui pourrait supporter la baisse d'activité observée. Les images des cellules non encapsulées contrôles ne montrent aucune différence claire entre l'hypoxie et la normoxie, mais une diminution importante du nombre de cellules est observée entre les jours 3 et 7 alors que la fraction de cellules mortes augmente. En résumé, aucun effet clair de l'hypoxie peut être identifié avec les essais *live/dead* et d'activité métabolique.

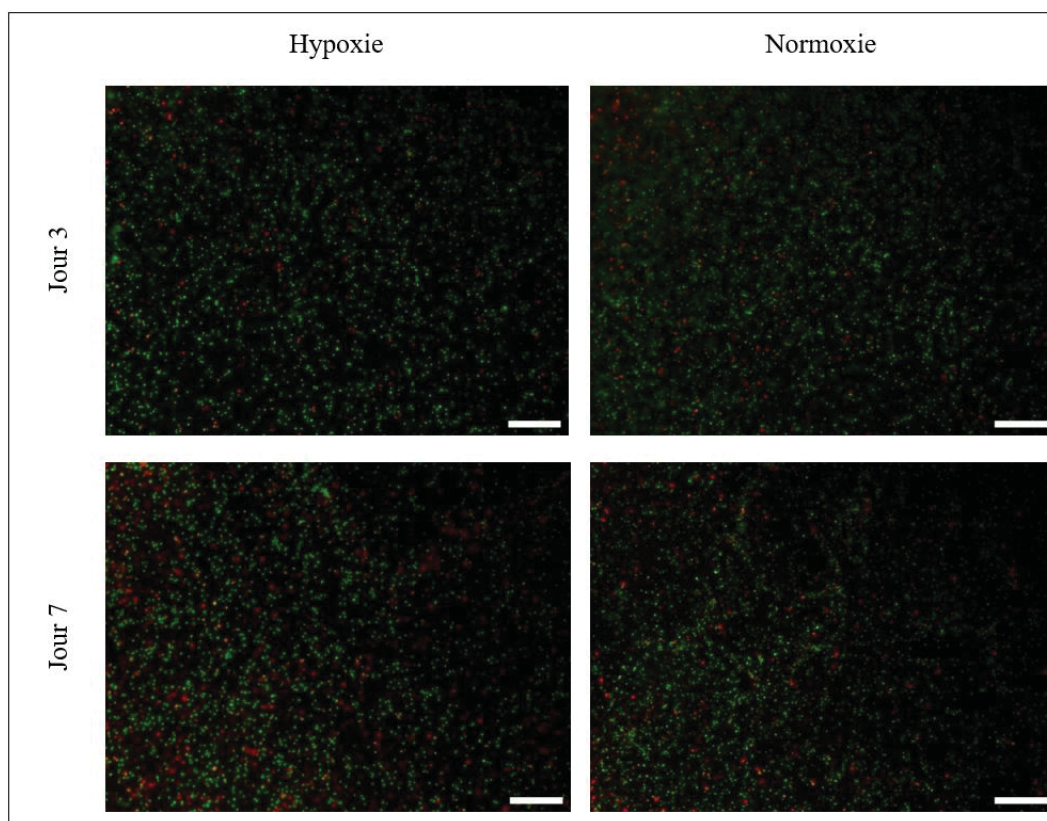


Figure 3.4 : Essais *live/dead* des cellules OT-I encapsulées dans des hydrogels sur 7 jours en hypoxie ou normoxie (données du jour 0 non présentées, vert = cellules vivantes et rouge = cellules mortes). Milieu régulier changé à chaque 2 – 3 jours. Échelle : 200 μm . N=2, n=4

Pour cette raison, des analyses plus poussées de cytométrie de flux ont été effectuées afin de vérifier l'effet de l'hypoxie sur la prolifération, l'activation/phénotype et l'épuisement des cellules OT-I. Les analyses présentées sont effectuées sur des lymphocytes T CD8⁺ (cellules seules isolées) vivants pour les cellules non encapsulées mais vivants+morts pour celles encapsulées. Étant donné la faible taille des populations de cellules récupérées (surtout pour les gels au jour 7) et l'absence de répétitions (n=1 et N=1), cette étude de cytométrie est **préliminaire et qualitative** et ne permet pas de conclure avec certitude sur les effets observés. Les tests effectués ici visent surtout à montrer la méthode et l'analyse qui pourraient être effectuées à l'avenir.

Prolifération (Figure 3.5)

i) Cellules non encapsulées (cellules vivantes seulement): Les histogrammes et les mesures arrondies d'intensité moyenne de fluorescence (MFI) indiquent des intensités de carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) plus faibles en normoxie aux jours 3 et 7 (Figure 3.5 première rangée), ce qui implique un nombre de divisions cellulaires plus important (voir section 2.2.4 pour des explications sur le fonctionnement du CFSE). Le logiciel FlowJo permet de déterminer le nombre de cycles de réplication à partir des histogrammes présentés dans la Figure 3.5. Les cellules cultivées en hypoxie peuvent effectuer jusqu'à 3 cycles cellulaires en 7 jours contre 5 cycles en normoxie (données non présentées). Entre les jours 0 et 3, jusqu'à 2 cycles en hypoxie sont réalisés contre 4 cycles en normoxie. Ainsi, l'hypoxie et le temps semblent ralentir la prolifération des OT-I. Il est important de noter que les MFIs ne peuvent être comparées entre les différents jours à cause des variations des paramètres du cytomètre entre les *time points*, et cette remarque est valide pour tous les marqueurs utilisés dans ce projet et rapportés dans cette section.

ii) Cellules encapsulées (cellules vivantes+mortes) : Des conclusions semblables à celles des cellules non encapsulées peuvent être tirées dans l'ensemble (Figure 3.5 deuxième rangée). De plus, les cellules encapsulées ont effectué, en 3 jours, jusqu'à 3 cycles cellulaires en hypoxie contre 6 cycles en normoxie et ces valeurs sont toujours les mêmes au jour 7. La destruction mécanique du gel pour la libération des cellules encapsulées mène à la présence de débris de

gel dans les échantillons analysés (même après filtration). Ces débris autofluorescents génèrent un bruit de fond important, compliquent la compensation et l'identification de la population cible (lymphocytes), engendrent des pics plus larges dans les histogrammes et pourraient potentiellement se coller aux cellules ce qui augmenterait le signal de fluorescence. Pour cette raison, l'intensité des signaux des cellules non encapsulées ne peuvent pas être comparés à celle des cellules encapsulées ce qui est valide pour tous les autres marqueurs également. **En résumé :** l'hypoxie semble diminuer la prolifération pour les cellules, qu'elles soient encapsulées ou non.

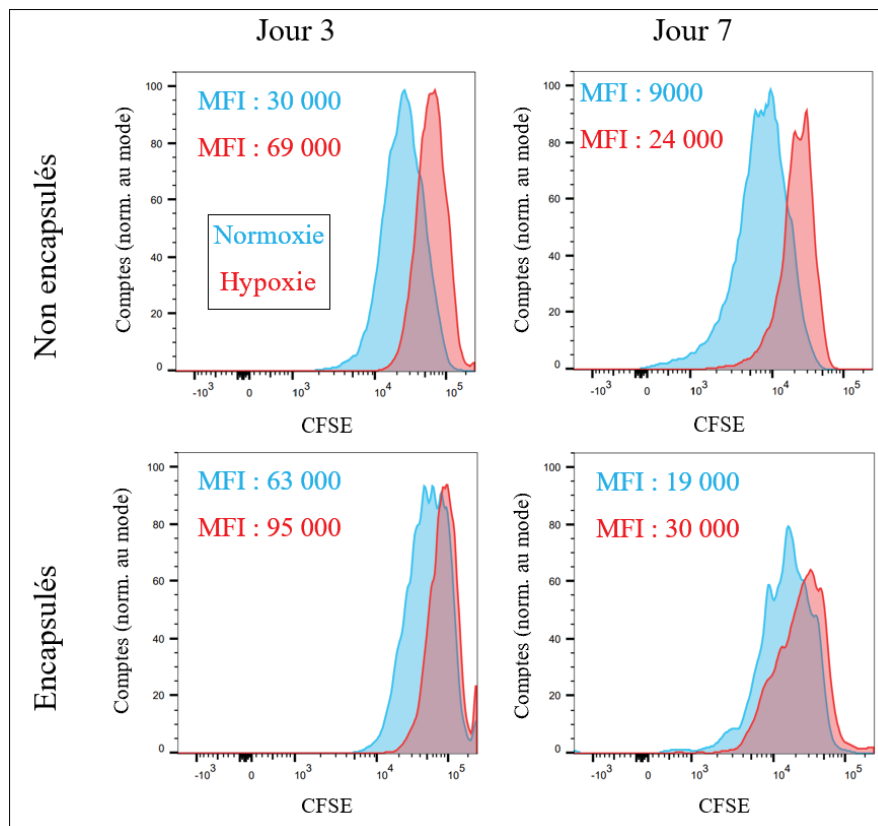


Figure 3.5 Signal CFSE des OT-I non encapsulés (vivants) et encapsulés (vivants+morts) en hypoxie (rouge) et en normoxie (bleu) aux jours 3 et 7 (prolifération). N=1, n=1

Activation/phénotype (Figure 3.6)

i) Cellules non encapsulées (cellules vivantes seulement) : Les 48 heures de stimulation avec l'anti-CD3 et l'anti-CD28 (+ interleukines) suivies des 24 heures avec interleukines engendrent principalement une population de cellules T mémoire centrale ($CD44^{hi}/CD62L^{hi}$)

(Kim et al., 2015)) ainsi qu'une population plus modeste de cellules T à caractère effecteur (CD44^{hi}/CD62L^{lo} (Kim et al., 2015)) au jour 0 (données non présentées). Une expression du CD25 (marqueur d'activation tardif (Reddy, Eirikis, Davis, Davis, & Prabhakar, 2004)) semble également être observée dès le jour 0 (données non présentées). Les 7 jours de cultures en hypoxie avec interleukines suivant la stimulation révèlent une légère augmentation du CD25 par rapport aux conditions normoxiques, et ce, dès le jour 3 (Figure 3.6 première rangée du CD25). De plus, l'hypoxie semble engendrer une fraction plus importante de cellules T mémoire centrale mais pas nécessairement de cellules T à caractère effecteur (Figure 3.6 première rangée du CD62L vs CD44). Cependant, ces différences sont faibles et il est impossible de conclure à ce stade étant donné le nombre de réplicas et de cellules récupérées.

ii) Cellules encapsulées (cellules vivantes + mortes) : Des observations semblables sont obtenues avec toutefois quelques différences. Entre autres, la différence entre l'expression du CD25 en hypoxie et en normoxie est plus faible et les données du jour 7 sont soumises à des variations à cause du faible nombre de cellules (Figure 3.6 deuxième rangée du CD25). De plus, une légère augmentation de la fraction de cellules à caractère effecteur semble se produire en hypoxie (Figure 3.6 deuxième rangée du CD62L vs CD44), mais le nombre d'évènements au jour 7 est trop faible pour conclure avec certitude. Toutefois, une partie importante des cellules mémoire centrale des jours 3 et 7 sont mortes et les cellules effectrices proviennent de la fraction vivante. **En résumé :** l'hypoxie diminuerait la prolifération, augmenterait l'expression du CD25 (moins évident pour les cellules encapsulées) et favoriserait le phénotype mémoire centrale (et potentiellement effecteur pour les cellules encapsulées).

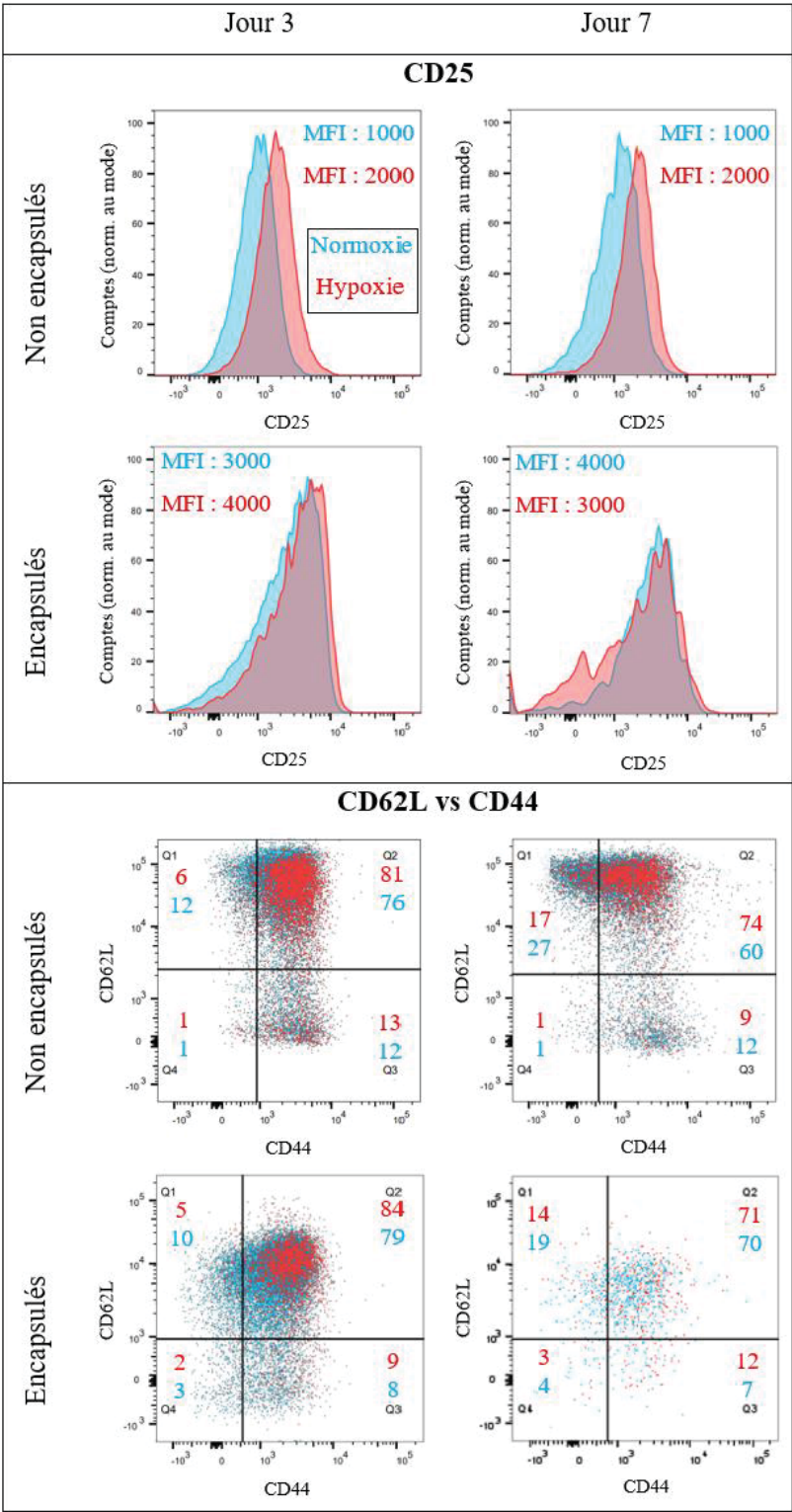


Figure 3.6 Expression du CD25 et du CD44/CD62L des OT-I non encapsulés (vivants) et encapsulés (vivants+morts) en hypoxie (rouge) et en normoxie (bleu) aux jours 3 et 7 (activation/phénotype). N=1, n=1

Épuisement (Figure 3.7)

i) Cellules non encapsulées (cellules vivantes) : Les trois marqueurs d'épuisement semblent être exprimés dès le jour 0 (données non présentées). En comparant les MFIs en conditions hypoxiques et normoxiques aux jours 3 et 7, l'hypoxie semble augmenter l'expression du LAG-3, mais l'augmentation qu'elle engendre sur TIM-3 et PD-1 n'est que minime (Figure 3.7 première rangée pour chaque marqueur).

ii) Cellules encapsulées (cellules vivantes+mortes): Au jour 3, l'effet de l'hypoxie est absent pour le LAG-3 et minime pour TIM-3 et PD-1 (Figure 3.7 deuxième rangée pour chaque marqueur). Au jour 7, le faible nombre de cellules, le signal du gel et les modifications aux voltages ont généré des graphiques avec beaucoup de perturbations qui compliquent l'analyse et qui peuvent difficilement être utilisés. **En résumé :** l'hypoxie semble augmenter légèrement l'épuisement.

Pour résumer, l'hypoxie semble diminuer la prolifération, favoriser le phénotype mémoire centrale et potentiellement, dans le cas des cellules encapsulées, le phénotype effecteur ainsi qu'augmenter l'expression du CD25. Ces effets sont toutefois minimes dans certains cas. L'hypoxie semble également engendrer une très légère augmentation de l'expression du TIM-3 et du PD-1 ainsi qu'une augmentation du LAG-3 dans le cas des cellules non encapsulées. Ces conclusions restent toutefois à confirmer avec des expériences additionnelles en particulier pour les cellules encapsulées au jour 7 où la population était trop faible pour conclure.

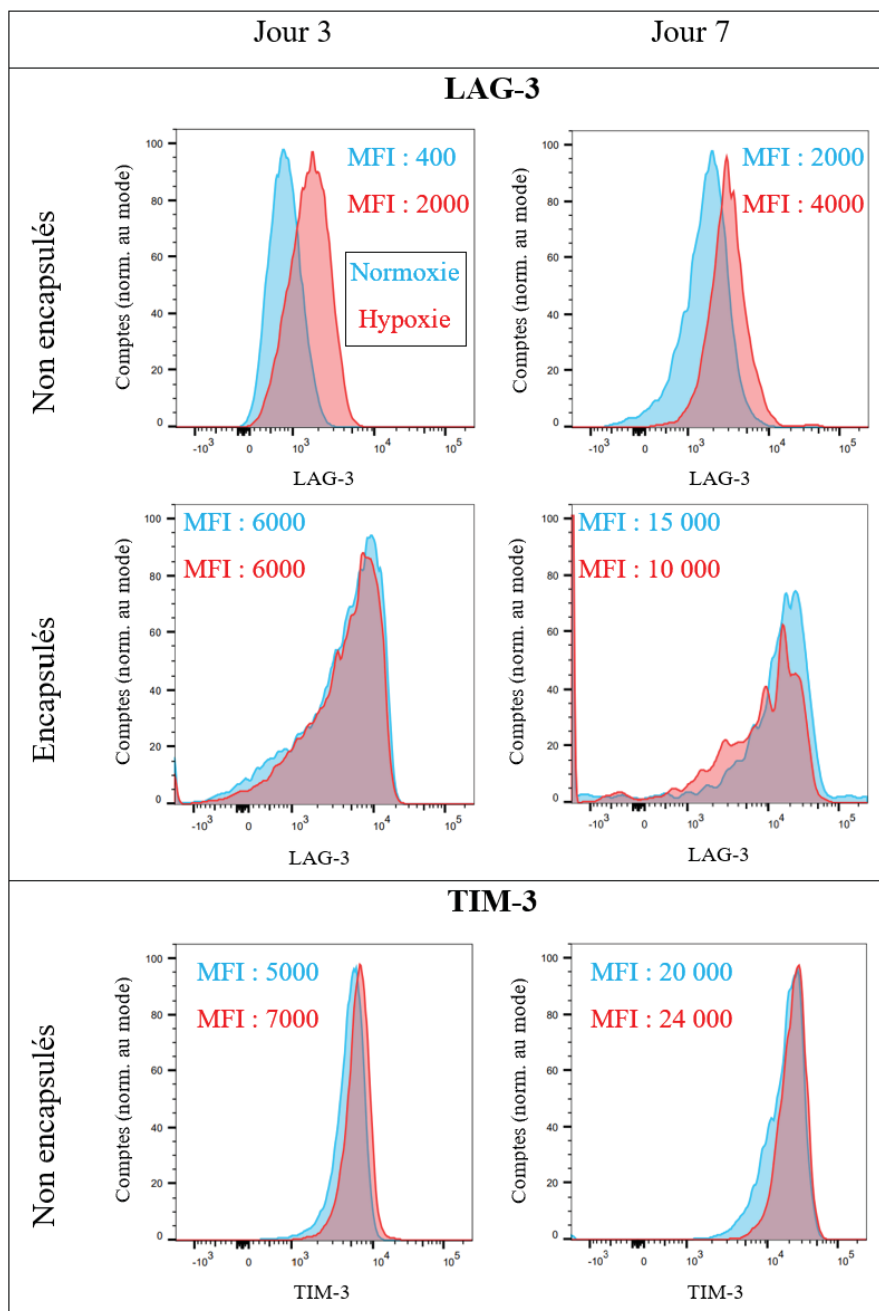


Figure 3.7 Expression du LAG-3, TIM-3 et PD-1 des OT-I non encapsulés (vivants) et encapsulés (vivants+morts) en hypoxie (rouge) et en normoxie (bleu) aux jours 3 et 7 (épuisement). N=1, n=1

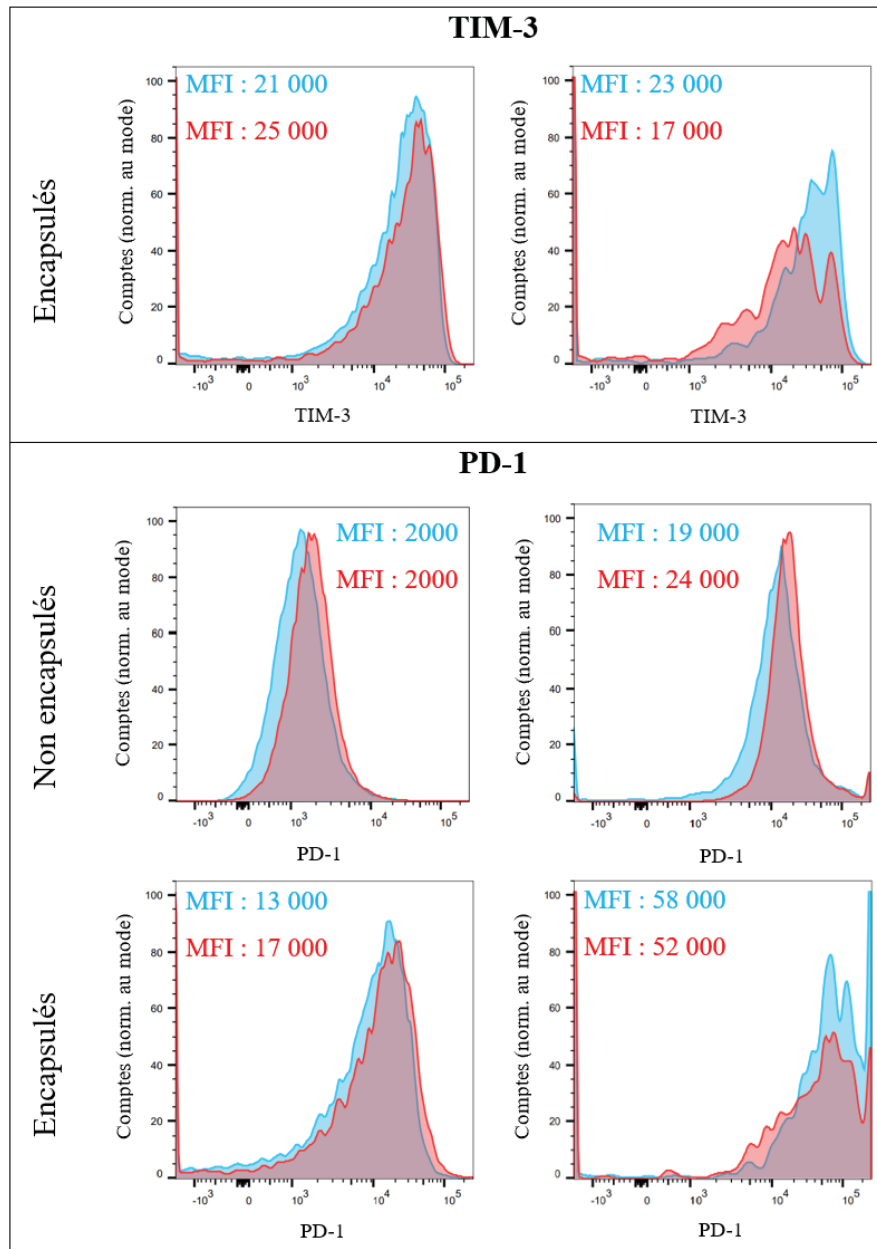


Figure 3.7 (suite) Expression du LAG-3, TIM-3 et PD-1 des OT-I non encapsulés (vivants) et encapsulés (vivants+morts) en hypoxie (rouge) et en normoxie (bleu) aux jours 3 et 7 (épuisement). N=1, n=1

3.2 **Objectif 2 : Développement de méthodes pour la caractérisation et l'optimisation des particules de CaO_2 , recouvertes d'HAp, relarguant du H_2O_2 et de l' O_2 pour l'oxygénation des matrices**

Comme mentionné dans la revue de littérature, l'ajout de CaO_2 sans recouvrement à l'hydrogel n'est pas envisageable étant donné la libération rapide, sous forme de *burst release*, d'une importante quantité d'oxygène (O_2) et de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) toxique pour les cellules. C'est pourquoi un recouvrement d'hydroxyapatite (HAp) à la surface du CaO_2 a été développé (inspiré de l'étude de Tomioka et al. (2023)). Plusieurs paramètres dans le processus de recouvrement ont été modifiés dans le but d'obtenir une meilleure compréhension de leurs effets sur le recouvrement final à optimiser ainsi que sur le relargage d' H_2O_2 et d' O_2 . Cette section présente la démarche pour développer un protocole de mise en hypoxie et de mesure de l'oxygène, le changement des paramètres de recouvrement et leurs effets sur les profils de relargage de produits et la caractérisation des particules et de leur présence dans le gel. Les cellules ne sont pas utilisées dans cette section.

Note importante sur les résultats statistiques présentés dans la section 3.2 : puisque le nombre de réplicas était faible, certains *time points* pour une même expérience ne respectaient pas les critères de normalité et de variance des tests paramétriques. Par conséquent, certaines analyses paramétriques et non paramétriques se trouvent dans un même graphique et se différencient par la couleur des étoiles. La légende de chaque graphique indique les tests statistiques effectués pour chaque *time point* et la procédure retrouvée dans l'ANNEXE III a été suivie pour chaque expérience.

3.2.1 **Effet de l'ajout de CaO_2 dans la solution d'hydrogel sur le pH**

L'hydroxyde de calcium ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) produit par le CaO_2 en milieu aqueux peut alcaliniser le pH de l'agent gélifiant, et potentiellement celui du gel, et ainsi affecter le processus de gélification (voir section 1.1.4). Par conséquent, des mesures de pH ont été prises à chacune des étapes de la préparation du gel, ainsi que pour le PBS qui recouvre les hydrogels lorsqu'ils sont « cultivés » à 37°C pendant 7 jours. Le pH du PBS est mesuré juste avant de faire le

changement aux 2 à 3 jours. La Figure 3.8 présente l'évolution du pH pendant 10 min de l'agent gélifiant contenant soit du CPO (CaO_2 non recouvert) ou du CPO_ctrl (CaO_2 recouvert avec les paramètres de base). L'évolution du pH de la solution d'hydrogel contenant les particules et du PBS sur les gels est présentée dans l'ANNEXE VIII, Figure-A VIII-1.

En moins d'une minute, le pH de l'agent gélifiant (dans lequel les particules sont ajoutées lors de la préparation des gels) est passé de $\sim 8,8$ à presque 12 en présence de CPO avant de se stabiliser autour de 12,5 (Figure 3.8). Cela a également pour effet d'augmenter significativement le pH du gel (Figure-A VIII-1a) et celui du PBS sur les gels (Figure-A VIII-1b) et de faire précipiter les gels. Au contraire, le CPO_ctrl n'influence que très peu le pH de l'agent gélifiant (pH constant autour de 8,7 en moyenne) et ne modifie pas le pH du gel ni du PBS. **En résumé** : recouvrir le CPO est un moyen efficace pour éviter le *burst release* de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ et l'augmentation du pH à des valeurs causant la précipitation des gels.

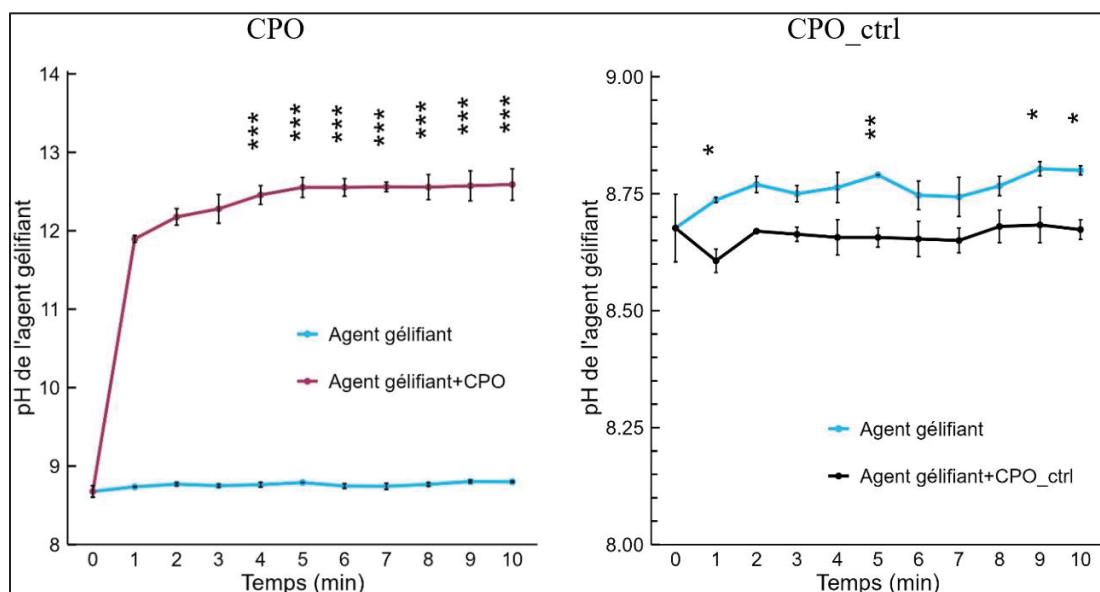


Figure 3.8 Évolution du pH pendant 10 min après l'ajout de particules dans l'agent gélifiant.

Gauche : CPO (particules non recouvertes), **droite** : CPO_ctrl (particules recouvertes).

*, **, *** $p < 0,05$, $0,01$, $0,001$ respectivement. **Gauche** : Student's T-test pour tous les *time points* (sauf 1 à 3 min : Mann-Whitney) et **droite** : ART ANOVA et contrastes (tous les *time points*). $N=1$, $n=3$

3.2.2 Effet de la présence des particules sur les propriétés mécaniques des hydrogels

La Figure 3.9 présente les modules de perte (G'') et de stockage (G') du gel de chitosane thermogélifiant avec ou sans particules et avec ou sans catalase. L'augmentation importante des modules à la suite de l'augmentation de la température à 37°C indique une gélification rapide sans différences entre les quatre conditions, soit gels contrôles (Gel) et gels CPO_ctrl avec ou sans catalase (cat) (courbes roses et vertes). Ainsi, l'ajout de catalase et de particules recouvertes ne semble pas modifier significativement les propriétés mécaniques des gels. Au contraire, lorsque des particules non recouvertes (CPO) sont ajoutées aux gels, ces derniers précipitent presque instantanément (à cause du pH élevé de l'agent gélifiant) et forment des grumeaux entourés de liquide au lieu d'un hydrogel cohésif. Les valeurs de G' n'ont alors plus de signification. **Ces résultats supportent donc les conclusions de la section 3.2.1.**

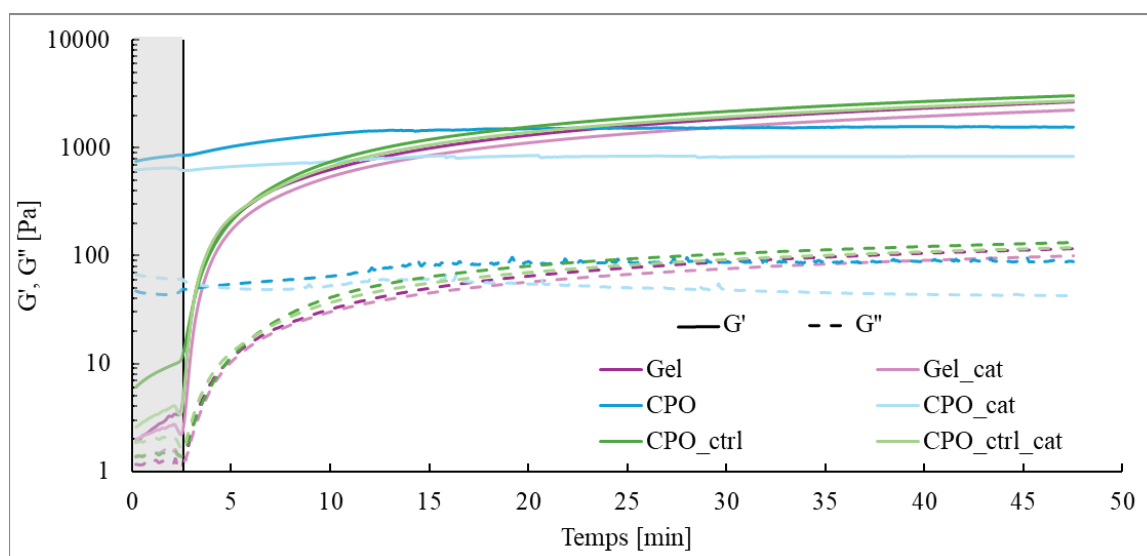


Figure 3.9 Modules de perte (G'') et de stockage (G') des hydrogels thermogélifiants encapsulant des particules recouvertes (CPO_ctrl) ou non (CPO) et avec ou sans catalase (cat). La bande grise marque la zone où la température augmente de 22 à 37°C. Les courbes pâles indiquent la présence de catalase. Courbes représentatives pour chaque condition. N=1, n=3

3.2.3 Commentaires préalables sur le protocole de mise en hypoxie et de mesure d'oxygène

Méthodes de mise en hypoxie : N'ayant pas de station de travail permettant de travailler en conditions réduites d'oxygène (et de désoxygéner les produits pour la préparation des gels), les échantillons ont été préparés à l'air ambiant puis mis en hypoxie. Deux méthodes de mise en hypoxie ont été utilisées dans les expériences avec les particules de CaO_2 . La méthode finale (#2), présentée dans la section 2.4.1 (préparer les gels dans les plaques puis purger le sac qui les contient avec de l'azote gazeux), est semblable à la méthode utilisée dans les expériences cellulaires (cloche à hypoxie, section 2.2.1). Cette méthode semble la plus fiable puisque les courbes obtenues présentent un signal relativement stable et les résultats sont présentés ci-après.

Toutefois, puisque les capteurs d' O_2 et l'oxygénomètre ont été reçus relativement tard dans le projet, une partie de l'optimisation a dû s'effectuer à même les expériences. Ainsi, dans la première partie du projet, certaines courbes de relargage d' O_2 ont été obtenues en utilisant la méthode #1 de mise en hypoxie qui diffère de la méthode #2 en deux points : 1) le PBS est préalablement purgé à l'azote gazeux, afin d'être désoxygéné, avant d'être distribué dans les puits; 2) après la purge à l'azote gazeux, le sac est mis sous vide afin de retirer tout le gaz qu'il contient. Bien que cette méthode semble *a priori* plus adéquate puisque l' O_2 est retiré du PBS, elle engendre plus de variabilité. L' O_2 pourrait rediffuser dans le PBS entre le moment où il est ajouté aux puits et le moment où le sac est purgé et mis sous vide. Puisque le temps entre ces deux étapes peut varier entre les échantillons, des mesures d' O_2 variables, aberrantes et peu reproductibles sont obtenues et les graphiques correspondants ne sont présentés, sauf exceptions, qu'en ANNEXE IX. Les courbes d' O_2 obtenues avec la méthode #1 sont un produit de l'optimisation du protocole de mise en hypoxie.

Commentaires importants sur les courbes d' O_2 : Le fait que les gels soient préparés en normoxie avant d'être mis en hypoxie génère des problèmes importants pour l'analyse des premiers *time points*. En effet, la diffusion de l' O_2 hors des gels au jour 0 (pendant et après la purge d'azote) se produit en même temps que les particules génèrent de l' O_2 ce qui complique

l'analyse, surtout si la quantité d'O₂ relarguée du CaO₂ est faible. Les données d'H₂O₂ sont donc considérées comme plus précises car l'H₂O₂ présent provient exclusivement de la réaction du CaO₂ avec l'eau contrairement à l'O₂ où l'O₂ présent dans l'air est un contaminant majeur. C'est pour cette raison que **le profil de relargage de l'H₂O₂ est utilisé dans certains cas pour estimer celui de l'O₂** (voir Wang et al. (2016), section 1.4.3.1). Or, cette hypothèse n'est plus valide si la catalase est présente puisque cette enzyme dégrade les molécules d'H₂O₂ en O₂ et en eau comme mentionné précédemment.

3.2.4 Effet du processus de recouvrement sur le relargage de produits

Le relargage d'H₂O₂ par les hydrogels encapsulant du CaO₂ non recouvert (CPO) ou du CaO₂ recouvert dans du tampon phosphate par la méthode de référence (CPO_ctrl) est présenté dans la Figure 3.10. Le CPO présente un *burst release* initial d'H₂O₂ important (~ 5000 µM au jour 0, réduit à ~ 120 µM au jour 3) qui est absent pour le CPO_ctrl et la différence entre ces conditions est significative jusqu'à 3 jours. Lorsque le tampon phosphate est remplacé par de l'eau ultra pure (CPO_H2O) (voir section 2.3.2, Figure 2.6 étape B), le profil de relargage obtenu est très semblable à celui du CPO (voir ANNEXE X, Figure-A X-1). **En résumé** : un recouvrement semble s'être formé autour des particules de CaO₂ dans le cas du CPO_ctrl ce qui aurait ralenti la réaction avec l'eau et donc le relargage de produits. Cette diminution nette du relargage serait bien causée par le recouvrement d'HAp (et non parce que le *burst release* se serait produit durant les 60 min d'agitation dans la solution aqueuse lors du recouvrement).

Les lignes pointillées sur les graphiques indiquent la valeur approximative du **contrôle négatif** sans particules de $(2,0 \pm 0,6)$ µM, et ce, pour tous les graphiques d'H₂O₂ de ce mémoire. Il est aussi à noter que certaines différences dans la quantité (µM) d'H₂O₂ mesurée pour le CPO_ctrl, CPO ou autres contrôles peuvent être retrouvées entre les expériences de la section 3.2. Ces différences peuvent être issues d'une répartition non homogène des particules entre les gels d'une même condition ou de l'échantillon dans le *working reagent* lors de la détection du produit avec la trousse de détection d'H₂O₂ (section 2.4.1).

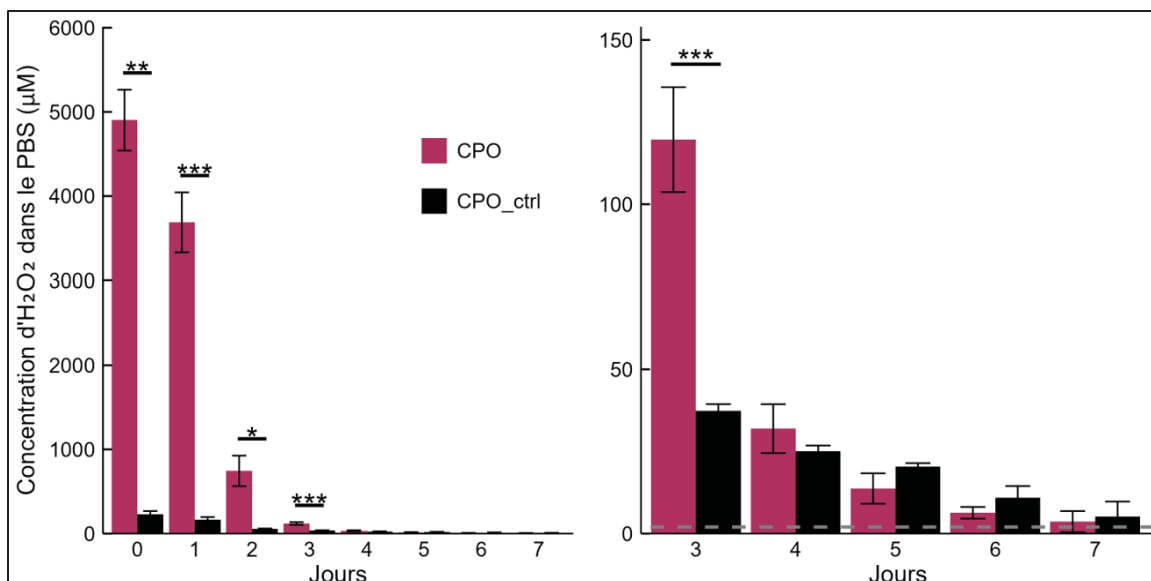


Figure 3.10 **Gauche** : concentration quotidienne d' H_2O_2 relargué des hydrogels dans le PBS en normoxie sur 7 jours en fonction de la présence d'un recouvrement. Comparaison entre CPO (aucun recouvrement) et CPO_ctrl (recouvert dans du tampon phosphate). **Droite** : agrandissement sur les données des jours 3 à 7. Student's T-tests (pour tous les *time points*). N=1, n=3

L'analyse des particules par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) (Figure 3.11) confirme la présence d'un phosphate de calcium à la suite du recouvrement dans le tampon phosphate (CPO_ctrl). En effet, les principaux pics correspondant au PO_4^{3-} rapportés dans la littérature, soit 470, 567, 603, 963, 1092 cm^{-1} (Lee et al., 2020) et 1044 cm^{-1} (Li et al., 2007) sont présents dans les spectres de l'HAp commercial et du CPO_ctrl mais sont absents dans le spectre du CPO commercial. Les pics du OH^- (non présentés) à 633 cm^{-1} et 3570 cm^{-1} (Lee et al., 2020) sont principalement visibles pour l'HAp et en partie pour le CPO_ctrl mais absents pour le CPO. Les pics du CO_3^{2-} (Lee et al., 2020) sont présents dans tous les échantillons, ce qui pourrait indiquer que certains ions de l'HAp commercial auraient été substitués par ces ions carbonate (section 1.5.1). De plus, puisque le CPO commercial contient du $Ca(OH)_2$ et du carbonate de calcium ($CaCO_3$), il est normal de retrouver ces pics dans le spectre. Enfin, la présence d'eau principalement dans le CPO et le CPO_ctrl est confirmée par les pics à 1641 cm^{-1} (Lee et al., 2020) et 3448 cm^{-1} (non présentés) (Wang, Xue, & Zhu, 2017). Ainsi, le CPO_ctrl possède tous les pics caractéristiques de l'HAp qui sont également

mentionnés dans d'autres études (Liu et al., 2003; Sharma, Pandey, Gupta, Kar, & Dhayal, 2012; Yao et al., 2021). Le spectre du CPO est semblable à celui obtenu par Amerhaider Nuar et al. (2023) qui utilisent un CPO commercial semblable en composition à celui de la présente étude. Dans une autre étude, ils ont mentionné les principaux pics du CaO_2 soit ~ 740 et $\sim 860 \text{ cm}^{-1}$ (O – O élongation), $\sim 1080 \text{ cm}^{-1}$ (CO_3^{2-}), $\sim 1460 \text{ cm}^{-1}$ (O – Ca – O pliage et CO_3^{2-}) et 1650 cm^{-1} (H_2O) (Amerhaider Nuar et al., 2022) et tous sont retrouvés dans le spectre du CPO obtenu ici (bien que certains pics se chevauchent à ceux de l'HAp). **En résumé :** le spectre FTIR du CPO_ctrl présente les pics caractéristiques de l'HAp et confirme ainsi la présence d'un recouvrement d'HAp sur les particules. Toutefois, le CaO_2 sous le recouvrement n'est pas clairement détecté.

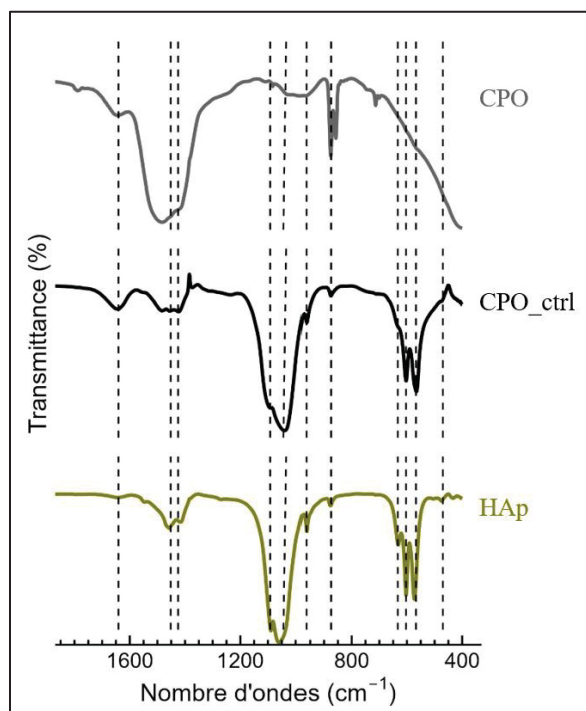


Figure 3.11 Spectres FTIR des particules de CPO commercial, CPO_ctrl (recouvert d'HAp) et HAp commercial. Spectres normalisés à 1044 cm^{-1} , CPO normalisé à 1482 cm^{-1} . L'HAp et le CPO_ctrl possèdent tous les pics du phosphate qui sont absents pour le CPO

3.2.5 Effet de la présence du gel sur le relargage d'H₂O₂ et d'O₂

Les mesures d'O₂ ont été faites à trois *time points* au jour 0, soit 0₁ (solution d'hydrogel juste avant la gélification en normoxie), 0₂ (hydrogel juste après la gélification et avant l'ajout de PBS en normoxie), et 0₃ (3 heures après l'ajout de PBS et de la mise en hypoxie). Ces trois *time points* sont retrouvés dans tous les graphiques d'O₂ de ce mémoire sauf exception.

La Figure 3.12 compare le relargage d'H₂O₂ (a) et d'O₂ (b) par le CPO (non recouvert) et CPO_ctrl (recouvert) où les particules sont soit encapsulées dans le gel soit seules (libres) dans le PBS. La masse de particules dans les puits avec ou sans gel est la même. On remarque que les concentrations d'H₂O₂ mesurées pour le CPO sont fortement supérieures à celles des particules non encapsulées (Figure 3.12a) et le *burst release* d'O₂ en provenance du CPO se produit environ un jour plus tôt lorsque les particules sont encapsulées (Figure 3.12b). Une hypothèse serait qu'une capsule de Ca(OH)₂ se formerait rapidement à la surface des particules CPO_seul, puisqu'elles sont en contact direct avec l'eau, ce qui nuirait par la suite à la réaction avec l'eau et réduirait donc la quantité de produits relargués. En effet, la couleur des particules de CPO_seul change au fil du temps dans le PBS, passant du jaune pâle au blanc, ce qui pourrait témoigner d'une autoencapsulation comme mentionné à la section 1.4.2. Il est aussi à noter que les faibles concentrations d'H₂O₂ mesurées pour le CPO_seul sont observées lorsque les particules sont dans du PBS (comme c'est le cas ici) ou dans l'eau ultra pure où le même changement de couleur des particules a été observé (données non présentées). Un recouvrement des particules à cause du phosphate contenu dans le PBS durant les 7 jours d'incubation n'est donc pas une explication possible pour ce faible relargage en absence de gel.

Concernant le CPO_ctrl et le CPO_ctrl_seul, les relargages d'O₂ et d'H₂O₂ sont très faibles dans les deux cas et les effets du gel semblent donc limités. Les variations d'O₂ pour le CPO_ctrl (seul ou encapsulé) sont très faibles et proviennent probablement de la prise de mesure. **En résumé** : le gel semble promouvoir le relargage de produits dans le cas du CPO puisque le CPO_ctrl ne relargue que peu de produits dans tous les cas.

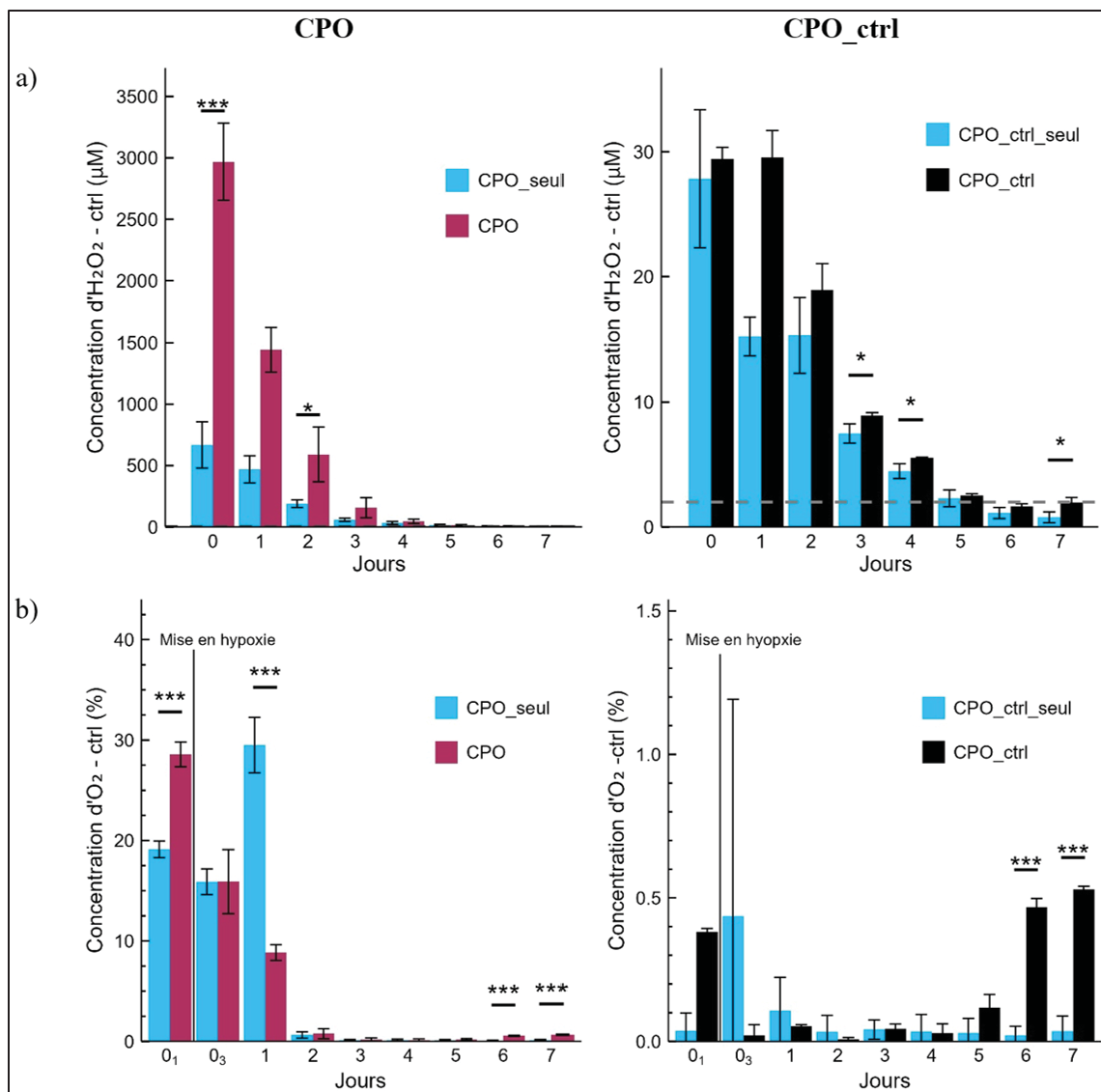


Figure 3.12 Concentration d'H₂O₂ (a) et d'O₂ (b) (contrôle négatif soustrait) relargués en hypoxie sur 7 jours. Comparaison entre les relargages de particules seules ou encapsulées dans des hydrogels. **Gauche** : CPO (non recouvert), **droite** : CPO_ctrl (recouvert). Données au jour 0 collectées après 3,5 heures au lieu de 3 heures. Student's T-test pour tous les *time points* (sauf jour 1 (H₂O₂) et 0₁ (O₂-CPO_ctrl) : Mann-Whitney). N=1, n=3

3.2.6 Effet de la présence de la catalase dans les hydrogels

Comme mentionné à la section 1.4.3.3, la catalase est une enzyme pouvant décomposer les molécules d'H₂O₂ en O₂ et en eau afin d'éviter que des concentrations cytotoxiques d'H₂O₂ ne soient atteintes. Elle a été ajoutée dans les gels à une concentration de 1000 – 2500 U (par mL

d'hydrogel) selon la méthode de Willemen et al. (2022) (section 1.4.3.3). Les effets de la présence de l'enzyme sur le relargage d' H_2O_2 par les hydrogels contenant des particules non recouvertes (CPO) (Figure 3.13 gauche) ou recouvertes (CPO_ctrl) (Figure 3.14) ont été étudiés. La catalase élimine complètement le *burst release* d' H_2O_2 produit par le CPO et augmente le pic d'oxygène au jour 0 (Figure 3.13 droite, répétition de la Figure-A IX-2a, ANNEXE IX). Elle élimine également le faible relargage initial d' H_2O_2 par le CPO_ctrl. Les courbes d' O_2 ont été obtenues avec la méthode #1 de mise en hypoxie et ne sont donc pas considérées fiables (section 3.2.3). Toutefois, le *burst release* d' O_2 du CPO détecté au jour 0 avant (0_1) et après (0_2) la gélification est présenté ici puisque les valeurs d' O_2 sont très élevées et que les mesures pour ces *time points* se sont effectuées **en normoxie** donc avant l'ajout de PBS et de la mise en hypoxie qui perturbent les résultats. **En résumé** : l'ajout de catalase est un moyen efficace pour décomposer les molécules d' H_2O_2 et de réduire leur concentration à environ zéro mais elle ne permet pas un relargage d' O_2 en continu. Afin d'obtenir un relargage progressif de l' O_2 et de l' H_2O_2 des hydrogels, différents paramètres de recouvrement ont été modifiés dans le but d'optimiser ce dernier.

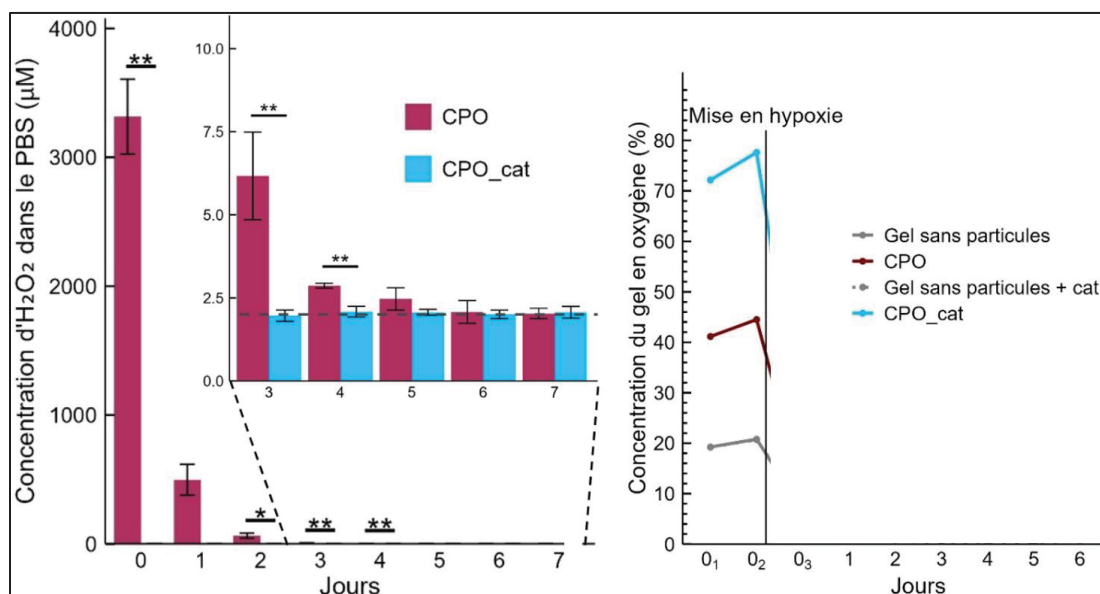


Figure 3.13 **Gauche** : effet de la catalase (cat) sur la concentration quotidienne d' H_2O_2 relargué des hydrogels contenant du CPO (non recouvert) dans le PBS en hypoxie sur 7 jours. Student's T-test pour tous les *time points* (sauf jour 1: Mann-Whitney). N=1, n=3.

Droite : concentration d' O_2 relargué en hypoxie sur 7 jours dans les hydrogels CPO et CPO_cat. N=1, n=1

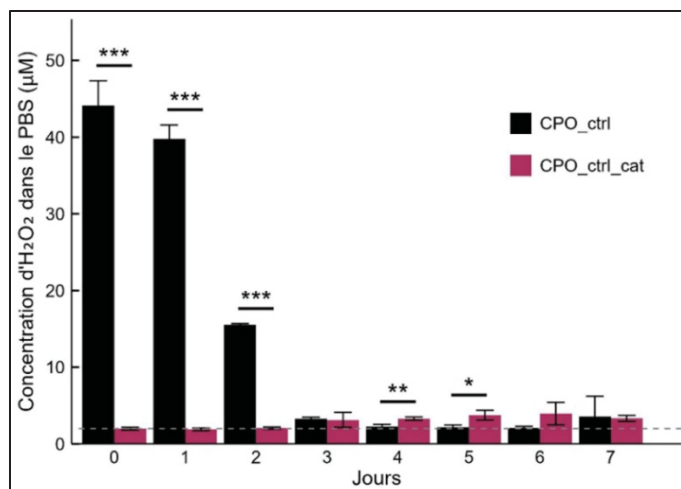


Figure 3.14 Effet de la catalase (cat) sur la concentration quotidienne, dans le PBS en hypoxie sur 7 jours, d' H_2O_2 relargué des hydrogels chargés en particules recouvertes (CPO_ctrl). Student's T-test (pour tous les *time points*). N=1, n=3

3.2.7 Effet de la molarité du tampon phosphate

Tomioka et al. (2023) avaient observé un relargage initial d' O_2 moins important mais s'étalant sur environ 10 jours au lieu de 4 jours lorsque les particules étaient recouvertes avec un tampon phosphate de 500 mM au lieu de 100 mM. Dans la présente étude, cette tendance n'est pas observée entre CPO_500 et CPO_ctrl (100 mM) (voir ANNEXE XI, Figure-A XI-1). Pour cette raison, le tampon 500 mM pH 7 n'est pas utilisé pour la suite des expériences. Puisqu'il n'y avait pas d'oxygénomètre au moment de l'expérience, le profil d' H_2O_2 a été utilisé pour estimer celui de l' O_2 .

3.2.8 Effet de la nature de la solution au-dessus de l'hydrogel

Le relargage quotidien d' H_2O_2 des hydrogels encapsulant des particules recouvertes avec les paramètres contrôlés a été analysé pour trois solutions différentes recouvrant les hydrogels, soit le PBS (CPO_ctrl), l'eau ultra pure (CPO_MQ) ou le milieu de culture à Jurkat (CPO_CM). Les résultats sont présentés dans l'ANNEXE XII, Figure-A XII-1. Les résultats obtenus semblent confirmer que, comme suggéré plus tôt, le phosphate contenu dans le PBS ne continue pas le processus de recouvrement des particules durant les 7 jours de « culture »

puisque les valeurs d' H_2O_2 du CPO_ctrl et CPO_MQ sont semblables. Dans le cas du CPO_CM, un relargage légèrement plus faible que les autres échantillons est observé durant les premiers jours ce qui pourrait témoigner de la formation d'un recouvrement de carbonate de calcium amorphe à la surface des particules à cause des composantes du milieu de culture (Tomioka et al., 2024).

3.2.9 Effet de la température

Relargage : Le relargage quotidien d' H_2O_2 (Figure 3.15) des hydrogels encapsulant des particules ayant été recouvertes dans du tampon phosphate à 4°C (CPO_4), température pièce (CPO_RT), 37°C (CPO_ctrl) ou 50°C (CPO_50) a été analysé. Les concentrations d' H_2O_2 du CPO_50 sont fortement et significativement plus élevées que celles des trois autres conditions à tous les *time points* (excluant ceux analysés par Kruskal-Wallis qui est un test non paramétrique moins puissant) tandis que le CPO_4 présente le signal le plus bas, au même niveau que le contrôle sans particules (ligne pointillée), ce qui indique qu'aucun H_2O_2 n'est relargué. Les données d' O_2 ne sont pas fiables (Figure-A IX-1a). **En résumé :** le recouvrement à 50°C augmente significativement le relargage tandis que celui à 4°C le supprime.

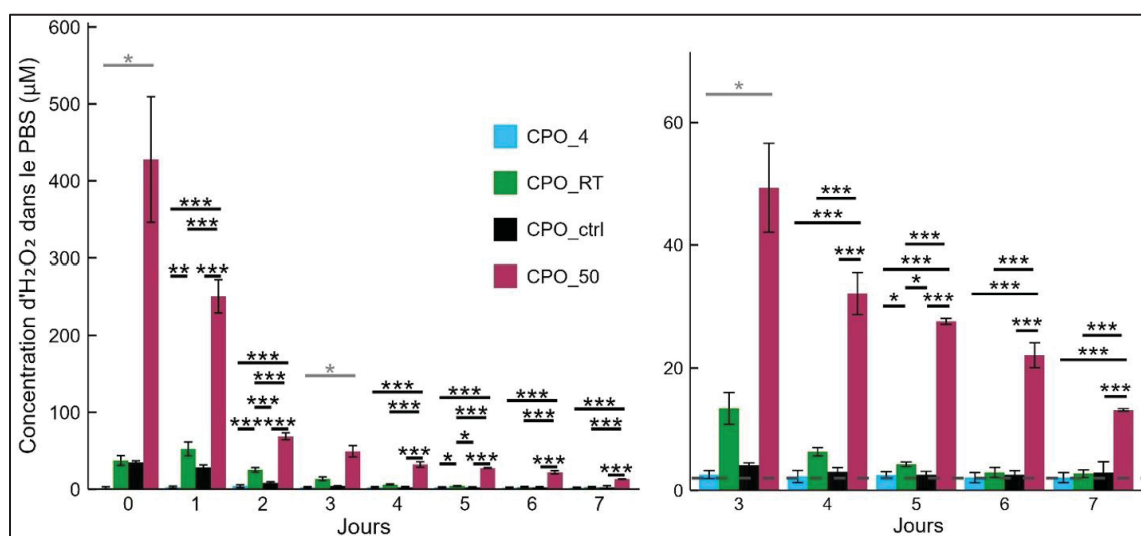


Figure 3.15 **Gauche** : concentration quotidienne d' H_2O_2 relargué des hydrogels dans le PBS en hypoxie sur 7 jours en fonction de la température de recouvrement des particules, soit 4°C (CPO_4), température pièce (CPO_RT), 37°C (CPO_ctrl) et 50°C (CPO_50). **Droite** : agrandissement sur les données des jours 3 à 7. One-way ANOVA pour tous les *time points* (sauf jours 0 et 3 : Kruskal-Wallis). N=1, n = 3

Caractérisation : Les spectres FTIR des particules recouvertes à 4, 37 (ctrl) et 50°C et du CPO (non recouvert) commercial se trouvent dans la Figure 3.16a. Malgré les différences importantes de relargage d' H_2O_2 entre CPO_4 et CPO_50, les spectres des particules recouvertes sont tous semblables et possèdent tous les pics présents chez l'HAp. Les pics entre 1400 et 1500 cm^{-1} sont toutefois moins intenses pour CPO_4, ce qui pourrait signifier une présence moins importante de carbonate ou de liens O – Ca – O provenant du CPO.

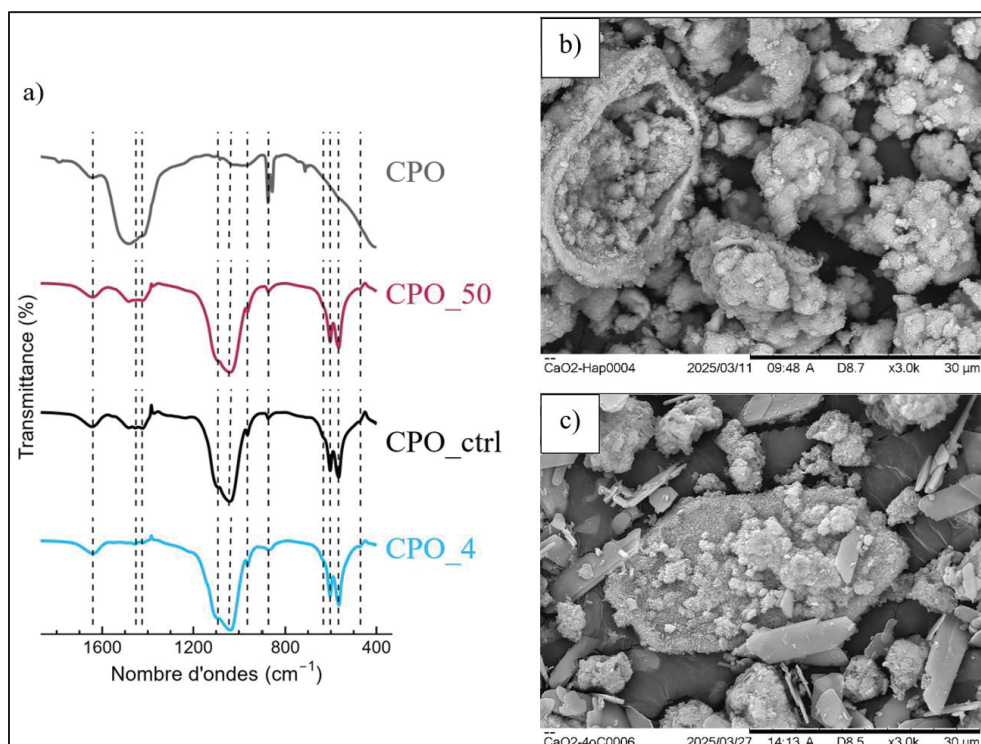


Figure 3.16 (a) Spectres FTIR des particules de CPO commercial (aucun recouvrement) et des particules recouvertes à 50°C (CPO_50), 37°C (CPO_ctrl) et 4°C (CPO_4) normalisés à 1044 cm^{-1} (CPO normalisé à 1482 cm^{-1}). Images obtenues du MEB par électrons rétrodiffusés à 15 kV des particules (b) CPO_ctrl et (c) CPO_4. Échelle : 30 μm

Les images du microscope électronique à balayage (MEB) obtenues des électrons rétrodiffusés se trouvent dans la Figure-A XIII-1 de l'ANNEXE XIII et dans la Figure 3.16b et c. La poudre commerciale de CaO_2 (Figure-A XIII-1a) comprend plusieurs agglomérats de particules rondes de tailles variées. Les agglomérats observés pour le CPO_ctrl (Figure 3.16b et Figure-A XIII-1b) sont aussi de différentes tailles mais ils possèdent une surface lamellaire absente pour la poudre commerciale (voir ANNEXE XIII, Figure-A XIII-2a et b). Le ratio

calcium/phosphore (Ca/P) mesuré pour le CPO_ctrl est $\sim 1,7$ soit près de celui de l'HAp (1,67). Des enveloppes regroupant de plus petites particules sont également observées. Les particules de CPO_ctrl de cette étude sont semblables à celles de Tomioka et al. (2023) qui avait aussi rapporté ces enveloppes. Pour CPO_4 (Ca/P mesuré $\sim 1,4$), différents amas des particules exhibant une surface lamellaire sont observés (Figure 3.16c et Figure-A XIII-1c). Toutefois, une multitude de fines plaquettes (Ca/P mesuré $\sim 1,1$) semblent avoir remplacé une grande partie des amas sphériques. Les observations du CPO_50 (Figure-A XIII-1d) sont semblables à celles de CPO_ctrl et le ratio Ca/P mesuré est $\sim 1,7$. **En résumé** : les spectres FTIR ne permettent pas d'expliquer les différences observées entre 4 et 50°C mais la présence de plaquettes ayant remplacé les particules rondes de CPO à 4°C pourrait expliquer le relargage apparemment inexistant de produits.

Les ratios Ca/P mesurés par EDX sont approximatifs et sont à titre informatif seulement.

De plus, le réseau de feuillet (lamellaire) d'HAp rapporté dans cette section et dans les sections subséquentes est également retrouvé dans la littérature sous forme plutôt aciculaire (Brown & Fulmer, 1991) ou sur des substrats pour des applications dans la régénération osseuse (Zhu et al., 2023). Sa formation pourrait être initiée par une sursaturation locale en ions calcium dissous près de la surface du CaO₂ (Brown & Fulmer, 1991; Diez-Escudero, Espanol, & Ginebra, 2024; Du et al., 2013). La morphologie lamellaire, quant à elle, pourrait être causée par un excès de phosphate (Ito, Oaki, & Imai, 2008) comme c'est le cas dans plusieurs conditions testées où le ratio Ca/P en solution est de $\sim 0,14$. Ce recouvrement lamellaire pourrait toutefois ralentir la dissolution du calcium par la suite (Brown & Fulmer, 1991).

3.2.10 Effet du temps d'agitation dans le tampon phosphate

Relargage : Le relargage d'H₂O₂ (Figure 3.17) et d'O₂ (Figure 3.18a) provenant d'hydrogels encapsulant des particules de CaO₂ recouvertes dans le tampon phosphate pendant 1 min (CPO_1min) et 60 min (CPO_ctrl) est considéré. Un *burst release* d'H₂O₂ est observé pour CPO_1min. Toutefois, ces valeurs sont environ 3x plus faibles qu'un *burst release* du

CPO (non recouvert) (données non présentées) ce qui implique que le *burst release* des particules peut être diminué de façon importante après seulement une minute passé dans le tampon phosphate. Une légère augmentation du relargage d'O₂ pour CPO_1min au jour 0 est également observée. Concernant les particules recouvertes pendant 15, 30 ou 120 min (données non présentées), aucune tendance claire dans le relargage d'H₂O₂ n'a été observée (données d'O₂ obtenues avec la méthode #1 de mise en hypoxie). Il est à noter que les courbes de relargage du contrôle négatif et du CPO_ctrl présentées dans la Figure 3.17 et la Figure 3.18a sont les mêmes que celles des sections 3.2.11 (modification du pH) et 3.2.12 (ratio Ca/P) puisque ces paramètres de recouvrement ont été modifiés dans le cadre d'une même expérience. **En résumé** : le recouvrement se forme rapidement à la surface des particules (diminution du *burst release*) mais réduire le temps d'agitation dans le tampon phosphate ne permet pas un relargage plus prolongé et constant.

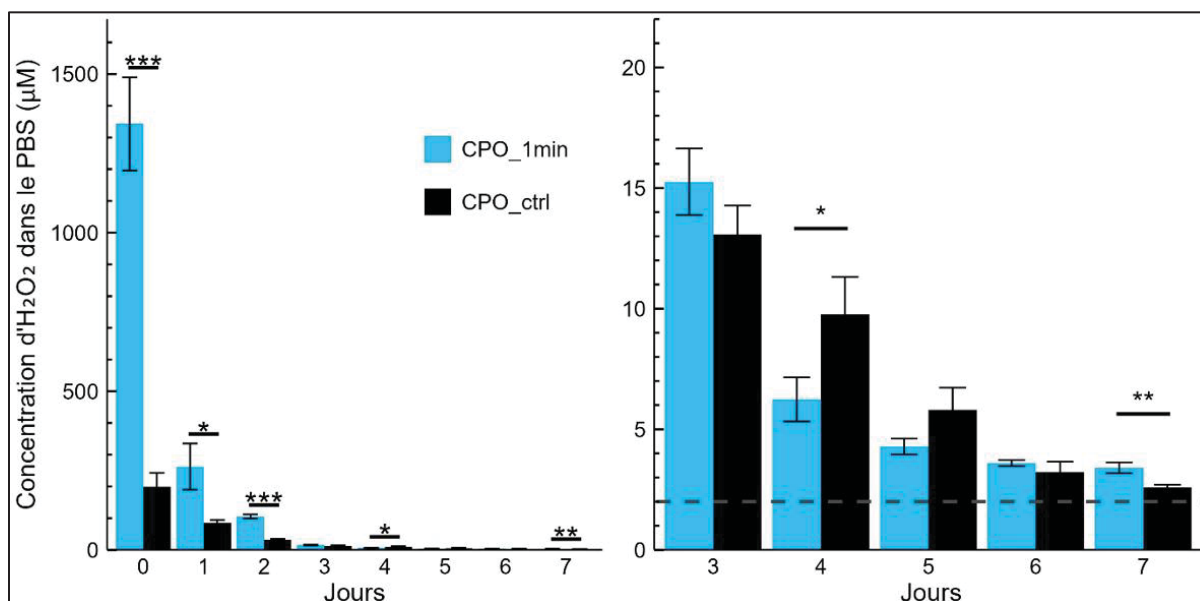


Figure 3.17 **Gauche** : concentration quotidienne d'H₂O₂ relargué des hydrogels dans le PBS en hypoxie sur 7 jours en fonction du temps passé par les particules dans le tampon phosphate lors du recouvrement, soit 1 min (CPO_1min) ou 60 min (CPO_ctrl). **Droite** : agrandissement sur les données des jours 3 à 7. Student's T-test (pour tous les *time points*). N=1, n = 3

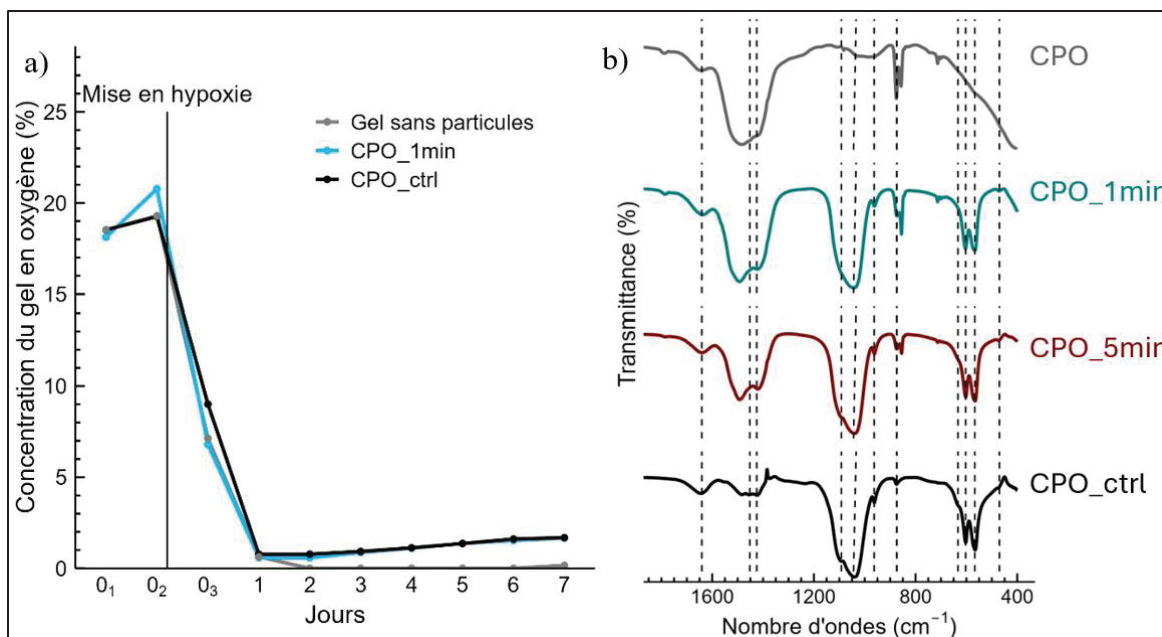


Figure 3.18 (a) Concentration d'O₂ relargué dans les hydrogels en hypoxie sur 7 jours en fonction du temps passé par les particules dans le tampon phosphate lors du recouvrement, soit 1 min (CPO_1min) ou 60 min (CPO_ctrl). N=1, n=1. (b) Spectres FTIR des particules de CPO commercial (aucun recouvrement) et du CPO avec différentes durées de recouvrement (1 à 60 min) normalisés à 1044 cm⁻¹ (CPO normalisé à 1482 cm⁻¹)

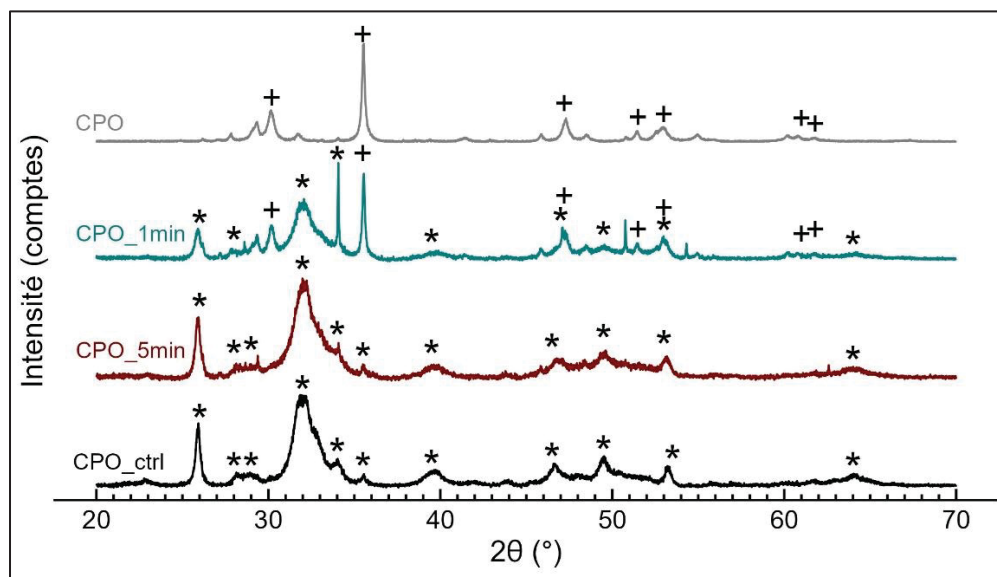


Figure 3.19 Spectres XRD des particules de CPO commercial (aucun recouvrement) et du CPO avec différentes durées de recouvrement (1 à 60 min (CPO_ctrl))

Caractérisation : Les spectres FTIR des différents échantillons se trouvent dans la Figure 3.18b. Un temps de recouvrement de 5 min a également été considéré pour toutes les techniques de caractérisation afin de mieux comprendre l'évolution de la morphologie et de la structure chimique entre 1 et 60 min de recouvrement. Les pics de l'HAp sont présents sur tous les spectres des particules recouvertes, à l'exception du pic de l' OH^- (633 cm^{-1}) pour le CPO_1min. Seuls les spectres CPO_1min et CPO_5min présentent les pics du CPO qui semblent diminuer en intensité avec le temps. Les spectres de 15, 30 et 120 min sont similaires à celui du CPO_ctrl (60 min) (ANNEXE XIV, Figure-A XIV-1) et les spectres de tous les temps de recouvrement possèdent le large pic à $\sim 3450\text{ cm}^{-1}$ confirmant la présence d'eau (Figure-A XIV-1). Certains pics du CPO et de l'HAp se chevauchent ce qui complique l'analyse.

La Figure 3.19 présente les spectres de diffraction des rayons X (XRD) du CPO et du CPO recouvert (1, 5 et 60 (ctrl) min). Seul le spectre du CPO_1min contenait des pics communs à ceux du CPO et tous les échantillons recouverts comprenaient des pics liés aux phosphates de calcium. Toutefois, puisque plusieurs pics des différents phosphates de calcium se chevauchent, il est difficile d'en déterminer la nature exacte. Cependant, l'HAp a été proposée suite à l'analyse des spectres dans les trois cas, ce qui est en accord avec les résultats de Tomioka et al. (2023).

Les images du MEB (Figure-A XIII-1 de l'ANNEXE XIII) montrent, après seulement une minute de recouvrement, l'apparition de petits paquets de fins bâtonnets longs rassemblés en leur milieu (non présentés, Ca/P mesuré $\sim 6,5$) en plus des agglomérats de particules de différentes tailles (Ca/P mesuré $\sim 2,7$). La Figure-A XIII-2c et d montre une surface lamellaire sur les particules CPO_1min semblable à celle des particules séchées plutôt à température pièce. Toutefois, la Figure-A XIII-2b suggère qu'un réseau lamellaire, plus dense et en partie fusionné, se forme lorsque le temps d'agitation augmente à 60 min (CPO_ctrl). Pour le CPO_5min (Figure-A XIII-1f), la surface lamellaire exhibe des pores potentiellement plus importants que ceux de CPO_ctrl et semble regrouper, comme un voile, certains agglomérats ensemble (Ca/P mesuré $\sim 2,1$). Certains bâtonnets sont encore présents. Un recouvrement

uniforme à base de phosphore se retrouve à la surface des particules après seulement 5 min d'agitation dans le tampon phosphate (Figure-A XIII-3a). **En résumé :** le CPO se recouvre rapidement et son signal est toujours détecté après 1 – 5 min de recouvrement mais l'intensité diminue avec le temps (jusqu'à disparaître après 60 min de recouvrement) alors que la structure lamellaire à la surface des particules semble se densifier. Cela pourrait indiquer que l'épaisseur du recouvrement augmente avec le temps passé dans le tampon phosphate. La diminution du ratio Ca/P mesuré par EDX vers des valeurs près de celles de l'HAp supporte cette hypothèse puisque le calcium du CaO_2 serait de moins en moins détecté à mesure que l'épaisseur augmente. Il est à noter que le chargement de l'échantillon durant l'imagerie par électrons secondaires du MEB (haute résolution), malgré le recouvrement de platine, n'a pas permis de balayer la surface des particules afin de vérifier l'état du recouvrement d'HAp à plusieurs endroits.

3.2.11 Effet du pH du tampon phosphate

Relargage : Le relargage d' H_2O_2 (Figure 3.20) et d' O_2 (Figure 3.21a) provenant d'hydrogels encapsulant des particules de CaO_2 recouvertes dans des tampons phosphates 100 mM de pH 5, 7 (CPO_ctrl) et 11 est considéré. On observe un fort impact du pH du tampon phosphate sur le relargage de H_2O_2 lors des premiers jours. Le CPO_pH5 ne relargue pas d' H_2O_2 (mêmes valeurs que le contrôle sans particules). Au contraire, la génération d' H_2O_2 du CPO_pH11 est largement supérieure à celle du CPO_ctrl avec un *burst release* dans le même ordre de grandeur que celui du CPO non recouvert (données non présentées) au jour 0. Les données d' O_2 supportent les observations du H_2O_2 pour le CPO_pH11 avec une forte augmentation du relargage d' O_2 au jour 0 qui diminue au même niveau que les autres conditions dès le jour 1. Aucun relargage d' O_2 ne semble être détecté pour le CPO_ctrl et CPO_pH5. Laisser les particules 1 min dans le tampon phosphate pH 5 (données non présentées) n'a pas modifié de façon importante la tendance observée ici avec 60 min de recouvrement. Cela indique que les changements effectués aux particules se sont opérés très rapidement dans le tampon phosphate. **En résumé :** un tampon phosphate de pH 5 supprime le relargage de produits tandis qu'un pH

11 ne semble pas avoir d'effets. Aucun des échantillons ne présente un relargage de produits en continu.

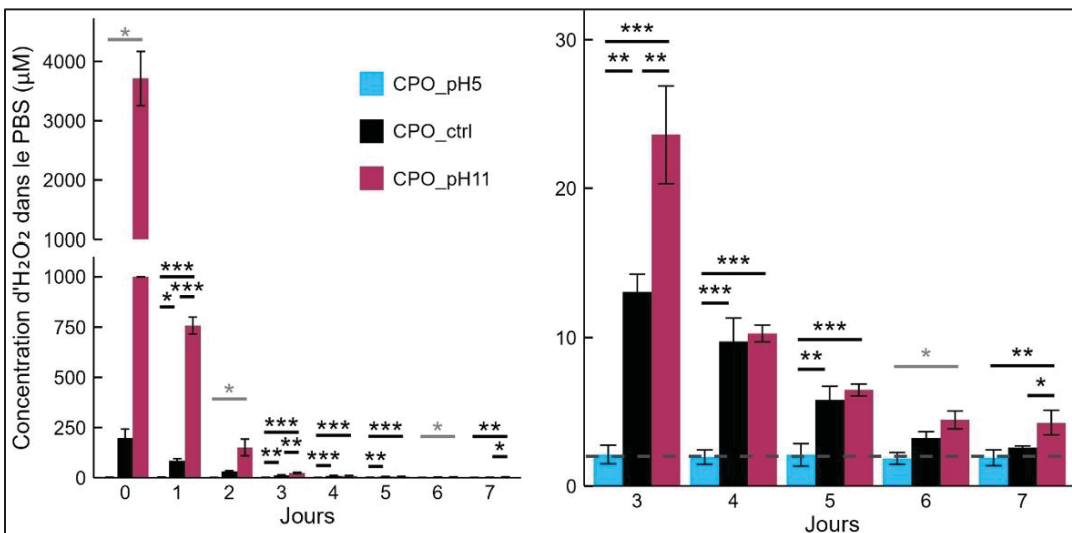


Figure 3.20 **Gauche** : concentration quotidienne d'H₂O₂ relargué des hydrogels dans le PBS en hypoxie sur 7 jours en fonction du pH du tampon phosphate lors du recouvrement, soit CPO_pH5, CPO_ctrl (pH 7) et CPO_pH11. **Droite** : agrandissement sur les données des jours 3 à 7. One-way ANOVA pour tous les *time points* (sauf jours 0, 2 et 6 : Kruskal-Wallis). N=1, n=3

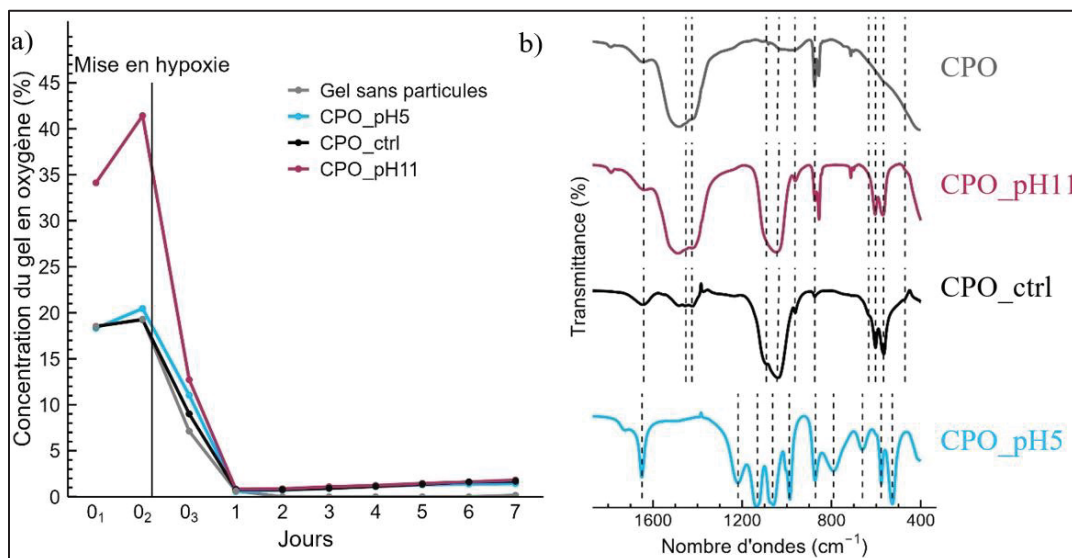


Figure 3.21 (a) Concentration d'O₂ relargué dans les hydrogels en hypoxie sur 7 jours en fonction du pH du tampon phosphate lors du recouvrement, soit CPO_pH5, CPO_ctrl (pH 7) et CPO_pH11. N=1, n=1. (b) Spectres FTIR des particules de CPO commercial (aucun recouvrement), CPO_pH5, CPO_ctrl et CPO_pH11 normalisés à 1044 cm⁻¹ (CPO normalisé à 1482 cm⁻¹, CPO_pH5 non normalisé)

Caractérisation : D'importantes différences sont observées dans les spectres FTIR selon le pH de recouvrement (Figure 3.21b). Le spectre du CPO_pH11 montre tous les pics de l'HAp identifiés excluant celui du OH^- à 633 cm^{-1} . Toutefois, tous les pics du spectre du CPO sont également visibles, ce qui suggère la présence de CPO et de phosphate de calcium (potentiellement d'HAp) dans l'échantillon. Le CPO_pH5 montre un spectre différent de celui de l'HAp, s'apparentant plutôt à celui du phosphate de calcium brushite, puisqu'il possède tous les pics caractéristiques (indiqués sur le spectre) tirés de Mansour, El-dek, Ahmed, Abd-Elwahab, et Ahmed (2016) (identification des pics dans le Tableau 3 de la référence).

L'image du MEB (Figure-A XIII-1g de l'ANNEXE XIII) révèle la perte des agglomérats de particules rondes de CPO pour de fines plaquettes (Ca/P mesuré $\sim 1,1$) à pH 5 semblables à celles observées à 4°C bien que les spectres FTIR de ces deux échantillons soient différents. Le ratio Ca/P mesuré se rapproche d'ailleurs de celui de la brushite à 1 (Uskoković & Uskoković, 2011). Le recouvrement à pH 11 (Figure-A XIII-1h) génère des amas de particules sous forme d'aiguilles (non présentés, Ca/P mesuré $\sim 7,5$) et ces aiguilles se retrouvent également entre les agglomérats de particules (Ca/P mesuré $\sim 4,4$) qui semblent être plus petits que ceux du CPO_ctrl. Les aiguilles et bâtonnets seraient des cristaux d'HAp développés en direction de l'axe c (Diez-Escudero et al., 2024) et cette forme aciculaire est rapportée ailleurs en pH alcalin (Ito et al., 2008). La structure lamellaire n'est pas observée à pH 11. La Figure-A XIII-3b) confirme qu'un recouvrement uniforme à base de phosphore s'est formé à la surface des particules lorsque recouvertes à pH 11. **En résumé :** les plaquettes de brushite ont remplacé les particules de CPO ce qui explique l'absence de relargage à pH 5. Malgré le fait que le recouvrement à pH 11 n'ait pas modifié les profils de relargage, un fin recouvrement de phosphate de calcium (ratio Ca/P mesuré élevé et CPO détecté au FTIR) semble s'être tout de même formé à la surface des particules.

3.2.12 Effet du ratio Ca/P lors du recouvrement

Relargage : Le processus de recouvrement des particules de CaO_2 a été effectué dans des tampons phosphate de molarités plus faibles afin d'augmenter le ratio Ca/P de 0,14 (CPO_ctrl)

à 1, 1,67 ou 2. Le relargage d' H_2O_2 (Figure 3.22) des CPO_CaP1, CPO_CaP1.67 et CPO_CaP2, significativement plus élevé que celui du CPO_ctrl, montre un *burst release* important au jour 0 semblable à celui du CPO_pH11 et du CPO non recouvert. Cependant, l'effet du ratio Ca/P sur l' O_2 (Figure 3.23a) n'est observable qu'au jour 0 (*burst release* pour $\text{Ca/P} \geq 1$) puisque la courbe descend rapidement à des valeurs très faibles d'oxygène dans le gel. **En résumé** : augmenter le ratio Ca/P en solution résulte en un profil de relargage semblable à celui du CPO.

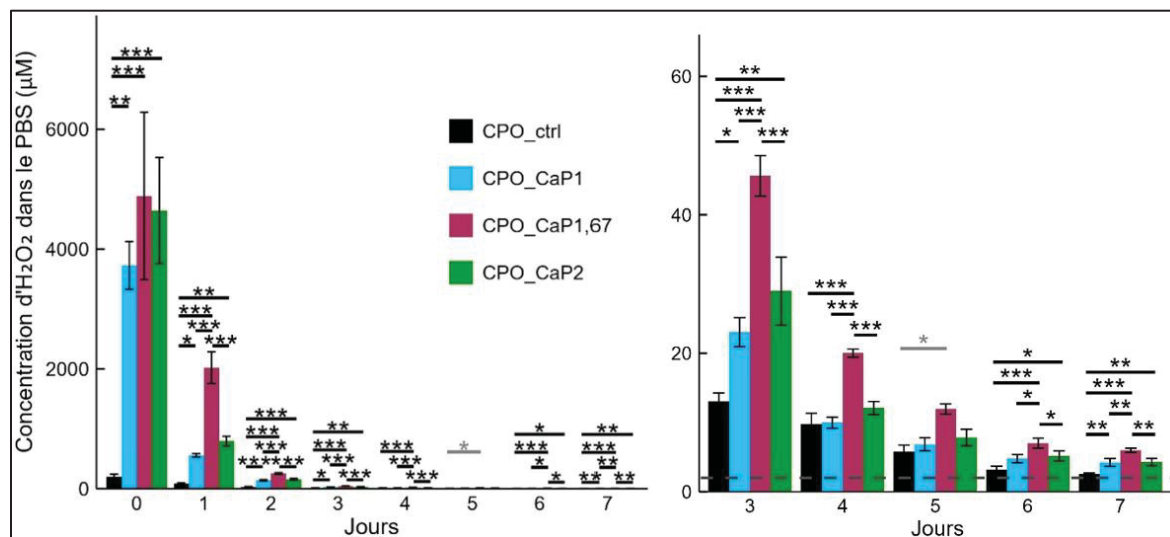


Figure 3.22 **Gauche** : concentration quotidienne d' H_2O_2 relargué des hydrogels dans le PBS en hypoxie sur 7 jours en fonction du ratio Ca/P dans le tampon phosphate, soit $\text{Ca/P} = 0,14$ (CPO_ctrl) et $\text{Ca/P} = 1$ à 2. **Droite** : agrandissement sur les données des jours 3 à 7. One-way ANOVA pour tous les *time points* (sauf jour 5 : Kruskal-Wallis). $N=1$, $n=3$

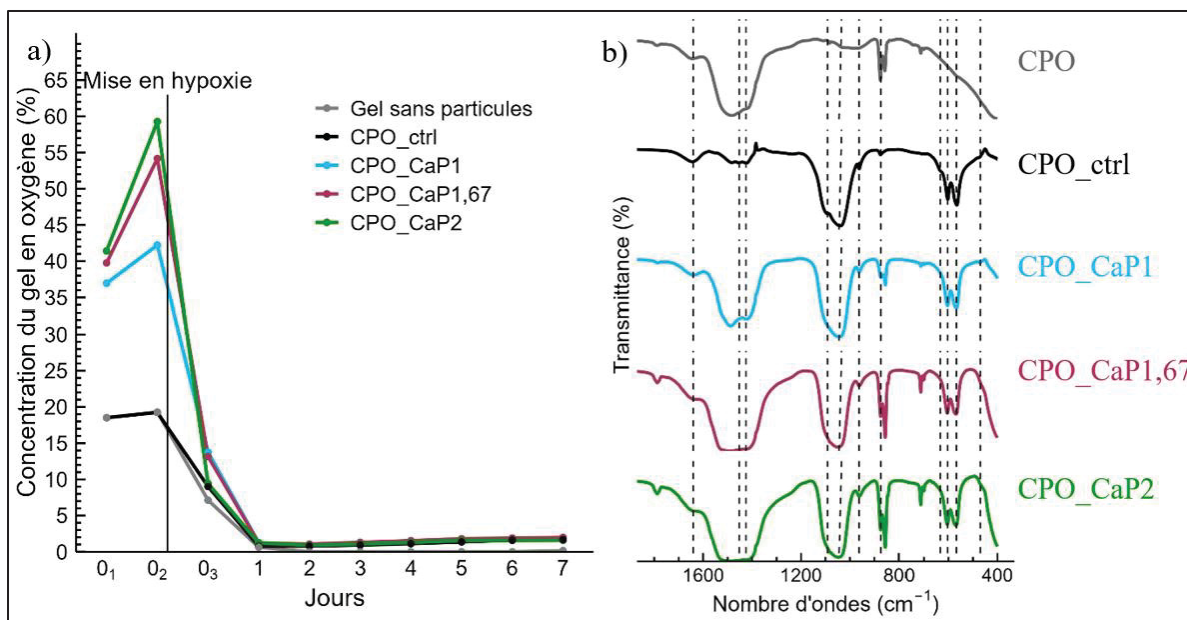


Figure 3.23 (a) Concentration d'O₂ relargué dans les hydrogels en hypoxie sur 7 jours en fonction du ratio Ca/P dans le tampon phosphate, soit Ca/P = 0,14 (CPO_ctrl) et Ca/P = 1 à 2. N=1, n=1. (b) Spectres FTIR des particules de CPO (aucun recouvrement) et du CPO recouvert à différents ratios Ca/P normalisés à 1044 cm⁻¹ (CPO normalisé à 1482 cm⁻¹)

Caractérisation : Les observations pour les spectres FTIR des CPO_CaP1, CPO_CaP1,67 et CPO_CaP2 sont similaires à celles du CPO_pH11 où le CPO et un phosphate de calcium, potentiellement l'HAp, sont détectés (Figure 3.23b). Les images du MEB pour les particules recouvertes à Ca/P = 1,67 (Figure-A XIII-1i de l'ANNEXE XIII) montrent également des résultats semblables à ceux recouvert à pH 11 avec des petits bâtonnets plus épais (non présentés) pouvant survenir avec des ratios Ca/P près de 1,67 (Zhang & Darvell, 2011). La Figure-A XIII-3c suggère un recouvrement uniforme de phosphore à la surface des particules recouvertes dans le tampon phosphate avec un Ca/P = 1,67 (Ca/P mesuré ~6,8) comme à pH 11. Concernant la nature du phosphate de calcium formé il pourrait s'agir d'apatite déficiente en calcium (Mekmene et al., 2009) ou d'HAp (Šimková & Šulcová, 2019). **En résumé :** comme avec le pH 11, le recouvrement minime de phosphate de calcium formé à plus hauts ratios Ca/P ne modifie pas les profils de relargage.

3.2.13 Effet de la température de séchage

Relargage : Lorsque les particules sont séchées à température pièce (CPO_dRT) au lieu de 70°C (CPO_ctrl), un relargage plus important d'H₂O₂ se produit durant les premiers jours (ANNEXE XV, Figure-A XV-1) et le relargage d'O₂ (Figure 3.24a) semble également plus élevé, et ce, tout au long de l'expérience. Toutefois, les barres d'erreur importantes d'O₂ indiquent que le protocole final de mise en hypoxie est à optimiser. En effet, les répliques du contrôle sans particules n'atteignent pas 0% O₂ le même jour et dans le cas du CPO_ctrl, l'un des répliques a atteint ~0% au jour 2 et l'autre est demeuré à ~5% jusqu'au jour 7. Il est donc difficile de savoir si le CPO_ctrl libère de l'O₂ ou si la vitesse de diffusion de l'O₂ hors du gel varie entre les répliques. Un équilibrage des produits dans une station hypoxique à ~0% d'O₂ avant les expériences est donc primordial pour la stabilité des résultats.

Caractérisation : Les images du MEB pour les particules recouvertes pendant 60 min et séchées à température pièce (Figure-A XIII-1j, l'ANNEXE XIII ou Figure 3.24b) (Ca/P mesuré ~1,6) indiquent la présence claire d'une surface lamellaire avec des pores potentiellement plus grands que ceux du CPO_ctrl et l'absence de petites particules. **En résumé** : la porosité pourrait expliquer le relargage plus important de produits.

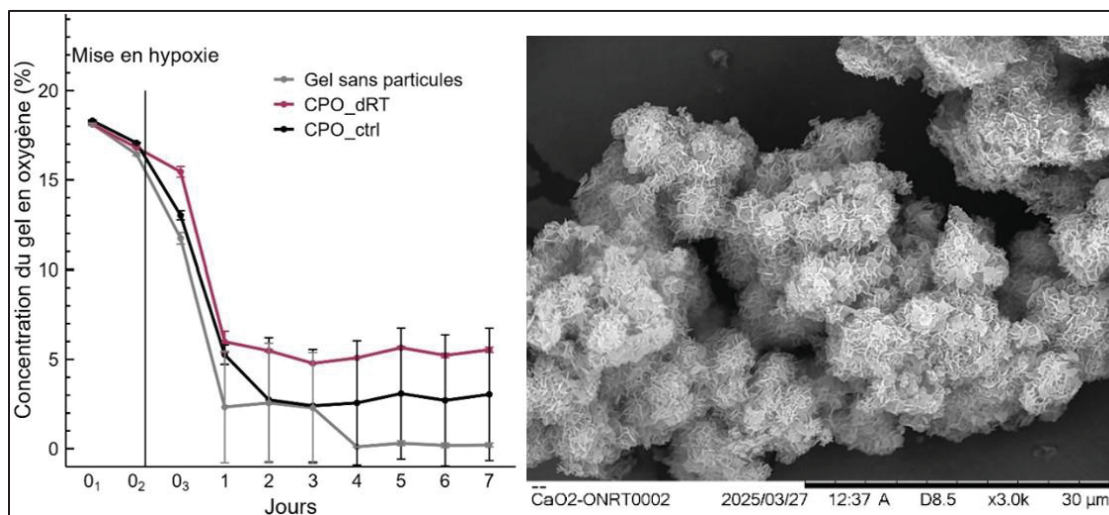


Figure 3.24 (a) Concentration d'O₂ relarguée dans les hydrogels en hypoxie sur 7 jours en fonction de la température de séchage des particules après le recouvrement, soit température pièce (CPO_dRT) et 70°C (CPO_ctrl). N=1, n=2. (b) Image obtenue du MEB par électrons rétrodiffusés à 15 kV des particules CPO_dRT. Échelle : 30 μm

3.2.14 Effet de la concentration des particules dans les hydrogels (relargage d'O₂ seulement)

Afin d'analyser les effets de la concentration des particules dans le gel sur la quantité d'O₂ relargué, des particules de CPO (non recouvertes, Figure 3.25a) ou de CPO_ctrl (recouvertes, Figure 3.25b) sont encapsulées à des concentrations bien supérieures à celles proposées par Tomioka et al. (2023) et pouvant atteindre 30 – 60 mg/mL. De plus, ces expériences utilisent un volume de 500 µL de gel par puit au lieu de 200 µL ce qui augmente davantage la masse totale de particules présentes dans le puit. Dans le cas du CPO, plus la concentration de particules augmente, plus la quantité d'O₂ relargué augmente mais pas de façon proportionnelle. Par conséquent, tripler la concentration de 10 à 30 mg de particules par mL ne résulte pas en un *burst release* d'O₂ 3x plus élevé mais cela permet un relargage d'O₂ plus important entre les jours 1 et 7 (Figure 3.25a). Comme il a été observé dans les sections 3.2.10 à 3.2.12, le CPO_ctrl ne semble pas relarguer d'O₂ puisqu'il se situe toujours très près de la courbe contrôle sans particules. Globalement, augmenter la concentration de particules de 10 à 60 mg/mL ne change pas les quantités d'O₂ détectées lorsqu'un volume de 200 µL de gel par puit est utilisé (données non présentées). Cependant, augmenter le volume à 500 µL permet d'augmenter suffisamment la masse de particules dans les puits pour pouvoir détecter, au jour 0, une augmentation (non proportionnelle) dans la quantité d'O₂ produit avec la concentration de particules recouvertes (Figure 3.25b). L'effet de la concentration est toutefois perdu dès le jour 1. **En résumé** : augmenter la concentration en particules permet d'augmenter (non proportionnellement) l'intensité et la durée du relargage pour le CPO mais, pour le CPO_ctrl, il faut augmenter le volume et la concentration davantage avant de pouvoir constater les effets (visibles qu'au jour 0) sur le relargage puisque les particules ne relarguent que peu de produits.

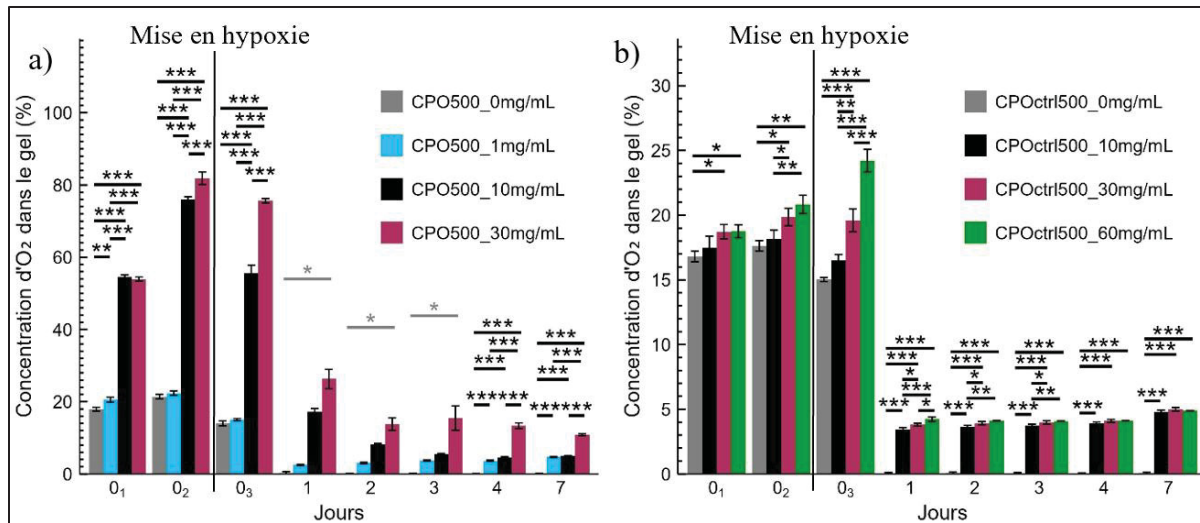


Figure 3.25 Concentration d'O₂ relargué dans les hydrogels en hypoxie sur 7 jours en fonction de la concentration dans le gel de particules (a) non recouvertes (CPO) et (b) recouvertes (CPO_ctrl). Données au jour 0₃ collectées après 1 heure au lieu de 3 heures. 500 μ L de gel par puits au lieu de 200 μ L. One-way ANOVA pour tous les *time points* (sauf a jours 1 à 3 : Kruskal-Wallis). N=1, n=3

Les courbes d'O₂ en lien avec les effets du temps d'agitation (Figure 3.18a), du pH (Figure 3.21a) et du ratio Ca/P (Figure 3.23a) se situent, entre les jours 1 et 7, à une valeur constante de ~1 – 2% O₂ (groupe 1). Les courbes ici pour les particules recouvertes (Figure 3.25b) se situent plutôt à ~3 – 4% O₂ entre ces mêmes jours (groupe 2). Le CPO finit par atteindre le même plateau à ~3 – 4% O₂ mais plus tard car il relargue plus longtemps (Figure 3.25a). Ces plateaux (1 – 2% ou 3 – 4%) suggèrent un relargage d'O₂ faible mais constant pendant 7 jours puisque le contrôle négatif sans particules est ~0% O₂ dans tous les cas. Toutefois, une raison autre que le relargage d'O₂ pourrait expliquer la présence de ces plateaux. En effet, toutes les courbes du groupe 1 se situent aux mêmes valeurs d'O₂ à partir du jour 1, et ce, peu importe les paramètres de recouvrement utilisés et le relargage initial (*burst release*) au jour 0. Comme mentionné dans la section 3.2.11, toutes les particules de CaO₂ dans le tampon phosphate de pH 5 se reprécipitent en brushite ce qui résulte en la perte des particules de CaO₂ et donc en l'absence de relargage d'H₂O₂. Il devrait en être de même pour l'O₂ dont la courbe suit pourtant celles des autres conditions du groupe 1. Une hypothèse serait que la présence de particules interférerait avec le signal fluorescent et affecterait donc la quantité d'O₂ détectée par l'oxygénomètre. Les observations supportent cette hypothèse puisque tous les échantillons du

groupe 1 ont la même concentration de particules et présentent donc un plateau situé aux mêmes valeurs d'O₂ (~1 – 2% O₂). Lorsque la concentration de particules augmente, comme c'est le cas entre les groupes 1 et 2, la valeur du plateau en fait de même (~ 3 – 4% O₂). Ainsi, ces plateaux seraient un signal de fond et les particules ne relargueraient aucun O₂ en quantité détectable. Enfin, ce bruit de fond n'est pas toujours visible au jour 0 potentiellement à cause de la formation incomplète du gel ainsi que de la présence d'O₂ de l'air dissout dans les échantillons. **En résumé** : il semble plus probable que les échantillons des groupes 1 et 2 ne relarguent pas assez d'O₂ à partir du jour 1 pour être détectable et que les valeurs observées à partir de ce moment soient un bruit de fond causé par la présence de particules.

CHAPITRE 4

DISCUSSION

La thérapie cellulaire adoptive offre une alternative prometteuse aux traitements actuels contre le cancer. L'encapsulation des cellules T dans une matrice pourrait en améliorer l'efficacité, mais l'accès limité aux nutriments et à l'oxygène avant la formation de vaisseaux sanguins pourrait s'avérer difficile pour les cellules qui risquent alors d'entrer en hypoxie. Ce projet se concentre donc sur le développement d'un hydrogel riche en oxygène pour la thérapie cellulaire adoptive (ACT) locale.

4.1 Objectif 1 : Caractérisation du comportement des cellules immunitaires en hypoxie

La littérature suggère que l'hypoxie peut entraîner des répercussions sur le phénotype, la prolifération, la viabilité, le métabolisme et la production de cytokines et de récepteurs pour les cellules T. Le premier objectif de ce projet a été de caractériser la réponse cellulaire sur 7 à 14 jours en hypoxie pour trois lignées différentes. Les principales observations pour les cellules Jurkat et OT-I sont résumées et discutées ci-dessous. Les cellules mononuclées de sang périphérique (PBMCs) n'ont pas mené à des résultats fiables et utiles au projet et sont seulement discutés dans l'ANNEXE VI.

4.1.1 Cellules T Jurkat

Malgré les effets négatifs de l'hypoxie sur la prolifération, c'est lorsque les deux agents stressants (hypoxie et milieu faible en sérum) sont combinés que la diminution de la prolifération et de la viabilité est la plus marquée et qu'une courbe d'activité métabolique relativement constante au lieu de fortement croissante est obtenue. Les courbes de prolifération de cellules de leucémie aiguë lymphoblastique de type T (T-ALL) en hypoxie et en normoxie de Fahy et al. (2021) sur 21 jours semblent suivre une tendance similaire à celle de l'activité métabolique en milieu faible en sérum obtenue ici pour les Jurkat. Ils constatent également que

l'hypoxie diminue la prolifération et augmente la mort cellulaire, mais que cet état est réversible lorsque de retour en normoxie après 3 semaines passées en hypoxie. Ainsi, selon ces résultats, les Jurkat de la présente étude entreraient dans un état de « dormance » temporaire lorsqu'en hypoxie (et en milieu faible en sérum) ce qui expliquerait la courbe d'activité métabolique observée. Les courbes d'activité métabolique des Jurkat en milieu régulier se rapprochent davantage de la tendance suivie par les courbes de prolifération de Kim et al. (2008) bien que la prolifération et la viabilité en hypoxie dans le présent projet soient plus élevées que ce que les auteurs ont observé. Toutefois, une stimulation de la prolifération en hypoxie des cellules Jurkat, grâce à la voie de signalisation Notch1 rapportée par Zou et al. (2013), n'a pas été observée ici. Enfin, les travaux de Davern et al. (2023) ont également combiné hypoxie et carence en sérum sur des cellules T humaines et suggèrent que la diminution en acides aminés et en nutriments disponibles qui en résulte affecterait la fabrication de certaines protéines. En résumé, les Jurkat seraient un modèle cellulaire intéressant pour tester la future matrice oxygénée vu leur réponse marquée lorsqu'en hypoxie et en manque de sérum.

4.1.2 Cellules T CD8⁺ murines (OT-I)

Une baisse de la prolifération/activité métabolique ainsi qu'une augmentation de la mort cellulaire (en périphérie des gels) ont été observées avec le temps en hypoxie et en normoxie. L'hypoxie semble diminuer la prolifération, augmenter l'expression du CD25 et des marqueurs d'épuisement (quoique les effets soient minimes) et stimuler les phénotypes mémoire centrale et potentiellement effecteur. Aucune différence significative entre l'hypoxie et la normoxie n'est constatée pour l'activité métabolique. De plus, une évaluation visuelle des essais *live/dead* ne permet pas de conclure en une mort cellulaire plus ou moins importante en hypoxie.

Certains de ces résultats préliminaires concordent avec la littérature présentée à la section 1.3.2. En effet, des travaux cités la revue de la littérature suggèrent aussi baisse de la prolifération et une augmentation du CD25 en hypoxie (Cunha et al., 2023; Vuillefroy de Silly

et al., 2015). Neitzke-Montinelli et al. (2022) ont obtenu un phénotype mémoire centrale majoritaire avec les OT-I tout comme les travaux de ce mémoire en suivant un protocole similaire (à quelques différences près) à celui qui a été utilisé ici. La stimulation d'un phénotype effecteur en hypoxie est rapportée dans certaines études (Cunha et al., 2023; Ross et al., 2021). Enfin, l'augmentation des marqueurs d'épuisement a été constatée par d'autres équipes (Doedens et al., 2013; Gropper et al., 2017; Ross et al., 2021). En résumé, les OT-I pourraient aussi être un modèle intéressant qui devrait être investigué davantage.

4.1.3 Limitations

Les principales limitations concernent l'analyse par cytométrie de flux des cellules OT-I. L'expérience a été effectuée une seule fois et doit donc être répétée afin de confirmer les résultats obtenus et ainsi avoir des conclusions plus robustes et fiables. De l'optimisation est aussi requise dans l'analyse avec le cytomètre et dans les protocoles de culture des cellules dans les gels afin d'obtenir de meilleurs signaux pour les cellules encapsulées ainsi qu'une plus grande population de cellules récupérées des gels.

4.1.4 Résumé et recommandations

L'objectif de la caractérisation de la réponse cellulaire en hypoxie était avant tout de trouver un modèle cellulaire montrant des différences avec la réponse normoxique afin d'être utilisé pour vérifier les effets des matrices riches en oxygène. Les cellules Jurkat en milieu faible en sérum seraient un modèle intéressant pour des analyses préliminaires puisqu'une réponse hypoxique est clairement observée dans les essais simples et peu coûteux de *live/dead* et d'activité métabolique. Toutefois, les cellules OT-I seraient un meilleur modèle à plus long terme puisque les changements dans l'activation/phénotype, la prolifération et l'épuisement en hypoxie pourraient être réévalués avec la matrice riche en oxygène et ce modèle pourrait également être utilisé dans des essais *in vivo* une fois la matrice mise au point. De plus, les effets de la matrice en conditions hypoxiques et d'activation continue des OT-I (comme dans le cas de *killing assays*) pourraient servir à évaluer la cytotoxicité des cellules. Aussi, puisque les cellules semblent adopter la glycolyse en hypoxie (section 1.3.2), mais qu'*in vivo* les

nutriments sont aussi limités que l'oxygène, il serait intéressant de répéter les tests avec les OT-I mais dans un milieu pauvre en glucose semblable aux travaux de Davern et al. (2023). Bien que le modèle actuel avec les PBMCs dans ce mémoire ne soit pas adéquat pour être utilisé avec les matrices oxygénées, un modèle avec des cellules T humaines devra être mis au point dans le futur si des résultats *in vivo* prometteurs sont obtenus. Dans tous les cas, la détection du facteur induit par l'hypoxie HIF-1 α par transfert de Western pourrait s'avérer utile afin de confirmer que les effets de la matrice permettent réellement d'améliorer l'état hypoxique des cellules et des tests plus approfondis sur la viabilité pourraient également être entrepris.

4.2 Objectif 2 : Développement de méthodes pour la caractérisation et l'optimisation des particules de CaO₂, recouvertes d'HAp, relarguant du H₂O₂ et de l'O₂ pour l'oxygénation des matrices

Ce projet étant nouveau dans le laboratoire, un résultat important est la mise au point de protocoles, notamment pour la détection de l'oxygène (O₂) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), ainsi que des techniques de caractérisation qui ont permis d'explorer le potentiel des particules de peroxyde de calcium (CaO₂) pour oxygéner les matrices et tenter d'optimiser les profils de relargage.

En effet, les particules de CaO₂ (sans recouvrement) augmentent fortement le pH, mènent à une précipitation des gels et surtout à un relargage de produits très élevé, sous forme de *burst release*, incluant le peroxyde d'hydrogène potentiellement toxique pour les cellules selon la concentration libérée. La catalase décompose l'H₂O₂ en O₂ et en eau et permet d'éliminer le *burst release* d'H₂O₂ sans toutefois mener à un relargage prolongé sur plusieurs jours. Basé sur les travaux de Tomioka et al. (2023), les particules ont été recouvertes d'hydroxyapatite (HAp) afin de réduire la réaction entre le CaO₂ et l'eau et donc d'éliminer le *burst release* de produits qui serait remplacé par un relargage constant et prolongé.

Cependant, ce recouvrement s'avère trop efficace car il empêche presque tout relargage. Dans ce travail, une optimisation a été tentée afin d'obtenir un profil de relargage constant, prolongé

et contrôlé d'oxygène en modifiant le revêtement de phosphate de calcium. Afin de mieux comprendre les effets des paramètres de recouvrement comme la température, le ratio calcium/phosphore (Ca/P), le pH, le temps, etc., qui correspondent également aux facteurs influents dans la formation de l'HAp (section 1.5.2), chaque paramètre a été modifié, les particules, caractérisées et les profils de relargage d'O₂ et d'H₂O₂, mesurés. Les résultats principaux concernant les profils de relargage sont résumés dans le Tableau 4.1. Malheureusement, aucune condition n'a permis d'atteindre complètement l'objectif visé, soit un relargage d'oxygène prolongé dans les gels. Trois tendances principales sont observées et expliquées ci-dessous en fonction du type et de la morphologie de phosphate de calcium qui se forme lors du procédé de recouvrement. Les mesures d'O₂ ayant une validité limitée (voir section 3.2.3), l'analyse a été effectuée surtout en se basant sur l'H₂O₂.

Tableau 4.1 Résultats globaux des effets engendrés par les modifications au processus de recouvrement des particules de CaO₂ et des conditions de « culture » des hydrogels contenant les particules sur les profils de relargage des produits (H₂O₂ et O₂)

# Groupe	Profil de relargage des produits*	Échantillons
1-Perte du <i>burst release</i>	-<i>Burst release</i> initial : réduction (H₂O₂) ou perte (O₂) -Prolongation du relargage : non prolongé (H₂O₂), aucun relargage détecté (O₂)	-CPO_ctrl -CPO_ctrl_seul (sans gel) -CPO_500 (tampon phosphate 500 mM) -CPO_MQ (gel recouvert d'eau) -CPO_CM (gel recouvert de milieu) -CPO_RT (tampon à température pièce) -CPOctrl500_10 à 60mg/mL (augmentation [CPO_ctrl] dans gel, aucune donnée d'H₂O₂)
2-Aucun changement	-<i>Burst release</i> : présent (H₂O₂ et O₂) -Prolongation : non prolongé/aucun relargage détecté après <i>burst release</i> (H₂O₂ et O₂)	-CPO (non recouvert) -CPO_H2O (eau au lieu du tampon) -CPO_1min (1 min dans tampon) -CPO_pH11 (tampon pH 11) -CPO_CaP1 (Ca/P=1 dans tampon)

# Groupe	Profil de relargage des produits*	Échantillons
		-CPO_CaP1.67 (Ca/P=1,67 dans tampon) -CPO_CaP2 (Ca/P=2 dans tampon)
3-Perte du relargage	- <i>Burst release</i> : perte complète (H ₂ O ₂ et O ₂) -Prolongation : aucun relargage détecté (H ₂ O ₂ et O ₂)	-CPO_4 (tampon à 4°C) -CPO_pH5 (tampon pH 5)
4-Hybride 1&2	- <i>Burst release</i> : -Réduit (H ₂ O ₂) -Retardé (CPO_seul) (O ₂) -Absent (CPO_dRT) (O ₂) -Prolongation : -Non prolongé (H ₂ O ₂) -Aucun relargage détecté après <i>burst release</i> (CPO_seul) (O ₂) -Léger relargage détecté (CPO_dRT) (O ₂)	-CPO_seul (sans gel) -CPO_dRT (séchage à température pièce)
5-Ajout de catalase	- <i>Burst release</i> : perte complète (H ₂ O ₂), augmente si un <i>burst release</i> d'H ₂ O ₂ est présent sans catalase (O ₂) -Prolongation : aucun relargage détecté (H ₂ O ₂), aucune donnée après jour 0 (O ₂)	-CPO_cat (non recouvert) -CPO_ctrl_cat (recouvert ctrl)
6-Léger prolongement du relargage	- <i>Burst release</i> : -Réduit (CPO_50) (H ₂ O ₂) -Perte complète (CPO_50) (O ₂) -Augmente avec la [CPO] dans le gel mais pas proportionnellement (O ₂) -Prolongation : -Prolongé mais pas constant (CPO_50) (H ₂ O ₂) -Aucune donnée après jour 0 (CPO_50) (O ₂) -Augmente selon la [CPO] dans le gel (O ₂)	-CPO_50 (tampon à 50°C) -CPO500_1 à 30mg/mL (augmentation [CPO] dans gel, aucune donnée d'H ₂ O ₂)

*Note : certaines des observations d'O₂ ou d'H₂O₂ ne sont pas disponibles pour tous les échantillons du groupe

4.2.1 Tendances de relargage observées dans ce projet

Tendance 1 – Perte du *burst release* initial (Tableau 4.1, groupe 1) : Le principal échantillon de cette catégorie est le CPO recouvert avec les paramètres contrôles (CPO_ctrl) inspiré des travaux de Tomioka et al. (2023). Les résultats de ce mémoire montrent que les particules CPO_ctrl relarguent peu de produits (perte du *burst release*), ne causant donc aucun changement au pH des gels ni aux propriétés mécaniques, et le relargage n'est pas prolongé. Dans le cas de l'O₂, aucun relargage n'a été détecté. Les courbes d'O₂ de Tomioka et al. (2023) montrent d'importantes différences avec celles obtenues ici. En effet, ils détectent un relargage initial très important d'O₂ qui varie en intensité selon les concentrations de 2,5, 5 et 10 mg de particules/mL de gel. Les courbes diminuent avec le temps mais demeurent au-dessus du contrôle négatif jusqu'au jour 10 (maximum). Dans ce mémoire, il faut augmenter la concentration de particules (10 à 60 mg/mL) et même le volume de gel (500 µL) à des valeurs bien supérieures à celles de Tomioka et al. (2023) avant de voir une augmentation du relargage avec la concentration et cet effet n'est visible qu'au jour 0 principalement. En bref, des valeurs d'O₂ beaucoup plus élevées pour le CPO_ctrl étaient attendues dans le présent projet, d'autant plus qu'aucune différence avec Tomioka et al. (2023) concernant la caractérisation des particules n'est observée. En effet, dans ce mémoire, les images du microscope électronique à balayage (MEB) du CPO_ctrl et le recouvrement, identifié comme de l'HAp à cause des pics caractéristiques présents dans les spectres obtenus par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) et de diffraction des rayons X (XRD), concordent avec les résultats de Tomioka et al. (2023) même s'ils ont utilisé un tampon de 500 mM au lieu de 100 mM. Ainsi, la caractérisation ne fournit aucune explication sur la raison de la disparité dans les profils d'O₂ de ce mémoire et ceux de Tomioka et al. (2023). Il faut cependant noter certaines différences méthodologiques entre les deux études : Tomioka et al. (2023) ont fait les mesures d'O₂ dans le milieu des gels plutôt que dans ces derniers, la catalase était présente en tout temps, des hydrogels de gélatine sont utilisés et les particules sont recouvertes dans du tampon phosphate

500 mM. De plus, il y a de petites différences de protocole de recouvrement. Les particules sont séchées sous pression réduite ce qui n'est pas le cas ici. Ce mémoire suggère que sécher les particules à plus basse température (température pièce au lieu de 70°C) semble augmenter légèrement les pores de la structure lamellaire (et donc les produits relargués, Tableau 4.1, groupe 4) puisque le réseau lamellaire durant le séchage à 70°C se compacterait, imperméabilisant davantage les particules de CaO_2 . En effet, l'augmentation de la température résulte en un développement plus important et plus rapide de l'HAp (Elhendawi, Felfel, Abd El-Hady, & Reicha, 2014). Le temps de vieillissement affecte aussi sa structure cristalline (Saharudin et al., 2019). Le séchage sous pression réduite de Tomioka et al. (2023) à 80°C réduit, non pas la température de séchage, mais la durée. Dans les deux cas, il se pourrait que le recouvrement d'HAp n'ait pas autant de temps pour se développer/compacter durant le séchage et qu'une structure plus poreuse, permettant une plus grande quantité d' O_2 d'être relarguée, soit obtenue (la présence de catalase dans leur étude augmenterait encore plus ce rendement).

D'autres modifications au processus de recouvrement dans le présent projet, soit utiliser un tampon phosphate de 500 mM ou à température pièce, ont résulté en des profils de relargage d' H_2O_2 similaires à ceux du CPO_ctrl. Il en va de même lorsque les hydrogels sont couverts d'eau ultra pure ou de milieu complet à Jurkat, bien que le milieu (remplaçant le PBS dans les tests cellulaires) ait montré une tendance vers des valeurs plus faibles qui devront être réévaluées. La présence du gel n'est toutefois pas responsable des faibles relargages du CPO_ctrl puisque les particules non encapsulées n'augmentent pas le rendement. En résumé, les paramètres de cette section ne permettent pas un relargage de produits en continu bien que le *burst release* soit grandement diminué.

Tendance 2 – Recouvrement sans effets (Tableau 4.1, groupe 2) : Les particules recouvertes à pH 11 ou à ratios Ca/P 1, 1,67 ou 2 montrent toutes un important *burst release* d' H_2O_2 et d' O_2 semblable à celui du CPO, mais aucun relargage prolongé. La répartition homogène du phosphore à la surface des particules ainsi que la présence de pics de l'HAp dans les spectres obtenus par FTIR suggèrent qu'un recouvrement de phosphate de calcium est bien présent mais

trop limité pour interférer dans la réaction entre le CaO_2 (également détecté dans les spectres) et l'eau. D'autres indices confirmant qu'un recouvrement peu développé et mince se soit formé incluent l'absence d'une surface lamellaire et la présence de petits amas de particules, en particulier pour $\text{Ca/P}=1,67$, qui n'auraient pas été regroupés par un « voile » d'HAp (comme il semble être le cas, par exemple, avec le recouvrement de 5 min). De plus, les ratios Ca/P mesurés par EDX sont bien supérieurs à celui de l'HAp, ce qui suggère qu'une partie du calcium du CaO_2 sous la couche mince de phosphate de calcium soit aussi détectée. Un recouvrement limité expliquerait les profils de relargage semblables à ceux du CPO et serait causé par le manque d'ions calcium (pH 11) ou phosphate (Ca/P 1, 1,167 ou 2). En effet, puisque la solubilité du CaO_2 diminue avec l'augmentation du pH (section 1.4.3.1), moins d'ions calcium seraient disponibles en solution pour commencer et/ou entretenir la formation de l'HAp. Il en va de même pour les tampons phosphate de faibles molarités (pour le recouvrement à Ca/P 1, 1,67 et 2) qui réduiraient plutôt la présence d'ions phosphate. Dans tous les cas, ces paramètres de recouvrement ne permettent pas d'améliorer le profil de relargage en *burst release* du CPO.

Raccourcir le temps d'agitation dans le tampon phosphate pourrait également limiter le recouvrement puisque le temps alloué pour la formation de l'HAp serait plus restreint. Les particules recouvertes pendant une minute (CPO_1min) dans le tampon ont montré un profil de relargage hybride entre celui du CPO et du CPO_ctrl (60 min) puisqu'un *burst release* d' H_2O_2 et d' O_2 , quoique plus faible que celui du CPO, est généré. L'hypothèse d'un recouvrement plus mince pour CPO_1min est également soutenue par les spectres FTIR et XRD qui montrent la présence de CPO (en plus du phosphate de calcium) après 1 min (et parfois même 5 min) de recouvrement mais plus après 60 min et les ratios Ca/P mesurés par EDX. Le recouvrement lamellaire potentiellement moins dense et développé pour CPO_1min que CPO_ctrl pourrait être à l'origine du relargage plus important de produits. Par conséquent, réduire le temps d'agitation ne fait qu'augmenter le relargage initial mais ne prolonge pas la durée du relargage.

Tendance 3 – Modifications majeures des particules (Tableau 4.1, groupe 3) : Ce groupe inclut les recouvrements à 4°C et à pH 5 qui engendrent tous deux de fines plaquettes absentes dans le cas du CPO et des autres conditions. Ces plaquettes ne semblent contenir aucun CaO_2 et semblent s'être formées au détriment des particules de CaO_2 . Par conséquent, aucun relargage de produits n'est détecté ce qui n'est d'aucune utilité dans ce projet.

Les plaquettes (potentiellement d'HAp non stœchiométrique) formées à 4°C pourraient être initialement composées d'un phosphate de calcium métastable sur lequel l'HAp se serait ensuite formée (Diez-Escudero et al., 2024). Ces plaquettes ne sont pas observées lors des recouvrements à plus hautes températures ce qui pourrait signifier qu'un autre mécanisme de formation ait alors été employé. En effet, les basses températures diminuent la vitesse de formation de l'HAp (Brown & Fulmer, 1991) et génèrent un processus de formation différent de celui des températures plus élevées (Fulmer & Brown, 1993). Pour le pH 5, les particules de CaO_2 (ayant une solubilité accrue en pH acide (section 1.4.3.1)) semblent se dissoudre très rapidement avant de se reprécipiter en plaquettes de brushite (également retrouvées ailleurs à un pH similaire (Boanini, Silingardi, Gazzano, & Bigi, 2021; Toshima et al., 2014)). Par conséquent, ces paramètres de recouvrement ne peuvent pas être utilisés puisqu'ils résultent en la perte partielle ou totale des particules de CaO_2 et, par conséquent, des produits relargués.

4.2.2 Difficultés à situer les travaux avec ceux de la littérature et critères de relargage d'une matrice oxygénée « idéale »

Il n'est pas possible de comparer directement les courbes de relargage d' O_2 obtenues dans ce mémoire avec celles observées dans d'autres études que celle de Tomioka et al. (2023) puisque la diversité des systèmes employés ainsi que la durée de l'étude, la concentration de CaO_2 dans les matrices, le volume de matrice utilisé, les conditions hypoxiques, la méthode pour mesurer l' O_2 et les unités de mesure de l' O_2 vont varier grandement d'une référence à l'autre. De plus, l'information sur la masse de CaO_2 utilisée pour générer les courbes, et qui affecte la quantité d' O_2 relargué, est parfois difficile à trouver. Toutefois, la tendance globale retrouvée chez la plupart des courbes de relargage d' O_2 dans les divers travaux mentionnés dans la revue de la littérature montrent une concentration initiale en oxygène plus élevée qui diminue avec le

temps au lieu d'un relargage plus constant comme souhaité dans le présent projet. Cette tendance montre la difficulté à se départir du *burst release* intrinsèque du CPO. Certaines études semblent obtenir un relargage prolongé et plus ou moins constant selon le cas (Aleemardani et al., 2023; Liang et al., 2021; Liu et al., 2021; Xu et al., 2024), d'autres ont un relargage de moins de trois jours (Kang et al., 2019; Toftdal et al., 2021; Zou et al., 2024) et certains ont des résultats intermédiaires à ces deux tendances (Hassan et al., 2023). Un groupe s'est particulièrement démarqué (Suvarnapathaki, Nguyen, Goulopoulos, & Camci-Unal, 2023; Suvarnapathaki et al., 2021; Suvarnapathaki et al., 2022) puisque leur système à base de CPO a permis un relargage en hypoxie sur plus de 35 jours avec une augmentation croissante d' O_2 relargué (en présence de cellules ou non) jusqu'au jour 19 – 21 avant de redescendre graduellement. Le système a permis d'augmenter l'activité métabolique et la viabilité des cellules encapsulées.

Dans ce mémoire, plusieurs courbes d' H_2O_2 ont un profil semblable à la tendance générale observée dans la littérature pour les courbes d' O_2 (relargage initial plus intense qui diminue avec le temps). Les quantités d' H_2O_2 relarguées, parfois plus élevées que la limite $\sim 20 - 100 \mu M$ (section 1.4.3.3), ne posent toutefois pas de problèmes puisque la catalase s'est avérée très efficace pour décomposer l' H_2O_2 en O_2 et en eau. En effet, elle a permis d'éliminer complètement le relargage d' H_2O_2 et a intensifié le relargage d' O_2 pour le CPO (Tableau 4.1, groupe 5). Cependant, le relargage d' O_2 (s'il y en a) par les particules recouvertes obtenu ici dépasse rarement le jour 0 car, après ce moment, il est trop faible pour être détecté. Un relargage d' O_2 « idéal » dans ce projet serait semblable au schéma avec recouvrement de la Figure 1.8, soit une absence de *burst release* et un relargage constant autour de 5% (physiologie, section 1.3.1) sur quelques semaines (durant le processus de vascularisation la matrice *in vivo*, section 1.3.1). Les présents travaux présentent les résultats préliminaires issus du développement des méthodes pour la détection de produits et le recouvrement du CaO_2 . Ces résultats informatifs sont importants dans l'avancée du projet vers l'objectif global d'oxygéner les matrices pour répondre aux besoins des cellules encapsulées. Bien que de l'optimisation soit toujours requise pour améliorer le profil de l' O_2 , certains paramètres considérés dans ce projet sont prometteurs et pourraient servir de point de départ pour de futurs travaux.

4.2.3 Paramètres prometteurs

Les particules recouvertes à 50°C ont montré un relargage parmi les plus élevés et prolongés sans avoir un important *burst release* de produits (Tableau 4.1, groupe 6). Comme mentionné dans la section 4.2.1, la température peut affecter le processus de formation de l’HAp. La caractérisation des particules ne permet toutefois pas d’expliquer les différences avec le CPO_ctrl recouvert à 37°C. En effet, les images du MEB et les spectres FTIR de ces particules recouvertes à l’une ou l’autre de ces températures sont très semblables. Des effets potentiels pourraient cependant être observés par imagerie avec électrons secondaires du MEB. Dans tous les cas, le recouvrement à 50°C a semblé plus permissif aux interactions avec l’eau, et ce, de façon plus prolongée.

Augmenter la concentration de particules à plus de 10 mg/mL dans les gels pourrait être un moyen efficace pour non seulement augmenter le rendement mais aussi prolonger le relargage. Bien que ces effets aient été moins visibles dans le cas du CPO_ctrl à cause du recouvrement trop imperméable et du faible relargage de produits, les résultats avec le CPO (non recouvert) sont intéressants. En effet, tripler la concentration de particules a légèrement augmenté l’intensité du *burst release* (de façon non proportionnelle) et a pu prolonger le relargage (Tableau 4.1, groupe 6).

4.2.4 Limitations

Puisque ce projet était le premier du laboratoire à étudier l’oxygène dans ses travaux ainsi que l’oxygénation des matrices, un travail important quant au choix des équipements et des produits à se procurer a dû être effectué. L’optimisation des protocoles, l’ajustement des méthodes et l’exploration de diverses avenues, bien que non présentés dans ce rapport, ont constitué un travail important et chronophage. Certaines limitations du projet sont donc liées au manque de temps.

Les deux premières, et les plus importantes des limitations, en sont un exemple. Elles concernent le manque de répétitions des expériences (soit N) et le nombre parfois trop faible de

réplicas (soit n) pour les mesures d' O_2 . Pour cette raison, les observations et les conclusions en lien avec le deuxième objectif sont surtout à titre informatif et fournissent un aperçu général des effets des différents paramètres de recouvrement et des conditions de « culture » des gels sur les profils de relargage. À cause de ces limitations, il est plus difficile de répondre aux critères des tests statistiques paramétriques (car peu de réplicas) et donc certains tests non paramétriques moins puissants ont dû être employés. Il a été choisi de ne pas répéter les expériences où les profils de relargage ne s'approchaient pas du comportement « idéal » mentionné à la section 4.2.2 et d'utiliser plutôt le temps et les ressources impartis afin de modifier d'autres paramètres de recouvrement dont les effets sur les profils restaient encore à découvrir. Dans le cas des mesures de relargage d' O_2 , $n = 1$ est souvent retrouvé. Puisque les expériences sont longues (du recouvrement à l'interprétation des données), différents paramètres ont été combinés dans une même expérience afin d'augmenter l'efficacité. Par exemple, les gels pour analyser l'effet du temps, du pH et du ratio Ca/P (sections 3.2.10 à 3.2.12) ont été préparés le même jour et donc la collecte d'échantillons et la prise de mesures se sont effectuées dans le cadre d'une même expérience au lieu de trois expériences distinctes. Toutefois, il n'y avait pas assez de capteurs d' O_2 pour pouvoir faire des triplicatas et tester un seul paramètre par expérience n'aurait pas réglé ce problème à certains moments. Dans tous les cas, la fiabilité et la reproductibilité des mesures d' O_2 étaient parfois incertaines, ce qui mène à la troisième limitation, soit la variabilité dans les mesures d' O_2 .

Comme mentionné dans la section 3.2.3, la mise en hypoxie et l'utilisation de l'oxymètre étaient et sont encore à optimiser. Malheureusement, cela implique que certaines courbes d' O_2 sont soit absentes ou inutilisables. Bien que la méthode #2 de mise en hypoxie soit plus efficace que la méthode #1, elle n'est pas idéale pour autant. La méthode #2 a permis de réduire de façon importante les variations dans les mesures d' O_2 mais ces dernières, ainsi que la stabilité des mesures, peuvent encore être améliorées. Ainsi, ces données peuvent être utilisées pour avoir une idée générale du profil de relargage d' O_2 mais pas pour faire de l'analyse détaillée. Par conséquent, les courbes de relargage d' H_2O_2 sont toujours requises afin de comparer avec les résultats d' O_2 .

De l'optimisation dans la détection de l' H_2O_2 était aussi requise dans le cadre de ce projet et est encore requise puisque certaines différences dans les concentrations détectées sont présentes d'une expérience à l'autre pour une même condition. Comme mentionné à la section 3.2.4, cette variation provient potentiellement de la distribution non homogène de l'échantillon dans le *working reagent* puisque le mélange des deux substances est difficile. La répartition homogène des particules dans la solution d'hydrogel est également un défi (puisque les particules vont rapidement tomber au fond de la seringue) ce qui peut expliquer en partie certaines variations dans les mesures d' H_2O_2 pour une même condition.

Il est aussi à noter que la même masse de particules est utilisée dans tous les cas (pour une concentration dans le gel donnée) ce qui implique que la masse de CaO_2 présent diminue si un recouvrement augmente la masse des particules. Le gel est également très mince au centre du puit et couvre à peine le capteur d' O_2 puisque le même volume de gel que celui dans les tests cellulaires est utilisé. En bref, de l'optimisation est encore requise pour différents aspects du projet, en particulier pour les mesures d' O_2 .

Une limitation globale en lien avec l'utilisation du CaO_2 pour oxygéner les matrices est que ce produit a fait ses preuves dans le domaine des sciences environnementales (section 1.4.3.2) mais, comme en discute Augustine, Gezek, Bostanci, Nguyen, et Camci-Unal (2023), la sécurité de son emploi dans le corps humain n'a pas encore été évaluée adéquatement. En effet, les interactions possibles avec le système, la toxicité, la distribution et l'évacuation du produit comptent parmi les aspects devant être étudiés afin de déterminer les conditions d'utilisation et les concentrations sécuritaires (Augustine et al., 2023). De plus, du calcium en provenance du CaO_2 ou du phosphate de calcium pourrait, selon la concentration, causer de l'hypercalcémie (Lun et al., 2024) ou de la calcification (M. Zhang et al., 2019). La quantification des ions calcium relargués par les particules en fonction du temps pourrait être déterminée par spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (M. Zhang et al., 2019). En bref, des analyses supplémentaires sont requises avant l'approbation du CaO_2 dans un contexte clinique.

4.2.5 Résumé et recommandations

À la suite du changement des paramètres de recouvrement des particules, trois tendances sont observées à partir des profils de relargage obtenus. Elles varient entre les deux extrêmes, soit « aucun changement dans le relargage » et « aucun relargage ». Bien qu'aucun paramètre n'ait permis d'obtenir un profil constant, prolongé et contrôlé, le recouvrement à 50°C est celui qui s'en approche le plus et augmenter la concentration des particules dans le gel pourrait potentiellement prolonger le relargage. Puisque ces paramètres sont les plus prometteurs, il serait intéressant d'effectuer un recouvrement à des températures entre 50 et 100°C pour vérifier si un relargage plus prolongé en résulte. Puisque ce mémoire n'a pas exploré la combinaison de différents paramètres modifiés en même temps, les deux paramètres (température et concentration) pourraient être combinés afin de vérifier si leurs effets sur l'intensité et le prolongement du relargage peuvent s'additionner. Dans tous les cas, les expériences devraient être répétées pour ces deux paramètres afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats. Si la concentration en H_2O_2 devient trop élevée, utiliser la catalase permet de détruire efficacement ces molécules et d'augmenter la concentration en O_2 . Si le relargage d' O_2 doit être prolongé davantage, le CaO_2 pourrait être mélangé à du peroxyde de magnésium (MgO_2) puisque, selon Waite et al. (1999), le MgO_2 pourrait relarguer l' O_2 sur une plus longue période (section 1.4.2).

En ce qui concerne les mesures d' O_2 , l'interaction entre les particules et les substances luminescentes du capteur doit être investiguée davantage afin de vérifier si les particules affectent réellement le signal. Pour ce faire, des particules d'HAp (sans CPO ou source d' O_2) seraient encapsulées dans les gels et l' O_2 serait mesuré selon le même protocole que celui utilisé dans ce mémoire afin de quantifier le signal de fond. De plus, afin d'obtenir des courbes de relargage d' O_2 qui ne soient pas affectées par la présence de l' O_2 de l'air, les mesures devraient être effectuées dans une station hypoxique, avec tous les produits préalablement désoxygénés afin d'améliorer la stabilité et la fiabilité des mesures. Enfin, la distribution des particules dans la solution d'hydrogel pourrait être évaluée par coloration avec le rouge d'alizarine S (Zhang et al., 2020) et le nombre de mélanges avec les seringues lors de la

préparation des gels pourrait être ajusté si nécessaire. La distribution des particules doit être la plus homogène possible afin que les répliques issus d'une même solution d'hydrogel ne montrent pas d'importantes variations dans la quantité de produits relargués.

Certains tests complémentaires seraient aussi pertinents. Par exemple, le séchage des particules sous vide, afin de vérifier les effets sur le recouvrement et la morphologie, devrait être effectué. De plus, l'épaisseur du recouvrement n'a pu être déterminée, mais des analyses par spectroscopie de photoélectrons X, pouvant révéler de l'information chimique allant de quelques nanomètres de profondeur à plusieurs microns grâce au profilage de profondeur par pulvérisation ionique (D. Li et al., 2024), serait un moyen possible pour y parvenir.

Une caractérisation plus approfondie des gels contenant les particules devra être effectuée. Par exemple, les propriétés mécaniques du gel devraient être caractérisées à nouveau par rhéologie lorsque les concentrations de particules dépassent 10 mg/mL pour s'assurer qu'aucun effet adverse sur l'intégrité des gels et le processus de gélification ne survienne. De plus, puisque le gel contient du phosphate et du carbonate (provenant du β -glycérophosphate disodique hydraté (BGP), hydrogénocarbonate de sodium (SHC) et du milieu de culture), des tests de dégradation et de compression des hydrogels pourraient être entrepris afin de vérifier qu'une partie du BGP ou/et du SHC n'interagisse pas avec le recouvrement d'HAp ce qui pourrait compromettre l'intégrité du gel. Les gels pourraient également être lyophilisés (semblable à Assaad et al. (2015)) et analysés au FTIR afin de vérifier si le CaO_2 ou l'HAp affectent la structure du gel ou certains groupements comme hydroxyle $-\text{OH}$ ou amine $-\text{NH}_2$. Une augmentation de l'intensité du pic à 3643 cm^{-1} (liens $\text{O} - \text{H}$ du $\text{Ca}(\text{OH})_2$) (Valor et al., 2003) pourrait aussi témoigner d'une autoencapsulation des particules durant l'expérience.

Une fois qu'un recouvrement montrant un profil de relargage prometteur sera mis au point, des tests cellulaires devront être effectués avec la matrice riche en oxygène comme mentionné dans la section 4.1 afin de répondre à un troisième objectif, qui n'a pu être investigué dans ce projet, sur les bénéfices de ces matrices sur la réponse cellulaire en hypoxie. En résumé, cette section propose certaines pistes pour améliorer le profil de relargage d' O_2 et les mesures d' O_2 ainsi

que des tests complémentaires pour permettre une meilleure caractérisation des particules et de la matrice qui les contient.

CONCLUSION

La thérapie cellulaire permet de traiter une multitude de maladies ou de conditions. La thérapie cellulaire adoptive (ACT) contre le cancer en est un exemple et l'utilisation de matrices injectables contenant des lymphocytes T pour localiser le traitement au site tumoral constitue une approche prometteuse. Toutefois, les matrices n'améliorent l'ACT que si elles assurent la survie, la prolifération ainsi que le bon fonctionnement des cellules encapsulées et l'accès à l'oxygène est l'un des paramètres clés pour atteindre cet objectif. Or, cet accès est souvent limité dans les matrices avant l'angiogenèse. Ce projet avait donc pour but de développer un hydrogel riche en oxygène pour améliorer l'ACT locale. Pour ce faire, un système comprenant des hydrogels injectables thermosensibles de chitosane combinés au générateur d'oxygène peroxyde de calcium (CaO_2) recouvert d'hydroxyapatite (HAp) et encapsulant des cellules immunitaires a été étudié.

Le premier objectif visait à caractériser la réponse hypoxique de lymphocytes T afin d'identifier un modèle cellulaire aux réponses hypoxiques et normoxiques distinctes et avec lequel tester les matrices riches en oxygène dans le futur. L'hypoxie combinée au milieu faible en sérum résulte en une baisse marquée de la prolifération, de la viabilité et de l'activité métabolique des cellules immortalisées Jurkat. Ces observations pourraient d'abord être réévaluées lors des premiers essais avec la matrice riche en oxygène. Ensuite, les résultats préliminaires avec les OT-I murins suggèrent que l'hypoxie stimule l'expression du CD25, l'épuisement et le phénotype mémoire centrale (et potentiellement effecteur) mais diminue la prolifération. Les mêmes marqueurs pourraient donc être reconsidérés avec la matrice oxygénée une fois qu'elle aura fait ses preuves avec le modèle Jurkat. Les OT-I permettraient également d'effectuer des tests plus approfondis comme des *killing assays* ainsi que des essais *in vivo* si la matrice s'avère prometteuse.

Le second objectif consistait principalement à développer des protocoles et trouver des paramètres de recouvrement d'HAp pour le CaO_2 permettant un relargage prolongé, constant et contrôlé d'oxygène dans la matrice ainsi que de caractériser les particules résultantes et les

propriétés des gels encapsulant ces dernières. Bien que la présence de particules recouvertes ne semble pas affecter les propriétés du gel, le recouvrement initial (contrôle) d'HAp ne permet pas d'obtenir le profil de relargage désiré. C'est pourquoi les principaux paramètres du processus de recouvrement ont été changés et d'importantes modifications concernant le relargage obtenu, la morphologie des particules et même le type de phosphate de calcium en ont résulté. Deux paramètres sont prometteurs, soit le recouvrement à 50°C et l'augmentation de la concentration des particules dans le gel. Toutefois, aucune expérience a mené au profil de relargage « idéal » escompté.

Pour conclure, bien que l'objectif global de fabriquer un hydrogel riche en oxygène pour l'ACT demeure un défi à relever, les résultats préliminaires obtenus ainsi que les méthodes développées sont importants pour l'avancée du projet vers cet objectif. En effet, l'ajout de CaO_2 est un moyen efficace et plutôt répandu pour oxygéner les matrices mais son recouvrement y joue un rôle important. Le recouvrement d'HAp est une méthode novatrice qui résout certains aspects négatifs des recouvrements polymériques. Toutefois, son processus de formation à la surface des particules doit encore être optimisé avant que la matrice ne puisse être utilisée dans des tests cellulaires et certaines pistes d'investigation ont été proposées à cet effet. Les bénéfices d'une matrice riche en oxygène pourraient s'étendre beaucoup plus loin que l'ACT et servir dans d'autres thérapies cellulaires ainsi qu'en ingénierie tissulaire.

ANNEXE I

COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE ET CONDITIONS DE CULTURE AVANT ENCAPSULATION

Tableau-A I-1 Composition des milieux de culture et étapes préencapsulation pour les cellules Jurkat, PBMCs et OT-I

Type cellulaire	Composition du milieu complet de culture	Culture cellulaire avant encapsulation
Jurkat	-DMEM : F12 (Gibco, États-Unis) -10% de FBS (Gibco, Canada) inactivé à 56°C, 30 min -1% pénicilline/streptomycine (Wisent, Canada)	-1 million de cellules/mL de milieu -Changement de milieu à chaque 2 – 3 jours -Culture dans des flacons
PBMCs	-Milieu RPMI 1640 (Gibco, États-Unis) -10% sérum humain (Sigma-Aldrich, États-Unis) inactivé à 56°C, 30 min -2 mM L-glutamine (Gibco, Brésil) -1% pénicilline/streptomycine -10 µg/mL gentamicine (Wisent, Canada) -25 mM HEPES (Wisent, Canada)	Les cellules sont décongelées et encapsulées immédiatement.
OT-I	- Milieu RPMI 1640 -10% de FBS inactivé -1% pénicilline/streptomycine -1% L-glutamine -1% pyruvate de sodium (Sigma-Aldrich, Japon) -1% solution d'acides aminés MEM (Gibco, États-Unis) -1% insuline-transferrine-sélénium (Gibco, États-Unis) -0,35% de β-mercaptoéthanol (dilué 1:1000 dans le PBS)	-Isolation et stimulation des OT-I

ANNEXE II

PROTOCOLE OT-I : INFORMATIONS SUPPLÉMENTAIRES

Isolation et stimulation des cellules : Les souris sont sacrifiées par asphyxie au CO₂ et dislocation cervicale. Les rates sont récupérées et immédiatement cisaillées afin d'en extraire les cellules. Les globules rouges sont ensuite détruits à l'aide du tampon de lyse (Sigma-Aldrich, États-Unis). Les cellules sont mélangées à des microbilles magnétiques (Miltenyi Biotec, Allemagne) se liant spécifiquement aux récepteurs des cellules T CD8 α^+ . La suspension cellulaire est ensuite passée à l'intérieur d'une colonne (Miltenyi Biotec, Allemagne) apposée à un aimant (Miltenyi Biotec, Allemagne) servant à retenir les cellules liées aux billes magnétiques dans la colonne. Les cellules sont ensuite extraites de la colonne en pressant le contenu dans un tube. Si le nombre de cellules OT-I est insuffisant, la fraction négative (n'ayant pas adhéré à la colonne) est mélangée à de nouvelles billes et le processus est recommencé jusqu'à ce que le nombre de cellules désiré soit atteint. Les cellules OT-I sont ensuite stimulées dans une plaque de 24 puits avec le fond des puits recouvert de 1 μ g d'anti-CD3 (InVivoMAb, États-Unis). Chaque puit contient 1 mL de milieu avec 1 million de cellules, 30 UI d'IL-2 recombinante (BioLegend, États-Unis), 0,5 ng d'IL-7 recombinante (R&D Systems, États-Unis) et 5 μ g d'anti-CD28 (InVivoMAb, États-Unis). Après 48 heures, les cellules sont récupérées et le milieu est changé (culture à 1 million cellules/mL dans des plaques de 24 puits avec uniquement des interleukines). Les cellules peuvent ensuite être encapsulées 24 heures suivant ce changement de milieu.

Libération des cellules encapsulées (sur glace) : Le milieu des gels est récupéré et remplacé par du PBS. Les gels sont détruits à l'aide de va-et-vient avec une micropipette et la solution résultante est ajoutée au milieu récupéré. La solution est ensuite soumise à un vortex avant d'être filtrée (40 μ m) et centrifugée. Le culot est remis en suspension dans du PBS et ajouté au tube de FACS. Cette procédure est répétée pour chaque condition testée. Les cellules seules sont ajoutées directement à leur tube FACS spécifique.

Coloration des cellules avec les anticorps : Chaque tube contient soit des cellules seules ou libérées et un tube/condition est utilisé. Les cellules avec CFSE sont dans un tube différent des cellules sans CFSE de la même condition. Les cellules sont rincées au PBS et incubées dans la solution de blocage composée de tampon FACS (PBS + 0,5% albumine de sérum bovin (BSA) et 0,1% azoture de sodium) avec 1% FC shield (anti-mouse CD16/CD32, clone 2.4G2, Tonbo biosciences, États-Unis) pendant 10 min à 50 μ L/tube, sans lumière, sur glace. La solution de coloration est préparée suivant la composition du Tableau-A II-1 et 150 μ L de solution est ajouté par tube. Les tubes de compensation contiennent 20 μ L de billes (UltraComp eBeads, Invitrogen, États-Unis) avec 150 μ L de tampon FACS et le volume adéquat d'un anticorps. Un tube de compensation est préparé pour chaque anticorps. Les tubes de cellules et de compensation sont incubés 20 min, sans lumière, sur glace. Les tubes sont ensuite rincés au tampon FACS avant d'être analysés au cytomètre.

Tableau-A II-1 Composition de la solution de coloration

Composante	Volume (uL)/tube	Composante	Volume (uL)/tube
CD8 (BD Horizon, R718 rat anti-mouse CD8a, clone 53.67, Hongrie)	0,63	TIM-3 (BD Horizon, RB705 rat anti-mouse CD366, clone 25F.1D6, États-Unis)	2,50
CD25 (BD Horizon, BUV737 rat anti-mouse CD25, clone PC61, États-Unis)	0,31	LAG-3 (BD OptiBuild, RB545 rat anti-mouse CD233, clone C9B7W, États-Unis)	2,50
CD44 (BD Horizon, BV786 rat anti-mouse CD44, clone IM7, Hongrie)	0,15	Brilliant stain buffer+ (BD Horizon, États-Unis)	10,00
CD62L (BD Horizon, PE-CF 594 rat anti-mouse CD62L, clone MEL-14, Hongrie)	0,15	Live/dead aqua (Invitrogen, États-Unis)	0,50
PD-1 (BD Horizon, BUV395 rat anti-mouse CD279, clone 29F.1A12, États-Unis)	5,00	Tampon FACS	Compléter le volume à 150 µL

*Une deuxième solution de coloration sans marqueurs d'activation/phénotype (CD25, CD44, CD62L) et d'épuisement (TIM-3, LAG-3, PD-1) est préparée pour les cellules avec CFSE.

ANNEXE III

PLAN D'ANALYSE STATISTIQUE

Tableau-A III-1 Plan d'analyse statistique

ANALYSE À DEUX FACTEURS	
Paramétrique	Tests/observations complémentaires
Two-way ANOVA <i>Post hoc</i> : Tukey	Variances égales : -Test de Levene ($p > 0,05$) -Graphique des résidus Distribution normale des résidus : -Test Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) -Diagramme quantile-quantile -Coefficients d'asymétrie et d'aplatissement standardisés (entre $[-2,2]$)
Non paramétrique (si une ou plusieurs conditions paramétriques non respectées)	Tests/observations complémentaires
Aligned rank transform (ART) <i>Post hoc</i> : tests de contrastes (correction : Holm-Bonferroni)	-Moins de 10% des données sont aberrantes
ANALYSE À UN FACTEUR (SI INTERACTIONS DÉTECTÉES DANS L'ANALYSE À DEUX FACTEURS ET DIAGRAMME D'INTERACTIONS)	
Paramétrique (≥ 3 groupes)	Tests/observations complémentaires
One-way ANOVA <i>Post hoc</i> : Tukey	-Voir two-way ANOVA

Non paramétrique (≥ 3 groupes)	Tests/observations complémentaires
Test Kruskal-Wallis <i>Post hoc</i> : Dunn (correction : Holm-Bonferroni) Test Friedman <i>Post hoc</i> : Wilcoxon apparié (correction : Holm-Bonferroni)	-Mesures non répétées -Mesures répétées
Paramétrique (2 groupes)	Tests/observations complémentaires
Student's T-test	Variances égales : - $\alpha = 20\%$ au lieu de 5% pour test de Levene (plus restrictif), si test échoue : var.equal=FALSE Distribution normale des données : -Test Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) -Diagramme quantile-quantile -Coefficients d'asymétrie et d'aplatissement standardisés (entre [-2,2])
Non paramétrique (2 groupes)	Tests/observations complémentaires
Test Mann-Whitney	-Mesures non répétées

ANNEXE IV

MARQUAGE DES CELLULES JURKAT HYPOXIQUES AVEC L'HypoxiTRAK™

L'état hypoxique des Jurkat cultivées dans la chambre à hypoxie a été confirmé à l'aide du marqueur HypoxiTRAK™. La Figure-A IV-1 montre les cellules encapsulées et non encapsulées étant ou ayant été en état hypoxique après 7 jours de culture dans la chambre hypoxique. Toutes les images ont été prises avec la même intensité de laser et temps d'exposition et le même *background* est également utilisé.

Pour les contrôles (données non présentées) : les contrôles à 0 nM en hypoxie et normoxie présentent des débris autofluorescents aux formes irrégulières, ce qui indique que seul le signal en provenance de cellules rondes et saines hypoxiques peut être considéré comme le résultat du marquage et non de l'autofluorescence. Les contrôles normoxiques présentent seulement les débris autofluorescents (en absence ou présence du marqueur), ce qui confirme que les cellules en normoxie n'ont pas été en état hypoxique durant 7 jours. Toutefois, bien que le marqueur ne devrait pas affecter les cellules normoxiques, leur prolifération semble être ralentie après le jour 3. Le gel n'est pas autofluorescent.

Pour les cellules cultivées dans la chambre hypoxique en présence du marqueur : Les images en fluorescence de la Figure-A IV-1 indiquent, pour les cellules encapsulées ou non, que l'intensité du signal, la taille des cellules et la quantité de débris cellulaires semblent augmenter avec le temps tandis que le nombre de cellules colorées diminue. Cette tendance est plus visible chez les cellules non encapsulées qui tendent à se concentrer au centre du puit que chez les cellules encapsulées qui sont distribuées dans le gel et donc, plus difficiles à localiser. Toutefois, cette tendance n'est pas observée dans le contrôle hypoxique sans marqueur (données non présentées), ce qui suggère que la mort cellulaire importante (grand nombre de débris et peu de cellules rondes au jour 7) serait surtout causée par le marqueur. Le signal des débris est présent peu importe les conditions d'oxygène et de concentration d'HypoxiTRAK™ et est difficilement distinguable en mode fluorescence de celui des cellules rondes saines qui ont un signal uniquement en hypoxie en présence du marqueur. Il faut donc comparer avec les images correspondantes en *bright-field* de la Figure-A IV-1 pour distinguer les débris des cellules saines. Des exemples de cellules saines et de débris sont indiqués dans les images en *bright-field*. Puisque l'intensité des cellules rondes saines est très faible au jour 1, il est difficile de voir leur signal en fluorescence.

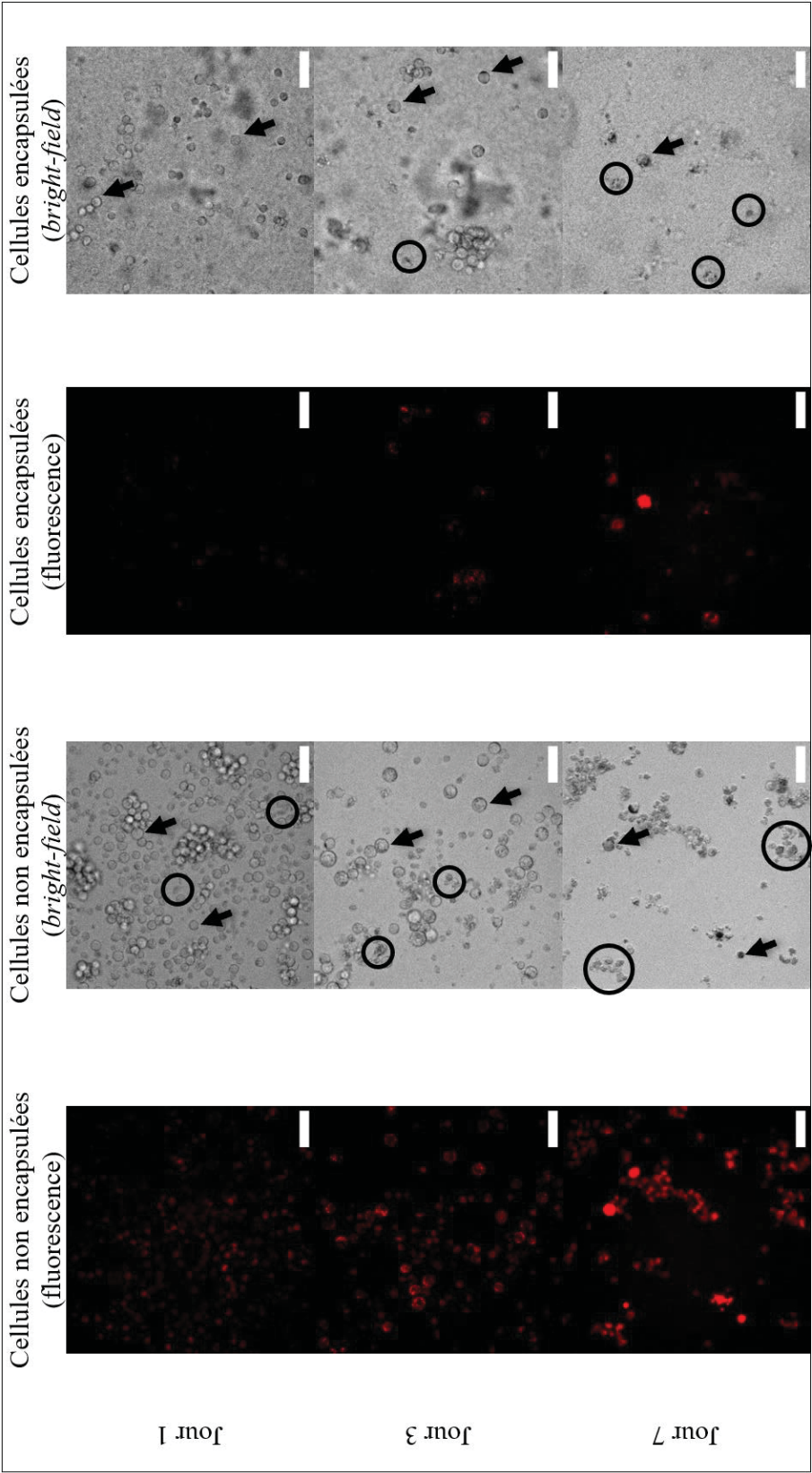


Figure-A IV-1 Cellules Jurkat non encapsulées et encapsulées (fluorescence et *bright-field*) cultivées dans la chambre hypoxique et colorées par l'HypoxiTRAK™ 50 nM après 1, 3 et 7 jours en hypoxie. Flèches : exemples de cellules saines rondes et cercles : exemples de débris. Échelle : 50 μm . $N \geq 1$, $n \geq 1$

ANNEXE V

VIABILITÉ ET ACTIVITÉ MÉTABOLIQUE DES CELLULES JURKAT NON ENCAPSULÉES

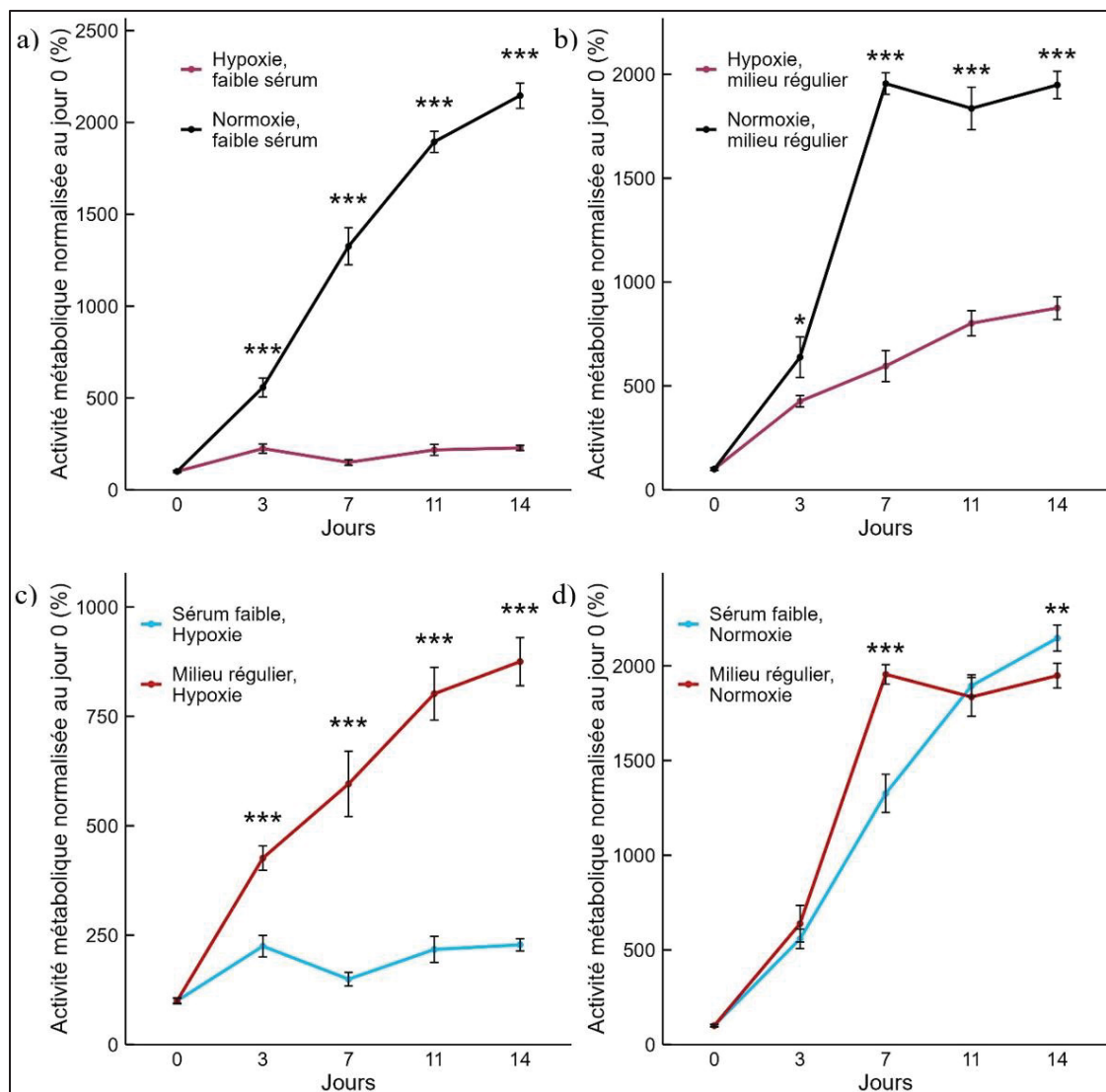


Figure-A V-1 Activité métabolique des cellules Jurkat non encapsulées sur 14 jours en fonction du milieu (faible en sérum (1%) ou régulier (10%)) et de la concentration en oxygène (hypoxie ($< 1\% \text{ O}_2$) ou normoxie). Effet de l'hypoxie en milieu pauvre en sérum (a) ou en milieu régulier (b). Effet du milieu en hypoxie (c) ou normoxie (d). Milieu changé à chaque 2 – 3 jours. *, **, *** $p < 0,05, 0,01, 0,001$ respectivement. Student's T-test à chaque *time point*. N=2, n=8

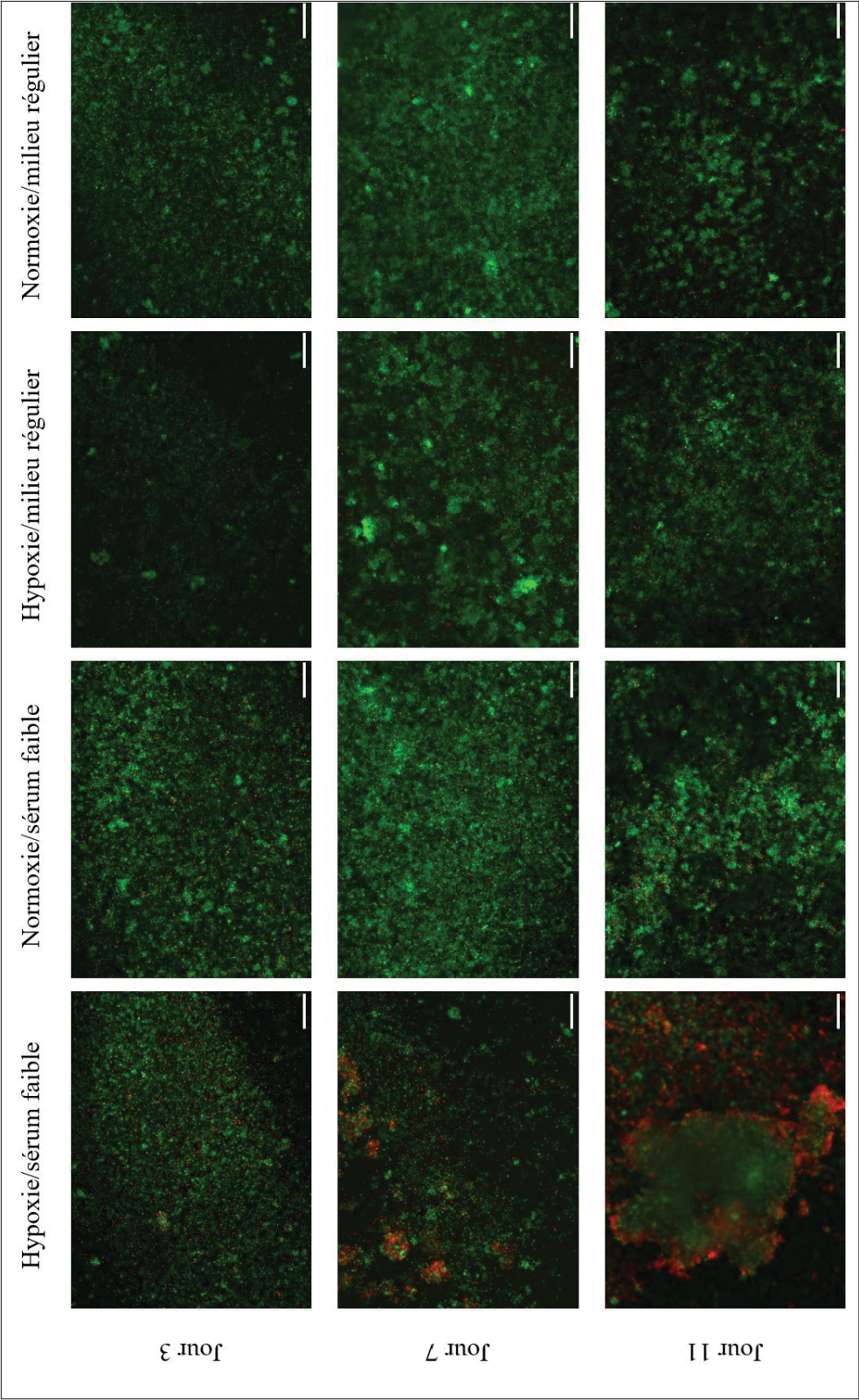


Figure-A V-2 Essais *live/dead* des cellules Jurkat non encapsulées sur 14 jours en hypoxie ou normoxie, dans du milieu faible en sérum ou régulier (données des jours 0 et 14 non présentées, vert = cellules vivantes et rouge = cellules mortes). Jour 11 normoxie : images à côté des amas diffus de cellules. Milieu changé à chaque 2 – 3 jours. Échelle : 200 μ m. N=2, n=2

ANNEXE VI

VIABILITÉ ET ACTIVITÉ MÉTABOLIQUE DES CELLULES PBMCs ENCAPSULÉES ET NON ENCAPSULÉES – RÉSULTATS ET DISCUSSION

Cellules mononuclées de sang périphérique (PBMCs) : Ces cellules humaines comprennent des cellules lymphoïdes (cellules T, B et tueuses naturelles) et des monocytes (Melo, Thornton, Coomarasamy, & Granne, 2022). Les cellules T constituent la plus grande fraction (Goronzy, Fujii, & Weyand, 2006).

Expériences avec les PBMCs – essais *live/dead* et activité : Les PBMCs humaines sont fournies par le laboratoire du Pr. Réjean Lapointe au CrCHUM selon le protocole d'éthique numéro MEO-37-2021-9206. Environ 60% de la population de PBMCs a été présumée être des cellules T et la concentration de cellules a donc été choisie de façon que les concentrations finales de cellules T dans le gel ou dans les puits de cellules contrôles soit environ les mêmes que pour les Jurkat. La concentration dans les puits de PBMCs seules contrôles est de 167 000/mL (même nombre de cellules que dans les puits avec les gels). Durant le processus de décongélation des cellules, la désoxyribonucléase (Nuclease S7, Roche Diagnostics, Allemagne) est ajoutée aux PBMCs afin d'éviter l'agrégation des cellules, et ce, sans les affecter (García-Piñeres et al., 2006). Les procédures d'encapsulation, de culture en hypoxie, et d'essais *live/dead* et d'activité métabolique sont semblables à celles des Jurkat avec quelques différences: de l'interleukine (IL)-2 (Proleukin, SteriMax Inc., Canada) est ajoutée à la suspension cellulaire lors de l'encapsulation, seul du milieu complet (+ IL-2 à 300 U/mL) est utilisé pour couvrir les gels, les essais se font aux jours 0, 3 et 7, pour les essais d'activité métabolique : de l'IL-2 est ajoutée à la solution de résazurine.

Les résultats d'activité métabolique des PBMCs encapsulées ou non (Figure-A VI-1) et de viabilité (encapsulées : Figure-A VI-2, non encapsulées : Figure-A VI-3) sont présentés ci-dessous. Il est à noter que le *background* et les conditions d'imagerie du *live/dead* ont dû être ajustés pour chaque image puisque l'intensité du signal émis par les cellules était très faible et les images présentées sont prises au centre des puits.

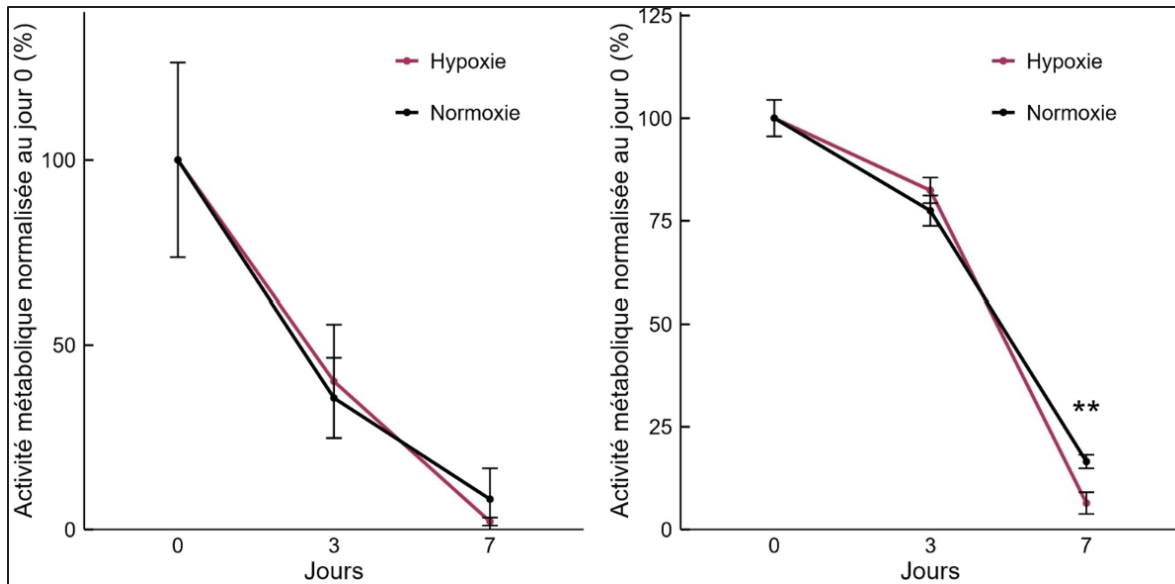


Figure-A VI-1 Activité métabolique des cellules PBMCs encapsulées dans des hydrogels (**gauche**) et non encapsulées (**droite**) sur 7 jours en hypoxie ou normoxie. Milieu régulier changé à chaque 2 – 3 jours. *, **, *** $p < 0,05$, $0,01$, $0,001$ respectivement. **Gauche** : ART ANOVA et contrastes et **droite** : Student's T-test. $N=2$, $n=8$

L'analyse de l'activité métabolique des PBMCs encapsulées ne suggère aucune différence significative entre l'hypoxie et la normoxie sur 7 jours. Les courbes d'activité diminuent fortement avec le temps, ce qui pourrait témoigner d'un ralentissement de l'activité cellulaire, d'une prolifération faible ou absente et/ou d'une augmentation de la mort cellulaire avec le temps. Les résultats *live/dead* suggèrent une forte baisse de la viabilité au cours du temps. Au jour 0 (données non présentées), seulement quelques cellules mortes sont observées alors qu'au jour 3, approximativement 50% des cellules sont mortes contre la presque totalité au jour 7. Cependant, aucun effet clair de l'hypoxie est constaté pour chaque *time point*. Les résultats des cellules non encapsulées contrôles sont semblables à ceux des cellules encapsulées avec les différences suivantes : une mortalité légèrement plus grande en normoxie qu'en hypoxie est observée au jour 3, mais cette tendance semble se renverser au jour 7 (où l'activité métabolique normoxique est significativement supérieure).

Discussion : Aucun effet de l'hypoxie sur la viabilité et la prolifération n'a été observé dans le modèle utilisé ici puisque ces deux paramètres étaient très faibles peu importe les conditions d'oxygène. Les PBMCs ont seulement été cultivées avec l'IL-2 ce qui pourrait s'avérer insuffisant pour assurer une prolifération et une survie tout au long de l'expérience comme suggéré ailleurs pour les cellules T isolées de PBMCs (Katzen et al., 1985). Naldini, Carraro, Silvestri, et Bocci (1997) n'ont également pas observé de différences dans la viabilité des PBMCs à cause de l'hypoxie cependant leur période d'incubation était de moins de 2 jours. De plus, ils ont utilisé le mitogène phytohémagglutinine et ont constaté que son effet prolifératif était réduit en hypoxie à cause du ralentissement du cycle cellulaire. D'autres études rapportent

également une diminution en hypoxie dans la prolifération de leur cellules T isolées des PBMCs (Byrnes et al., 2022; Liu et al., 2020) mais aucune différence sur la viabilité (Byrnes et al., 2022). Kim et al. (2008) suggèrent plutôt une diminution dans la viabilité. Dans la présente étude, et puisqu'il s'agissait d'expériences préliminaires, les cellules T CD8⁺ des PBMCs n'ont pas été isolées des autres cellules. Cependant, isoler et activer les cellules T pourrait potentiellement révéler un effet de l'hypoxie qui n'a pas pu être observé dans les conditions actuelles.

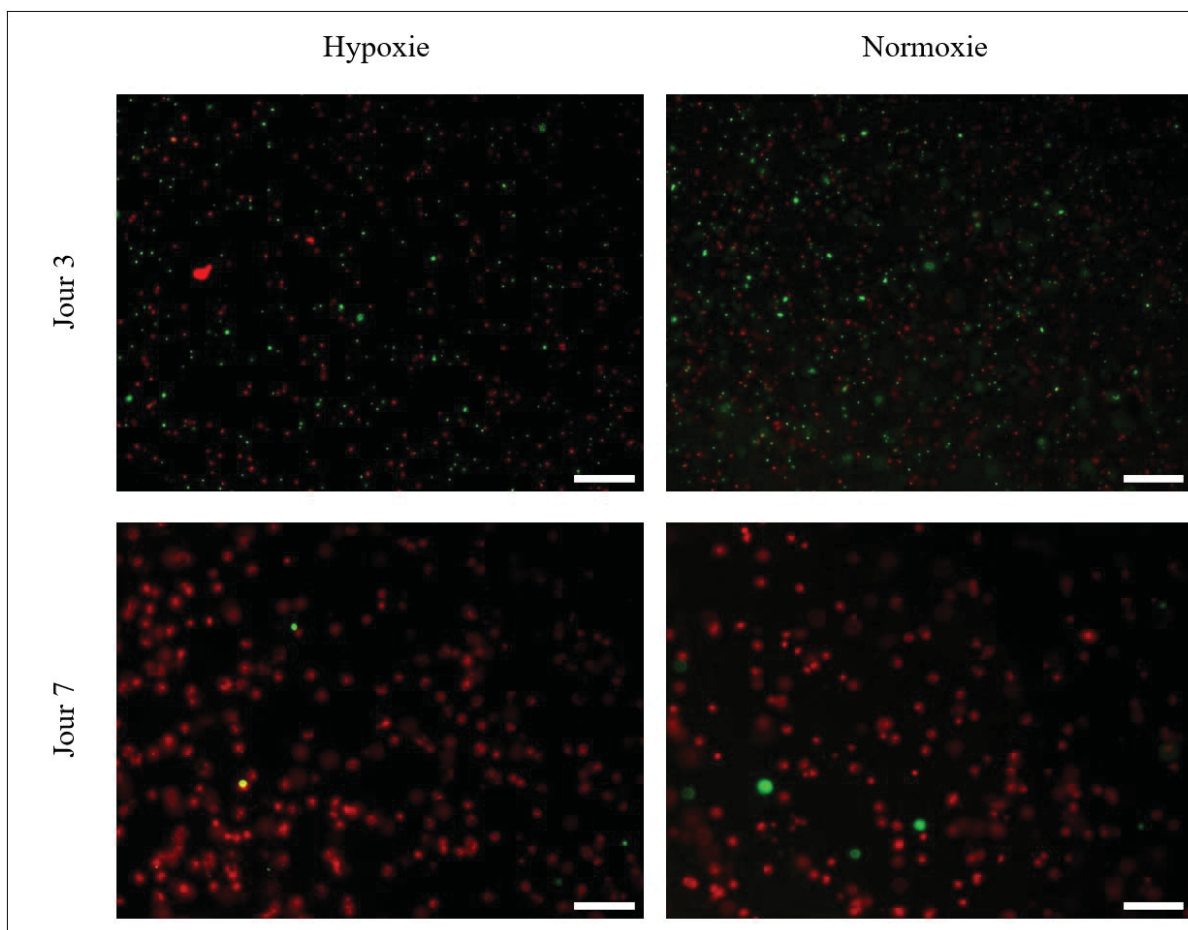


Figure-A VI-2 Essais *live/dead* des cellules PBMCs encapsulées dans des hydrogels sur 7 jours en hypoxie ou normoxie (données du jour 0 non présentées, vert = cellules vivantes et rouge = cellules mortes). Milieu régulier changé à chaque 2 – 3 jours. Échelle : **200 μ m** jour 3 et 100 μ m jour 7. N=2, n=4

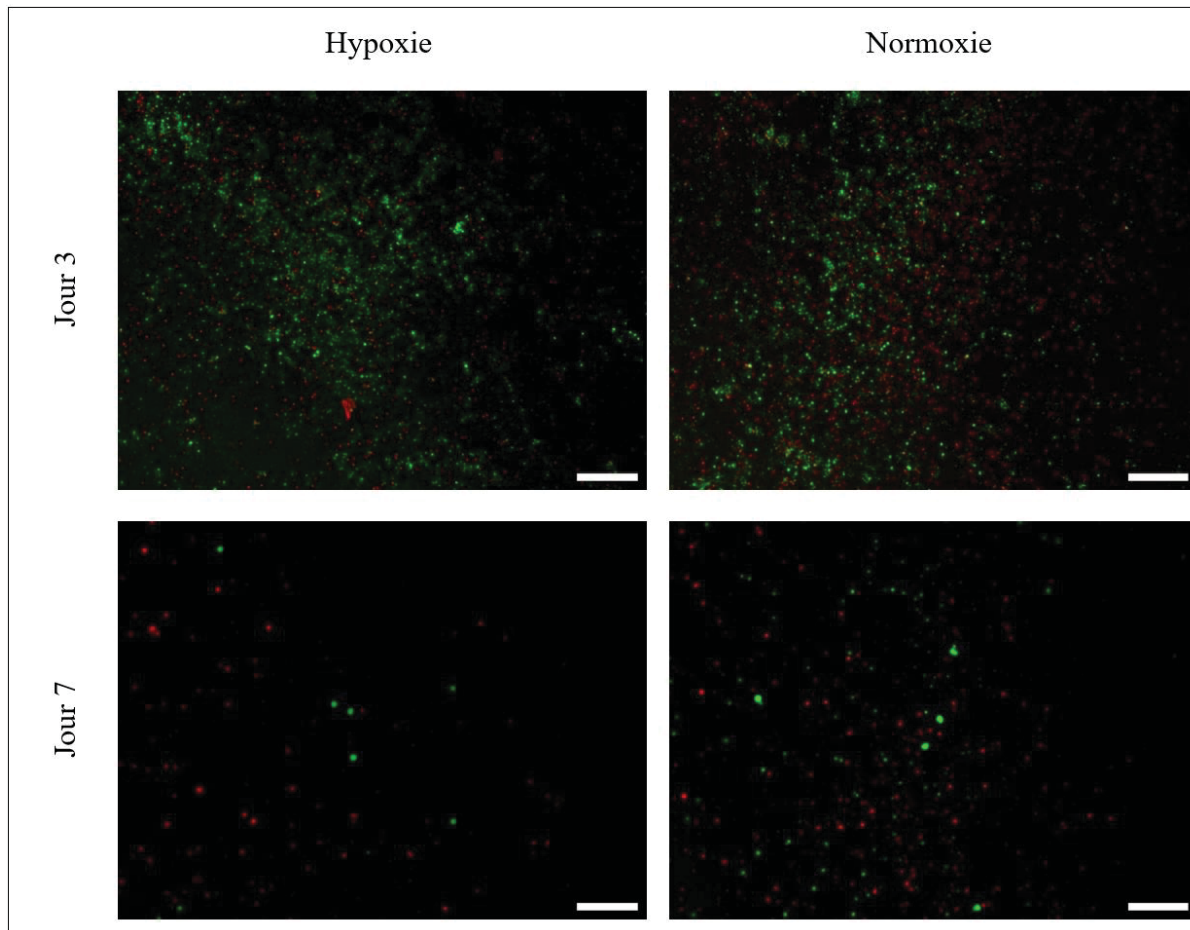


Figure-A VI-3 Essais *live/dead* des cellules PBMCs non encapsulées sur 7 jours en hypoxie ou normoxie (données du jour 0 non présentées, vert = cellules vivantes et rouge = cellules mortes). Milieu régulier changé à chaque 2 – 3 jours. Échelle : **200 μ m jour 3 et 100 μ m jour 7**. N=2, n=2

ANNEXE VII

VIABILITÉ DES CELLULES OT-I NON ENCAPSULÉES

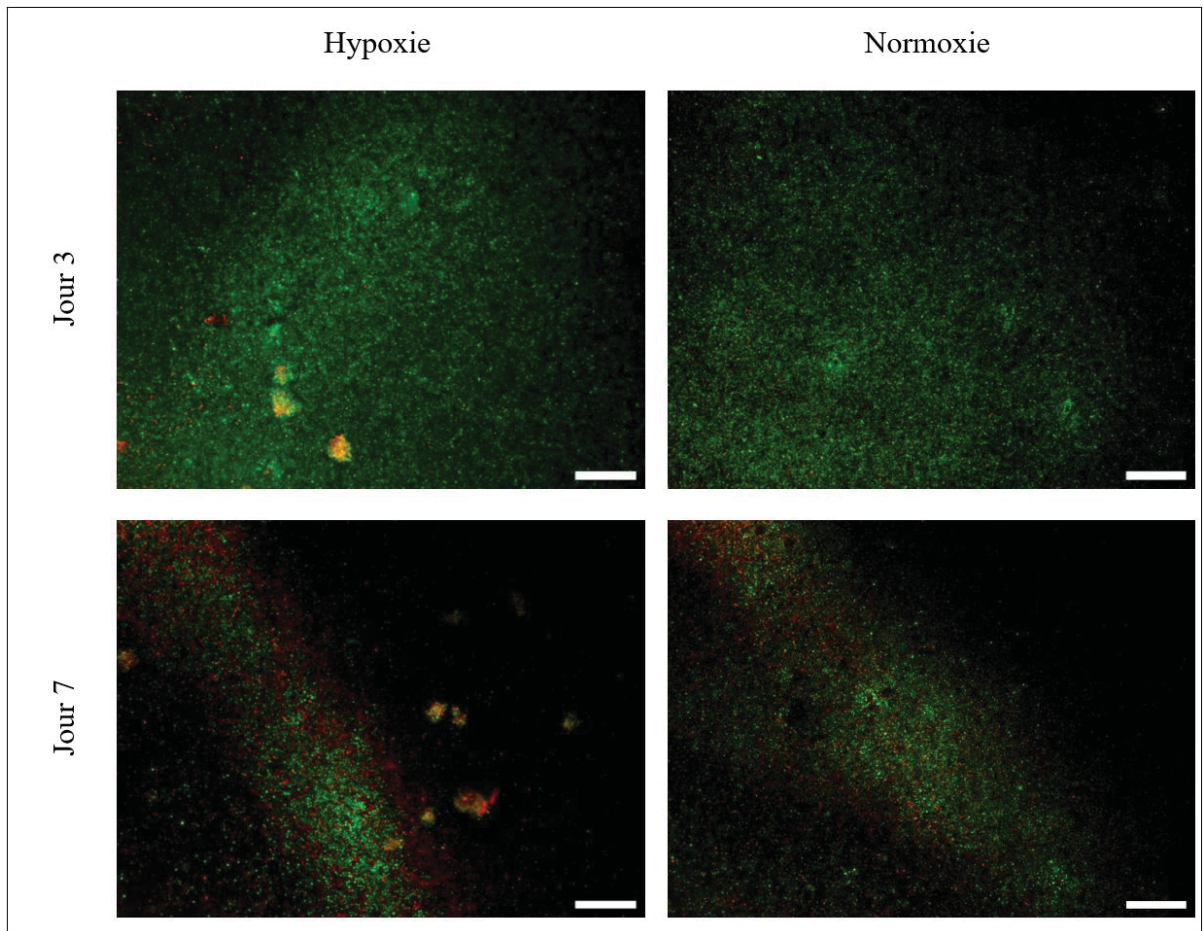


Figure-A VII-1 Essais *live/dead* des cellules OT-I non encapsulées sur 7 jours en hypoxie ou normoxie (données du jour 0 non présentées, vert = cellules vivantes et rouge = cellules mortes). Milieu régulier changé à chaque 2 – 3 jours. Échelle : 200 μ m. N=2, n=2

ANNEXE VIII

pH DE LA SOLUTION D'HYDROGEL CONTENANT DES PARTICULES RECOUVERTES OU NON ET DU PBS QUI RECOUVRE LES GELS

Les graphiques suivant l'évolution du pH de la solution d'hydrogel contenant les particules recouvertes (CPO_ctrl) ou non (CPO) ainsi que le pH du PBS couvrant les gels contenant des particules sont présentés dans la Figure-A VIII-1 a et b, respectivement.

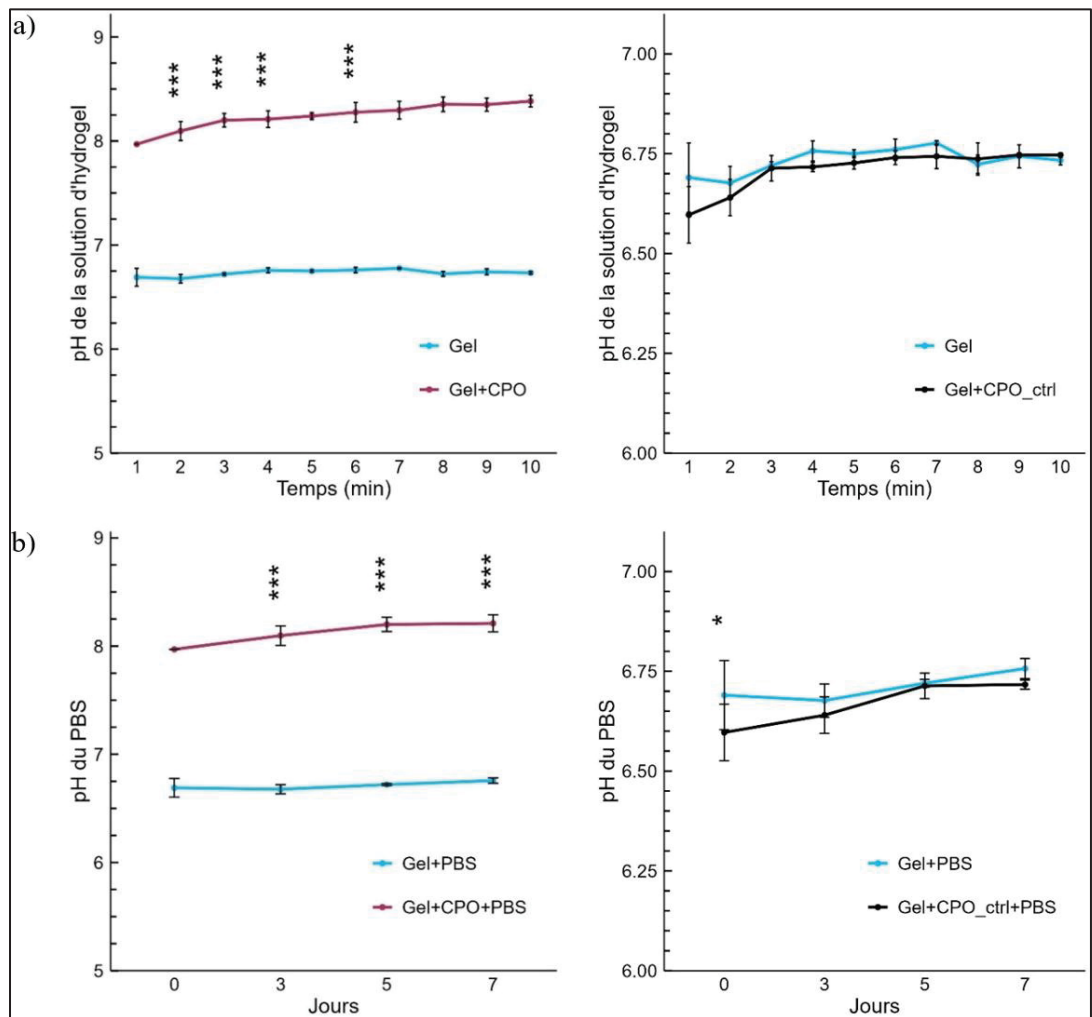


Figure-A VIII-1 **Gauche** : CPO (non recouvert), **Droite** : CPO_ctrl (recouvert). **(a)** Évolution du pH pendant 10 min après l'ajout de particules dans la solution d'hydrogel. **(b)** pH aux jours 0, 3, 5 et 7 du PBS recouvrant les hydrogels encapsulant les particules. *, **, *** $p < 0,05, 0,01, 0,001$ respectivement. CPO : Student's T-test pour tous les *time points* (sauf **a** 1, 5, 7 à 10 min, **b** J0 : Mann-Whitney) et CPO_ctrl : **a** ART ANOVA et contrastes et **b** two-way ANOVA et Tukey pour tous les *time points*. N=1, n=3

ANNEXE IX

COURBES DE RELARGAGE D'O₂ OBTENUES AVEC LA MÉTHODE INITIALE (#1) DE MISE EN HYPOXIE (RÉSULTATS NON FIABLES)

Certains exemples de courbes obtenues avec la méthode #1 de mise en hypoxie sont présentés ci-dessous (résultats non fiables sauf pour le jour 0₁ (avant gélification) et 0₂ (après gélification) qui sont pris en normoxie avant l'ajout de PBS). Les sections auxquelles ces courbes se rapportent sont résumées ici.

Section 3.2.9 – Effet de la température : cette section présente les effets de la température du tampon phosphate lors du recouvrement sur les profils de relargage des gels encapsulant les particules. Les résultats d'O₂ (Figure-A IX-1a) ne concordent pas avec les conclusions du H₂O₂ de la section 3.2.9 et un plateau jusqu'au jour 4 pour le CPO_ctrl (recouvert à 37°C) n'est observé dans aucune autre expérience. Ces résultats ne peuvent donc pas être considérés.

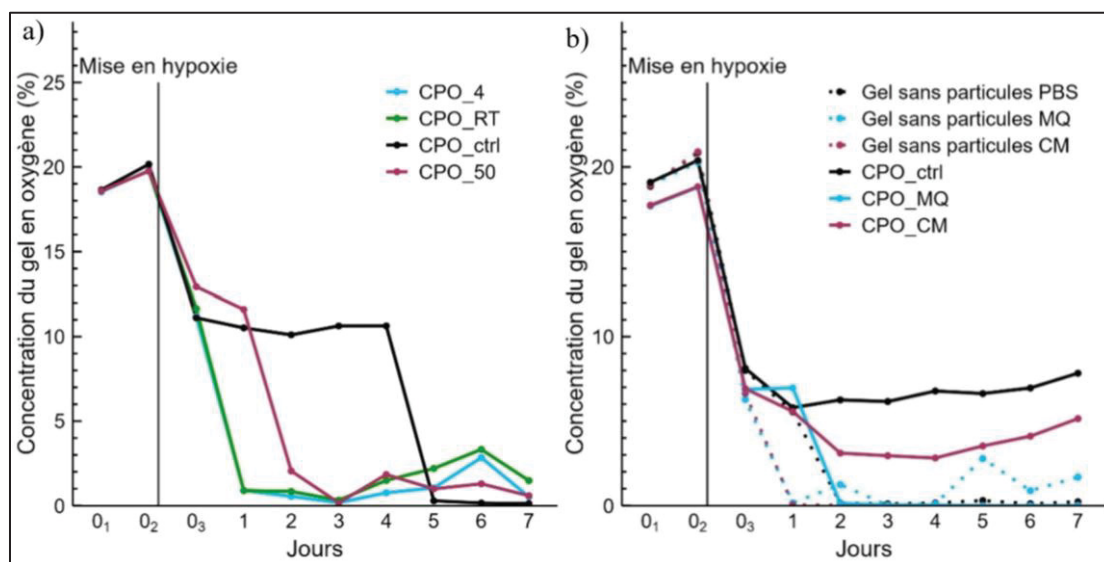


Figure-A IX-1 Concentration d'O₂ relargué dans les hydrogels en hypoxie sur 7 jours en fonction (a) de la température de recouvrement des particules, soit 4°C (CPO_4), température pièce (CPO_RT), 37°C (CPO_ctrl) et 50°C (CPO_50) et (b) du milieu d'incubation soit PBS (CPO_ctrl), eau ultra pure (CPO_MQ) et milieu complet à Jurkat (CPO_CM). N=1, n=1

Section 3.2.8 – Effet de la nature de la solution au-dessus de l'hydrogel : cette section discute des effets du PBS (CPO_ctrl), de l'eau ultra pure (CPO_MQ) ou du milieu de culture complet à Jurkat (CPO_CM) couvrant les hydrogels encapsulant les particules sur les profils de relargage. Non seulement la Figure-A IX-1b ne concorde pas avec les conclusions présentées dans la section 3.2.8 pour l'H₂O₂, mais les contrôles négatifs (sans particules) ne se

chevauchent pas et la courbe du gel sans particules PBS atteint $\sim 0\%$ O_2 un jour après les deux autres contrôles négatifs. Il y a également d'importantes variations dans le contrôle négatif gel sans particules MQ entre les jours 1 et 7. Puisque les contrôles négatifs ne sont pas fiables, ces données ne peuvent pas être utilisées pour conclure sur les profils de relargage d' O_2 .

Section 3.2.6 – Effet de la présence de la catalase dans les hydrogels : cette section présente les effets de l'ajout de cette enzyme dans les hydrogels afin de décomposer l' H_2O_2 produit par les particules encapsulées. Les courbes d' O_2 (Figure-A IX-2) sont parmi les meilleures obtenues avec la méthode #1 puisqu'elles ne présentent aucune variation importante et concordent relativement bien avec les résultats d' H_2O_2 . Toutefois, puisque cette méthode n'est pas considérée fiable, ces courbes ne peuvent être utilisées.

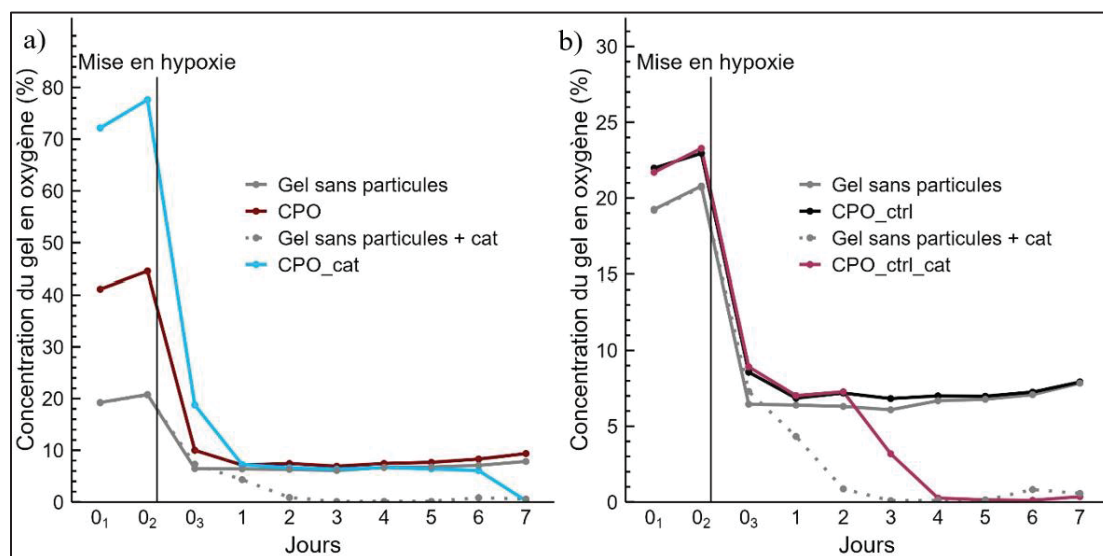


Figure-A IX-2 Concentration d' O_2 relargué en hypoxie sur 7 jours dans les hydrogels encapsulant des particules sans ou avec catalase (cat). (a) CPO (aucun recouvrement) et (b) CPO_ctrl (recouvrement d'HAp). N=1, n=1

ANNEXE X

RECOUVREMENT DANS L'EAU ULTRA PURE VS TAMPON PHOSPHATE

Les effets de l'utilisation de l'eau ultra pure au lieu du tampon phosphate lors du recouvrement des particules de CaO_2 sur le profil de relargage de l' H_2O_2 se trouvent dans la Figure-A X-1. Malgré de petites différences aux jours 1 et 3, les concentrations d' H_2O_2 du CPO et CPO_ H_2O sont dans les mêmes ordres de grandeur ($\sim 5000 - 6000 \mu\text{M}$ au jour 0, réduit à $\sim 70 - 120 \mu\text{M}$ au jour 3) alors que le H_2O_2 relargué par le CPO_ctrl est significativement inférieur jusqu'au jour 3 ($\sim 230 \mu\text{M}$ au jour 0 et $\sim 35 \mu\text{M}$ au jour 3). Par la suite, les différences ne sont pas significatives. En résumé, le CPO et le CPO_ H_2O présentent un *burst release* initial qui est absent pour le CPO_ctrl. Cela confirme que la perte du *burst release* dans le cas du CPO_ctrl est causée par le recouvrement d'HAp et non parce que le *burst release* se serait produit durant les 60 min d'agitation dans la solution aqueuse.

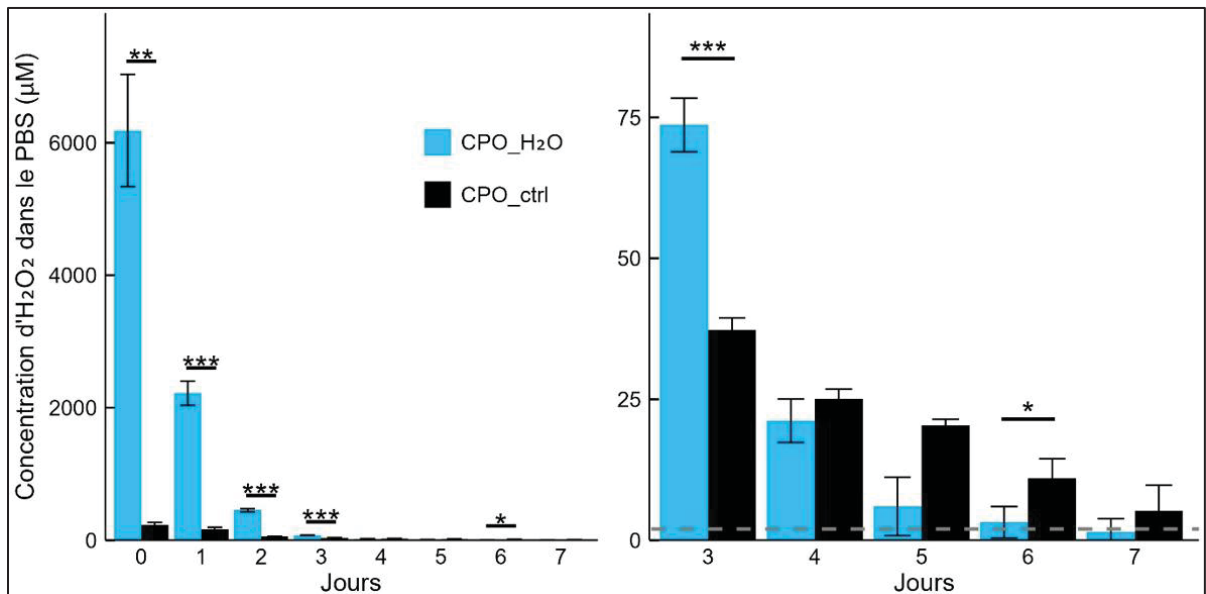


Figure-A X-1 **Gauche** : concentration quotidienne d' H_2O_2 relargué des hydrogels dans le PBS en normoxie sur 7 jours en fonction des conditions de recouvrement. Comparaison entre CPO_ H_2O (eau ultra pure) et CPO_ctrl (tampon phosphate). **Droite** : agrandissement sur les données des jours 3 à 7. *, **, *** $p < 0,05, 0,01, 0,001$ respectivement. Student's T-tests pour tous les *time points* (sauf jour 5 : Mann-Whitney). N=1, n=3

ANNEXE XI

MOLARITÉ DU TAMPON PHOSPHATE LORS DU RECOUVREMENT

L'effet d'une augmentation de la concentration du tampon phosphate (500 au lieu de 100 mM) lors du recouvrement sur le relargage d' H_2O_2 est présenté dans la Figure-A XI-1.

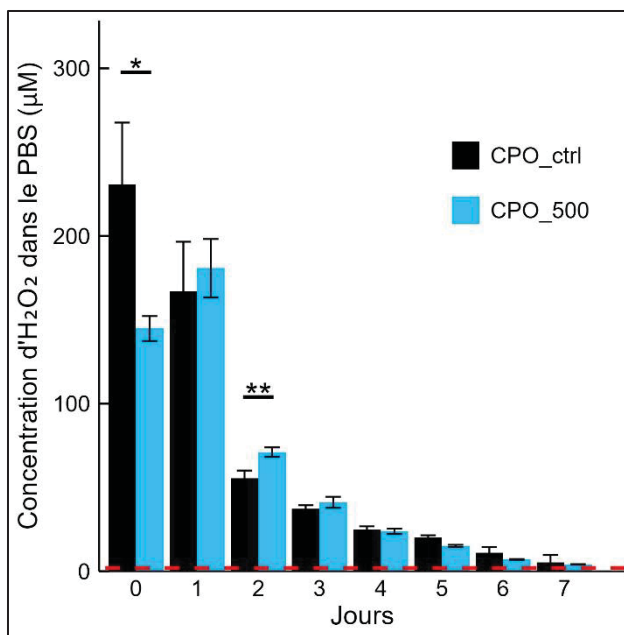


Figure-A XI-1 Concentration quotidienne d' H_2O_2 relargué des hydrogels dans le PBS en normoxie sur 7 jours en fonction de la molarité du tampon phosphate lors du recouvrement. Comparaison entre CPO_ctrl (100 mM) et CPO_500 (500 mM). *, **, *** $p < 0,05, 0,01, 0,001$ respectivement. Student's T-test pour tous les *time points* (sauf jour 5 : Mann-Whitney). N=1, n=3

ANNEXE XII

EFFET DE LA NATURE DE LA SOLUTION AU-DESSUS DE L'HYDROGEL

Le relargage quotidien d' H_2O_2 des hydrogels encapsulant des particules CPO_ctrl a été analysé pour trois solutions différentes recouvrant les hydrogels, soit le PBS (CPO_ctrl), l'eau ultra pure (CPO_MQ) ou le milieu de culture à Jurkat (CPO_CM). Les résultats sont présentés dans la Figure-A XII-1. Les valeurs de relargage sont semblables entre le CPO_ctrl et le CPO_MQ. Bien que le CPO_CM semble résulter en une concentration d' H_2O_2 inférieure aux autres solutions durant les deux premiers jours, cette différence n'est significative qu'au jour 1. Toutefois, une réduction des barres d'erreur en augmentant le nombre d'échantillons pourrait potentiellement mener à des différences significatives entre le CPO_CM et les deux autres conditions durant les premiers jours. À partir du jour 3, les trois échantillons se rapprochent/atteignent la ligne de contrôle sans particules (aucun relargage). Aucun *burst release* d' O_2 n'est observé pour aucun échantillon avant et après la gélification avant l'ajout du PBS (jours 0₁ et 0₂, Figure-A IX-1b, ANNEXE IX, seuls *time points* fiables de la méthode de mise en hypoxie #1).

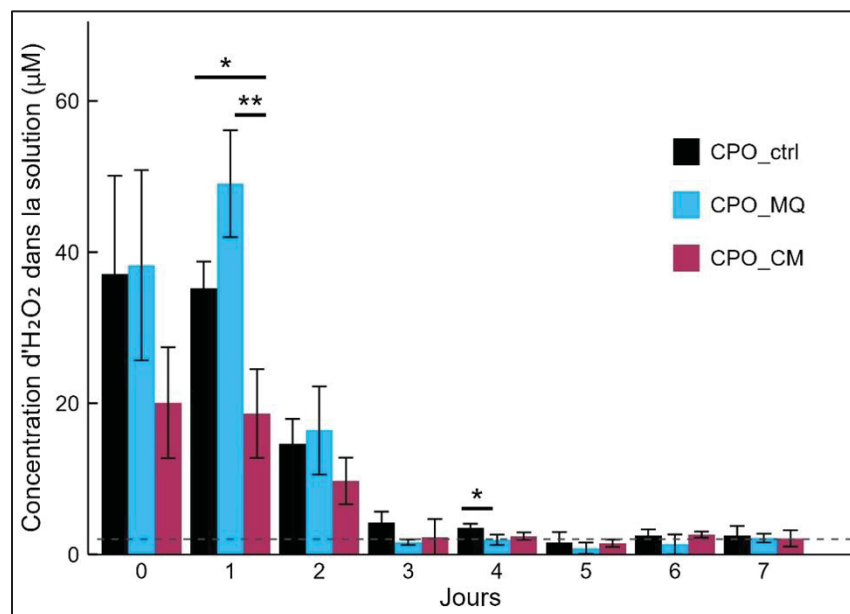


Figure-A XII-1 Concentration quotidienne d' H_2O_2 relargué des hydrogels dans la solution en hypoxie sur 7 jours en fonction du milieu d'incubation soit PBS (CPO_ctrl), eau ultra pure (CPO_MQ) et milieu complet à Jurkat (CPO_CM). *, **, *** $p < 0,05$, $0,01$, $0,001$ respectivement. One-way ANOVA et Tukey pour tous les *time points*. $N=1$, $n=3$

ANNEXE XIII

MEB - PARTICULES RECOUVERTES DANS DIFFÉRENTES CONDITIONS DE RECOUVREMENT

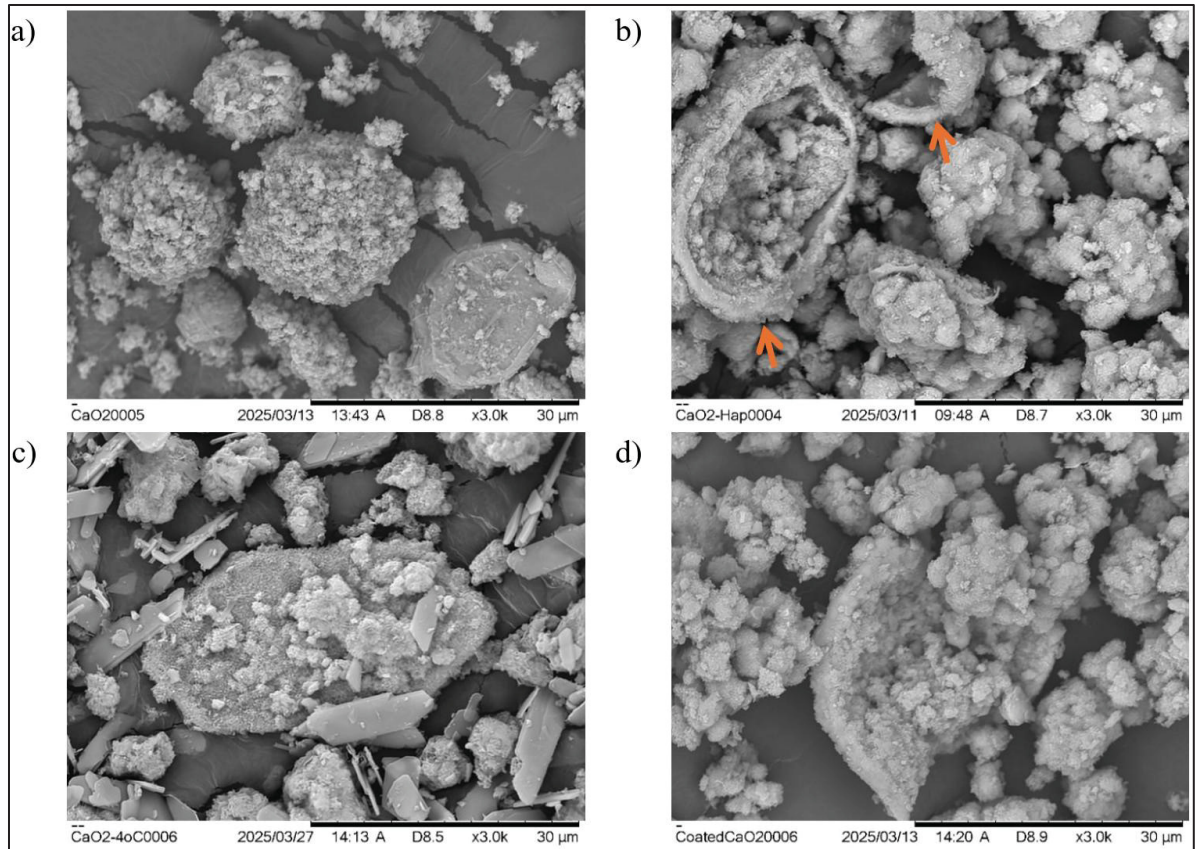


Figure-A XIII-1 Images obtenues du MEB par électrons rétrodiffusés à 15 kV des particules (a) CPO commercial et CPO recouvert dans le tampon phosphate (b) contrôle (flèches indiquent les morceaux d'enveloppes) (c) 4°C, (d) 50°C, (e) 1 min, (f) 5 min, (g) pH 5, (h) pH 11, (i) Ca/P = 1,67 et (j) séchage *overnight* à température pièce. Échelle : 30 µm

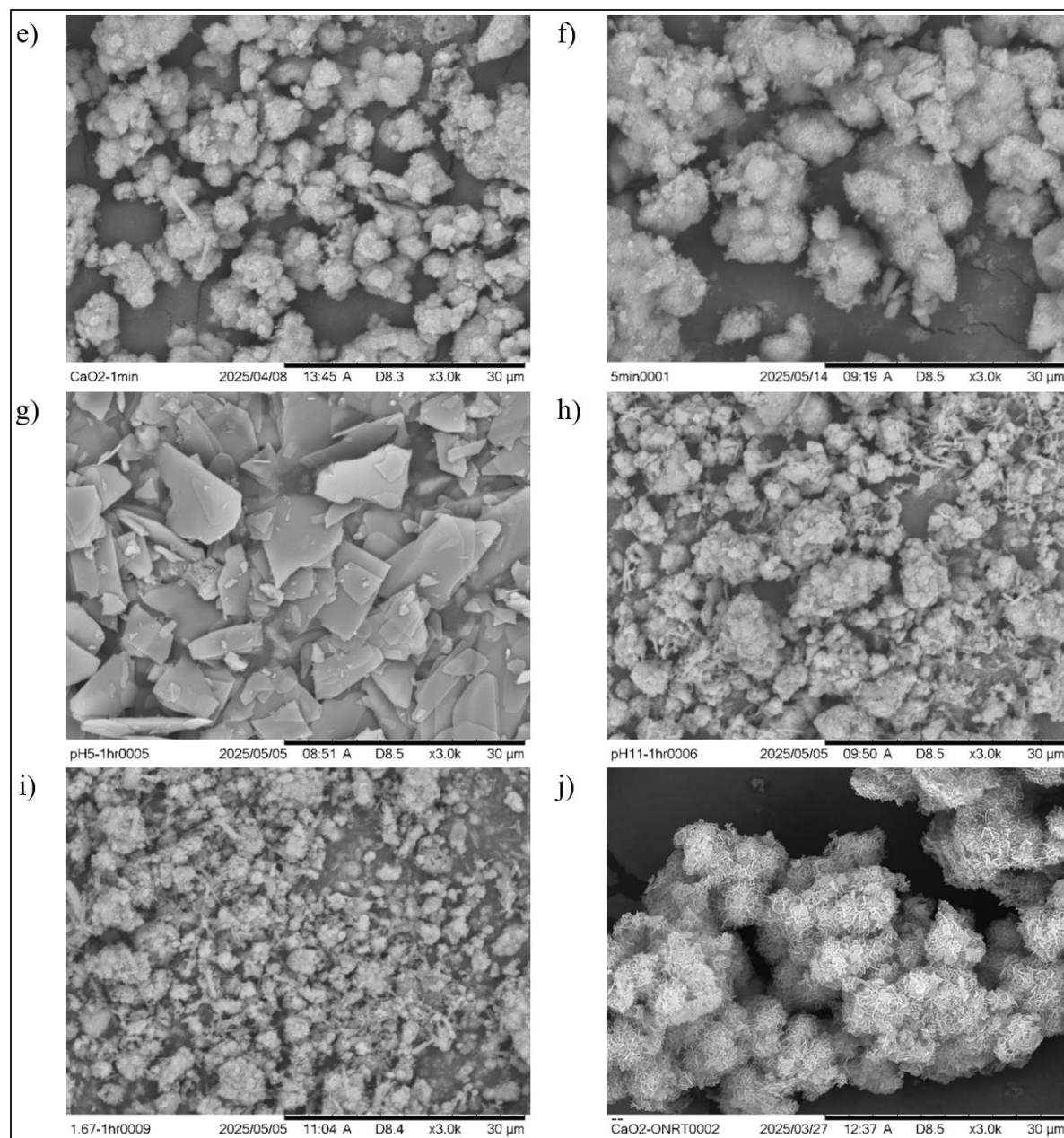


Figure-A XIII-1 (suite) Images obtenues du MEB par électrons rétrodiffusés à 15 kV des particules (a) CPO commercial et CPO recouvert dans le tampon phosphate (b) contrôle (flèches indiquent les morceaux d'enveloppes) (c) 4°C, (d) 50°C, (e) 1 min, (f) 5 min, (g) pH 5, (h) pH 11, (i) Ca/P = 1,67 et (j) séchage *overnight* à température pièce. Échelle : 30 µm

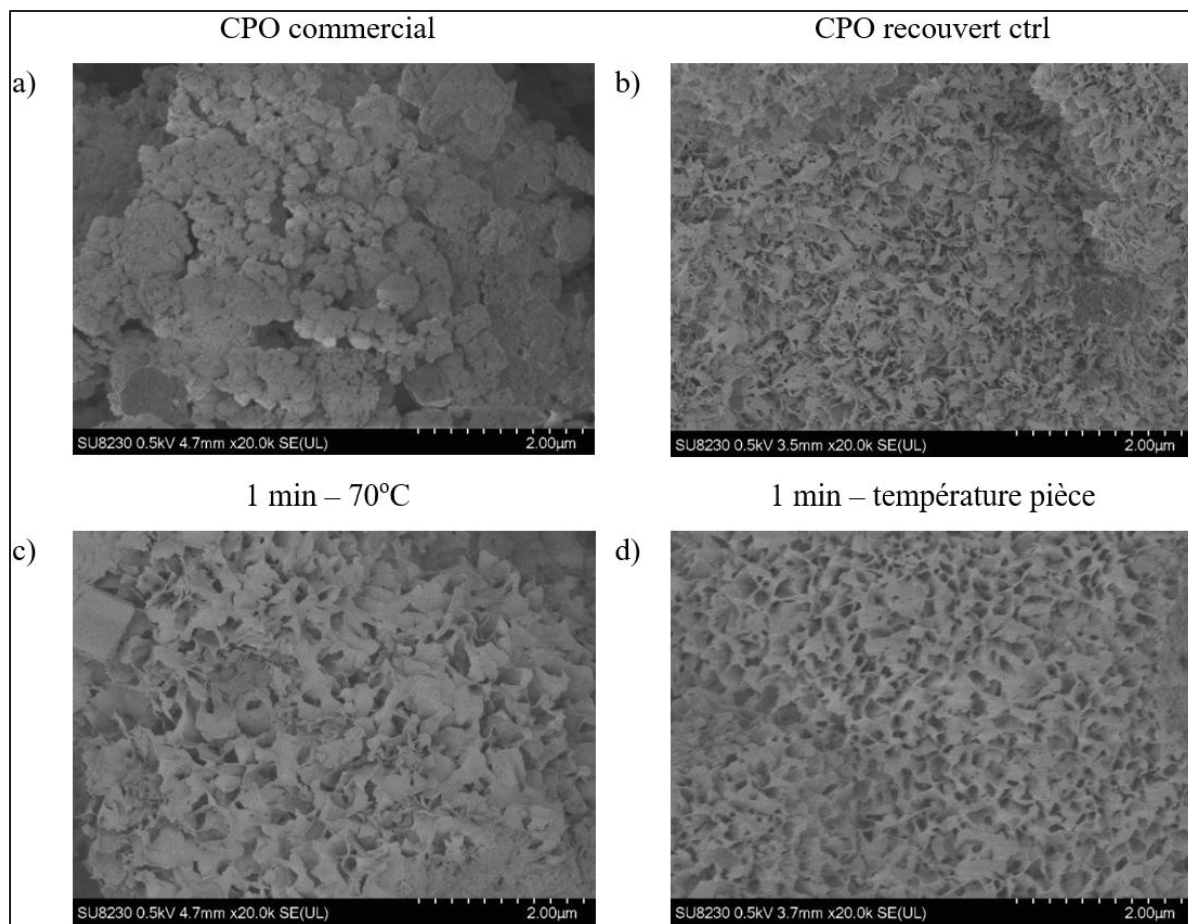


Figure-A XIII-2 Images obtenues du MEB par électrons secondaires à 0,5 kV des particules (a) CPO commercial et CPO recouvert dans le tampon phosphate (b) contrôle, (c) 1 min et séché à 70°C et (d) 1 min et séché à température pièce. Échelle : 2 µm

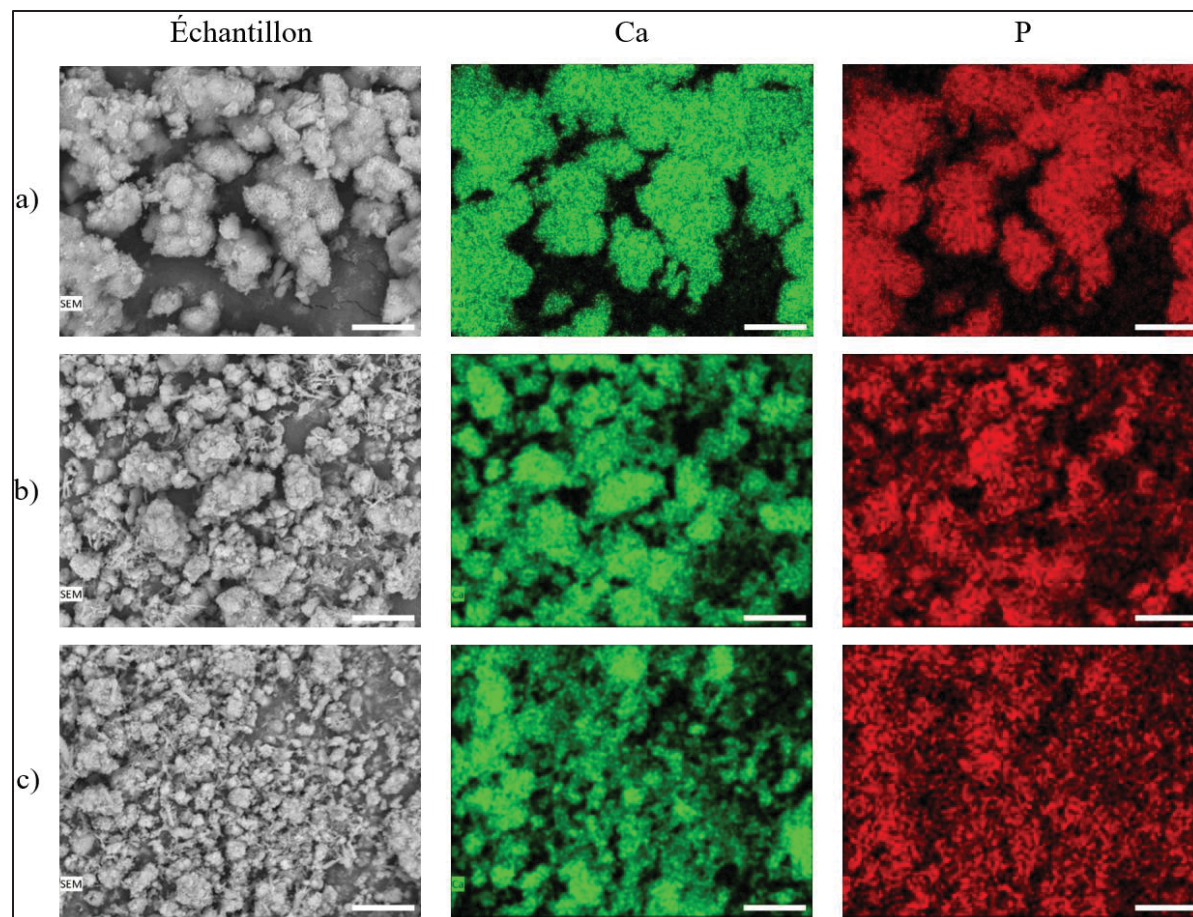


Figure-A XIII-3 Cartographie de la distribution des éléments calcium (Ca) et phosphore (P) à la surface des particules recouvertes (a) à 5 min d'agitation dans le tampon phosphate (b) dans le tampon phosphate pH 11 et (c) à un ratio Ca/P = 1,67. Échelle : 10 μ m

ANNEXE XIV

SPECTRES FTIR

Les spectres FTIR de 400 à 4000 cm^{-1} pour différents temps de recouvrement dans le tampon phosphate (1 à 120 min) sont présentés dans la Figure-A XIV-1.

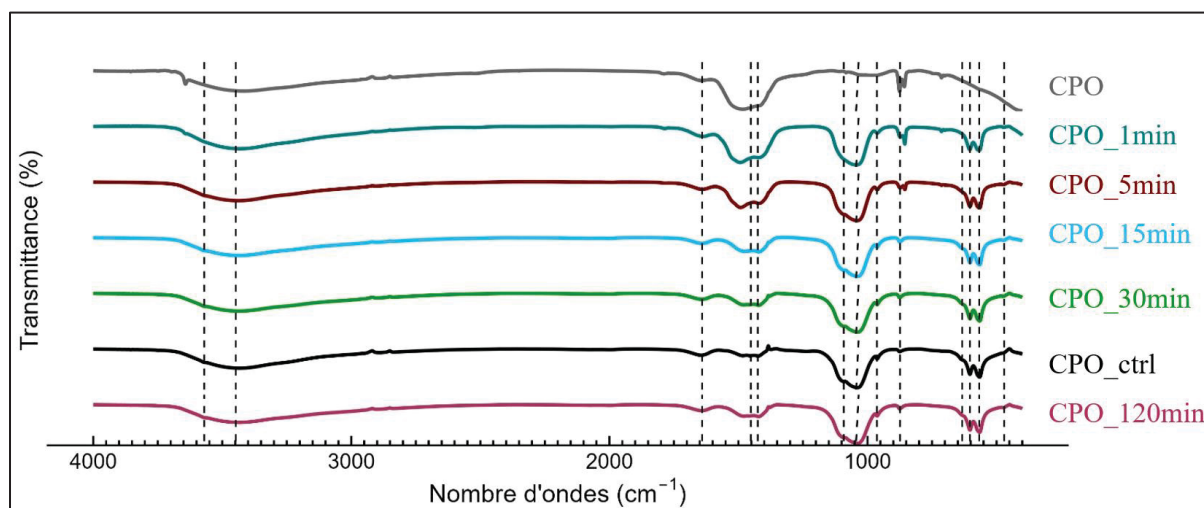


Figure-A XIV-1 Spectres FTIR du CPO commercial et du CPO recouvert sur différentes périodes normalisés à 1044 cm^{-1} (CPO normalisé à 1482 cm^{-1})

ANNEXE XV

RELARGAGE D'H₂O₂ SELON LA TEMPÉRATURE DE SÉCHAGE DES PARTICULES

Le relargage d'H₂O₂ (Figure-A XV-1) provenant d'hydrogels encapsulant des particules recouvertes et séchées *overnight* à température pièce (CPO_dRT) ou à 70°C (CPO_ctrl) est considéré. Un léger *burst release* d'H₂O₂ est observé pour le CPO_dRT aux jours 0 et 1 alors que le CPO_ctrl semble reprendre le dessus durant les derniers jours de l'expérience.

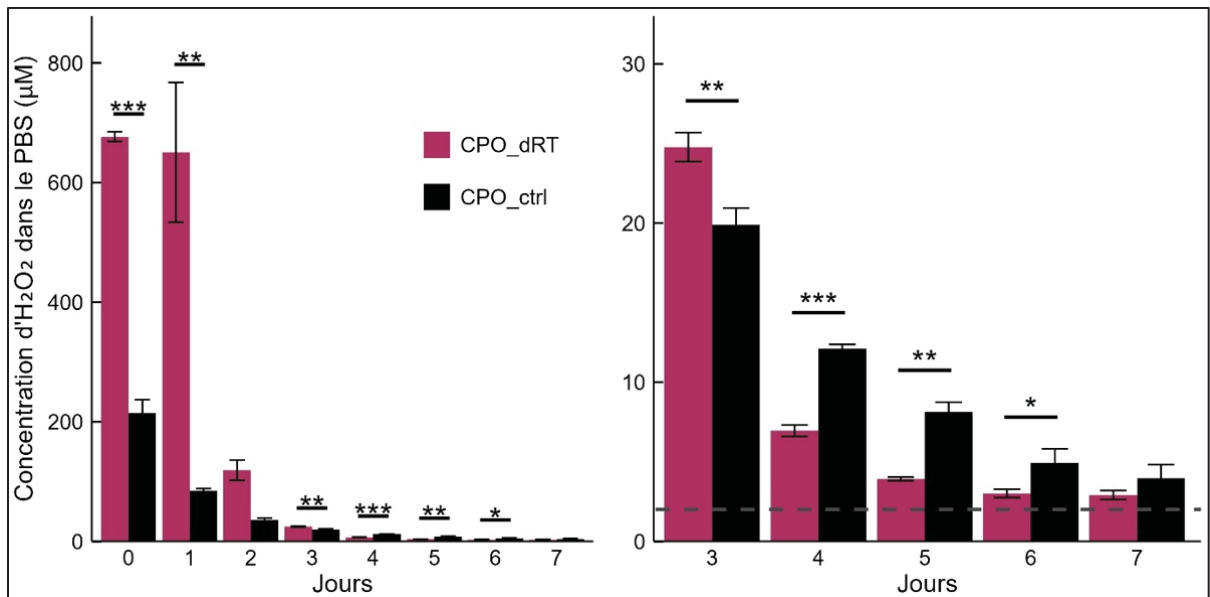


Figure-A XV-1 **Gauche** : Concentration quotidienne d'H₂O₂ relargué des hydrogels dans le PBS en hypoxie sur 7 jours en fonction de la température de séchage des particules après le recouvrement, soit température pièce (CPO_dRT) et 70°C (CPO_ctrl). **Droite** : agrandissement sur les données des jours 3 à 7. *, **, *** p < 0,05, 0,01, 0,001 respectivement. Student's T-test pour tous les *time points* (sauf jour 2: Mann-Whitney). N=1, n=3

LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abraham, R. T., & Weiss, A. (2004). Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nature Reviews Immunology*, 4(4), 301–308. doi: <https://doi.org/10.1038/nri1330>
- Agarwalla, P., Ogunnaike, E. A., Ahn, S., Froehlich, K. A., Jansson, A., Ligler, F. S., . . . Brudno, Y. (2022). Bioinstructive implantable scaffolds for rapid in vivo manufacture and release of CAR-T cells. *Nature Biotechnology*, 40(8), 1250–1258. doi: <https://doi.org/10.1038/s41587-022-01245-x>
- Aghajanpour, S., Esfandyari-Manesh, M., Ghahri, T., Ghahremani, M. H., Atyabi, F., Heydari, M., . . . Dinarvand, R. (2022). Impact of oxygen-calcium-generating and bone morphogenetic protein-2 nanoparticles on survival and differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the 3D bio-printed scaffold. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 216, 112581. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112581>
- Agulnick, A. D., Ambruzs, D. M., Moorman, M. A., Bhoumik, A., Cesario, R. M., Payne, J. K., . . . D'Amour, K. A. (2015). Insulin-Producing Endocrine Cells Differentiated In Vitro From Human Embryonic Stem Cells Function in Macroencapsulation Devices In Vivo. *Stem Cells Translational Medicine*, 4(10), 1214–1222. doi: <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0079>
- Al-Qasas, N. S., & Rohani, S. (2005). Synthesis of Pure Hydroxyapatite and the Effect of Synthesis Conditions on its Yield, Crystallinity, Morphology and Mean Particle Size. *Separation Science and Technology*, 40(15), 3187–3224. doi: <https://doi.org/10.1080/01496390500385400>
- Albarrán, V., San Román, M., Pozas, J., Chamorro, J., Rosero, D. I., Guerrero, P., . . . Soria, A. (2024). Adoptive T cell therapy for solid tumors: current landscape and future challenges. *Frontiers in Immunology*, 15. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1352805>
- Aleemardani, M., Solouk, A., Akbari, S., & Moeini, M. (2023). A hydrogel–fiber–hydrogel composite scaffold based on silk fibroin with the dual-delivery of oxygen and quercetin. *Biotechnology and Bioengineering*, 120(1), 297–311. doi: <https://doi.org/10.1002/bit.28259>
- Alemdar, N., Leijten, J., Camci-Unal, G., Hjortnaes, J., Ribas, J., Paul, A., . . . Khademhosseini, A. (2017). Oxygen-Generating Photo-Cross-Linkable Hydrogels Support Cardiac Progenitor Cell Survival by Reducing Hypoxia-Induced Necrosis. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 3(9), 1964–1971. doi: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.6b00109>

- Almeida, A., Loy, A., & Hofmann, H. (2018). ggplot2 Compatible Quantile-Quantile Plots in R. *The R Journal*, 10(2), 248–261. doi: <https://doi.org/10.32614/RJ-2018-051>
- Amaria, R. N., Komanduri, K. V., Schoenfeld, A. J., Ramsingh, G., Burga, R. A., & Jagasia, M. H. (2025). Entering a new era of tumor-infiltrating lymphocyte cell therapy innovation. *Cytotherapy*, 27(7), 864–873. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2024.12.010>
- Amerhaider Nuar, N. N., Jamil, S. N. M., Choong, T. S., Mat Azmi, I. D., Abdul Romli, N. A., Abdullah, L. C., . . . Li, F. (2023). Synthesis of Calcium Peroxide Nanoparticles with Starch as a Stabilizer for the Degradation of Organic Dye in an Aqueous Solution. *Polymers*, 15(5), 1327. doi: <https://doi.org/10.3390/polym15051327>
- Amerhaider Nuar, N. N., Jamil, S. N. M., Li, F., Mat Azmi, I. D., Chiang, P.-C., & Choong, T. S. (2022). Synthesis of Controlled-Release Calcium Peroxide Nanoparticles Coated with Dextran for Removal of Doxycycline from Aqueous System. *Polymers*, 14(18), 3866. doi: <https://doi.org/10.3390/polym14183866>
- American Chemical Society. (2019). Dichloromethane. Repéré à <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/d/dichloromethane.html>
- American Chemical Society. (2024). Chloroform. Repéré à <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/c/chloroform.html>
- Ashammakhi, N., Darabi, M. A., Kehr, N. S., Erdem, A., Hu, S.-K., Dokmeci, M. R., . . . Khademhosseini, A. (2020). Advances in Controlled Oxygen Generating Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Therapy. *Biomacromolecules*, 21(1), 56–72. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.9b00546>
- Assaad, E., Maire, M., & Lerouge, S. (2015). Injectable thermosensitive chitosan hydrogels with controlled gelation kinetics and enhanced mechanical resistance. *Carbohydrate Polymers*, 130, 87–96. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.063>
- Augustine, R., Gezek, M., Bostanci, N. S., Nguyen, A., & Camci-Unal, G. (2023). Oxygen-generating scaffolds: One step closer to the clinical translation of tissue engineered products. *Chemical Engineering Journal*, 455, 140783. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2022.140783>
- Bae, K.-S. (2025). sasLM: 'SAS' Linear Model. Repéré à <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.sasLM>
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2015). Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1), 1–48. doi: <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>

- Bhattacharjee, R., Pallavi, P., Bajrang, B., Mandal, S., Pradhan, L., Nayak, M., & Mukherjee, S. (2026). Oxygen generating magnesium peroxide nanoparticles by in-situ catalytic reaction with nano-manganese oxide promote rapid healing of chronic diabetic wounds. *Biomaterials Advances*, 179, 214521. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2025.214521>
- BioStatus. (2023). HypoxiTRAK™. Repéré à <https://www.biostatus.com/HypoxiTRAK/>
- Boanini, E., Silingardi, F., Gazzano, M., & Bigi, A. (2021). Synthesis and Hydrolysis of Brushite (DCPD): The Role of Ionic Substitution. *Crystal Growth & Design*, 21(3), 1689–1697. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.0c01569>
- Bosak, D., & Huang, B. (2025). reporter: Creates Statistical Reports. Repéré à <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.reporter>
- Boskey, A. L., & Posner, A. S. (1973). Conversion of amorphous calcium phosphate to microcrystalline hydroxyapatite. A pH-dependent, solution-mediated, solid-solid conversion. *The Journal of Physical Chemistry*, 77(19), 2313–2317. doi: <https://doi.org/10.1021/j100638a011>
- Brown, P. W., & Fulmer, M. (1991). Kinetics of Hydroxyapatite Formation at Low Temperature. *Journal of the American Ceramic Society*, 74(5), 934–940. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1151-2916.1991.tb04324.x>
- Byrnes, J. R., Weeks, A. M., Shifrut, E., Carnevale, J., Kirkemo, L., Ashworth, A., . . . Wells, J. A. (2022). Hypoxia Is a Dominant Remodeler of the Effector T Cell Surface Proteome Relative to Activation and Regulatory T Cell Suppression. *Molecular & Cellular Proteomics*, 21(4), 100217. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2022.100217>
- Caldwell, C. C., Kojima, H., Lukashev, D., Armstrong, J., Farber, M., Apasov, S. G., & Sitkovsky, M. V. (2001). Differential Effects of Physiologically Relevant Hypoxic Conditions on T Lymphocyte Development and Effector Functions. *The Journal of Immunology*, 167(11), 6140–6149. doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6140>
- Camci-Unal, G., Alemdar, N., Annabi, N., & Khademhosseini, A. (2013). Oxygen-releasing biomaterials for tissue engineering. *Polymer International*, 62(6), 843–848. doi: <https://doi.org/10.1002/pi.4502>
- Cárdenas-Moreno, Y., González-Bacerio, J., García Arellano, H., & del Monte-Martínez, A. (2023). Oxidoreductase enzymes: Characteristics, applications, and challenges as a biocatalyst. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 70(6), 2108–2135. doi: <https://doi.org/10.1002/bab.2513>

- Cassidy, D. P., & Irvine, R. L. (1999). Use of calcium peroxide to provide oxygen for contaminant biodegradation in a saturated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 69(1), 25–39. doi: [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(99\)00051-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(99)00051-5)
- Chan, B. P., & Leong, K. W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*, 17(4), 467–479. doi: <https://doi.org/10.1007/s00586-008-0745-3>
- Chelikani, P., Fita, I., & Loewen, P. C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(2), 192–208. doi: <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3206-5>
- Chenite, A., Buschmann, M., Wang, D., Chaput, C., & Kandani, N. (2001). Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions. *Carbohydrate Polymers*, 46(1), 39–47. doi: [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00281-2](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00281-2)
- Chenite, A., Chaput, C., Wang, D., Combes, C., Buschmann, M. D., Hoemann, C. D., . . . Selmani, A. (2000). Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials*, 21(21), 2155–2161. doi: [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00116-2)
- Cho, I., & Lee, K. (2002). Effect of calcium peroxide on the growth and proliferation of *Microcystis aeruginosa*, a water-blooming cyanobacterium. *Biotechnology and Bioengineering*, 7(4), 231–233. doi: <https://doi.org/10.1007/BF02932976>
- Chuprunov, K., Yudin, A., Lysov, D., Kolesnikov, E., Kuznetsov, D., Leybo, D., . . . Godymchuk, A. (2020). The pH Level Influence on Hydroxyapatite Phase Composition Synthesized with Hydrothermal Method. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 731(1), 012023. doi: <https://doi.org/10.1088/1757-899X/731/1/012023>
- Clark, E. R., & Clark, E. L. (1939). Microscopic observations on the growth of blood capillaries in the living mammal. *American Journal of Anatomy*, 64(2), 251–301. doi: <https://doi.org/10.1002/aja.1000640203>
- Cunha, P. P., Minogue, E., Krause, L. C. M., Hess, R. M., Bargiela, D., Wadsworth, B. J., . . . Johnson, R. S. (2023). Oxygen levels at the time of activation determine T cell persistence and immunotherapeutic efficacy. *eLife*, 12, e84280. doi: <https://doi.org/10.7554/eLife.84280>
- Cunningham, N., Malaret, T., Thébault, P., St-Jean, G., Azzi, F., Trudel, D., . . . Lerouge, S. (2023). T cell-loaded injectable chitosan scaffold shows short-term efficacy in localised cancer immunotherapy in mice. *Biomaterials Science*, 11(10), 3561–3573. doi: <http://dx.doi.org/10.1039/D2BM01795D>

- Daneshmandi, L., & Laurencin, C. T. (2020). Regenerative engineered vascularized bone mediated by calcium peroxide. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 108(5), 1045–1057. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36879>
- Davern, M., Donlon, N. E., O’Connell, F., Gaughan, C., O’Donovan, C., McGrath, J., . . . Lysaght, J. (2023). Nutrient deprivation and hypoxia alter T cell immune checkpoint expression: potential impact for immunotherapy. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 149(8), 5377–5395. doi: <https://doi.org/10.1007/s00432-022-04440-0>
- De, A., Jee, J.-P., & Park, Y.-J. (2024). Why Perfluorocarbon nanoparticles encounter bottlenecks in clinical translation despite promising oxygen carriers? *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 199, 114292. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2024.114292>
- Decker, H., & van Holde, K. E. (2011a). Coping with Oxygen. Dans H. Decker & K. E. van Holde (Éds.), *Oxygen and the Evolution of Life* (1 éd., pp. 43–59). doi: https://doi.org/10.1007/978-3-642-13179-0_3
- Decker, H., & van Holde, K. E. (2011b). Facilitated Oxygen Transport. Dans H. Decker & K. E. van Holde (Éds.), *Oxygen and the Evolution of Life* (1 éd., pp. 79–105). doi: https://doi.org/10.1007/978-3-642-13179-0_5
- Diez-Escudero, A., Espanol, M., & Ginebra, M.-P. (2024). High-aspect-ratio nanostructured hydroxyapatite: towards new functionalities for a classical material. *Chemical Science*, 15(1), 55–76. doi: <http://dx.doi.org/10.1039/D3SC05344J>
- Doedens, A. L., Phan, A. T., Stradner, M. H., Fujimoto, J. K., Nguyen, J. V., Yang, E., . . . Goldrath, A. W. (2013). Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8⁺ T cells to persistent antigen. *Nature Immunology*, 14(11), 1173–1182. doi: <https://doi.org/10.1038/ni.2714>
- Du, L.-W., Bian, S., Gou, B.-D., Jiang, Y., Huang, J., Gao, Y.-X., . . . Wang, K. (2013). Structure of Clusters and Formation of Amorphous Calcium Phosphate and Hydroxyapatite: From the Perspective of Coordination Chemistry. *Crystal Growth & Design*, 13(7), 3103–3109. doi: <https://doi.org/10.1021/cg400498j>
- Du, S., Yan, J., Xue, Y., Zhong, Y., & Dong, Y. (2023). Adoptive cell therapy for cancer treatment. *Exploration*, 3(4), 20210058. doi: <https://doi.org/10.1002/EXP.20210058>
- Echeverria Molina, M. I., Malollari, K. G., & Komvopoulos, K. (2021). Design Challenges in Polymeric Scaffolds for Tissue Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. doi: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.617141>

- El-Kadiry, A. E.-H., Rafei, M., & Shammaa, R. (2021). Cell Therapy: Types, Regulation, and Clinical Benefits. *Frontiers in Medicine*, 8. doi: <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.756029>
- Elhendawi, H., Felfel, R. M., Abd El-Hady, B. M., & Reicha, F. M. (2014). Effect of Synthesis Temperature on the Crystallization and Growth of In Situ Prepared Nanohydroxyapatite in Chitosan Matrix. *International Scholarly Research Notices*, 2014(1), 897468. doi: <https://doi.org/10.1155/2014/897468>
- Fahy, L., Calvo, J., Chabi, S., Renou, L., Le Maout, C., Poglio, S., . . . Uzan, B. (2021). Hypoxia favors chemoresistance in T-ALL through an HIF1 α -mediated mTORC1 inhibition loop. *Blood Adv*, 5(2), 513–526. doi: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2020002832>
- Farris, A. L., Rindone, A. N., & Grayson, W. L. (2016). Oxygen delivering biomaterials for tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, 4(20), 3422–3432. doi: <http://dx.doi.org/10.1039/C5TB02635K>
- Food & Drug Administration. (2017). FDA approves tisagenlecleucel for B-cell ALL and tocilizumab for cytokine release syndrome. Repéré à <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs/fda-approves-tisagenlecleucel-b-cell-all-and-tocilizumab-cytokine-release-syndrome>
- Food & Drug Administration. (2025). FDA Approves First CAR T-Cell Therapy for Marginal Zone Lymphoma In the US. Repéré à <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-car-t-cell-therapy-marginal-zone-lymphoma-us>
- Food & Drug Administration, & ICH. (2018). *Q3C - Tables and List Guidance for Industry (Rev.4)*. Repéré à <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q3c-tables-and-list-rev-4>
- Fox, J., & Weisberg, S. (2019). *An R Companion to Applied Regression* (3e éd.). Thousand Oaks, CA: Sage Publications.
- Fulmer, M. T., & Brown, P. W. (1993). Effects of temperature on the formation of hydroxyapatite. *Journal of Materials Research*, 8(7), 1687–1696. doi: <https://doi.org/10.1557/JMR.1993.1687>
- Gao, S., Lu, X., Zhu, P., Lin, H., Yu, L., Yao, H., . . . Shi, J. (2019). Self-evolved hydrogen peroxide boosts photothermal-promoted tumor-specific nanocatalytic therapy. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(22), 3599–3609. doi: <http://dx.doi.org/10.1039/C9TB00525K>
- García-Piñeres, A. J., Hildesheim, A., Williams, M., Trivett, M., Strobl, S., & Pinto, L. A. (2006). DNase treatment following thawing of Cryopreserved PBMC is a procedure

- suitable for lymphocyte functional studies. *Journal of Immunological Methods*, 313(1), 209–213. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2006.04.004>
- Ghaffari-Bohloul, P., Alimoradi, H., Freitas Siqueira Petri, D., Moghassemi, S., Amorim, C. A., Nie, L., & Shavandi, A. (2023). Alleviating hypoxia through self-generating oxygen and hydrogen peroxide fluorinated chitosan: Insights from a kinetic study. *Chemical Engineering Journal*, 473, 145072. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.145072>
- Gioia, L., Siddique, A., Head, S. R., Salomon, D. R., & Su, A. I. (2018). A genome-wide survey of mutations in the Jurkat cell line. *BMC Genomics*, 19(1), 334. doi: <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4718-6>
- Gladwin, M. T., Crawford, J. H., & Patel, R. P. (2004). The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radical Biology and Medicine*, 36(6), 707–717. doi: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2003.11.032>
- Golchin, A. (2021). Cell-Based Therapy for Severe COVID-19 Patients: Clinical Trials and Cost-Utility. *Stem Cell Reviews and Reports*, 17(1), 56–62. doi: <https://doi.org/10.1007/s12015-020-10046-1>
- Goronzy, J. J., Fujii, H., & Weyand, C. M. (2006). Telomeres, immune aging and autoimmunity. *Experimental Gerontology*, 41(3), 246–251. doi: <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.12.002>
- Gropper, Y., Feferman, T., Shalit, T., Salame, T.-M., Porat, Z., & Shakhar, G. (2017). Culturing CTLs under Hypoxic Conditions Enhances Their Cytolysis and Improves Their Anti-tumor Function. *Cell Reports*, 20(11), 2547–2555. doi: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.071>
- Guyot, C., & Lerouge, S. (2018). Can we Achieve the Perfect Injectable Scaffold for Cell Therapy? *Future Science OA*, 4(4), FSO284. doi: <https://doi.org/10.4155/fsoa-2017-0153>
- Haddad-Mashadrizheh, A., Matin, M. M., Shahabipour, F., Ensandost, S., Zomorodipour, A., & Bahrami, A. R. (2022). Effects of chitosan-glycerol phosphate hydrogel on the maintenance and homing of hAd-MSCs after xenotransplantation into the rat liver. *Emergent Materials*, 5(2), 519–528. doi: <https://doi.org/10.1007/s42247-021-00167-9>
- Haixia, X., Peng, Z., Jiezhao, L., Huiling, G., Xie, C., Yihan, W., . . . Liu, C. (2024). 3D-Printed Magnesium Peroxide-Incorporated Scaffolds with Sustained Oxygen Release and Enhanced Photothermal Performance for Osteosarcoma Multimodal Treatments. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 16(8), 9626–9639. doi: <https://doi.org/10.1021/acsami.3c10807>

- Han, X., Alu, A., Liu, H., Shi, Y., Wei, X., Cai, L., & Wei, Y. (2022). Biomaterial-assisted biotherapy: A brief review of biomaterials used in drug delivery, vaccine development, gene therapy, and stem cell therapy. *Bioactive Materials*, 17, 29–48. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.01.011>
- Harel, D. (2020). sur: Companion to "Statistics Using R: An Integrative Approach". Repéré à <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.sur>
- Harrison, B. S., Eberli, D., Lee, S. J., Atala, A., & Yoo, J. J. (2007). Oxygen producing biomaterials for tissue regeneration. *Biomaterials*, 28(31), 4628–4634. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.07.003>
- Harugade, A., Sherje, A. P., & Pethe, A. (2023). Chitosan: A review on properties, biological activities and recent progress in biomedical applications. *Reactive and Functional Polymers*, 191, 105634. doi: <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2023.105634>
- Hassan, S., Wang, T., Shi, K., Huang, Y., Urbina Lopez, M. E., Gan, K., . . . Shin, S. R. (2023). Self-oxygenation of engineered living tissues orchestrates osteogenic commitment of mesenchymal stem cells. *Biomaterials*, 300, 122179. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2023.122179>
- He, C., Zhang, X., Yan, R., Zhao, P., Chen, Y., Li, M., . . . Xiang, G. (2019). Enhancement of cisplatin efficacy by lipid–CaO₂ nanocarrier-mediated comprehensive modulation of the tumor microenvironment. *Biomaterials Science*, 7(10), 4260–4272. doi: <http://dx.doi.org/10.1039/C9BM00797K>
- He, W., Cui, K., Farooq, M. A., Huang, N., Zhu, S., Jiang, D., . . . Xu, G. (2025). TCR-T cell therapy for solid tumors: challenges and emerging solutions. *Frontiers in Pharmacology*, 16. doi: <https://doi.org/10.3389/fphar.2025.1493346>
- Hong, F., Qiu, P., Wang, Y., Ren, P., Liu, J., Zhao, J., & Gou, D. (2024). Chitosan-based hydrogels: From preparation to applications, a review. *Food Chemistry: X*, 21, 101095. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.101095>
- Hu, Q., Li, H., Archibong, E., Chen, Q., Ruan, H., Ahn, S., . . . Gu, Z. (2021). Inhibition of post-surgery tumour recurrence via a hydrogel releasing CAR-T cells and anti-PDL1-conjugated platelets. *Nature Biomedical Engineering*, 5(9), 1038–1047. doi: <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00712-1>
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>

- Ito, H., Oaki, Y., & Imai, H. (2008). Selective Synthesis of Various Nanoscale Morphologies of Hydroxyapatite via an Intermediate phase. *Crystal Growth & Design*, 8(3), 1055–1059. doi: <https://doi.org/10.1021/cg070443f>
- Jägers, J., Wrobeln, A., & Ferenz, K. B. (2021). Perfluorocarbon-based oxygen carriers: from physics to physiology. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 473(2), 139–150. doi: <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02482-2>
- Jahr, J. S., MacKinnon, K., Baum, V. C., & Alayash, A. I. (2025). Hemoglobin-based oxygen carriers: Biochemical, biophysical differences, and safety. *Transfusion*, 65(2), 386–396. doi: <https://doi.org/10.1111/trf.18116>
- Jennings, J. A. (2017). 7 - Controlling chitosan degradation properties in vitro and in vivo. Dans J. A. Jennings & J. D. Bumgardner (Éds.), *Chitosan Based Biomaterials* (Vol. 1, pp. 159–182). doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100230-8.00007-8>
- Jiang, S., Zheng, Y., Xia, H., Liu, Z., Rao, S., Wang, Y., . . . Xie, C. (2024). Oxygen-Releasing Hydrogels for Tissue Regeneration. *Advanced NanoBiomed Research*, 4(6), 2300133. doi: <https://doi.org/10.1002/anbr.202300133>
- Jiang, Y., Li, Y., & Zhu, B. (2015). T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death & Disease*, 6(6), e1792. doi: <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.162>
- Jin, M., & Wang, L. (2025). A review on calcium peroxide: Preparation raw materials and methods, modifications, environmental applications, and future prospects. *Journal of Water Process Engineering*, 78, 108676. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2025.108676>
- Kang, J. I., Park, K. M., & Park, K. D. (2019). Oxygen-generating alginate hydrogels as a bioactive acellular matrix for facilitating wound healing. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 69, 397–404. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2018.09.048>
- Kassambara, A. (2025). rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests. Repéré à <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.rstatix>
- Kattimani, V. S., Kondaka, S., & Lingamaneni, K. P. (2016). Hydroxyapatite—Past, Present, and Future in Bone Regeneration. *Bone and Tissue Regeneration Insights*, 7. doi: <https://doi.org/10.4137/BTRI.S36138>
- Katzen, D., Chu, E., Terhost, C., Leung, D. Y., Gesner, M., Miller, R. A., & Geha, R. S. (1985). Mechanisms of human T cell response to mitogens: IL 2 induces IL 2 receptor expression and proliferation but not IL 2 synthesis in PHA-stimulated T cells. *J Immunol*, 135(3), 1840–1845. doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.135.3.1840>

- Kay, M., Elkin, L., Higgins, J., & Wobbrock, J. (2025). ARTool: Aligned Rank Transform
Repéré à <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.ARTool>
- Keane, T. J., & Badylak, S. F. (2014). Biomaterials for tissue engineering applications. *Seminars in Pediatric Surgery*, 23(3), 112–118. doi: <https://doi.org/10.1053/j.sempedsurg.2014.06.010>
- Khattak, S. F., Chin, K.-S., Bhatia, S. R., & Roberts, S. C. (2007). Enhancing oxygen tension and cellular function in alginate cell encapsulation devices through the use of perfluorocarbons. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(1), 156–166. doi: <https://doi.org/10.1002/bit.21151>
- Kim, C. W., Kim, C. J., Park, E.-H., Ryu, S., Lee, Y., Kim, E., . . . Chang, K. (2020). MSC-Encapsulating in Situ Cross-Linkable Gelatin Hydrogels To Promote Myocardial Repair. *ACS Applied Bio Materials*, 3(3), 1646–1655. doi: <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b01215>
- Kim, H., Peng, G., Hicks, J. M., Weiss, H. L., Van Meir, E. G., Brenner, M. K., & Yotnda, P. (2008). Engineering Human Tumor-specific Cytotoxic T Cells to Function in a Hypoxic Environment. *Molecular Therapy*, 16(3), 599–606. doi: <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300391>
- Kim, J., Jeong Ryu, S., Oh, K., Ju, J.-M., Yeong Jeon, J., Nam, G., . . . Young Choi, E. (2015). Memory programming in CD8+ T-cell differentiation is intrinsic and is not determined by CD4 help. *Nature Communications*, 6(1), 7994. doi: <https://doi.org/10.1038/ncomms8994>
- Kim, K.-I., Ku, K.-H., Cho, H.-M., Han, H.-G., & Kim, M.-S. (2025). Comparison of the effects of hydrogel and normal saline as carriers of MSC on fracture healing in a rat long bone fracture model. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 20(1), 629. doi: <https://doi.org/10.1186/s13018-025-06029-y>
- Kothapalli, C. R., Wei, M., Legeros, R. Z., & Shaw, M. T. (2005). Influence of temperature and aging time on HA synthesized by the hydrothermal method. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 16(5), 441–446. doi: <https://doi.org/10.1007/s10856-005-6984-5>
- Lavertu, M., Filion, D., & Buschmann, M. D. (2008). Heat-Induced Transfer of Protons from Chitosan to Glycerol Phosphate Produces Chitosan Precipitation and Gelation. *Biomacromolecules*, 9(2), 640–650. doi: <https://doi.org/10.1021/bm700745d>
- Lazić, S., Zec, S., Miljević, N., & Milonjić, S. (2001). The effect of temperature on the properties of hydroxyapatite precipitated from calcium hydroxide and phosphoric acid. *Thermochimica Acta*, 374(1), 13–22. doi: [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(01\)00453-1](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(01)00453-1)

- Le Pape, F., Bossard, M., Dutheil, D., Rousselot, M., Polard, V., Férec, C., . . . Zal, F. (2015). Advancement in recombinant protein production using a marine oxygen carrier to enhance oxygen transfer in a CHO-S cell line. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 43(3), 186–195. doi: <https://doi.org/10.3109/21691401.2015.1029632>
- Le Pape, F., Cosnuau-Kemmat, L., Richard, G., Dubrana, F., Férec, C., Zal, F., . . . Delépine, P. (2017). HEMOXCell, a New Oxygen Carrier Usable as an Additive for Mesenchymal Stem Cell Culture in Platelet Lysate-Supplemented Media. *Artif Organs*, 41(4), 359–371. doi: <https://doi.org/10.1111/aor.12892>
- Le Pape, F., Richard, G., Porchet, E., Sourice, S., Dubrana, F., Férec, C., . . . Leize, E. (2018). Adhesion, proliferation and osteogenic differentiation of human MSCs cultured under perfusion with a marine oxygen carrier on an allogenic bone substitute. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(1), 95–107. doi: <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1365724>
- Lee, C.-S., Le Thanh, T., Kim, E.-J., Gong, J., Chang, Y.-Y., & Chang, Y.-S. (2014). Fabrication of novel oxygen-releasing alginate beads as an efficient oxygen carrier for the enhancement of aerobic bioremediation of 1,4-dioxane contaminated groundwater. *Bioresource Technology*, 171, 59–65. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.039>
- Lee, E. M., Jung, J.-I., Alam, Z., Yi, H.-G., Kim, H., Choi, J. W., . . . Ahn, C. (2018). Effect of an oxygen-generating scaffold on the viability and insulin secretion function of porcine neonatal pancreatic cell clusters. *Xenotransplantation*, 25(2), e12378. doi: <https://doi.org/10.1111/xen.12378>
- Lee, I.-H., Lee, J.-A., Lee, J.-H., Heo, Y.-W., & Kim, J.-J. (2020). Effects of pH and reaction temperature on hydroxyapatite powders synthesized by precipitation. *Journal of the Korean Ceramic Society*, 57(1), 56–64. doi: <https://doi.org/10.1007/s43207-019-00004-0>
- Lee, J., Kim, J., Kim, J., & Song, S.-C. (2025). Synergistic Effect of Prolonged Oxygenation and Reactive Oxygen Species Scavenging on Diabetic Wound Healing Using an Injectable Thermoresponsive Hydrogel. *Small*, 21(39), 2502399. doi: <https://doi.org/10.1002/smll.202502399>
- Lemaire, F., Sigrist, S., Brassard, J., Demini, L., Zal, F., Jeandidier, N., . . . Maillard, E. (2023). Beneficial Effects of Two Marine Oxygen Carriers, M101 and M201, on Human Islet Quality in Hypoxic Culture Conditions. *Cell Transplant*, 32. doi: <https://doi.org/10.1177/09636897231179642>
- Lenth, R. V., & Piaskowski, J. (2025). emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. Repéré à <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.emmeans>

- Li, D., Chen, Y., Zhou, C., Shi, C., Xu, Z., Miao, Z., . . . Han, J. (2024). XPS depth profiling of functional materials: applications of ion beam etching techniques. *Materials Chemistry Frontiers*, 8(3), 715–731. doi: <http://dx.doi.org/10.1039/D3QM01036H>
- Li, N., Lu, X., Yang, Y., Ning, S., Tian, Y., Zhou, M., . . . Zang, J. (2024). Calcium Peroxide-Based Hydrogel Patch with Sustainable Oxygenation for Diabetic Wound Healing. *Advanced Healthcare Materials*, 13(16), 2303314. doi: <https://doi.org/10.1002/adhm.202303314>
- Li, Z. Y., Lam, W. M., Yang, C., Xu, B., Ni, G. X., Abbah, S. A., . . . Lu, W. W. (2007). Chemical composition, crystal size and lattice structural changes after incorporation of strontium into biomimetic apatite. *Biomaterials*, 28(7), 1452–1460. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.11.001>
- Liang, J.-P., Accolla, R. P., Soundirarajan, M., Emerson, A., Coronel, M. M., & Stabler, C. L. (2021). Engineering a macroporous oxygen-generating scaffold for enhancing islet cell transplantation within an extrahepatic site. *Acta Biomaterialia*, 130, 268–280. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.05.028>
- Lin, C., Lu, T.-W., Hsu, F.-Y., Huang, T.-W., Ho, M.-H., Lu, H.-T., & Mi, F.-L. (2025). An injectable in situ-forming hydrogel with self-activating genipin-chitosan (GpCS) cross-linking and an O₂/Ca²⁺ self-supplying capability for wound healing and rapid hemostasis. *Carbohydrate Polymers*, 351, 123051. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2024.123051>
- Liu, J., Ye, X., Wang, H., Zhu, M., Wang, B., & Yan, H. (2003). The influence of pH and temperature on the morphology of hydroxyapatite synthesized by hydrothermal method. *Ceramics International*, 29(6), 629–633. doi: [https://doi.org/10.1016/S0272-8842\(02\)00210-9](https://doi.org/10.1016/S0272-8842(02)00210-9)
- Liu, L., Peng, Z., Wang, C., Wang, C., Liu, C., Zhu, L., & Tang, C. (2021). Effect of synthetic oxygen-generating system on cell survival under hypoxic condition in vitro. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 32(8), 967–979. doi: <https://doi.org/10.1080/09205063.2021.1878806>
- Liu, Y.-N., Yang, J.-F., Huang, D.-J., Ni, H.-H., Zhang, C.-X., Zhang, L., . . . Li, J. (2020). Hypoxia Induces Mitochondrial Defect That Promotes T Cell Exhaustion in Tumor Microenvironment Through MYC-Regulated Pathways. *Frontiers in Immunology*, 11. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01906>
- Lowe, K. C., Davey, M. R., & Power, J. B. (1998). Perfluorochemicals: their applications and benefits to cell culture. *Trends in Biotechnology*, 16(6), 272–277. doi: [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(98\)01205-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(98)01205-0)

- Lukashev, D., Klebanov, B., Kojima, H., Grinberg, A., Ohta, A., Berenfeld, L., . . . Sitkovsky, M. (2006). Cutting Edge: Hypoxia-Inducible Factor 1 α and Its Activation-Inducible Short Isoform I.1 Negatively Regulate Functions of CD4⁺ and CD8⁺ T Lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 177(8), 4962–4965. doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.8.4962>
- Lun, D.-X., Li, S.-Y., Li, N.-N., Mou, L.-M., Li, H.-Q., Zhu, W.-P., . . . Hu, Y.-C. (2024). Limitations and modifications in the clinical application of calcium sulfate. *Frontiers in Surgery*, 11. doi: <https://doi.org/10.3389/fsurg.2024.1278421>
- Ma, T., Wang, Y., Qi, F., Zhu, S., Huang, L., Liu, Z., . . . Luo, Z. (2013). The effect of synthetic oxygen carrier-enriched fibrin hydrogel on Schwann cells under hypoxia condition in vitro. *Biomaterials*, 34(38), 10016–10027. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.09.047>
- Maillard, E., Juszczak, M. T., Langlois, A., Kleiss, C., Sencier, M. C., Bietiger, W., . . . Sigrist, S. (2012). Perfluorocarbon Emulsions Prevent Hypoxia of Pancreatic β -Cells. *Cell Transplantation*, 21(4), 657–669. doi: <https://doi.org/10.3727/096368911X593136>
- Maleki, M., Karimi-Soflou, R., & Karkhaneh, A. (2025). Development of an in situ forming hydrogel concurrently delivering oxygen and magnesium for bone tissue engineering. *Applied Materials Today*, 44, 102703. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2025.102703>
- Mansour, S. F., El-dek, S. I., Ahmed, M. A., Abd-Elwahab, S. M., & Ahmed, M. K. (2016). Effect of preparation conditions on the nanostructure of hydroxyapatite and brushite phases. *Applied Nanoscience*, 6(7), 991–1000. doi: <https://doi.org/10.1007/s13204-015-0509-4>
- Mantell, L. L., Horowitz, S., Davis, J. M., & Kazzaz, J. A. (1999). Hyperoxia-induced Cell Death in the Lung—the Correlation of Apoptosis, Necrosis, and Inflammation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 887(1), 171–180. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07931.x>
- Mastrullo, V., Cathery, W., Velliou, E., Madeddu, P., & Campagnolo, P. (2020). Angiogenesis in Tissue Engineering: As Nature Intended? *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. doi: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00188>
- McKeown, S. R. (2014). Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours—implications for treatment response. *British Journal of Radiology*, 87(1035), 20130676. doi: <https://doi.org/10.1259/bjr.20130676>
- Mekmene, O., Quillard, S., Rouillon, T., Boulter, J.-M., Piot, M., & Gaucheron, F. (2009). Effects of pH and Ca/P molar ratio on the quantity and crystalline structure of calcium phosphates obtained from aqueous solutions. *Dairy Science & Technology*, 89(3), 301–316. doi: <https://doi.org/10.1051/dst/2009019>

- Melo, P., Thornton, T., Coomarasamy, A., & Granne, I. (2022). Evidence for the effectiveness of immunologic therapies in women with subfertility and/or undergoing assisted reproduction. *Fertility and Sterility*, 117(6), 1144–1159. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.04.015>
- Meng, F., Kassa, T., Jana, S., Wood, F., Zhang, X., Jia, Y., . . . Alayash, A. I. (2018). Comprehensive Biochemical and Biophysical Characterization of Hemoglobin-Based Oxygen Carrier Therapeutics: All HBOCs Are Not Created Equally. *Bioconjugate Chemistry*, 29(5), 1560–1575. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00093>
- Meyer, D., Dimitriadou, E., Hornik, K., Weingessel, A., & Leisch, F. (2024). e1071: Misc Functions of the Department of Statistics, Probability Theory Group (Formerly: E1071), TU Wien. Repéré à <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.e1071>
- Millipore Sigma. (s.d.). Enzymatic Assay of Catalase (EC 1.11.1.6). Repéré à <https://www.sigmaaldrich.com/CA/en/technical-documents/protocol/protein-biology/enzyme-activity-assays/enzymatic-assay-of-catalase>
- Mohd Pu'ad, N. A. S., Abdul Haq, R. H., Mohd Noh, H., Abdullah, H. Z., Idris, M. I., & Lee, T. C. (2020). Synthesis method of hydroxyapatite: A review. *Materials Today: Proceedings*, 29, 233–239. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.05.536>
- Mohseni-Vadeghani, E., Karimi-Soflou, R., Khorshidi, S., & Karkhaneh, A. (2021). Fabrication of oxygen and calcium releasing microcarriers with different internal structures for bone tissue engineering: Solid filled versus hollow microparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 197, 111376. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111376>
- Mondal, S., Park, S., Choi, J., Vu, T. T. H., Doan, V. H. M., Vo, T. T., . . . Oh, J. (2023). Hydroxyapatite: A journey from biomaterials to advanced functional materials. *Advances in Colloid and Interface Science*, 321, 103013. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2023.103013>
- Monette, A., Ceccaldi, C., Assaad, E., Lerouge, S., & Lapointe, R. (2016). Chitosan thermogels for local expansion and delivery of tumor-specific T lymphocytes towards enhanced cancer immunotherapies. *Biomaterials*, 75, 237–249. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.10.021>
- Moratti, S. C., & Cabral, J. D. (2017). 2 - Antibacterial properties of chitosan. Dans J. A. Jennings & J. D. Bumgardner (Éds.), *Chitosan Based Biomaterials* (Vol. 1, pp. 31–44). doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100230-8.00002-9>
- Mosmeri, H., Alaie, E., Shavandi, M., Dastgheib, S. M. M., & Tasharrofi, S. (2017). Benzene-contaminated groundwater remediation using calcium peroxide nanoparticles:

- synthesis and process optimization. *Environmental Monitoring and Assessment*, 189(9), 452. doi: <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6157-2>
- Mouré, A., Bacou, E., Bosch, S., Jegou, D., Salama, A., Riochet, D., . . . Mosser, M. (2019). Extracellular hemoglobin combined with an O₂-generating material overcomes O₂ limitation in the bioartificial pancreas. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(5), 1176–1189. doi: <https://doi.org/10.1002/bit.26913>
- Muzzelo, C., Neely, C., Shah, P., Abdulmalik, O., & Elmer, J. (2018). Prolonging the shelf life of *Lumbricus terrestris* erythrocrurin for use as a novel blood substitute. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(1), 39–46. doi: <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1290645>
- Mystkowska, J., Prokopczyk, G., & Łysik, D. (2024). Influence of Perfluorodecalin Content on the Properties of Blood Substitute. *Acta Mechanica et Automatica*, 18(4). doi: <https://doi.org/10.2478/ama-2024-0076>
- Nakagawa, Y., Negishi, Y., Shimizu, M., Takahashi, M., Ichikawa, M., & Takahashi, H. (2015). Effects of extracellular pH and hypoxia on the function and development of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Immunology Letters*, 167(2), 72–86. doi: <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2015.07.003>
- Naldini, A., Carraro, F., Silvestri, S., & Bocci, V. (1997). Hypoxia affects cytokine production and proliferative responses by human peripheral mononuclear cells. *Journal of Cellular Physiology*, 173(3), 335–342. doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199712\)173:3%3C335::AID-JCP5%3E3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199712)173:3%3C335::AID-JCP5%3E3.0.CO;2-O)
- Neitzke-Montinelli, V., Calôba, C., Melo, G., Frade, B. B., Caraméz, E., Mazzoccoli, L., . . . Viola, J. P. B. (2022). Differentiation of Memory CD8 T Cells Unravel Gene Expression Pattern Common to Effector and Memory Precursors. *Frontiers in Immunology*, 13. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.840203>
- Northup, A., & Cassidy, D. (2008). Calcium peroxide (CaO₂) for use in modified Fenton chemistry. *Journal of Hazardous Materials*, 152(3), 1164–1170. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.07.096>
- O'Brien, F. J. (2011). Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, 14(3), 88–95. doi: [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)
- O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., & Pognan, F. (2000). Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267(17), 5421–5426. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>

- Oba, B. T., Zheng, X., Aborisade, M. A., Battamo, A. Y., Kumar, A., Kavwenje, S., . . . Zhao, L. (2021). Environmental opportunities and challenges of utilizing unactivated calcium peroxide to treat soils co-contaminated with mixed chlorinated organic compounds. *Environmental Pollution*, 291, 118239. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118239>
- Ohta, A., Diwanji, R., Kini, R., Subramanian, M., Ohta, A., & Sitkovsky, M. (2011). In vivo T Cell Activation in Lymphoid Tissues is Inhibited in the Oxygen-Poor Microenvironment. *Frontiers in Immunology*, 2. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2011.00027>
- Pacheco, M. O., Lutz, H. M., Armada, J., Davies, N., Gerzenshtein, I. K., Cakley, A. S., . . . Stoppel, W. L. (2023). Silk Fibroin Particles as Carriers in the Development of Hemoglobin-Based Oxygen Carriers. *Advanced NanoBiomed Research*, 3(9), 2300019. doi: <https://doi.org/10.1002/anbr.202300019>
- Parisi, G., Saco, J. D., Salazar, F. B., Tsoi, J., Krystofinski, P., Puig-Saus, C., . . . Ribas, A. (2020). Persistence of adoptively transferred T cells with a kinetically engineered IL-2 receptor agonist. *Nature Communications*, 11(1), 660. doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12901-3>
- Park, S., & Park, K. M. (2018). Hyperbaric oxygen-generating hydrogels. *Biomaterials*, 182, 234–244. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.08.032>
- Pedersen, T. L. (2025). patchwork: The Composer of Plots. Repéré à <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.patchwork>
- Picco, C. J., Utomo, E., McClean, A., Domínguez-Robles, J., Anjani, Q. K., Volpe-Zanutto, F., . . . Larrañeta, E. (2023). Development of 3D-printed subcutaneous implants using concentrated polymer/drug solutions. *International Journal of Pharmaceutics*, 631, 122477. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122477>
- Pirsadeghi, A., Namakkoobi, N., Behzadi, M. S., Pourzinolabedin, H., Askari, F., Shahabinejad, E., . . . Kamrani, M. H. (2024). Therapeutic approaches of cell therapy based on stem cells and terminally differentiated cells: Potential and effectiveness. *Cells & Development*, 177, 203904. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cdev.2024.203904>
- Pohlert, T. (2024). PMCMRplus: Calculate Pairwise Multiple Comparisons of Mean Rank Sums Extended. Repéré à <https://doi.org/10.32614/CRAN.package.PMCMRplus>
- Posit Team. (2025). RStudio: Integrated Development Environment for R (Version 2025.9.2.418) [EDI]. Repéré à <http://www.posit.co/>
- PreSens. (s.d.). How does an oxygen sensor work? Repéré à <https://www.presens.de/support-services/faqs/question/how-does-an-oxygen-sensor-work-3>

- Quah, B. J. C., & Parish, C. R. (2010). The Use of Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) to Monitor Lymphocyte Proliferation. *Journal of Visualized Experiments*, (44), e2259. doi: <http://dx.doi.org/10.3791/2259>
- R Core Team. (2025). R: A Language and Environment for Statistical Computing (Version 4.5.2) [Logiciel]. Repéré à <https://cran.r-project.org/bin/windows/base/>
- Rambhia, K. J., & Ma, P. X. (2015). Controlled drug release for tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, 219, 119–128. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.049>
- Razavi, M., Primavera, R., Kevadiya, B. D., Wang, J., Buchwald, P., & Thakor, A. S. (2020). A Collagen Based Cryogel Bioscaffold that Generates Oxygen for Islet Transplantation. *Advanced Functional Materials*, 30(15), 1902463. doi: <https://doi.org/10.1002/adfm.201902463>
- Reddy, M., Eirikis, E., Davis, C., Davis, H. M., & Prabhakar, U. (2004). Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *Journal of Immunological Methods*, 293(1), 127–142. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.07.006>
- Roamcharern, N., Payoungkiattikun, W., Anwised, P., Mahong, B., Jangpromma, N., Daduang, S., & Klaynongsruang, S. (2019). Physicochemical properties and oxygen affinity of glutaraldehyde polymerized crocodile hemoglobin: the new alternative hemoglobin source for hemoglobin-based oxygen carriers. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 47(1), 852–861. doi: <https://doi.org/10.1080/21691401.2019.1579733>
- Roberts, G. A. F. (1992). Structure of Chitin and Chitosan. Dans G. A. F. Roberts (Éd.), *Chitin Chemistry* (1 éd., pp. 1–53). doi: https://doi.org/10.1007/978-1-349-11545-7_1
- Rodriguez-Brotons, A., Bietiger, W., Peronet, C., Langlois, A., Magisson, J., Mura, C., . . . Maillard, E. (2016). Comparison of Perfluorodecalin and HEMOXCell as Oxygen Carriers for Islet Oxygenation in an In Vitro Model of Encapsulation. *Tissue Engineering Part A*, 22(23-24), 1327–1336. doi: <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0064>
- Ross, S. H., Rollings, C. M., & Cantrell, D. A. (2021). Quantitative Analyses Reveal How Hypoxia Reconfigures the Proteome of Primary Cytotoxic T Lymphocytes. *Frontiers in Immunology*, 12. doi: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.712402>
- Rousselot, M., Delpy, E., Drieu La Rochelle, C., Lagente, V., Pirow, R., Rees, J.-F., . . . Zal, F. (2006). Arenicola marina extracellular hemoglobin: a new promising blood

- substitute. *Biotechnology Journal*, 1(3), 333–345. doi: <https://doi.org/10.1002/biot.200500049>
- Rouwkema, J., Rivron, N. C., & van Blitterswijk, C. A. (2008). Vascularization in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*, 26(8), 434–441. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.04.009>
- Saharudin, S. H., Shariffuddin, J. H., Nordin, N. I. A. A., & Ismail, A. (2019). Effect of Aging Time in the Synthesis of Biogenic Hydroxyapatite Derived from Cockle Shell. *Materials Today: Proceedings*, 19, 1208–1215. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2019.11.124>
- Samanipour, R., Farzaneh, S., Ranjbari, J., Hashemi, S., Khojasteh, A., & Hosseinzadeh, S. (2023). Osteogenic differentiation of pulp stem cells from human permanent teeth on an oxygen-releasing electrospun scaffold. *Polymer Bulletin*, 80(2), 1795–1816. doi: <https://doi.org/10.1007/s00289-022-04145-x>
- Saputra, H. A., & Andreas. (2025). Chitosan and its biomedical applications: A review. *Next Materials*, 9, 101270. doi: <https://doi.org/10.1016/j.nxmte.2025.101270>
- Scharping, N. E., Rivadeneira, D. B., Menk, A. V., Vignali, P. D. A., Ford, B. R., Rittenhouse, N. L., . . . Delgoffe, G. M. (2021). Mitochondrial stress induced by continuous stimulation under hypoxia rapidly drives T cell exhaustion. *Nature Immunology*, 22(2), 205–215. doi: <https://doi.org/10.1038/s41590-020-00834-9>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., . . . Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. doi: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Sharma, R., Pandey, R. R., Gupta, A. A., Kar, S., & Dhayal, M. (2012). In situ amino acid functionalization and microstructure formation of hydroxyapatite nanoparticles synthesized at different pH by precipitation route. *Materials Chemistry and Physics*, 133(2), 718–725. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2012.01.072>
- Sheng, Y., Nesbitt, H., Callan, B., Taylor, M. A., Love, M., McHale, A. P., & Callan, J. F. (2017). Oxygen generating nanoparticles for improved photodynamic therapy of hypoxic tumours. *Journal of Controlled Release*, 264, 333–340. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.09.004>
- Shi, R., Lian, W., Jin, Y., Cao, C., Han, S., Yang, X., . . . Zhao, H. (2020). Role and effect of vein-transplanted human umbilical cord mesenchymal stem cells in the repair of diabetic foot ulcers in rats. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 52(6), 620–630. doi: <https://doi.org/10.1093/abbs/gmaa039>

- Šimková, L., & Šulcová, P. (2019). Characterization and thermal behavior of hydroxyapatite prepared by precipitation. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 138(1), 321–329. doi: <https://doi.org/10.1007/s10973-019-08144-5>
- Singh, P., Andrabi, S. M., Tariq, U., Gupta, S., Shaikh, S., & Kumar, A. (2023). Functionally multifaceted scaffolds delivering bioactive compounds for treatment of infectious chronic and ischemic wounds. *Chemical Engineering Journal*, 457, 141359. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.141359>
- Smith, T. T., Moffett, H. F., Stephan, S. B., Opel, C. F., Dumigan, A. G., Jiang, X., . . . Stephan, M. T. (2017). Biopolymers codelivering engineered T cells and STING agonists can eliminate heterogeneous tumors. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(6), 2176–2191. doi: <https://doi.org/10.1172/JCI87624>
- Spahn, D. R. (2000). Current status of artificial oxygen carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 40(3), 143–151. doi: [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(99\)00046-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(99)00046-0)
- Stammeier, J. A., Purgstaller, B., Hippler, D., Mavromatis, V., & Dietzel, M. (2018). In-situ Raman spectroscopy of amorphous calcium phosphate to crystalline hydroxyapatite transformation. *MethodsX*, 5, 1241–1250. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mex.2018.09.015>
- Sterner, R. C., & Sterner, R. M. (2021). CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer Journal*, 11(4), 69. doi: <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00459-7>
- Stowell, C. P., Levin, J., Spiess, B. D., & Winslow, R. M. (2001). Progress in the development of RBC substitutes. *Transfusion*, 41(2), 287–299. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.2001.41020287.x>
- Supper, S., Anton, N., Seidel, N., Riemenschnitter, M., Schoch, C., & Vandamme, T. (2013). Rheological Study of Chitosan/Polyol-phosphate Systems: Influence of the Polyol Part on the Thermo-Induced Gelation Mechanism. *Langmuir*, 29(32), 10229–10237. doi: <https://doi.org/10.1021/la401993q>
- Suraiya, A. B., Evtimov, V. J., Truong, V. X., Boyd, R. L., Forsythe, J. S., & Boyd, N. R. (2022). Micro-hydrogel injectables that deliver effective CAR-T immunotherapy against 3D solid tumor spheroids. *Translational Oncology*, 24, 101477. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2022.101477>
- Suvarnapathaki, S., Nguyen, A., Gouloupoulos, A., & Camci-Unal, G. (2023). Oxygen-Generating Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering Applications. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 9(1), 409–426. doi: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.2c00853>

- Suvarnapathaki, S., Nguyen, M. A., Goulopoulos, A. A., Lantigua, D., & Camci-Unal, G. (2021). Engineering calcium peroxide based oxygen generating scaffolds for tissue survival. *Biomaterials Science*, 9(7), 2519–2532. doi: <http://dx.doi.org/10.1039/D0BM02048F>
- Suvarnapathaki, S., Wu, X., Zhang, T., Nguyen, M. A., Goulopoulos, A. A., Wu, B., & Camci-Unal, G. (2022). Oxygen generating scaffolds regenerate critical size bone defects. *Bioactive Materials*, 13, 64–81. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.11.002>
- Takahashi, J. (2020). iPS cell-based therapy for Parkinson's disease: A Kyoto trial. *Regenerative Therapy*, 13, 18–22. doi: <https://doi.org/10.1016/j.reth.2020.06.002>
- Tao, J.-H., Barbi, J., & Pan, F. (2015). Hypoxia-inducible factors in T lymphocyte differentiation and function. A Review in the Theme: Cellular Responses to Hypoxia. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 309(9), C580–C589. doi: <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00204.2015>
- Tao, Z., Raffel, R. A., Souid, A.-K., & Goodisman, J. (2009). Kinetic Studies on Enzyme-Catalyzed Reactions: Oxidation of Glucose, Decomposition of Hydrogen Peroxide and Their Combination. *Biophysical Journal*, 96(7), 2977–2988. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.11.071>
- Thermo Fisher Scientific. (2020). Calcein AM, Cell-permeant Green and Blue Dyes. Repéré à <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C1430>
- Thermo Fisher Scientific. (s.d.–a). Ethidium Homodimer-1 (EthD-1). Repéré à <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/E1169>
- Thermo Fisher Scientific. (s.d.–b). Pierce™ Quantitative Peroxide Assay Kit (Aqueous). Repéré à <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23280>
- Thomas, S., Rajendran, A. R., & Subramanian, B. (2023). Influence of pH in the synthesis of calcium phosphate based nanostructures with enhanced bioactivity and pro-angiogenic properties. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 111(4), 858–871. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.35196>
- Toftdal, M. S., Taebnia, N., Kadumudi, F. B., Andresen, T. L., Frogne, T., Winkel, L., . . . Dolatshahi-Pirouz, A. (2021). Oxygen releasing hydrogels for beta cell assisted therapy. *Int J Pharm*, 602, 120595. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120595>
- Tomioka, D., Fujita, S., Groll, J., & Matsusaki, M. (2023). Hydroxyapatite Nanocoating on Calcium Peroxide Microparticles for Sustained Oxygen Release. *Chemistry of Materials*, 35(14), 5378–5391. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.3c00601>

- Tomioka, D., Fujita, S., & Matsusaki, M. (2024). Controlled Release of Oxygen from Calcium Peroxide in a Weak Acidic Condition by Stabilized Amorphous Calcium Carbonate Nanocoating for Biomedical Applications. *ACS Omega*, 9(5), 5903–5910. doi: <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c09406>
- Tonino, A. J., van der Wal, B. C. H., Heyligers, I. C., & Grimm, B. (2009). Bone Remodeling and Hydroxyapatite Resorption in Coated Primary Hip Prostheses. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®, 467(2), 478–484. doi: <https://doi.org/10.1007/s11999-008-0559-y>
- Tootoonchi, M. H., Hashempour, M., Blackwelder, P. L., & Fraker, C. A. (2017). Manganese oxide particles as cytoprotective, oxygen generating agents. *Acta Biomaterialia*, 59, 327–337. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.07.006>
- Torgal, S., Subramani, G., & Manian, R. (2025). Comprehensive insights into chitosan hydrogels: from crosslinking and characterization to immunomodulation, microbiome interactions and biomedical uses. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 15(9), 13191–13226. doi: <https://doi.org/10.1007/s13399-024-06350-2>
- Toshima, T., Hamai, R., Tafu, M., Takemura, Y., Fujita, S., Chohji, T., . . . Qin, G. W. (2014). Morphology control of brushite prepared by aqueous solution synthesis. *Journal of Asian Ceramic Societies*, 2(1), 52–56. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jascer.2014.01.004>
- Ucar, S., Bjørnøy, S. H., Bassett, D. C., Strand, B. L., Sikorski, P., & Andreassen, J.-P. (2019). Formation of Hydroxyapatite via Transformation of Amorphous Calcium Phosphate in the Presence of Alginate Additives. *Crystal Growth & Design*, 19(12), 7077–7087. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.cgd.9b00887>
- Uskoković, V., & Uskoković, D. P. (2011). Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: Chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 96B(1), 152–191. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31746>
- Valor, A., Kycia, S., Torres-García, E., Reguera, E., Vázquez-Ramos, C., & Sánchez-Sinencio, F. (2003). Structural and thermal study of calcium undecanoate. *Journal of Solid State Chemistry*, 172(2), 471–479. doi: [https://doi.org/10.1016/S0022-4596\(03\)00042-2](https://doi.org/10.1016/S0022-4596(03)00042-2)
- Versteyhe, S., Driessens, N., Ghaddhab, C., Tarabichi, M., Hoste, C., Dumont, J.-E., . . . Detours, V. (2013). Comparative Analysis of the Thyrocytes and T Cells: Responses to H₂O₂ and Radiation Reveals an H₂O₂-Induced Antioxidant Transcriptional Program in Thyrocytes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 98(10), E1645–E1654. doi: <https://doi.org/10.1210/jc.2013-1266>
- Vuillefroy de Silly, R., Ducimetière, L., Yacoub Maroun, C., Dietrich, P.-Y., Derouazi, M., & Walker, P. R. (2015). Phenotypic switch of CD8⁺ T cells reactivated under hypoxia

- toward IL-10 secreting, poorly proliferative effector cells. *European Journal of Immunology*, 45(8), 2263–2275. doi: <https://doi.org/10.1002/eji.201445284>
- Waite, A. J., Bonner, J. S., & Autenrieth, R. (1999). Kinetics and Stoichiometry of Oxygen Release from Solid Peroxides. *Environmental Engineering Science*, 16(3), 187–199. doi: <https://doi.org/10.1089/ees.1999.16.187>
- Wang, B., Zheng, S., Huang, Z., Hu, Y., & Zhu, K. (2021). Fabrication of H₂O₂ slow-releasing composites for simultaneous Microcystis mitigation and phosphate immobilization. *Science of The Total Environment*, 798, 149164. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149164>
- Wang, H., Zhao, Y., Li, T., Chen, Z., Wang, Y., & Qin, C. (2016). Properties of calcium peroxide for release of hydrogen peroxide and oxygen: A kinetics study. *Chemical Engineering Journal*, 303, 450–457. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.05.123>
- Wang, J., Xue, C., & Zhu, P. (2017). Hydrothermal synthesis and structure characterization of flower-like self assembly of silicon-doped hydroxyapatite. *Materials Letters*, 196, 400–402. doi: <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2017.03.062>
- Wang, K., Chen, Y., Ahn, S., Zheng, M., Landoni, E., Dotti, G., . . . Han, Z. (2020). GD2-specific CAR T cells encapsulated in an injectable hydrogel control retinoblastoma and preserve vision. *Nature Cancer*, 1(10), 990–997. doi: <https://doi.org/10.1038/s43018-020-00119-y>
- Wang, L., Ge, K., Duan, J., Du, X., Zhou, G., Ma, L., . . . Zhang, J. (2024). A double-gain theranostic nanoplatform based on self-supplying H₂O₂ nanocomposites for synergistic chemodynamic/gas therapy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 654, 774–784. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2023.10.092>
- Wang, Q., Zhang, R., Lu, M., You, G., Wang, Y., Chen, G., . . . Zhou, H. (2017). Bioinspired Polydopamine-Coated Hemoglobin as Potential Oxygen Carrier with Antioxidant Properties. *Biomacromolecules*, 18(4), 1333–1341. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00077>
- Wang, Z., Chen, T., Li, X., Guo, B., Liu, P., Zhu, Z., & Xu, R. X. (2023). Oxygen-releasing biomaterials for regenerative medicine. *Journal of Materials Chemistry B*, 11(31), 7300–7320. doi: <http://dx.doi.org/10.1039/D3TB00670K>
- Weber, L. M., Cheung, C. Y., & Anseth, K. S. (2007). Multifunctional Pancreatic Islet Encapsulation Barriers Achieved via Multilayer PEG Hydrogels. *Cell Transplantation*, 16(10), 1049–1057. doi: <https://doi.org/10.3727/000000007783472336>
- Weidemann, A., & Johnson, R. S. (2008). Biology of HIF-1 α . *Cell Death & Differentiation*, 15(4), 621–627. doi: <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.12>

- White, D. M., Irvine, R. L., & Woolard, C. R. (1998). The use of solid peroxides to stimulate growth of aerobic microbes in tundra. *Journal of Hazardous Materials*, 57(1), 71–78. doi: [https://doi.org/10.1016/S0304-3894\(97\)00065-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3894(97)00065-4)
- White, J. C., Godsey, M. E., & Bhatia, S. R. (2014). Perfluorocarbons enhance oxygen transport in alginate-based hydrogels. *Polymers for Advanced Technologies*, 25(11), 1242–1246. doi: <https://doi.org/10.1002/pat.3296>
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L. D., François, R., . . . Yutani, H. (2019). Welcome to the tidyverse. *Journal of Open Source Software*, 4(43). doi: <https://doi.org/10.21105/joss.01686>
- Wiebe, L. I., & Machulla, H.-J. (1999). Hypoxia: an Introduction. Dans H.-J. Machulla (Éd.), *Imaging of Hypoxia: Tracer Developments (Developments in Nuclear Medicine)* (1 éd., Vol. 33, pp. 1–18). doi: https://doi.org/10.1007/978-94-017-1828-8_1
- Wijekoon, A., Fountas-Davis, N., & Leipzig, N. D. (2013). Fluorinated methacrylamide chitosan hydrogel systems as adaptable oxygen carriers for wound healing. *Acta Biomaterialia*, 9(3), 5653–5664. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.10.034>
- Willemen, N. G. A., Hassan, S., Gurian, M., Jasso-Salazar, M. F., Fan, K., Wang, H., . . . Shin, S. R. (2022). Enzyme-Mediated Alleviation of Peroxide Toxicity in Self-Oxygenating Biomaterials. *Advanced Healthcare Materials*, 11(13), 2102697. doi: <https://doi.org/10.1002/adhm.202102697>
- Wilson, A., Dasyam, N., O'Hagan, F., Farrell, D., Turner, C., Jay, A., . . . Weinkove, R. (2025). Jurkat T-cell lines exhibit marked genomic instability affecting karyotype, mutational profile, gene expression, immunophenotype and function. *Scientific Reports*, 15(1), 22426. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-95903-0>
- Wright, K. O., Murray, D. A., Crispe, N. I., & Pierce, R. H. (2005). Quantitative PCR for detection of the OT-1 transgene. *BMC Immunology*, 6(1), 20. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2172-6-20>
- Wu, C.-H., Chang, S.-H., & Lin, C.-W. (2015). Improvement of Oxygen Release from Calcium Peroxide-polyvinyl Alcohol Beads by Adding Low-cost Bamboo Biochar and Its Application in Bioremediation. *CLEAN – Soil, Air, Water*, 43(2), 287–295. doi: <https://doi.org/10.1002/clen.201400059>
- Xiao, W., Sonny Bal, B., & Rahaman, M. N. (2016). Preparation of resorbable carbonate-substituted hollow hydroxyapatite microspheres and their evaluation in osseous defects in vivo. *Materials Science and Engineering: C*, 60, 324–332. doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.11.039>

- Xin, H., Yang, S., Tang, Y., Wu, M., Deng, Y., Xu, B., & Gao, N. (2020). Mechanisms and performance of calcium peroxide-enhanced Fe(ii) coagulation for treatment of *Microcystis aeruginosa*-laden water. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 6(5), 1272–1285. doi: <http://dx.doi.org/10.1039/D0EW00005A>
- Xu, S., Chen, M., Feng, T., Zhan, L., Zhou, L., & Yu, G. (2021). Use ggbreak to effectively utilize plotting space to deal with large datasets and outliers. *Frontiers in Genetics*, 12. doi: <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.774846>
- Xu, Y., Zheng, S., Tang, Z., Zhong, Q., Chen, R., Wang, P., . . . Shi, Z. (2024). Injectable, oxygen-releasing, thermosensitive hydrogel promotes vascularized bone formation with prolonged oxygen delivery and improved osteoinductivity. *Materials Today Bio*, 29, 101267. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2024.101267>
- Xue, H., Tang, Y., Hu, Y., Zha, M., Ge, S., & Tan, J. (2026). Preparation, properties, and applications of bio-based antibacterial hydrogels: A review. *Journal of Agriculture and Food Research*, 26, 102687. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2026.102687>
- Xue, Y., Lu, S., Fu, X., Sharma, V. K., Mendoza-Sanchez, I., Qiu, Z., & Sui, Q. (2018). Simultaneous removal of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX) by CaO₂ based Fenton system: Enhanced degradation by chelating agents. *Chemical Engineering Journal*, 331, 255–264. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2017.08.099>
- Xue, Y., Rajic, L., Chen, L., Lyu, S., & Alshawabkeh, A. N. (2018). Electrolytic control of hydrogen peroxide release from calcium peroxide in aqueous solution. *Electrochemistry Communications*, 93, 81–85. doi: <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2018.06.008>
- Yao, S., Qi, M.-L., Qi, L., Ding, Y., Chen, M., & Wang, Y. (2021). Investigation of EDTA concentration on the size of carbonated flowerlike hydroxyapatite microspheres. *Royal Society Open Science*, 8(3). doi: <https://doi.org/10.1098/rsos.202148>
- Yeh, C.-S., Wang, R., Chang, W.-C., & Shih, Y.-H. (2018). Synthesis and characterization of stabilized oxygen-releasing CaO₂ nanoparticles for bioremediation. *Journal of Environmental Management*, 212, 17–22. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.01.068>
- Yin, X., Wei, Y., Qin, H., Zhao, J., Chen, Y., Yao, S., . . . Chen, Y. (2024). Oxygen tension regulating hydrogels for vascularization and osteogenesis via sequential activation of HIF-1 α and ERK1/2 signaling pathways in bone regeneration. *Biomaterials Advances*, 161, 213893. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2024.213893>
- Yuki, Y., Hagiwara, K., Kinoshita, M., Ishibashi, H., Kaneko, K., Ishida, O., . . . Terui, K. (2021). Efficacy of resuscitative infusion with hemoglobin vesicles in rabbits with

- massive obstetric hemorrhage. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 224(4), 398.e001–398.e011. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2020.09.010>
- Zal, F., Green, B. N., Lallier, F. H., Vinogradov, S. N., & Toulmond, A. (1997). Quaternary Structure of the Extracellular Haemoglobin of the Lugworm *Arenicola marina*. *European Journal of Biochemistry*, 243(1-2), 85–92. doi: https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.85_1a.x
- Zenin, V., Ivanova, J., Pugovkina, N., Shatrova, A., Aksenov, N., Tyuryaeva, I., . . . Lyublinskaya, O. (2022). Resistance to H₂O₂-induced oxidative stress in human cells of different phenotypes. *Redox Biology*, 50, 102245. doi: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102245>
- Zhang, C., Liu, J., Zhong, J. F., & Zhang, X. (2017). Engineering CAR-T cells. *Biomarker Research*, 5(1), 22. doi: <https://doi.org/10.1186/s40364-017-0102-y>
- Zhang, F., Zhang, M., Su, X., Zhang, S., Zhang, Q., & Zhong, S. (2019). Preparation and application of oxygen slow-releasing materials for in situ manganese removal from groundwater. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(10), 5585–5594. doi: <https://doi.org/10.1007/s13762-018-2105-0>
- Zhang, H., & Darvell, B. W. (2011). Morphology and structural characteristics of hydroxyapatite whiskers: Effect of the initial Ca concentration, Ca/P ratio and pH. *Acta Biomaterialia*, 7(7), 2960–2968. doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.020>
- Zhang, M., Kiratiwongwan, T., & Shen, W. (2020). Oxygen-releasing polycaprolactone/calcium peroxide composite microspheres. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 108(3), 1097–1106. doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34461>
- Zhang, M., Song, R., Liu, Y., Yi, Z., Meng, X., Zhang, J., . . . Bu, W. (2019). Calcium-Overload-Mediated Tumor Therapy by Calcium Peroxide Nanoparticles. *Chem*, 5(8), 2171–2182. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2019.06.003>
- Zhang, W., Yan, K., Dai, P., Tian, J., Zhu, H., & Chen, C. (2012). A Novel Hemoglobin-Based Oxygen Carrier, Polymerized Porcine Hemoglobin, Inhibits H₂O₂-Induced Cytotoxicity of Endothelial Cells. *Artificial Organs*, 36(2), 151–160. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2011.01305.x>
- Zhao, B., He, J., Wang, F., Xing, R., Sun, B., & Zhou, Y. (2021). Polyacrylamide-Sodium Alginate Hydrogel Releasing Oxygen and Vitamin C Promotes Bone Regeneration in Rat Skull Defects. *Frontiers in Materials*, 8. doi: <https://doi.org/10.3389/fmats.2021.758599>

- Zhao, X., Nguyen, M. C., Wang, C.-Z., & Ho, K.-M. (2013). Structures and stabilities of alkaline earth metal peroxides XO_2 ($X = Ca, Be, Mg$) studied by a genetic algorithm. *RSC Advances*, 3(44), 22135–22139. doi: <http://dx.doi.org/10.1039/C3RA43617A>
- Zhou, L., Qian, Y., Chen, J., Zhang, Y., & Zhou, X. (2023). A critical review of solid peroxides in environmental remediation and water purification: From properties to field applications. *Chemical Engineering Journal*, 465, 142424. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.142424>
- Zhou, Q., Ye, X., Sun, R., Matsumoto, Y., Moriyama, M., Asano, Y., . . . Saijo, Y. (2014). Differentiation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Into Alveolar Epithelial Cells In Vitro for Use In Vivo. *Stem Cells Translational Medicine*, 3(6), 675–685. doi: <https://doi.org/10.5966/sctm.2013-0142>
- Zhu, J., Kong, D., Zhang, Y., Yao, N., Tao, Y., & Qiu, T. (2011). The Influence of Conditions on Synthesis Hydroxyapatite By Chemical Precipitation Method. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 18(6), 062023. doi: <https://dx.doi.org/10.1088/1757-899X/18/6/062023>
- Zhu, Q., Jiao, H., Zhao, K., Gou, X., Tang, Y., & Ji, J. (2023). Biomimetic Synthesis and Mechanism of Hydroxyapatite Crystals by Biotemplate of Small Intestinal Submucosa and Bacterial Cellulose. *Crystal Research and Technology*, 58(9), 2300037. doi: <https://doi.org/10.1002/crat.202300037>
- Zhu, Y., Qin, J., Zhang, S., Radian, A., & Long, M. (2021). Solid peroxides in Fenton-like reactions at near neutral pHs: Superior performance of MgO_2 on the accelerated reduction of ferric species. *Chemosphere*, 270, 128639. doi: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128639>
- Zong, A., Cao, H., & Wang, F. (2012). Anticancer polysaccharides from natural resources: A review of recent research. *Carbohydrate Polymers*, 90(4), 1395–1410. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.07.026>
- Zou, J., Li, P., Lu, F., Liu, N., Dai, J., Ye, J., . . . Ji, C. (2013). Notch1 is required for hypoxia-induced proliferation, invasion and chemoresistance of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Journal of Hematology & Oncology*, 6(1), 3. doi: <https://doi.org/10.1186/1756-8722-6-3>
- Zou, R., Zhou, Q., Liu, Q., Li, Q., Chen, Z., & Niu, L. (2017). Temperature Affects the Hydroxyapatite Crystal Arrangement on Silk Fibroin Surfaces. *Polymers and Polymer Composites*, 25(9), 689–694. doi: <https://doi.org/10.1177/096739111702500907>
- Zou, T., Jiang, S., Zhang, Y., Liu, J., Yi, B., Qi, Y., . . . Zhang, C. (2021). In Situ Oxygen Generation Enhances the SCAP Survival in Hydrogel Constructs. *Journal of Dental Research*, 100(10), 1127–1135. doi: <https://doi.org/10.1177/00220345211027155>

Zou, T., Liang, Y., Kang, J., Liu, J., Kang, W., Jiang, S., & Zhang, C. (2024). Oxygen enrichment mediated by calcium peroxide loaded gelatin methacrylate hydrogel eradicates periodontal biofilms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 265, 130868. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130868>