



HAL
open science

Conception de modèles tridimensionnels en hydrogels supramoléculaires de sphéroïdes tumoraux issus de cellules souches cancéreuses de glioblastome

Tarek Sayde

► **To cite this version:**

Tarek Sayde. Conception de modèles tridimensionnels en hydrogels supramoléculaires de sphéroïdes tumoraux issus de cellules souches cancéreuses de glioblastome. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2021. Français. NNT : 2021LIMO0072 . tel-04416353

HAL Id: tel-04416353

<https://theses.hal.science/tel-04416353>

Submitted on 25 Jan 2024

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Limoges
ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)

EA 3842 “Contrôle de l’Activation cellulaire, Progression Tumorale et
Résistance thérapeutique” CAPTuR

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l’Université de Limoges

Diplôme : Biologie Santé

Mention : Innovation technologique et thérapeutique

Présentée et soutenue par

Tarek Saydé

Le 13 décembre 2021

**Conception de modèles tridimensionnels en hydrogels
supramoléculaires de sphéroïdes tumoraux issus de cellules
souches cancéreuses de Glioblastome**

Thèse dirigée par **Pr Serge Battu** et **Pr Karen Gaudin**

JURY :

Rapporteurs

Pr Mireille Kallassy Awad, Département des sciences de la vie et de la terre, UR-EGP, Faculté des sciences, Université Saint-Joseph de Beyrouth

Pr Jean-philippe Hugnot, Institut de Neurosciences, INSERM U1051, Hôpital Saint Eloi, Université de Montpellier

Examineurs

Dr Hélène Bœuf, Laboratoire de bio-ingénierie tissulaire, BIOTIS, INSERM U1026, Université de Bordeaux

Dr Lars Petter Jordheim, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, CRCL, INSERM 1052, Université de Lyon

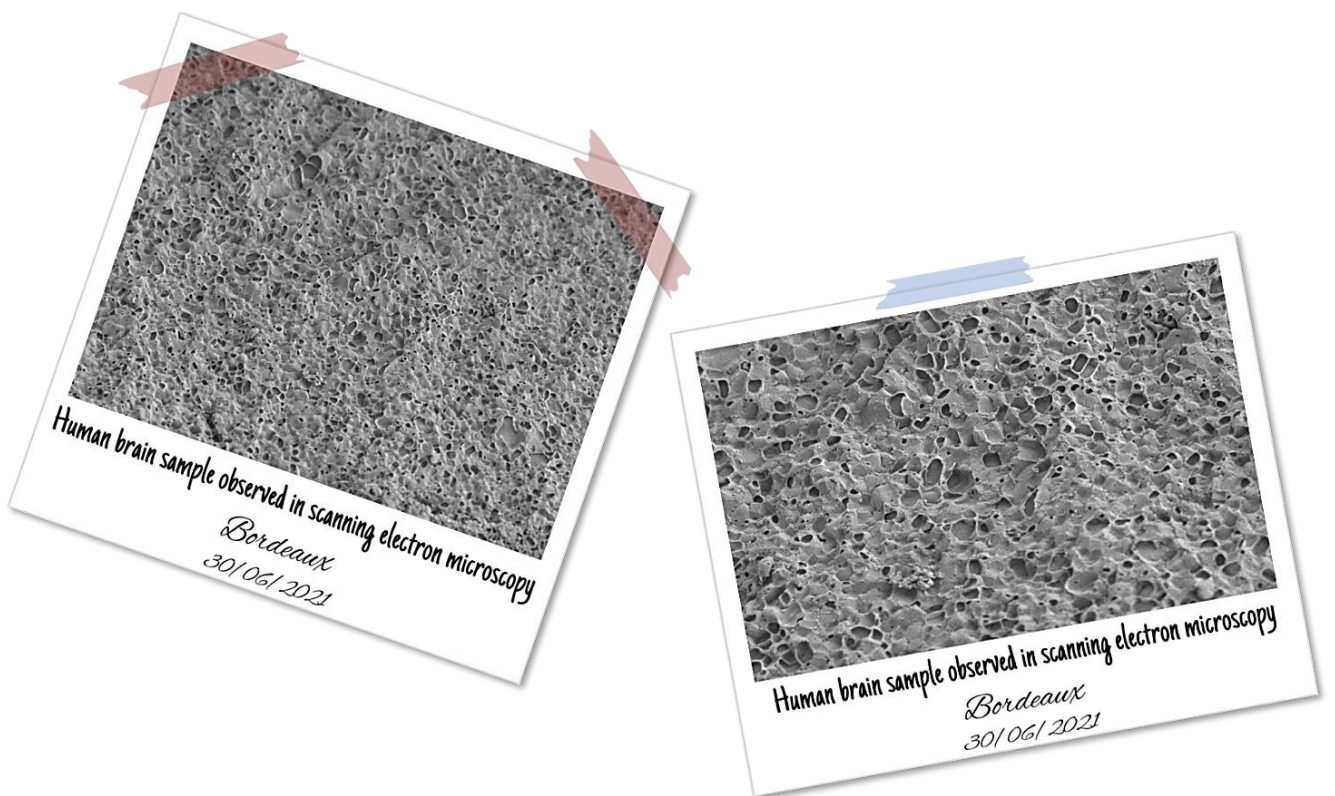


*Je dédie cette thèse à la personne qui a toujours cru en moi,
Qui dans son regard j'ai toujours senti la fierté,
À la personne qui m'a tout offert pour que je puisse goûter aux fruits de ma passion,*

À Maman!

“The brain is the human body's most mysterious organ. It learns. It changes. It adapts. It tells us what we see. What we hear. It lets us feel love. I think it holds our soul. And no matter how much research we do, no one can really say how all that delicate grey matter inside our skull works. And when it's hurt, when the human brain is traumatized, well, that's when it gets even more mysterious.”

Callie Torres



All human beings are born free and equal in dignity and rights.

And love is the pillar of the latter.

On that note, I wish you a pleasant reading!

Remerciements

Au début de cette thèse, je ne m'attendais pas à ce qui allait se passer pendant ces trois années. Joie, douleur, doute, succès, perte, gain, mal du pays... En effet, cela a été une montagne russe d'émotions. Mais dans l'ensemble, je suis reconnaissant envers chaque personne qui a contribué à faire de moi l'homme que je suis aujourd'hui.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury pour le temps qu'ils ont consacré pour la lecture attentive de ma thèse ainsi que pour les remarques qu'ils m'adresseront lors de la soutenance afin d'améliorer mon travail.

À Mme le Professeur Mireille Kallassy Awad,

Il est extrêmement difficile de trouver les mots qui exprimeraient la gratitude que j'ai envers votre présence dans mon parcours académique. Vous avez été une force majeure dans ma vie. Je n'oublierai jamais vos conseils, votre bienveillance et votre brillance. Vous avez fait partie de mon Jury de Master 1 et 2, et aujourd'hui vous êtes un des rapporteurs de mon travail de thèse. Donc j'espère du fond du cœur que vous avez été fier de mon parcours et que je ne cesserai jamais d'être à la hauteur de vos attentes.

À M. le Professeur Jean-Philippe Hugnot,

Recevez, Monsieur, mes plus sincères remerciements pour m'avoir fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et d'en être rapporteur. Je tiens à vous exprimer ma plus profonde reconnaissance.

À Mme le Docteur Hélène Bœuf,

Je vous remercie Madame, d'avoir accepté de consacrer votre temps pour lire et juger mon travail de thèse de votre œil professionnel.

À M. le Docteur Lars Petter Jordheim,

Je tiens à vous remercier Monsieur, pour votre contribution à l'évaluation de ce projet. Soyez assuré de ma plus profonde reconnaissance.

*Je tiens à remercier **Mme le Professeur Marie-Odile Jauberteau-Marchan**, pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire EA3842 à la faculté de médecine. Vous avez été toujours disponible, à l'écoute de mes nombreuses questions pour mes futurs projet professionnels, et toujours intéressée à l'avancée de mes travaux.*

*Je tiens également à remercier **M. le Professeur Philippe Barthélémy**, pour m'avoir accueillie au sein de l'unité ARNA de l'Université de Bordeaux, et de nous avoir accompagné dans cette aventure.*

*Je remercie l'école doctorale **SBS 615** de l'Université de Limoges, qui nous a garantie tout au long de la thèse des formations plus que parfaites et pour avoir été toujours à l'écoute.*

*Je remercie également la **Région nouvelle Aquitaine**, d'avoir garantie une partie du financement qui a permis l'élaboration de ce projet.*

STORM !!!! Comme son nom l'indique, notre projet était une vraie tempête. Mais après la pluie vient le beau temps. Et ce projet fut un arc-en-ciel à l'issue de cette tempête.

***Serge**, "il est où mon petit libanais ?" résonnera à jamais dans les couloirs de la fac. C'était un grand honneur de travailler avec toi. Malgré nos disputes, qui aujourd'hui me font rigoler, je suis pour toujours reconnaissant d'avoir eu la chance d'être formé par une personne si brillante. Merci pour la confiance aveugle que tu m'as accordée, pour tes conseils et ton guide. Je suis absolument sûr et certain que la personne que je suis aujourd'hui est à ce niveau grâce à toi. Que ça soit sur le plan scientifique, humain ou personnel, tu as joué un rôle primordial pour me ficeler afin d'être la meilleure version de moi. Nos souvenirs de congrès ensemble (Vienne, Paris, Bordeaux etc) sont gravés dans ma mémoire. Ils étaient l'occasion de découvrir la personne formidable que tu es, et de retenir des leçons de vie en or. J'espère sincèrement que j'ai réussi de te rendre fier et que je continuerais à le faire dans le futur.*

***Karen**, je tiens à te remercier tout d'abord d'avoir été toujours à l'écoute. Merci pour toutes les corrections du subjonctif, du passé composé et du futur antérieur ; je te promets de toujours essayer d'écrire des phrases courtes dans mes futurs projets. Mais en vrai, je te remercie pour ta bienveillance et ta contribution énergétique qui a permis de concevoir ce projet dans les meilleures ambiances. Je me souviendrai toujours du temps que nous avons passé à discuter de sujets scientifiques, mais également de la vie en général.*

***Gaëtane**, ce fut un grand plaisir de te connaître et de travailler avec toi. Merci d'avoir tenu une pancarte "Go Tarek" à Vienne. Tu as toujours réussi à ajouter des épices philosophiques à ce plat scientifique, que je garderai avec moi pour toujours. Merci pour ta gentillesse, ton humanité et tes conseils très appréciés.*

***Bruno**, tout d'abord merci pour le temps que tu as passé devant la balance à peser des molécules gélatrices. Je te remercie pour tes conseils, ton guide et ta bienveillance. Je te souhaite le meilleur dans tes futurs projets.*

***Omar**, oh lala la liste est très longue. Je suis très content d'avoir eu la chance de travailler avec toi durant cette aventure. Nos souvenirs sont très précieux pour moi. Je me rappellerai pour toujours du moment quand je t'ai appelé en criant 'on l'a faiiiiit !! on a le sphéroïde !!' Tu as toujours été un grand soutien dans les moments difficiles, ce que j'apprécie énormément. Je suis reconnaissant pour les rigolades interminables, pour nos sorties sur Bordeaux et sur Limoges, pour ta sagesse et ton altruisme. Je suis sûr que l'avenir te réserve de merveilleux projets qui te permettront de briller même plus fort. Et enfin, je suis content de t'avoir comme ami en premier lieu et un collègue en deuxième lieu, de ce petit bébé qu'on a conçu ensemble. ET OUI, les libanais sont les plus forts.*

*Je tiens ensuite à remercier **Bordeaux Imaging Center** pour leur contribution dans ce travail et pour l'opportunité d'acquérir des connaissances approfondies en imagerie.*

*Je remercie l'équipe de Xlim, notamment **Arnaud, Rémi et Claire** pour toutes les connaissances que j'ai acquies grâce à vous et de m'avoir permis de travailler avec vous au sein du projet SUMCASTEC.*

*Mes remerciements s'étendent également à toute l'équipe formidable de CAPTuR. **Fabrice**, je te remercie pour ta contribution active au sein de notre laboratoire afin de garantir un progrès scientifique mais aussi notre bien-être. Merci à **Barbara et Mireille** pour vos conseils et les discussions scientifiques et de vie que j'apprécie énormément. Merci à **Gaelle** pour la formation sur la SdFFF et pour ton encouragement continu. Sans oublier **Thomas et François**, pour toutes les discussions intéressantes et drôles (+18) des pauses de midi. Merci également à **Amandine et Philippe**.*

*Un très grand merci à tous les doctorants anciens et actuels, notamment **Céline, Axel et Aude**, c'était un grand plaisir de travailler avec vous et je vous remercie pour vos conseils, pour avoir été toujours à l'écoute.*

*Je remercie mes nouvelles copines de bureau, **May et Léa**. Malheureusement vous êtes arrivées un peu en retard mais bon, je suis très content d'avoir passé cette dernière année avec de la bonne humeur dans le bureau. Vous rayonnez des ondes positives même quand le western blot foire, ce n'est pas grave ça arrive. J'ai hâte de suivre votre parcours et de vous voir détériorer petit à petit. Non je rigole .. ou pas.*

*Un énorme merci à mon algérienne préférée au monde, **Hafidha**. Je suis tellement reconnaissant pour ton soutien interminable grande sœur. Merci pour tes conseils, ton encouragement, de m'avoir appris des manip (à la libanaise), pour tous nos souvenirs. Ce fut un grand plaisir de t'avoir rencontré durant cette aventure. Continue à briller et donne pleeeeeein de bisous de la part de tonton Tarek à petit Anass.*

Marinou, mon Habibi, mon éclair à la crème pâtissière, mon cookie trois chocolat et ma tarte aux fraises. Les mots ne sont pas suffisants pour exprimer ma gratitude envers ta présence dans ma vie. Ces trois années auraient été fade sans ton rire qui résonne et sans la joie et l'optimisme que tu rayannes. Mes plus beaux souvenirs sont les temps qu'on a passé à faire des vidéos dans chaque coin du laboratoire, à danser aux chansons de Beyonce dans la salle de culture, aux 100 cafés qu'on prenait par semaine juste pour éviter d'aller voir le western blot qui a foiré et à rigoler tellement fort que nous ne pouvions plus respirer. Mais surtout Marinou, je suis reconnaissant pour l'incroyable soutien que tu as été et que tu continues à l'être. Face aux mauvais moments, mauvaises personnes et les jours déprimants, tu as été un refuge pour me rendre le sourire, la force et la motivation à continuer jusqu'au bout. Je suis très fier de ce que tu as pu accomplir dans ta vie, de la manière que tu brilles chaque jour et j'ai hâte de te rejoindre dans le chemin à venir. PS : Non les photos que je prends ne sont pas floues et tu es toujours si belle.

Clément, Khayéééé, ce n'est pas pour rien que c'est le premier mot en libanais que je t'ai appris. (Bon après les gros mots of course). Malgré tout, tu as fait preuve d'être plus qu'un ami, tu es comme un frère. Tu étais là pour le bon et le mauvais même avec mon caractère qui pourrait "rarement" être difficile. Nos souvenirs sont gravés au creux de moi : les 500 habitants de la Ferté Beauharnais, le formidable château de Chambord, le trajet Limoges-Paris juste pour aider des étrangers que tu ne connais pas. Ton altruisme, ta gentillesse, ton intelligence, ta passion pour l'espace, ton sourire qui rend les jours froids plus agréables, tout ça fait de toi une personne en or que j'espère avoir pour toujours dans ma vie. J'ai hâte de te voir grandir dans ta carrière et te voir arriver jusqu'aux étoiles, tu le mérites sans aucun doute. Et enfin je te promets de toujours regarder France 2 et pas BFM pour les infos ... Cheers for many years of success to come !

Et enfin, une petite pensée aux gens qui m'ont alimenté de soutien, d'amour et de motivation même s'ils sont à 3000 km de distance.

Deborah, ma meilleure amie de 22 ans. Le sang ne fait pas la famille, ça c'est les parents. La famille, c'est ceux qui partagent le bon et le mauvais, et s'aiment toujours à la fin. C'est ceux que l'on choisit. Tu m'as accepté comme je suis sans jamais essayer de me changer. Une amie comme toi est si rare à trouver. Merci pour le soutien interminable. Je suis très fier de notre amitié, de ce qu'on a construit pendant deux décennies et que nous continuerons à construire pour toujours. Les fous rires, les larmes, la joie, la douleur, la perte et le gain, on a tout vécu. Et si je dois revivre ma vie de 0, je te choisirais toujours comme meilleure amie.

*Un grand merci à mes Fake Besties, **Rancy et Judy**, vous avez été une force majeure dans ma vie. De nos souvenirs au foyer, à nos soirées jusqu'à l'aube dans les rues de Beyrouth. Ce fut une expérience extraordinaire. Mais je tiens à souligner en particulier votre soutien continu pour me pousser toujours vers l'excellence.*

*A **Vanessa et Tracy**, la vie est destinée aux bons amis et aux grandes aventures. Et que je suis chanceux d'avoir gagné ces deux avec vous. Vous étiez là, les premières, avant tout le monde durant les moments sombres. Et aujourd'hui j'ai le summum d'honneur de vous inclure dans mes remerciements de ma thèse de doctorat. C'est grâce aux gens comme vous deux, que j'ai pu exceller.*

*A **Léa**, ma parisienne préférée. "Ya Tareeeek" Comment puis-je trouver les mots qui exprimeront ma gratitude ? Notre amitié va au-delà du langage humain. Tu es incroyable et je suis tellement content d'avoir trouvé une personne comme toi dans cette vie.*

***Elio et Nadia**, mes potes qui sont mes antidépresseurs persos, je vous regarde de loin et mon cœur rayonne de joie. Je suis reconnaissant pour cette complicité de malade qu'on a, que je ne pourrais pour rien au monde la remplacer.*

***Lucia**, à ta forte personnalité, ta gentillesse, ton altruisme .. un grand merci. Tu m'as toujours donné la force pour aller jusqu'au bout. Je suis très fier de toi, de ce que tu accomplis dans ta vie et de la personne que tu deviens. T'as fait preuve d'une magnifique indispensable personne dans ma vie.*

*A **Christie**, my number one fan. Je n'ai pas les mots pour exprimer ma gratitude envers ta présence dans ma vie, donc je vais avoir recours à une personne plus sage que moi : "I sneezed on the beat and the beat got sickah" – Beyonce*

*Un grand merci à **Ziad, Ramzi, Maria, Hady, Elia, Elie, Jiji, Gaelle, Pamela et Maryline**. Je vous adore.*

Je tiens à finir par remercier mes parents, mes frères et sœur pour le soutien continu. Merci d'être là pour moi, de toujours m'encourager pour aller jusqu'au bout. C'est grâce à vous que j'ai pu surmonter les moments sombres dans ma vie. Un grand merci !

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

<i>Remerciements</i>	7
Droits d’auteurs	13
Introduction	25
Chapitre I : Synthèse bibliographique	37
I.1 Introduction	39
I.2 Biomaterials for three-dimensional cell culture: from applications in oncology to nanotechnology	42
I.2.1 Introduction	43
I.2.2 Three-dimensional culture systems	45
I.2.2.1 Scaffold-free systems	45
I.2.2.2 Scaffold-based systems	47
I.2.3 Cancer applications of hydrogels	53
I.2.4 Nanoparticles emergence	56
I.2.4.1 Definition of nanoparticles	56
I.2.4.2 Nanoparticles origin and environmental dispersion	56
I.2.4.3 Why are NPs a center of attention today?.....	57
I.2.4.4 In vitro cellular models for nanoparticles toxicity assays.....	58
I.2.5 Conclusion and perspectives	64
I.3 Le support tridimensionnel	70
I.3.1 Un modèle adapté à la culture cellulaire	70
I.3.1.1 La mécano-biologie	70
I.3.1.2 L’architecture fibrillaire.....	71
I.3.1.3 La diffusion des molécules	72
I.3.2 De la molécule gélifiante à l’hydrogel : un autoassemblage supramoléculaire	72
I.3.2.1 L’autoassemblage supramoléculaire	73
I.3.2.2 Les glyco-nucléo-bolaamphiphile.....	74

I.3.2.3 Les GNB : un support idéal pour la culture 3D	75
I.4 Les cellules souches cancéreuses dans le Glioblastome	76
I.4.1 Glioblastome : un cancer hétérogène	76
I.4.2 Les cellules souches cancéreuses	78
I.4.2.1 Définition et rôles des CSCs	78
I.4.2.2 Propriétés des CSCs	78
I.5 Le tri cellulaire des CSCs	80
I.5.1 Les méthodes de tri basées sur un marquage cellulaire	80
I.5.2 Fractionnement par couplage flux-force de sédimentation	81
I.5.2.1 Principe de la SdFFF	81
I.5.2.2 Tri cellulaire par SdFFF	82
Chapitre II : Le support tridimensionnel	87
II.1 Introduction	89
II.2 Nucleoside derived low molecular weight gelators as a synthetic micro-environment for 3D cell culture	94
II.2.1 Introduction	95
II.2.2 Materials and methods	97
II.2.2.1 Sample preparation	97
II.2.2.2 Rheology experiments	98
II.2.2.3 Cryo-scanning electron microscopy (cryo-SEM)	98
II.2.2.4 Gelation kinetics	98
II.2.2.5 Molecule diffusion	99
II.2.2.6 2D cell culture	100
II.2.2.7 3D cell culture	100
II.2.2.8 Live/Dead assay	100
II.2.3 Results and discussion	101
II.2.3.1 Mechanical characterization	101

II.2.3.2 Structural properties	103
II.2.3.3 Gelation kinetics	104
II.2.3.4 Porosity and molecular diffusion timescales	105
II.2.3.5 3D cell culture	107
IV.2.3.6 Hydrogel stability during 3D culture	112
II.2.4. Conclusion.....	113
II.2.5 Supplementary information	114
II.3 Conclusion.....	121
Chapitre III : Le modèle cellulaire	125
III.1 Introduction	127
III.2 Characterization of Glioblastoma cancer stem cells sorted by Sedimentation field-flow fractionation, using Ultra High Frequency range Dielectrophoresis biosensor.....	130
III.2.1 Introduction	131
III.2.2 Materials and methods.....	134
III.2.2.1 Cell culture	134
III.2.2.2 SdFFF device and cell elution conditions	134
III.2.2.3 Tools and methodology for cell crossover frequency measurement.....	135
III.2.2.4 Cellular characterizations	136
III.2.2.5 Statistical Analysis	137
III.2.3 Results and discussion.....	137
III.2.3.1 Methodological development of SdFFF cell sorting.....	137
III.2.3.2 Cell characterization with UHF-DEP biosensor subsequent to their sorting ...	141
III.2.4 Conclusion	144
III.2.5 Supplementary information.....	145
Chapitre IV : Un système 3D reproductible	155
IV.1 Introduction.....	157
IV.2 Design of reproducible 3D systems: uniform-sized tumor spheroids based on cancer stem cells in a supramolecular hydrogel	159

IV.2.1 Introduction	160
IV.2.2 Materials and methods	163
IV.2.2.1 Cell culture	163
IV.2.2.2 SdFFF device and cell elution conditions	163
IV.2.2.3 Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction (RTqPCR)...	163
IV.2.2.4 3D cell culture	164
IV.2.2.5 Live/dead assay	165
IV.2.2.6 Growth kinetics	165
IV.2.2.7 MTT assay.....	165
IV.2.2.8 Immunofluorescence	165
IV.2.2.9 Confocal microscopy imaging	165
IV.2.3 Results and discussion	166
IV.2.3.1 Cell sorting of a GBM cell line	166
IV.2.3.2 Three-dimensional culture of post SdFFF populations.....	167
IV.2.3.3 Comparative analysis of the metabolic activity of the different sub-populations in 3D culture	172
IV.2.3.4 Characterization of spheroids generated by CSCs	173
IV.2.4 Conclusion	175
IV.2.5 Supplementary information	176
IV. 5 Conclusion	178
Chapitre V : Etude de l'impact de nanoparticules sur un système vivant	181
V.1 Introduction	183
V.2 Physicochemical characterization of manufactured silver nanoparticles and study of their impact on 2D cell culture vs reproducible 3D MCTS	187
V.2.1 Introduction	187
V.2.2 Materials and methods	190
V.2.2.1 Silver Nanoparticles	190
V.2.2.2 Dynamic Light Scattering (DLS)	190

V.2.2.3 Transmission electron microscopy (TEM).....	190
V.2.2.4 Elemental analysis of Ag-NPs by TEM/STEM EDXS	191
V.2.2.5 Qualitative analysis of Ag-NPs diffusion in the hydrogel	191
V.2.2.6 Quantitative analysis of Ag-NPs diffusion in the hydrogel	192
V.2.2.7 Impact of Ag-NPs on 2D culture.....	192
V.2.2.8 Live/dead assay	193
V.2.2.9 MTT assay.....	193
V.2.2.10 Impact of Ag-NPs on 3D culture.....	193
V.2.3 Results and discussion.....	194
V.2.3.1 Nanoparticles properties in a biological medium.....	194
V.2.3.2 Diffusion of Ag-NPs through the supramolecular hydrogel	197
V.2.3.3 Impact of Ag-NPs on 2D cell culture.....	198
V.2.3.4 Ag-NPs internalization in the cells in 2D culture.....	205
V.2.3.5 Impact of Ag-NPs on 3D cell culture.....	207
V.2.4 Conclusion.....	209
V.3 Conclusion.....	211
Conclusion et Perspectives.....	215
Références	237
Annexe.....	303

Abréviations

2D	: Bidimensionnel
3D	: Tridimensionnel
A549	: Lignée cellulaire de cancer du poumon
Ag-NP	: Nanoparticules d'argent (‘‘ <i>Silver nanoparticles</i> ’’)
BA	: Dérivé glyco-nucléo-bolaamphiphile bis amide
BU	: Dérivé glyco-nucléo-bolaamphiphile bis urée
CSC	: Cellule souche cancéreuse (‘‘ <i>cancer stem cell</i> ’’)
DEP	: Dielectrophorèse
DEP-B	: Tampon de dielectrophorèse
D_f	: Dimension fractale, grandeur représentant la manière dont un objet fractal remplit l'espace
DF	: Facteur de dilution (‘‘ <i>Dilution factor</i> ’’)
DLS	: Diffusion dynamique de la lumière (« <i>dynamic light scattering</i> »)
DMEM	: Milieu de culture cellulaire « <i>Dulbecco's minimum essential medium</i> »
E (rhéologie)	: Module d'Young (Pa)
EDXS	: Spectroscopie de rayons X à dispersion d'énergie (« <i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i> »)
F1	: Fraction 1 collectée par SdFFF
F2	: Fraction 2 collectée par SdFFF
FACS	: <i>Fluorescent-activated cell sorting</i>
G (rhéologie)	: Module de cisaillement (Pa)
G'	: Module de conservation (Pa)
G''	: Module de dissipation (Pa)
GBM	: Glioblastome
GNB	: Glyco-nucléo-bolaamphiphile
GNF	: Glyco-nucléotide fluoré
GNL	: Glycol-nucléo-lipide
ICP-MS	: Spectrométrie à plasma à couplage inductif couplée à la spectrométrie de masse (« <i>inductively-coupled plasma – mass spectrometry</i> »)

MACS	: <i>Magnetic-activated cell sorting</i>
MALS	: <i>Multi-angle light scattering</i>
MCTS	: Sphéroïde tumoral multicellulaire (« <i>multicellular tumor spheroid</i> »)
MEC (“ECM”)	: Matrice extracellulaire (“ <i>extracellular matrix</i> ”)
Mel28	: Lignée de cellules cancéreuses de la peau
MTT	: 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide
NP	: Nanoparticules
LMWG	: Gélifiant de faible masse moléculaire (« <i>low molecular weight gelator</i> »)
LN18	: Lignée de cellules cancéreuses du glioblastome
PBS	: Tampon phosphate salin (“ <i>phosphate buffer saline</i> ”)
PdI	: Indice de polydispersité (« <i>polydispersity index</i> »)
PDMS	: Polydiméthylsiloxane
RACS	: <i>Raman activated cell sorting</i>
ROS	: Espèces réactives de l’oxygène (“ <i>Reactive oxydative species</i> ”)
RT	: <i>Room temperature</i>
SdFFF	: Fractionnement par couplage flux-force de sédimentation (“ <i>Sedimentation field-flow fractionation</i> ”)
SEM	: Microscopie électronique à balayage (“ <i>scanning electron microscopy</i> ”)
SN	: Surnageant (“ <i>Supernatant</i> ”)
Sol	: Phase dans laquelle les gélifiants sont solubilisés
STEM	: Microscopie électronique à transmission balayage (“ <i>scanning transmission electron microscopy</i> ”)
SVF	: Sérum de veau foetal (ou <i>FBS</i> “ <i>Fetal bovine serum</i> ”)
SW480	: Lignée de cellules cancéreuses du colon
T	: Température (K ou °C)
TEM	: Microscopie électronique à transmission (« <i>transmission electron microscopy</i> »)
$T_{gel-sol}$: Température de transition de la phase gel vers la phase sol (°C)
TP	: Pic total collecté par SdFFF (“ <i>total peak</i> ”)

$T_{sol-gel}$: Température de transition de la phase sol vers la phase gel (°C)
U87-MG	: Lignée de cellules cancéreuses du glioblastome
UHF-DEP	: Ultra high frequency range dielectrophoresis
ULA	: Ultra-low attachment
w/v	: weight/volume

Introduction

La culture cellulaire est une méthode qui consiste à reproduire des cellules hors de leur environnement de vie habituel ou de l'organisme d'où elles proviennent. Aujourd'hui, elle demeure un pilier de la recherche qu'elle soit translationnelle, médicale ou en biotechnologie. Dans le domaine de l'oncologie, la culture cellulaire sert de support d'étude de l'évolution du développement tumoral, du comportement des cellules vis-à-vis de leur microenvironnement, des réponses cellulaires à la suite de stimuli externes etc. Depuis longtemps, les chercheurs se servent de la culture conventionnelle dite bidimensionnelle (2D)¹⁻³ en tant que plateforme d'études et d'analyses. Ces modèles consistent à faire croître des cellules sur des surfaces planes, comme des flasques de culture. Malgré l'efficacité et le rendement élevé que ces modèles ont démontrés par le passé, leurs grandes limitations résident dans la morphologie et le comportement cellulaire qui sont éloignées de leur réalité physiologique. En effet, dans la culture 2D il n'y a pas de formation d'une matrice extracellulaire (MEC)^{1,3-5} typique du microenvironnement *in vivo*. De ce fait, les cellules se développent en monocouche, avec une morphologie cellulaire non représentative de celle *in vivo*, perturbant ainsi les interactions cellule-cellule et cellule-MEC et donc modifiant plusieurs aspects génomiques (activation/inhibition de voies de signalisation) et phénotypiques.⁶⁻⁸ Parallèlement, il y a un recours aux modèles animaux *in vivo*, comme les modèles murins, surmontant ces problèmes et s'approchant de la réponse cellulaire normalement observée chez les humains.⁹ Les modèles *in vivo* ont révolutionné la recherche en biologie, notamment en oncologie. Cependant, l'expérimentation animale suscite une polémique majeure sur le plan éthique, notamment en Europe et en Amérique du Nord, conduisant à l'élaboration de la règle des 3 R (réduire, raffiner et remplacer)^{10,11} pour fixer une ligne de conduite concernant la manipulation animale et pour remplacer le *in vivo* par le *in vitro* lorsque cela est possible. Ainsi, la culture tridimensionnelle (3D)^{3,6-8} a émergé pour former un pont entre la culture 2D et les modèles animaux, en offrant un système, naturel ou synthétique, qui rétablit une structure proche de la MEC observée *in vivo*, et dans lequel les cellules se comportent d'une façon dite réaliste.^{7,8,12} Par conséquent, elle permet aux cellules de recouvrir une morphologie 3D et des meilleures interactions cellule-cellule et cellule-microenvironnement.¹⁻³ Ainsi, du fait que les cellules regagnent leurs propriétés physiologiques, leurs réponses aux traitements sont très proches de ce que nous observons *in vivo*.^{4,5} Les applications de ces systèmes 3D sont diverses. Des études de différenciation notamment sur les cellules souches neuronales¹³ ou cellules souches pluripotentes induites^{14,15} ont été effectuées en 3D pour des finalités thérapeutiques pour les

maladies neurodégénératives et cardiaques. D'autres études consistaient à effectuer une cartographie génomique de cellules en 3D pour évaluer l'activation de voies de signalisations vis-à-vis de stimuli externes¹⁶, l'organisation génomique des cellules pluripotentes¹⁷ et des cellules immunitaires suite à leur activation¹⁸. En outre, l'applicabilité des systèmes 3D a connu une croissance remarquable dans le domaine de l'oncologie.¹⁹⁻²³ La culture 3D de cellules cancéreuses permet la conception de sphéroïdes tumoraux multicellulaires (MCTS) représentatifs des tumeurs solides.²⁴⁻²⁷ Les MCTS permettent de mimer la même construction de la tumeur d'origine, ainsi que ses interactions et son comportement vis-à-vis de son microenvironnement.^{28,29} Ils sont formés par trois couches de cellules de propriétés phénotypiques et morphologiques différentes : une couche périphérique proliférative de cellules différenciées, une couche intermédiaire de cellules quiescentes comprenant des précurseurs de cellules indifférenciées et un centre hypoxique riche en cellules souches cancéreuses (CSCs).^{25,26,30,31} Les systèmes 3D à base de MCTS sont un atout essentiel en tant que plateformes d'étude dans le cadre de multiples investigations en oncologie, offrant des réponses qui traduisent mieux le comportement *in vivo*.³² Ils permettent notamment la conception de nouvelles approches thérapeutiques innovantes³³⁻³⁶, l'optimisation d'anciennes thérapies en comparaison avec la 2D³⁷⁻⁴¹, la compréhension de la progression tumorale,^{42,43} l'évaluation de nanoparticules à visées thérapeutiques⁴⁴⁻⁴⁶ et l'étude de l'effet de substances polluantes, d'entités présents dans l'environnement et/ou de particules disséminées dans l'environnement et en contact avec des systèmes vivants.^{26,47,48}

L'objectif de ce travail de thèse est la conception maîtrisée de systèmes 3D de type MCTS de tailles uniformes pouvant être utilisés en routine en tant support d'études pertinent en oncologie ou en nano-toxicologie. Nous entendons par « maîtriser » l'obtention d'une plateforme dont les caractéristiques morphologiques et comportementales sont connues et constantes. Ainsi elles permettront de comparer l'évolution du MCTS en présence ou en absence de facteurs inductifs (chimiothérapie/radiothérapie, nanoparticules, etc.) pour permettre une évaluation de leurs effets. Il est donc primordial que le système 3D présente une variation minimale de ses caractéristiques intrinsèques en termes d'activité métabolique, de viabilité, de cinétique de croissance ou de taille finale de sphéroïdes obtenus. Pour atteindre cet objectif, nous avons envisagé de développer un modèle constitué d'éléments maîtrisés afin d'obtenir une production reproductible et ainsi proposer un modèle d'étude dont la variabilité comportementale pourra être associée uniquement à l'effet testé. Nous avons donc défini deux composants majeurs de la culture cellulaire 3D : un support tridimensionnel et un modèle cellulaire. La combinaison

du savoir-faire de deux laboratoires a permis de répondre à ces exigences. Le laboratoire ARNA INSERM U1212 de l'Université de Bordeaux, spécialisé dans la conception de molécules gélifiantes, nous a permis d'obtenir des hydrogels étudiés pour leur potentiel en tant que MEC synthétique pour la culture cellulaire 3D. Le laboratoire CAPTuR EA 3842 de l'Université de Limoges est expert en culture cellulaire et recherche en oncologie qui, grâce à un brevet d'invention sur une méthode de tri cellulaire, nous a permis de trier des sous-populations de cellules.

Aujourd'hui il existe de nombreuses approches pour obtenir des supports tridimensionnels dédiés à la culture cellulaire 3D pour se rapprocher au maximum du comportement cellulaire physiologique.^{3,49-55} Nous retrouvons deux catégories de systèmes 3D : les systèmes dépourvus d'échafaudage (scaffold-free)⁵⁶⁻⁵⁸ et les systèmes utilisant une matrice (scaffold-based)⁵⁹⁻⁶¹. La première catégorie se base principalement sur des milieux qui empêchent l'adhésion cellulaire et par conséquent la création d'agrégats cellulaires non représentatif du comportement *in vivo*. La deuxième catégorie consiste à recréer un microenvironnement complexe afin de reproduire l'architecture physiologique de la MEC, offrant ainsi support matériel dans lequel la croissance cellulaire est plus réaliste. Ces supports peuvent être des matrices solides ou des matrices gélifiantes.^{62,63} Les supports 3D à base de matrices solides, par exemple les membranes plastiques poreuses,⁶² permettent un développement cellulaire plus réaliste. Cependant, leurs propriétés physico-chimiques sont difficiles à moduler et présentent souvent une rigidité très importante empêchant de s'adapter aux différentes lignées cellulaires. Leurs propriétés présentent surtout un intérêt en médecine régénérative du tissu osseux⁶². Pour surmonter ce problème, il est nécessaire d'avoir recours à une matrice qui présente des propriétés physico-chimiques faciles à moduler tout en gardant une structure complexe intrinsèque similaire à la MEC.⁶⁴⁻⁶⁶ Les hydrogels sont des matériaux qui répondent à ces prérogatives.^{67,68} Certains hydrogels présentent des caractéristiques de biocompatibilité et de haute perméabilité pour les nutriments, l'oxygène et d'autres métabolites hydrosolubles, ce qui en font des candidats idéaux pour la culture 3D. Les éléments constitutifs des hydrogels peuvent être à base de polymères naturels, comme les protéines (collagène, gélatine, etc.),⁶⁹⁻⁷¹ les polysaccharides (acide hyaluronique, chitosane, etc.)^{72,73} ou des composés⁷⁴. La grande limitation de ce type de polymères est la variabilité inter lots en termes de stabilité, composition chimique et propriétés physiques. Nous retrouvons également les Matrigels®, des préparations d'une membrane basale reconstituée. Elles comprennent des assortiments de protéines extraites des tumeurs murines, principalement des laminine, collagène IV, énaactine et protéoglycane à

base d'héparane sulfate. Cependant, leur composition protéique varie énormément, la matrice ainsi formée n'est donc pas définie.^{75,76}

Un contrôle sur la variabilité peut être acquis en utilisant des polymères synthétiques comme le poly (acide lactique) et le poly (éthylène glycol) vu que la structure chimique est bien définie et facilement répétable. Néanmoins, ces polymères souffrent souvent d'une mauvaise cytocompatibilité et induisent une activité pro-inflammatoire. Les molécules gélifiantes de bas poids moléculaires offrent une alternative aux polymères synthétiques.⁷⁷ Ces molécules ont la capacité de gélifier pour former un hydrogel par assemblage supramoléculaire grâce à des liaisons non covalentes.^{78,79} Il en existe plusieurs, constituées de carbohydrates, de peptides, d'acides nucléiques, etc.⁸⁰ Le point commun de ces molécules est d'être composées de motifs structuraux bioinspirés leur conférant a priori une cytocompatibilité. Parmi les molécules gélifiantes de bas poids moléculaires, les glyco-nucléo-bola-amphiphiles (GNB)⁸¹ ont présenté un intérêt majeur pour nos travaux. Ces molécules possèdent une chaîne aliphatique centrale liée à chaque extrémité à des dérivés glyco-nucléotidiques (glyco-nucléo-bolaamphiphile). Elles forment des hydrogels supramoléculaires avec une architecture complexe dont les propriétés physico-chimiques comme la viscoélasticité sont facilement modulables en jouant sur leur concentration.⁷⁷ De plus, elles sont compatibles avec différents milieux : eau, tampon phosphate salin, milieu de culture (sans ou avec sérum de veau fœtal), etc.. Pour ces raisons, le choix du système 3D s'est effectué sur ces molécules.

Une fois le support tridimensionnel choisi, nous avons procédé au choix du modèle cellulaire. Le choix a porté sur la conception d'un modèle basé sur des lignées cancéreuses, et non pas saines, aussi bien pour des applications en oncologie que pour étudier l'impact de nanoparticules sur un système vivant. Bien que nous retrouvions aujourd'hui beaucoup d'approches basées sur la culture 3D de lignées cellulaires saines,^{13,14,82} leurs limitations en termes de prolifération et passage cellulaire, leur courte durée de vie et leur sensibilité aux stimuli physiques appliqués par le recouvrement du milieu 3D⁸³⁻⁸⁷ posent des problèmes de répétabilité de leur comportement en culture 3D. En revanche, les lignées cellulaires cancéreuses constituent des modèles bien définis dans les bases de données, résistants et s'adaptant facilement aux changements de leurs microenvironnements.^{83,85-87} La mise en place d'un tel système 3D permet la production de MCTS représentatifs d'une tumeur solide *in vivo* en termes d'organisations complexes en multicouches et évolution au cours du temps. Néanmoins, le choix de la lignée cancéreuse pour la conception d'un tel système 3D est capital. Dans le but de concevoir une plateforme d'étude et d'analyse, choisir une lignée hautement

clonogénique permet de mieux reproduire la construction des MCTS *in vivo*, à partir d'un petit nombre de cellules. Nous retrouvons ces caractéristiques dans le cancer cérébral connu tel que le Glioblastome (GBM). Le GBM, qui est un cancer de grade IV, est une tumeur solide multicellulaire constituée de sous-populations avec des propriétés génomiques, phénotypiques et physico-chimiques très différentes et distribuées sur trois couches⁸⁸⁻⁹⁰. Les cellules différenciées sont des cellules spécialisées prolifératives qui ne possèdent pas la capacité de former une tumeur ni de donner des progénitures hétérogènes au sein de la tumeur,⁹¹⁻⁹⁵ tandis que les CSCs sont beaucoup plus agressives.⁹⁴ Les CSCs possèdent deux caractéristiques clés qui sont l'auto-renouvellement et la multipotence⁹¹⁻⁹⁸ : elles prolifèrent par division asymétrique^{99,100} en donnant d'un côté des clones d'elles-mêmes, permettant de maintenir une quantité de CSCs au sein de la tumeur^{97,97}, tout en formant d'autres types de cellules plus spécialisées⁹³. De ce fait, les CSCs sont capables de générer tous les types de cellules présentes dans la tumeur et donc de recréer une tumeur à partir d'un faible nombre de cellules^{91,92}. C'est la raison pour laquelle ces cellules sont connues comme étant des cellules initiatrices de tumeurs.^{101,102} Par conséquent, les CSCs jouent un rôle primordial dans l'initiation et la progression tumorale, les échappements thérapeutiques, l'invasion métastatique et les récurrences des patients. Les CSCs acquièrent leur résistance aux thérapies par divers processus^{100,103-105} comme une suractivation des pompes d'efflux des médicaments en question¹⁰⁶, une forte capacité de réparation des dégâts causés à l'ADN causés par la molécule thérapeutique¹⁰⁷ et une protection accrue contre les espèces réactives de l'oxygène¹⁰⁸. Récemment, des études ont montré que la plasticité des CSCs leur permet d'adopter un état quiescent qui joue également un rôle dans la résistance thérapeutique.⁹³ De ce fait, les propriétés des CSCs trouvées au sein d'une population hétérogène dans le GBM demeurent très intéressantes à évaluer en 3D. Ces propriétés sont reproduites dans la lignée U87-MG, et nous formulons l'hypothèse qu'en arrivant à récupérer les CSCs de cette lignée, il serait possible de produire grâce à leurs propriétés des MCTS représentatifs de la tumeur d'origine avec la moindre variabilité.

La présence de tous les types de cellules (proliférantes, quiescentes et souches) dans une lignée cancéreuse peut être un frein à la reproductibilité des méthodes et des résultats. Or, le système d'étude ne doit pas posséder une variabilité intrinsèque qui pourrait être confondue avec un impact externe provenant de l'introduction des substances d'intérêt. Donc, il ne serait pas possible de savoir si, par exemple, une augmentation remarquable de la taille des sphéroïdes est le résultat de l'impact de l'entité d'intérêt causant un gain en masse tumorale, ou s'il s'agit d'une variation intrinsèque du modèle biologique. Durant une culture 3D, nous choisissons le

nombre de cellules implantées dans le support, cependant nous ne contrôlons pas la composition de la suspension. Une lignée cancéreuse de GBM comme U87-MG est constituée d'une population cellulaire hétérogène dont les CSCs. Ces dernières représentent la fraction qui va permettre de recréer un sphéroïde mais sont présentes en très faible proportion (<5%) au sein de la population mère. S'il s'avère que dans la suspension cellulaire préparée pour la culture 3D, la quantité en CSCs est insuffisante, elle pourrait ne pas suffire à former des sphéroïdes et/ou en former avec une cinétique de croissance non répétables.

De ce fait, si nous arrivons à implanter préférentiellement des CSCs dans un support 3D, nous pourrions engendrer le développement d'une tumeur solide représentative du Glioblastome, avec une plus grande chance d'obtenir des sphéroïdes uniformes et répétables. Pour isoler les CSCs, diverses méthodes de tri cellulaire existent comme la cytométrie en flux, mais elle requiert un marquage cellulaire pouvant altérer leur intégrité intracellulaire. Il existe une méthode de tri douce non-invasive appelée fractionnement par couplage flux-force de sédimentation (SdFFF), brevetée par l'Université de Limoges.¹⁰⁹⁻¹¹² Nous avons donc envisagé cette méthode se basant principalement sur les propriétés physico-chimiques des cellules tels que la taille et la densité, pour trier à partir d'une population hétérogène deux sous-populations : une sous-population de cellules différenciées et une sous-population de CSCs.

Ce manuscrit de thèse se décline en six chapitres. Le premier est une étude bibliographique dont la première partie est une revue publiée dans *nanomaterials* en 2021 reprenant l'intérêt des modèles cellulaires 3D, ainsi que les deux briques essentielles pour les obtenir : l'architecture pour accueillir les cellules et le choix des lignées cellulaires. Elle fait le focus sur une application de ce genre de modèles : l'utilisation de cellules cancéreuses pour une évaluation pertinente de la nano-toxicité grâce à la culture 3D. Ce bilan bibliographique souligne que de tels modèles doivent prendre en compte l'entièreté des caractéristiques des nanoparticules (taille, forme, structure, concentration, composition chimique) afin d'évaluer leur impact sur un système cellulaire représentatif d'une diversité cellulaire *in vivo*. Ce chapitre est complété par une étude bibliographique plus spécifique sur les supports tridimensionnels à base de molécules gélifiantes de faible masse moléculaire, le choix des cellules souches cancéreuses et le moyen de les obtenir par tri cellulaire grâce à la technique SdFFF.

Grâce à ces connaissances, des choix rationnels ont été effectués et testés expérimentalement, constituant les chapitres expérimentaux suivants.

Le deuxième chapitre rédigé sous forme d'article et soumis dans ACS Biomaterials Science & Engineering, souligne le potentiel et la pertinence des architectures à base de glyco-nucléo-bolaamphiphiles (GNB) pour accueillir des CSCs. Nous y détaillons la conception et l'optimisation de l'hydrogel à base de molécules gélifiantes de faibles masses moléculaires fournies par l'unité ARNA à Bordeaux, qui se forme par assemblage supramoléculaire de ces molécules grâce à des interactions moléculaires faibles de types liaisons hydrogènes, Van der Waals, etc. Deux molécules gélifiantes de structures chimiques légèrement différentes parmi les GNB ont été sélectionnées présentant une différence sur une fonction chimique reliant la chaîne aliphatique avec la thymidine : le dérivé bis urée (BU) et le dérivé bis amide (BA). Les propriétés mécaniques de ces hydrogels ont été étudiées grâce aux expertises de l'équipe ARNA, afin de d'obtenir une viscoélasticité représentative d'un tissu cérébral (rigidité entre 0.1 et 1 kPa) pouvant ainsi accueillir des cellules de GBM (lignée U87-MG). Nous avons également étudié leurs cinétiques de gélification, ce dernier s'effectuer par refroidissement après solubilisation à haute température (80 °C), pour établir un procédé d'ensemencement cellulaire sans choc thermique. Tandis que la culture 3D de U87-MG dans un hydrogel constitué de BA à une concentration de 0,25% w/v a montré un maintien de viabilité, une prolifération, une évolution et une organisation spatiale en sphéroïdes, les hydrogels à base de BU à 0,1% w/v présentant une rigidité comparable au gel avec le gélifiant BA, n'a pas permis d'observer cette organisation en sphéroïde. Cependant cette première phase d'étude a été faite avec des cellules du GBM hautement hétérogènes, ce qui a induit une formation de sphéroïdes de différentes tailles et organisations.

Afin d'obtenir une sous-population cellulaire enrichie en CSCs, nous avons évalué la technique de SdFFF associée à un biosenseur présentée dans un troisième chapitre sous la forme d'un article publié dans Analytical Chemistry en 2021. La SdFFF a déjà prouvé son efficacité pour trier des lignées cancéreuses en routine grâce à la calibration biologiques des profils d'élutions et ainsi obtenir une sous-population de CSCs. Cependant, dans un objectif d'études cliniques ultérieures, notre objectif est d'avoir un système de détection/caractérisation online des CSCs dès leur élution par SdFFF. Dans cette optique, nous avons étudié la possibilité de couplage de la SdFFF avec un biosenseur micro-fluidique « label-free ». Le biosenseur, basé sur la génération de force dielectrophorèse (DEP) à ultra haute fréquence (dans la gamme de MHz), est capable de discriminer entre une population de cellules différenciées et une population de cellules souches en mesurant les fréquences de transition DEP des cellules acheminées dans un canal micro-fluidique. L'enjeu du couplage a été de trouver un milieu compatible avec le tampon

d'élution de la SdFFF contribuant à la séparation (tampon phosphate salin) et avec le tampon de détection du biosenseur (milieu DEM osmotique à base de sucre) devant convenir au procédé de polarisation des cellules. La solution a consisté à changer le tampon salin de la phase mobile de la SdFFF par un milieu DEP, ce dernier étant indispensable pour la polarisation des cellules et tout en étant compatible avec la SdFFF. Pour démontrer que ce changement de milieu n'impactait pas les propriétés biologiques des cellules triées, une série de caractérisation biologique sur les populations triées avec ce nouveau milieu a été effectuée. Quatre populations ont été comparées : une population totale (TP) correspondant à la population entière ayant subi le passage dans la SdFFF, la population entière non triée (crude) n'ayant pas été injectée dans la SdFFF, une première fraction collectée (fraction 1 (F1)) et une sous-population éluée dans un temps plus grand (fraction 2 (F2)). La population TP possède la même hétérogénéité que la population crude, signifiant que le tri n'affecte pas les cellules. Des caractérisations phénotypiques ont montré que les cellules de F2 présentent une taille cellulaire plus petite ainsi que des expressions de marqueurs de CSCs plus élevées que celles de la fraction F1. Des caractérisations fonctionnelles ont montré que la F2 a une tendance à être dans la phase G1 du cycle cellulaire connue comme phase de quiescence alors que la F1 a une tendance à être dans la phase G2 connue comme phase de croissance. De plus, la F2 a montré une capacité élevée à former des colonies sur support d'agar, deux fois plus que la F1, prouvant ainsi la forte capacité clonogénique de cette sous-population de GBM. Pris ensemble, ces caractérisations biologiques démontrent que la sous-population F2 ainsi triée par SdFFF est une fraction enrichie en CSCs ayant conservées toutes ses propriétés d'origine. L'analyse avec le biosenseur de ces fractions triées a confirmé que les fréquences de transition des sous-populations sont plus élevées pour la F1 représentatives d'une population standard différenciées, et plus basses pour la F2 représentatives d'une population de CSCs. Cette approche constitue la preuve de concept du potentiel d'un couplage « online » qui permet de contribuer en routine la population de CSCs à la fraction F2.

Le quatrième chapitre expérimental sous forme de publication démontre la pertinence de la combinaison de ces deux éléments clés, matrice synthétique et modèle cellulaire viables, et nous a permis d'atteindre notre objectif principal, celui d'obtenir un système 3D reproductible. Après introduction d'une population non triée dans un gel de BA à 0,25% w/v et l'observation d'une évolution tumorale non répétable, nous avons émis l'hypothèse que la reproductibilité d'une évolution tumorale ainsi que de la taille des MCTS en fin de culture peut être obtenue en implantant une population de cellules connues pour être initiatrices de tumeurs, les CSCs. Nous

avons évalué la culture de trois populations (TP, F1 et F2) dans l'hydrogel retenu (BA 0,25% w/v). Ceci a permis de mettre en évidence le comportement de chaque population cellulaire. Nous avons retrouvé avec TP (pris comme population hétérogène de référence) un comportement similaire à la population non triée utilisée dans le deuxième chapitre. L'évolution cellulaire est hétérogène et la génération de sphéroïdes est très variable en termes de taille et d'organisation spatiale au bout de 35 jours de culture. La culture 3D des cellules différenciées (F1) a montré un maintien de la viabilité sans prolifération ni organisation spatiale, ce qui est représentatif du comportement de cellules qui sont spécialisées et incapables d'initier une progression tumorale. Enfin, la culture 3D de la fraction enrichie en CSCs (F2) a permis de générer des sphéroïdes de grandes tailles, aux alentours de 400µm, et viables, représentatifs des tumeurs solides *in vivo* au bout de 35 jours de culture 3D. La répétition de la culture des CSCs avec différents tris cellulaires par SdFFF et différents lots d'hydrogels a montré une évolution répétable et la génération de sphéroïdes reproductibles en taille et organisation spatiale. Les analyses microscopiques ont montré qu'un gradient de cellules s'est formé au sein des sphéroïdes consistant en une couche périphérique proliférative et un centre nécrotique. Ces résultats montrent que l'introduction d'une population de CSCs triées par SdFFF dans un hydrogel supramoléculaire adapté permet l'obtention de sphéroïdes tumoraux multicellulaires de taille répétable avec une cinétique de croissance répétable. Ainsi nous sommes en mesure de proposer un système de culture 3D maîtrisé pouvant servir de plateforme d'investigation de la progression tumorale, et d'analyses de l'impact de particules avec le vivant.

Après standardisation de notre système 3D, nous l'avons évalué pour différentes applications. Dans un cinquième chapitre, nous présentons les résultats de son potentiel comme bioindicateur pour étudier l'impact de nanoparticules (NPs) d'argent sur un système vivant. Les NPs sont d'abord caractérisées sur plan physico-chimique grâce à l'expertise du laboratoire IPREM (Université de Pau et des Pays de l'Adour), notamment pour étudier leur stabilité dans le milieu de culture cellulaire. Ensuite, l'état des NPs dans le gel est examiné pour savoir si les NPs diffusent avec ou sans agrégation au sein de l'architecture poreuse du gel. Par la suite, les NPs sont mises en contact avec les cellules en 2D pour avoir une première idée de leur impact sur les cellules pour être ensuite être testées en 3D. Cet impact est surtout étudié par étude de viabilité cellulaire et comportement prolifératif en premier lieu, puis caractérisé par microscopie électronique couplée à une analyse élémentaire afin de localiser les NPs post culture. Enfin, à différents temps d'incubation, les NPs sont mises en contact avec les sphéroïdes en cours de croissance. Nous avons observé, en 2D ou en 3D, que les NPs ont induit

un changement drastique du comportement cellulaire mais d'une manière différente pour chacune des cultures : en culture 2D les cellules en contact avec les NPs ont démontré une suractivation de leur phénotype prolifératif en formant en réseau de neuro-sphères qui est un comportement normalement corrélé à une présence excessive de CSCs (par comparaison au contrôle solvant sans NPs) ; en 3D nous avons observé un empêchement de structuration du sphéroïde quand les NPs sont déposées en début de culture, et une destruction de l'organisation spatiale du sphéroïde quand les NPs sont déposées en fin de culture. Ceci démontre que la culture 3D apporte des informations souvent manquantes en 2D, et surtout plus représentatives de la réponse physiologique.

Dans un dernier chapitre, nous mettons en évidence le panel de tests et applications qui peuvent être réalisées avec ce système 3D. Premièrement, nous avons testé la culture de divers types de cancer dans l'hydrogel BA 0,25% w/v qui ont montré une haute viabilité mais une progression qui reste moins importante que celle des cellules U87-MG du GBM, ce qui montre la compatibilité de la nature de cet hydrogel avec différente lignée. Ensuite nous avons essayé d'introduire des cellules de culture primaire de patient atteint du GBM pour évaluer la preuve de concept d'une approche basée sur notre système 3D pour la médecine personnalisée. Nous avons également testé la coculture de U87-MG avec des cellules souches mésenchymateuses issues de patients pour évaluer le changement de comportement de la progression tumorale par le microenvironnement et ses constituants. Dans la même optique d'examiner l'effet des entités du microenvironnement sur la progression tumorale, nous avons testé l'impact de vésicules extracellulaires sécrétées par des cellules de lignées U87-MG shrab27a, dont l'expression de la protéine 27a associée à Ras est atténuée, sur le développement des sphéroïdes. La diminution de l'expression de rab27a a théoriquement comme conséquence une diminution de sécrétion de vésicules extracellulaires. Cependant, une équipe au sein du laboratoire CAPTuR a démontré le maintien d'un niveau de sécrétion de ces petites vésicules qui pourraient être des exosomes jouant un rôle dans la communication entre les cellules et le transfert d'informations encore indéfinies aujourd'hui (agressivité ou atténuation de la progression tumorale ?). Nous avons évalué l'impact de ces petites vésicules extracellulaires sur le comportement des sphéroïdes en 3D.

Ce manuscrit expose comment nous avons pu obtenir un système de culture 3D délivrant un modèle de MCTS uniformes et dont les propriétés sont maîtrisées. En se basant sur un microenvironnement fibrillaire bien défini qualitativement et quantitativement, qui peut être adapté à la MEC recherchée (ici le tissu cérébral), associé à un tri cellulaire de CSCs

soigneusement effectué grâce à un tri par SdFFF conservant leur intégrité biologique ; nous proposons une plateforme inédite d'une grande utilité pour diverses applications. Nous sommes en particulier intéressés par les applications en nano-toxicologie pour évaluer l'impact de NPs qui peuvent se retrouver disséminées dans l'environnement et en contact avec les organismes vivants. Les conséquences de l'impact de NPs sur le comportement cellulaire en 3D (gain d'agressivité tumorale, ou désagrégation des sphéroïdes, ou induction de la mortalité cellulaire, ou augmentation de la vitesse de prolifération etc.) permettront de mieux comprendre leurs effets sur les organismes vivants. Ainsi, les MCTS répondent à un besoin d'outils pertinent pour les études de toxicité de NPs issues de l'environnement, qui est un enjeu de santé publique majeur. Au-delà de la nano-toxicité, les applications de cette plateforme sont très nombreuses, allant du suivi et la compréhension plus approfondie de la progression tumorale, vers l'optimisation de thérapies conventionnelles ou la conception de nouvelles thérapies innovantes (par exemple nano-thérapie ou thérapies ciblées pour les CSCs) sur des modèles tumoraux dont la réponse reflète mieux celle de l'*in vivo*. En outre cette plateforme permet d'aller plus loin dans le domaine de médecine personnalisée en utilisant des cellules issues de patients.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.1 Introduction

La conception d'un modèle biologique 3D en tant que plateforme d'études et d'analyses nécessite un assemblage de divers éléments qui doivent être parfaitement définis et diverses étapes complexes de production. Cependant, un point important pour en faire un système avec une réponse fiable est d'acquiescer un contrôle sur la répétabilité du système afin d'obtenir des données émergentes et pertinentes des tests effectués sur celui-ci. Dans ce projet de thèse, nous visons à concevoir un modèle cellulaire tridimensionnel reproductible. Ce modèle 3D permet de recréer un micro-environnement synthétique dans lequel les cellules se développent d'une manière mimant le *in vivo*, et donc avec des réponses vis-à-vis de stimuli externes plus représentatives des systèmes vivants. Ces modèles ouvrent la voie à diverses applications, et nous soulignerons en particulier l'étude de l'impact de nanoparticules (NPs) issues de l'environnement sur un système biologique 3D. En effet de telles études sont importantes à mettre en place aujourd'hui en raison de l'utilisation grandissante des NPs dans de nombreux produits de grandes consommations, suscitant des questions de santé publique. Ainsi nous pourrions évaluer les conséquences de l'impact réel de ces NPs sur le vivant, qui restent mal définies à ce jour, et dont nous ne disposons pas d'une approche claire et structurée pour les étudier. Afin que ces études soient représentatives de la réalité, il est nécessaire que la réponse obtenue soit représentative de l'impact *in vivo* et qu'elle soit reproductible. Pour le garantir, il est primordial que le modèle 3D possède les caractéristiques biologiques souhaitées et qu'elles soient comparables d'une culture à une autre. De tels modèles permettront de souligner le fait que les changements observés au niveau du système vivant sont issus du contact avec les NPs, et non pas d'une hétérogénéité issue de l'expérience. De ce fait, il est crucial d'établir un protocole clair et facilement répétable, qui permet de construire le modèle 3D reproductible d'une part, et d'étudier l'impact des NPs d'autre part.

Une revue de la littérature intitulée "Biomaterials for three-dimensional cell culture: from applications in oncology to nanotechnology" publiée en 2021 dans *Nanomaterials* (Ref : Saydé, T. et al. ; *Nanomaterials*. <https://doi.org/10.3390/nano11020481>) est présentée dans la première partie de ce chapitre. Elle pose le contexte général de ce travail de thèse, et répond également aux questions relatives à la conception de ce modèle d'intérêt. En effet, plusieurs études de nano-toxicité existent en 3D, mais elles présentent des difficultés en termes de reproduction des réponses cellulaires de l'impact des NPs. Après inspection des protocoles utilisés, ces difficultés sont dues à deux points majeurs : un manque de reproductibilité du système 3D

utilisé et/ou des caractérisations physico-chimiques menées sur les suspensions de NPs d'intérêt insuffisantes.

En se basant sur les avantages et les limitations de ces multiples approches existantes en nanotoxicologie 3D, nous offrons un guide qui définit les étapes clés à respecter afin d'obtenir une reproductibilité des études d'impact des NPs sur le vivant, et donc fournir une réponse fiable de leur impact. Le choix du support 3D doit mimer la complexité de la MEC et permettre une culture 3D répétable, par le biais de l'utilisation d'une matrice synthétique par exemple. Le choix du modèle cellulaire est essentiel afin d'obtenir des cellules de forte stabilité génomique et phénotypique et faible sensibilité au milieu 3D physique, tel que les cellules cancéreuses. La caractérisation des NPs avant l'étude de leur toxicité permet de connaître leur état initial au contact avec les cellules. Le mode de mise en contact des NPs avec le système vivant va décider du type de toxicité qui est étudiée (à quel moment de la culture, piégeage dans le gel ou dépôt dans le surnageant, etc.). Le choix des caractérisations en fin de culture est capital, en ce qu'elles vont permettre de souligner les modifications au niveau cellulaire (viabilité, agressivité, migration, différenciation, etc.) et au niveau de l'état des NPs (tailles, modification chimique, etc.).

Un modèle 3D viable pour une culture cellulaire doit répondre à des critères clés, que nous détaillerons en deuxième partie, telle qu'une architecture complexe représentative du microenvironnement *in vivo*, des propriétés viscoélastiques adaptées à la lignée cellulaire et un réseau qui permet un échange de nutriments entre le support 3D et le milieu d'entretien. Les hydrogels ont été choisis comme support prometteur pour la culture cellulaire, permettant d'obtenir une matrice 3D avec des propriétés physico-chimiques facilement modulables. De ce fait, nous détaillons également la conception des hydrogels à base de molécules gélifiantes de faibles poids moléculaires. L'unité ARNA de l'Université de Bordeaux a permis la conception de ces molécules ainsi que leurs caractérisations sur le plan physico-chimique et le contrôle de leurs propriétés viscoélastiques afin de répondre aux conditions requises pour la culture de la lignée cellulaire d'intérêt. Ces hydrogels se forment par assemblage supramoléculaire qui conduit à une architecture fibrillaire supportant l'implantation de cellules et leur développement dans l'espace. Cette première rubrique montre le concept de l'assemblage supramoléculaire et les différents avantages d'utiliser ce type d'hydrogels.

La deuxième rubrique porte sur le modèle cellulaire. Comme déjà décrit dans l'introduction générale, les lignées cancéreuses offrent un modèle pertinent pour produire ce type de

plateforme d'études. Grâce à leurs caractéristiques intrinsèques que nous ne retrouvons pas chez les cellules normales, elles présentent de nombreux avantages comme leur longue durée de vie, leur nombre de passage illimité et leur stabilité génomiques vis-à-vis des forces physiques induites par l'hydrogel. Les cellules cancéreuses en 3D se développent en tumeurs représentatives de la tumeur solide d'origine, et donc forment des sphéroïdes tumoraux multicellulaires ayant les mêmes zones concentriques de cellules de caractéristiques phénotypiques différentes. Afin de reconstituer cette organisation, il est nécessaire de choisir une lignée possédant des cellules hautement clonogéniques qui permettent de reproduire l'hétérogénéité des multicouches en 3D en partant d'un faible nombre de cellules comme le Glioblastome. Il est présenté dans la troisième partie de ce chapitre. En effet, la lignée cellulaire d'intérêt est la lignée U87-MG qui présente une importante hétérogénéité ainsi qu'un fort potentiel de clonogénicité, critères majeurs pour la culture 3D. Cependant, étant donné que notre objectif est la reproductibilité du modèle 3D, l'implémentation d'une population cellulaire homogène en taille et en phénotype s'avère l'approche la plus rationnelle à adopter. De ce fait, l'utilisation d'un modèle cellulaire enrichie en cellules initiatrices de tumeurs pourrait permettre d'atteindre cet objectif. Les cellules souches cancéreuses (ou initiatrice de tumeurs, CSCs), décrites également dans la troisième partie, sont connues pour jouer des rôles importants dans l'initiation et la progression tumorale, vu qu'elles possèdent des caractéristiques clés comme la multipotence et l'auto-renouvellement. Par conséquent, les CSCs sont des candidates importantes pour leur culture au sein d'un hydrogel afin de produire un modèle 3D répétable. Cependant, les CSCs se trouvent en proportion très faible au sein des lignées cancéreuses (~ 5%), il est donc nécessaire de les isoler et les caractériser sans affecter l'intégrité de leurs propriétés intrinsèques par des immunomarquages cellulaires. De ce fait, nous avons eu recours à la technique de fractionnement par couplage flux-force de sédimentation (SdFFF) développé par l'équipe CAPTuR de l'Université de Limoges. Cette technique, qui sera décrite dans la dernière partie de ce chapitre, est douce et non-invasive, et se base sur les propriétés biophysiques des cellules telles que la taille et la densité, afin de trier à partir d'une population hétérogène des sous populations de cellules souches cancéreuses.

I.2 Biomaterials for three-dimensional cell culture: from applications in oncology to nanotechnology

Tarek Saydé ^{1,2}, Omar El Hamoui ^{2,3}, Bruno Alies ², Karen Gaudin ², Gaëtane Lespes ^{3,*} and Serge Battu ^{1,*}

¹ EA3842-CAPTUR, GEIST, Faculté de Médecine, Université de Limoges, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges, France; tarek.sayde@unilim.fr

² ARNA, INSERM U1212, UMR CNRS 5320, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France; elhamoui.omar@gmail.com (O.E.H.); bruno.alies@u-bordeaux.fr (B.A.); karen.gaudin@u-bordeaux.fr (K.G.)

³ CNRS, Institut des Sciences Analytiques et de Physico-Chimie pour l'Environnement et les Matériaux (IPREM), UMR 5254, Université de Pau et des Pays de l'Adour (E2S/UPPA), 2 Avenue Pierre Angot, 64053 Pau, France

Abstract: Three-dimensional cell culture has revolutionized cellular biology research and opened the door to novel discoveries in terms of cellular behavior and response to microenvironment stimuli. Different types of 3D culture exist today, including hydrogel scaffold-based models, which possess a complex structure mimicking the extracellular matrix. These hydrogels can be made of polymers (natural or synthetic) or low-molecular weight gelators that, via the supramolecular assembly of molecules, allow the production of a reproducible hydrogel with tunable mechanical properties. When cancer cells are grown in this type of hydrogel, they develop into multicellular tumor spheroids (MCTS). Three-dimensional (3D) cancer culture combined with a complex microenvironment that consists of a platform to study tumor development and also to assess the toxicity of physico-chemical entities such as ions, molecules or particles. With the emergence of nanoparticles of different origins and natures, implementing a reproducible in vitro model that consists of a bio-indicator for nanotoxicity assays is inevitable. However, the maneuver process of such a bio-indicator requires the implementation of a repeatable system that undergoes an exhaustive follow-up. Hence, the biggest challenge in this matter is the reproducibility of the MCTS and the associated full-scale characterization of this system's components.

I.2.1 Introduction

The closer we can get to mimicking the human condition, the better the scientific research is going to be in understanding the fundamental pathology of a disease, also in predicting patient response regarding a drug therapy and estimating the toxicity of certain physico-chemical entities surrounding us on a daily basis. Biomaterials will allow us to recreate a smaller version of our inner physiological microenvironment, able of hosting cells and allowing the diffusion of small entities such as nanomaterials.

Cell culture is an indispensable tool for understanding the fundamental biophysical and biomolecular mechanisms by which cells assemble into tissues and organs; and to understand the physiological functions of cells consequently their disruption during illness. Nowadays, cell culture is used in biomedical research, tissue engineering, regenerative medicine as well as other industrial practices.

Accordingly, these *in vitro* cell cultures serve as a platform to understand the *in vivo* cellular behavior such as migration and differentiation. Nevertheless, conventional two-dimensional (2D) culture systems may give results that deviate from the true *in vivo* response. To overcome this limitation, new three-dimensional (3D) cell culture platforms are designed to better mimic *in vivo* conditions¹¹³. Cell lines provide us with excellent materials for biological studies and 3D culture leads these cells to behave in a way close to the natural conditions existing in the organism¹¹⁴.

Under conventional 2D culture conditions, components of the extracellular matrix (ECM) as well as cell-cell and cell-ECM interactions, which are important for differentiation, proliferation and normal cell function *in vivo*, are altered¹¹⁵. In addition, 2D culture methods do not provide control over cell shape, which is a biophysical parameter affecting cell bioactivity *in vivo*¹¹⁶. Cells in the body have a bioactivity stimulus dependent from their 3D microenvironment since cell-cell and cell-ECM interactions affect basic cellular behavior and even organ function. Historically, previous studies have shown that 3D cell organization reveals unanticipated results on the mechanism of tumorigenesis. These discoveries suggest that 2D *in vitro* cancer studies display shortcomings. 3D cell culture increases the dimensionality of the ECM around the cells. Thus, the major advantage of 3D culture over 2D culture is the reduction of the gap of cell behavior between *in vitro* cell culture systems and *in vivo* cell physiology¹¹⁶⁻¹¹⁸ (Figure I.1).

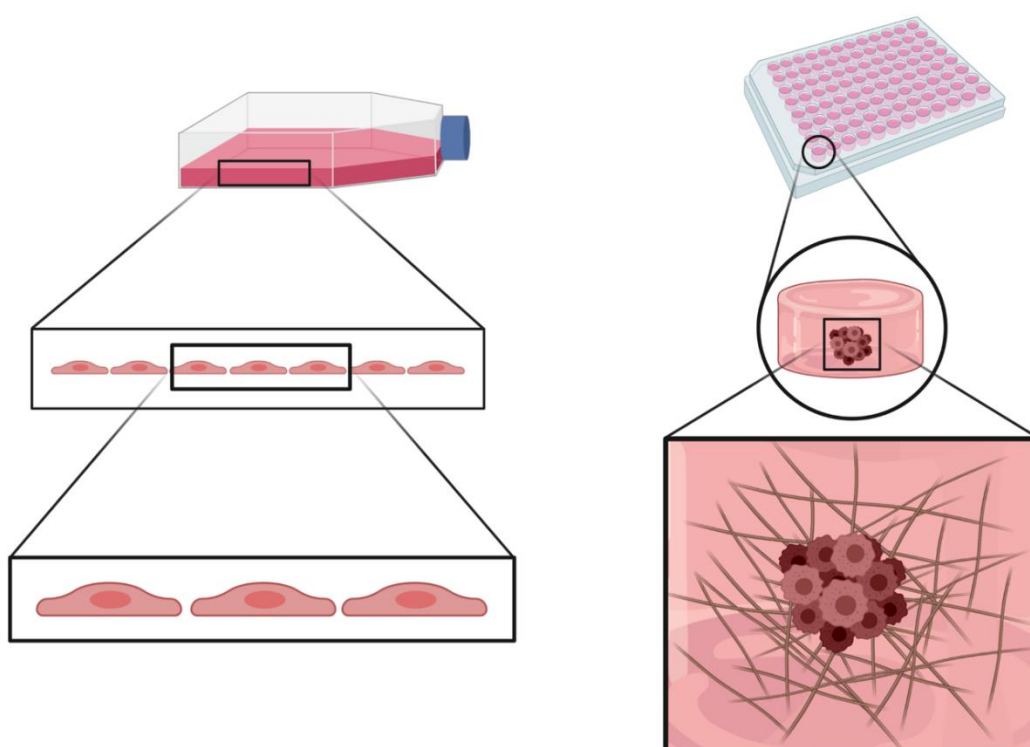
(A) 2D cell culture**(B) 3D cell culture**

Figure I.1 2D vs 3D cell culture (A) Cell behavior in 2D conventional cell culture. Cells cultured in a 2D manner tend to have a flat shape that does not represent the real physiological cell morphology. (B) Cell behavior in 3D cell culture. Cells cultured in a 3D system are present in a microenvironment similar to that *in vivo*, therefore they have a more representative morphology and behavior.

In order to confirm an observation made *in vitro*, the most reliable approach and most common is to use standard animal models such as mice, zebra fish, etc¹¹⁹.

However, there are numerous worries rising today concerning in particular the amount of pain and discomfort that an animal model has to endure. A fair amount of the animals that go through testing have an imperil immune system and do not possess a tumor-microenvironment interaction similar to that of humans. Consequently, it weakens the reliability of the given results. This prevents an efficient translation of novel research to clinical settings¹²⁰. In addition, experiments including animal trials can be time consuming and very expensive. The 3D models are a credible alternative to the use of animals and meet the ethical rule of the 3Rs (Reduce, Replace, Refine) limiting the use of animal experimentation^{114,121–124}.

A continuous challenge that we face today is obtaining a conformity between animal testing and clinical trials¹²⁵. Therefore, the need to create cellular models that can better capture the

complexities of research in biology is a motivation to switch from 2D to 3D culture¹²⁶. By replacing *in vivo* models with 3D cultures, the latter forms a bridge between 2D culture and animal testing.

3D models have proven their potential in many applications in today's research that we will be discussing later on. Nevertheless, the core of this review is to explain their role in nanotechnology, in particular how these 3D cellular models can serve as a platform to study nano-toxicity especially their impact on living systems including human organisms. This field has been insufficiently exploited and demands urgent attention due to the complexity in sample preparations as well as *in vitro* models implementation¹²⁷. While presenting a panel of 3D systems alongside their advantages and inconveniences, we will be mainly focusing on hydrogels that have particular characteristics and their implications in nano-toxicity assays.

I.2.2 Three-dimensional culture systems

In the preclinical development and translation of nanotechnology-based oncology platforms, cell-based biological systems that closely mimic tumors are vital¹²⁸. A single 3D technology, consisting as a solution or remedy to all difficulties or diseases, does not exist. Numerous approaches have been developed to meet the expanding interest in 3D cell culture. Therefore, scientists are required to select the most suitable model for their cell-based assay¹¹³. A 3D system must answer to key characteristics such as retaining natural shape of the cell¹²⁹, allows heterogeneous exposure between cell interface and medium as in physiological state there is gradient availability of media components¹³⁰. Cell junctions should be prevalent and enable cell-to-cell communication¹³¹. Particularly, a 3D system should permit a high cell viability as observed *in vivo*¹³², and cell proliferation¹³³.

Two broad categorizations for 3D culture exist: culture systems scaffold-free or scaffold-based, with the latter being either natural or synthetic.

I.2.2.1 Scaffold-free systems

Spheroids technique consist of model with different layers of cells that compensates the deficiencies seen in monolayer cultures^{113,134}. This model can be obtained in different methods such as the use of low-adhesion plates to promote the self-aggregation of cells into spheroids^{128,135} (Figure I.2A), the use hanging drop plates¹²¹ or the use of bioreactors to produce such models under dynamic culture conditions¹³⁶.

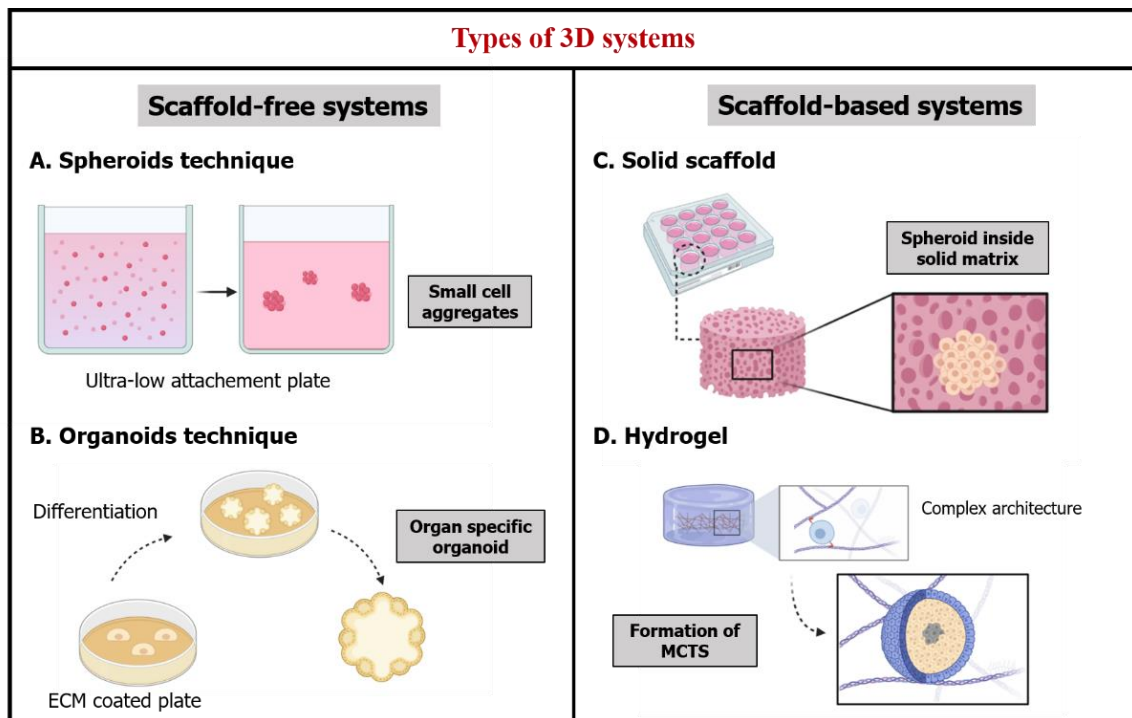


Figure I.2. Types of 3D systems. 3D systems fall into two categories either scaffold-free or scaffold-based systems. Scaffold-free systems depend greatly on the plate where the cells are culture whether it is (A) ultra-low attachment plate for the production of cell aggregates as spheroids or (B) ECM coated plates for cell differentiation into organoids. Scaffold-based systems are manmade microenvironments that can host cells whether they are (C) solid scaffolds that offer a rigid matrix and allow spheroid formation or (D) Soft scaffolds like hydrogels that contain an ECM-like complex architecture in which MCTS are produced similar to solid *in vivo* tumors.

However, spheroid culture is accompanied by several limitations that include the difficulty in production of spheroids having a uniform size and standardized composition, out of a small number of seeded cells; and an absence of adequate standardized assays regarding drug-screening studies therefore narrowing the spectrum of applications of these models¹³⁴.

Organoids technique, that are “a collection of organ-specific cell types that develops from stem cells or organ progenitors and self-organizes through cell sorting and spatially restricted lineage commitment in a manner similar to *in vivo*”¹³⁷. It either is obtained by a monolayer culture of cells on feeder cells or on a surface coated with an ECM, for example fibroblasts, so by cell differentiation, organoids are formed¹³⁴ (Figure I.2B). Alternatively, a second approach by differentiating primary tissues¹³⁸.

Studies have shown that, even though this model present an *in vivo*-like architecture and complexity, its main limitations reside in its variability and amenability to withstand high-throughput screening (HTS) and high-content screening (HCS)¹³⁹.

I.2.2.2 Scaffold-based systems

Another more important and complex facet of 3D culture is scaffold-based systems. This is a discipline that extends the range of options available to scientists.

Scaffolds are described as fabricated 3D structures made of an array of materials having different porosities, permeability, surface nature and mechanical stability that are modulated in order to design an architecture representing an ideal reconstruction of the microenvironment of specific tissues, also known as the ECM.

Unlike scaffold-free systems, this micro architecture enhances the biophysical and biochemical interaction of the adhered cells and provides a biologically active matrix for the cells to proliferate, differentiate and auto-organize.

Two subcategories emerge from this discipline:

Solid scaffold-based technology that provides a 3D space hosting cells and allowing them to create 3D tissue-like structures. Natural or synthetic, they consist of porous membranes or fibrous scaffolds that have been widely studied in the field of stem cells and regenerative medicine, for example, porous membranes produced by thermally induced phase separation^{140,141}. Owing to their porous structure, these 3D matrixes facilitate tissue regeneration (e.g. cornea, skin and bone)¹⁴²⁻¹⁴⁴. Other types of solid scaffold-based technologies are 3D tissue models made of paper-based microfluidics. The latter are materials retrieved from plant tissue in the perspectives of developing human tissue structures compatible for 3D culture of mammalian cells¹⁴⁵. Nanocellulose-based scaffolds, in particular nanocrystalline cellulose and nanofibrillated cellulose¹⁴⁶, and silk-based composite scaffolds¹⁴⁷, have proven their potential in regenerative medicine such as wound healing and organ reparation, due to their special permeability and hemocompatibility.

The interconnected network implemented in the inner matrix present a 3D microenvironment assisting the progress of different indispensable cellular activities like migration, proliferation and cellular interactions¹⁴⁸. (Figure I.2C)

Nonetheless, this scaffold-based system demands laborious synthesis and construction steps. It is equally challenging to seed and incorporate cells inside this matrix¹⁴⁹. The cells tend to exhibit inhomogeneous distribution within the microenvironment hence giving unstandardized results. This behavior is widely observed in large constructs with low seeding density¹⁵⁰.

For this matter, a biodegradable, biocompatible and tunable scaffold-based system that is able to host cells in a homogeneous manner is mandatory. With the advent of technology, the design of a scaffold that meets the requirement of a reproducible 3D culture was brought to life: hydrogels that can be designed as a soft scaffold for hosting cells

Hydrogels are matrixes made of molecules that have the ability to swell but without dissolving in water. This class of materials has a high affinity to its solvent, which explains its swelling properties¹⁵¹.

Today, hydrogels attract material scientists and biomedical researchers, to which their formulations and applications undergo until this day a series of improvements and optimizations. In their entirety, hydrogels are water based, 3D viscoelastic networks, which allow the diffusion of entities throughout their nano-pores or interfibrillar spaces, and attachment of cells¹⁵².

Hydrogel materials exhibit characteristics of biocompatibility and high permeability for nutrients, oxygen and other water-soluble metabolites, rendering them ideal candidates as scaffolds for cell encapsulation¹⁵³.

Hydrogel networks can contain both permanent junctions and semi-permanent junctions like chain entanglements. These architecture's properties, such as stiffness, swelling features and molecules transportation, are highly affected by the cross-linkage type and branching degree¹⁵⁴. The most common are either polymeric gels, formed by bioinspired-designed units linked by covalent bond, or low molecular weight gelators (LMWG) often mentioned as supramolecular gels since they consist of units self-assembled by weak interactions¹⁵⁵.

Hydrogels have their own properties and natures, yet they exhibit some similarities that could give interest for cell culture. Several of them tend to mimic the ECM architecture: cells encapsulated in a fibrillary environment, formed by a network of covalently-linked or self-assembled units, where they can recover their spatial organization and three-dimensional specificities such as cell-cell and cell-ECM interactions¹⁵⁶.

Further, these hydrogels mimic the ECM architecture in a morphological and biophysical manner. Most of hydrogels designed to host cells inside of them have rheological properties (i.e. stiffness), often close to living tissue, leading to a cellular development and behavior close to that *in vivo* without the intervention of animal models¹⁵⁷.

Hydrogels hold many advantages over other types of cell encapsulating systems. They resemble natural soft tissue by comparison to other types of polymeric biomaterials due to the fact that hydrogels are water-swollen entities^{151–157}. They also have advantages over other types of polymeric scaffolds, such as easy control of structural parameters ensuring biocompatibility

and a scaffold having adjustable architecture¹⁵⁷. Hydrogels also provide a complex three-dimensional tissue architecture and complex interactions between ECM and cells¹⁵⁸. On biological analysis level, unlike scaffold-free methods, hydrogels are applicable to microplates, amenable to HTS/HCS, are highly reproducible and offers a platform for co-culture assays¹³⁴. Hydrogel design is solely based on the nature of their constituent units¹⁵⁹. Depending on the desired experiments' end-result, researchers can design a hydrogel that fits their needs. Materials for hydrogel design can either be natural polymers, synthetic polymers or low molecular weight gelators.

Natural polymers are used to create natural hydrogels, and different groups can be found:

- Proteins used historically in stem cell-based tissue engineering^{114,121,134,157,160} such as collagen used for example in differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes^{161,162}, gelatin proved efficient in chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells^{163,164}, fibrin for differentiation of murine embryonic stem cells into neural lineage cells^{165,166}, and silk^{167,168}.

- Polysaccharides that are naturally found in the ECM^{121,157} such as hyaluronic acid that is either used as an integral scaffold for tissue engineering¹⁶⁹ or used as a functionalization tool of synthetic biomaterials to create a hybrid more biomimetic matrix¹⁷⁰ and chitosan for tissue engineering applications¹⁷¹.

- Matrigels, that originated from murine sarcomas ECM, are basement membrane matrixes composed mainly of four ECM proteins: laminin (60%), collagen IV (30%), entactin (8%) and heparin sulfate proteoglycan perlecan (2%)¹⁷². By virtue of their built-in bioactivity, they exhibited diverse applications in cellular biology¹⁷³. They have been used in cancer invasion studies to assess the metastasis capabilities of cancer cells¹⁷⁴. Matrigels were used in cell culture of human pluripotent stem cells (hPSCs) to understand the impact of the micro-environmental factors on cell differentiation¹⁷⁵, for cardiomyocytes as in vitro model of heart activity¹⁷⁶ and organoid production¹⁷⁷. However, matrigels construction requires a large number of structural proteins but also involves other factors such as growth factors¹⁷⁸ and transcription factors¹⁷⁹. Previous studies displayed major inconvenience that can limit cellular behavior studies linked to the matrigel's complex, unclear and highly fluctuating composition¹⁷⁸⁻¹⁸⁰.

Hydrogels made of natural polymers exhibit very important advantages much needed in biomedical applications that are biocompatibility, biodegradability and nontoxicity¹⁵⁹. In addition, they are expected to have better interaction with cells enhancing the occurrence of cell proliferation and differentiation¹⁸¹.

However, for the purposes of cell culture, high uncontrollable biodegradation capacities of the scaffold can end up being an inconvenience more than an advantage because it establishes a variable that is hard to control and may influence cell activity in unknown ways¹²¹. Other limitations may include batch-to-batch variabilities in biochemical and mechanical properties. For instance using atomic force microscopy, Soofi et al. showed that a batch of matrigel exhibited featured an average elastic modulus also known as stiffness of 400 Pa whereas another batch displayed an elastic modulus of 840 Pa, twice as high¹⁸². Other variabilities are observed in soluble factors like peptide and protein concentration^{178,180,183}. These variabilities hinders the reproducibility of results. They also have a higher probability of xenogenic contamination in the likes of viral contaminants¹⁸⁴.

To overcome these limitations, researchers resorted to non-animal synthetic hydrogels made of synthetic polymers that are more reproducible in terms of biochemical and mechanical properties. Synthetic polymers are also found in different groups:

- Biodegradable biomaterials including poly(lactic acid) (PLA), poly(glycolic acid) (PGA), poly(vinyl alcohol) (PVA) and their copolymers. They are commonly used in regenerative medicine for differentiation assays of stem cells progenitors¹⁸⁵⁻¹⁸⁷.
- Non-biodegradable biomaterials such as poly(ethylene glycol) (PEG), 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA) and acrylamide (AAm)^{188,189}. They maintain physical and mechanical integrity for non-biodegradable applications in tissue engineering¹⁵⁷. Today non-biodegradable biomaterials are more used combined with biodegradable materials to help tune and control some of their properties such as porosity and permeability.

Synthetic polymers possess tunable mechanical strength because of the strong covalent bonds within their matrix^{152,159}. These characteristics are known to affect cell differentiation and cell adhesion¹⁹⁰ so the preference of the desired synthetic polymer depends on the anticipated cellular behavior.

A synthetic scaffold provides reproducibility¹²¹ by minimizing the inter batches quality fluctuation since they are often processed and manufactured, hence there will be more consistency between cultures. These hydrogels possess high water content, enabling transport of oxygen, nutrients, waste, and soluble factors, all of which are important to cell functions¹⁹¹. However, several studies have shown that this theory does not apply on all these polymers. They suffer often from several limitations including poor biocompatibility, toxicity, pro-inflammatory unwanted activity etc.

Low molecular weight gelators (LMWG) are an alternative for synthetic polymers. They are small-molecule-based hydrogels, involving low-molecular-weight gelators are emerging as a

promising tool¹⁹². The common definition of LMWG includes two key features: 1) they consist of molecules with a molecular weight of at most 3000 Da, 2) they are capable of self-assembling by non-covalent interactions such as hydrogen bonds, electrostatic and Van der Waals interaction, π -stacking or other low energy interactions.

Nowadays, we know several different bio-inspired designs of LMWG, which most spread are: (Figure I.3)

- Carbohydrate^{193–196}
- Peptide^{197–201}
- Nucleic acid based^{202–205}

They have excellent biocompatibility and biodegradability, modular structure that permits specific interactions and most importantly they form a nano-fibrous network that mimics the natural ECM fibrillary architecture^{206–208}.

Carbohydrate-based hydro-gelators are less used in life science than peptide-based, although some of them have shown their successful application as cell culture scaffold, owing to their non-cytotoxicity, their very simple structure and their easy synthesis^{195,196}.

Amphiphilic-peptides (PAs) are found amidst the self-assembling peptides family. The amphiphilic nature of the molecules constitutes the most relevant feature of PAs. This feature is a key structure allowing the formation of nanofibers by PAs self-assembly, followed by intertwining to form a hydrogel network²⁰¹. Studies conducted on these molecules showed that the nano-fibrous network resulting from these self-assembling peptides have the ability to form stable hydrogels for cell encapsulation^{157,209}.

Some other design strategies showed their success by creating bio-inspired derivatives. For example, nucleolipids are perfect molecular design candidates for this type of target hydrogels, because they are made of lipids covalently linked to nucleosides and they can form intermolecular non-covalent interactions hence the biodegradability asset of this gel²⁰⁴. An example of hydrogel forming nucleolipids-based LMWG are glycosyl-nucleoside-lipids (GNLs) owing to their intrinsic supramolecular properties²¹⁰. These types of molecules are amphiphilic, given their particular structure consisting of a hydrophobic tail and a hydrophilic head group, giving upward thrust to their surfactant properties and conjointly their ability to self-assemble into nanostructures. In view of their transfection capabilities, they are valued in biomedical research for the delivery of nucleic acids into cells.

Another interesting molecular structure for gelators design is the bola-amphiphile structure. The self-assembling features of bolas have been described for decades now²¹¹ and inspired

many bola-based gelators^{212–214}. From this design, further other derivatives have shown their potential such as glycosyl-nucleoside-bola-amphiphiles (GNBs). They consist of the same moieties of GNL arranged in a bola structure: the two polar heads (glycosylated nucleobases) at each end of a hydrophobic chain (lipidic chain). Their interesting self-assembly characteristic that bola-amphiphiles hold allows the creation of a unique architectural hydrogel that features fast gelation kinetics, high elastic moduli, thixotropic and thermal reversibility properties^{215,216}. Synthetic hydrogels, prominently amphiphilic molecules based gels, are used in a variety of applications like nano-material synthesis²¹⁷ and more importantly in the biomedical field for tissue engineering, wound healing or drug delivery^{218–220}.

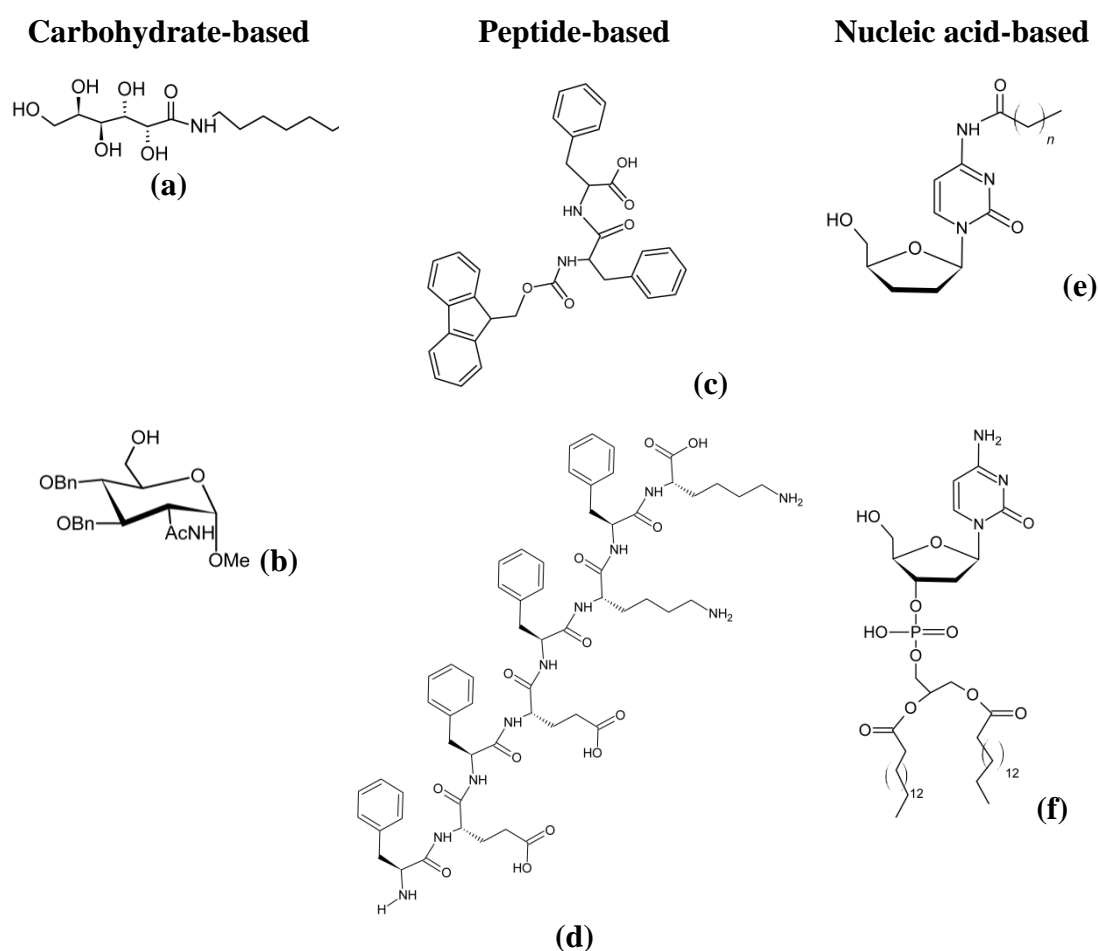


Figure I.3. Examples of LMWG structures. LMWG are either carbohydrate-based like (a) N-heptylgalactosamine or (b) N-acetyl glucosamine. They can be peptide-based like (c) FmocFF or (d) FEFEFKFK peptide. Alternatively, they can be nucleic acid-based like (e) N-acyl cytidine derivative or (f) Nucleotide lipid (diC16dC).

I.2.3 Cancer applications of hydrogels

Cancer cell lines are considered today as significant *in vitro* models in the medical field primarily due to their distinctive potential to produce an unlimited amount of biological material. The conception of databases that describe thoroughly the molecular and cellular diversifications of cancer cells such as mutations and difference in gene expression, ease the selection process of the desired cell type²²¹.

Unlike normal cell lines that present a short life span, cancer cell lines can be passaged with a low mortality rate. Owing to their anchorage-independent feature, they are convenient candidates for 3D culture. They are often observed to have a small size, more rounded with a higher nucleus/cytoplasm ratio by comparison to normal cells. Moreover, they have low serum dependency, as well as a higher growth rate and a higher ability of cloning than that of normal cells observed during toxicology assays²²².

Previous studies for example proved that cancer lines have a greater potential in drug-induced liver injury toxicity assessment, compared to conventional human hepatocytes. They also preserved some toxicity-related pathways throughout different assay systems, like peroxisome proliferator-activated receptor pathway and fatty acid-related pathways²²³.

Consequently, cancer cell lines are commonly used during drug design and treatment optimization^{224–228}, for personalized medicine using patient derived tumor cells²²⁹ and *in vitro* toxicity testing of physico-chemical contaminants. In particular, recently many studies demonstrated the use of cancer cells as support for nanoparticles (NPs) toxicity assays^{230,231}. Nanoparticles are proven to have a certain impact on cancer development, thus its toxicity could be correlated to the severity of the situation^{232,233}. Hydrogels retained historically a major application in biomedical research in particular tumor modelling *in vitro*^{208,234}.

Cancer research was subjected over the years to a load of optimizations and enhancement in experimentations. Scientists have gone from theories, to practical examination of cancer cells regarding their behavior, progression and reaction vis-a-vis therapy approaches. Cell culture was and remains until this day, the foundation of the development of today's well-known cancer therapies. Without cell culture assays, we would not have understood how cancer cells answer when exposed to chemotherapy or radiotherapy. We would not have understood the concept of metastasis, therapeutic resistance and the emergence of therapeutic multi-resistance.

The emergence of 3D culture helped us overcome many 2D culture barriers and took cancer research to a completely new dimension. The ECM-mimicking network created inside the

biomimetic hydrogels allows us to recreate the physiological microenvironment in which cells grow and develop inside the human body.

Accordingly, hydrogels became a more suitable microenvironment, in which, 3D culture of hosted cancer cells leads the cells to behave in a physiological manner. This behavior of cancer cells drive to a more realistic tumor progression. Meaning, the cells are going to assemble inside the nano-fibrous network, and will proliferate and differentiate as they would in the ECM. Depending on the nature of the polymer used to create the hydrogels, the cells will eventually create their own ECM and their own tumor niche²³⁵. In this kind of biomaterials, the assessment of tumor progression can be done from start to end because analysis of cell behavior, using different biological assays, can be done at any given time. It is important to understand how cancer cells begin their journey into tumor construction, so that innovative early stage treatments can be conceived.

On another hand, unlike other 3D systems, these kinds of hydrogel networks allow the creation of multicellular tumor spheroids (MCTS) (Figure I.2D). MCTS are solid cancer models that are created from a small number of seeded cells in a complex architecture. They represent solid tumors found inside the human body such as Glioblastoma. This kind of cancer model is very particular, very interesting and not easy to obtain²³⁶.

As their name implies, MCTS are a well-constructed series of cell layers forming a necrotic center, followed by a layer of quiescent cells and finally peripheral proliferative cells. An oxygen and nutrient gradient are created from the tumor surface to the core. This structure is uniform to the solid tumors observed *in vivo*. The conception of this structure culturing cancer cells in hydrogels, promote many possibilities of cancer therapy trials. The results using this *in vitro* model are similar when applied to the *in vivo* tumors^{118,123,237,238}.

Nowadays, in the field of drug discovery research, MCTS have proven efficient for all-inclusive drug penetration, efficacy and discharge²³⁸. Owing to their architectural structure, MCTS showed a higher resistance for antineoplastic agents compared to monolayer 2D cells. The reduced number of cells that are exposed to the anticancer drug in 3D MCTS similar to a solid tumor *in vivo*, and the highly necrotic core of the MCTS explain this high resistance to cancer therapy trials. In addition, the establishment of an ECM surrounding the MCTS can limit the drug penetration by comparison to a 2D culture. Thus, this is a clarification of the failed attempts of cancer treatment *in vivo*²³⁹. Many method articles have exposed detailed protocols for a successful production of MCTS inside a 3D microenvironment^{240,241}.

Radiotherapy assays have been investigated in 3D spheroids to examine the response of the latter to irradiation. Patient derived tumor cells spheroids demonstrated a radiation-dependent

reaction representative of a patient's specific response. Murine cell lines were also used in 3D irradiation approaches, and alongside human cell lines, they showed radio-biologic hypoxia that requires post treatment reoxygenation²²⁹.

Furthermore, chemo-sensitivity analysis was carried out on 3D MCTS due to its particular architectural structure. Gene expression profiling of these MCTS showed a similar gene expression of survival, proliferation and resistance genes to those of *in vivo* tumors by comparison to 2D cultures. In addition, the ECM surrounding the MCTS in the 3D systems was shown to play a key role in chemo-resistance, a role that is held by the physiological ECM during chemotherapy^{134,224,225}. Other experiments like combination therapies, chemotherapeutics and drug carriers can also be studied in these *in vitro* models²²⁶. For this matter, nano-vectors for drug delivery were investigated in cancer research. They have the ability to retain in their core a therapeutic payload that can be targeted to the tumor niche²²⁷. Current breakthroughs were documented in the biomedical research and approved by the FDA, consist of therapeutic nanoparticles encapsulated chemotherapy for the treatment of acute myeloid leukemia²²⁸.

Two important questions rise at this point. How can the hydrogel matrix's complex architecture be used in novel assays? Is MCTS's importance solely restricted to cancer research?

The porous architecture of hydrogel matrix has been subjected to various diffusion studies over the years. For example, diffusion of phage particles for bacterial bio sensing were analyzed in carbohydrate hydrogels²⁴². Macromolecules diffusion in hydrogels were also a center of attention²⁴³, especially protein diffusion inside the matrix like in PEG hydrogels for the design of an artificial cornea material²⁴⁴ or Poly(sulfobetaine Methacrylate) hydrogel for biological transport assays in zwitterionic hydrogels²⁴⁵. In addition, chemical elements diffusion such as ions were also investigated in a calcium alginate hydrogel-structure²⁴⁶ [134]. This means that other entities whether they are macromolecules or simply small particles may also have the ability to diffuse through this complex structure hence promoting the establishment of innovative particle, molecule or entity analysis such as toxicity assays of contaminants. Nevertheless, a thorough toxicity analysis remains insufficient without studying the impact of these contaminants on a living system. This is the important role of MCTS being the living system of interest grown inside the hydrogel.

I.2.4 Nanoparticles emergence

Today, with modern technology, the world is witnessing a global emergence of particles of all sorts, notably NPs. This may have an unforeseen impact on humans and ecosystems, becoming an object of particular attention for public health and environmental studies.

I.2.4.1 Definition of nanoparticles

A nanoparticle is characterized based on its size, shape, structure and chemical composition giving its particular personalized properties. Due to its very small size, it exhibits physical and chemical properties different from those of a big sized object of the same matter²⁴⁷. With stable material conditions and low number of atoms, the majority of the atoms of a nanoparticle are present on the outside rather than the inside of the particle itself. This gives particular atomic properties to a nanoparticle²⁴⁷. With the smallest observed nanoparticles ranging slightly less than 1 nm and the biggest going to several tens of nanometers, ISO²⁴⁸ defined nanoparticles as entities having one or several external dimensions at the nanoscale ranging from about 1 to 100 nm in size.

Nevertheless, another factor to be taken into consideration is the reactivity of a nanoparticle in regard of the environment in which it is found, due to its very large exchange surface with this environment. The latter can cause, among other transformations, agglomeration (reversible) and aggregation (semi-reversible) assemblies of NPs generating larger nanoparticles going up to several hundreds of nanometers; or dissolve NPs leading to smaller ones, or even to their total disappearance in favor of the ions and / or molecules that made them up. The surrounding medium can also modify the composition of the surface of nanoparticles by sorption or desorption, affecting their reactivity and fate²⁴⁹. This is the reason why it is fundamentally important to determine and monitor the NPs state before, during and after an experiment that requires their use.

I.2.4.2 Nanoparticles origin and environmental dispersion

Nanoparticles that are generated in or migrate to the environment are ubiquitous^{250–253} and found in natural aqueous media where they can cause potential hazards to living species^{254–256}. They can have natural origins like forest fires, dust storms and volcanic ash or anthropogenic origins. The latter are man-made and have two classifications²⁵⁷.

The first of anthropogenic origins are NPs with no prearranged size nor defined chemistry. For example, they can originate from combustion and diesel exhaust. For a matter of fact, NPs

released by diesel engine are urban air pollutants of great importance and may possess a compelling threat on public health. The NP modelling showed that, when released from their host medium into the environment, they could have different compositions and properties like size distribution and state of agglomeration. This implies that these unintentionally discharged NPs have an unforeseen and unpredictable impact on the environment and its inhabitants²⁵⁸.

In another category, we can find the engineered or manufactured NPs, with a potentially controlled size range, materials and surface composition²⁵⁷. For example, silver nanoparticles (Ag-NPs) were shown to exhibit antimicrobial effect making them interesting in medical devices²⁵⁹. Titanium (TiO₂-NPs) and zinc oxide nanoparticles (ZnO-NPs) have photochemical properties that are exploited for UV protection^{260,261}, photo degradation²⁶², pigmentation, etc. Iron oxide nanoparticles (IONPs) have magnetic properties that are used in medical imaging and cell targeting²⁶³. As a result, these nanomaterials are found in many everyday products, such as cosmetics, textiles, food and medical compounds. They are also used in industrial applications, like in modified concrete^{264,265}, energy production^{266,267}, health field^{268,269}, etc. In view of their ubiquity in manufactured products, these NPs are inevitably found in the environment via discharges, waste, etc.

1.2.4.3 Why are NPs a center of attention today?

Due to their recent growing emergence and environmental dispersion, NPs interactions with human organisms can originate from different sources.

NPs have witnessed a large spectrum of applications nowadays. One of the most important is their use as a diagnostic tool for example by functionalizing the surface of NPs (e.g. Gold NPs) with biological matter such as antibodies that can detect the presence of certain proteins correlated to a given disease²⁷⁰. In addition, NPs have become a center of attention because of their magnetic properties, such as iron oxide considered as superparamagnetic NPs. These NPs can serve as materials for cancer treatment and drug delivery systems owing to their controlled orientation and arrangement in a strong magnetic field²⁷¹. These features of NPs make them ideal candidates as thermal mediators in hyperthermia, drug vectors as well as contrast agents administered to patients for magnetic resonance imaging (MRI) or computed tomography²⁷². Thus, whether they are natural, incidental or engineered, NPs emergence and contact with living entities are exponentially growing²⁷³.

Thus, it is a crucial issue to assess their physiological impact and especially their cytotoxicity. Until now, the majority of the NPs toxicity assays were conducted in 2D *in vitro* models^{274–282} or *in vivo* models^{283–289}. Accordingly, gaps in the results were found when it comes to

comparing nano-toxicity results between *in vitro* and *in vivo*. Consequently, developing *in vitro* models are needed for NPs toxicity assays knowing that very little progress has been registered in the conception of *in vitro* models to study the distribution and translocation of nanoparticles across different barriers. The development of a more specific *in vitro* models is of utmost importance to understand systemic effects of nanomaterials¹²⁷.

I.2.4.4 In vitro cellular models for nanoparticles toxicity assays

At first, the standard nano-toxicity assays were mostly based on cytotoxicity and geno-toxicity evaluation for nanoparticles uptake by 2D cancer cells. Ag-NPs^{279–281,290–293} and TiO₂-NPs^{274,278,286,294–300} cytotoxicities are now established, with adopted hypothesis of mechanism involving ROS production, organelles inhibition and DNA damage, in a dose-dependent manner. As mentioned above, the use of cancer cell lines for most of these studies, such as HeLa^{293,301}, Hep2/HepG2^{292,295,299} or PC-3M²⁹⁶, leads to more reproducible and homogenous results under similar conditions, helping to focus on interactions between NPs and specific type of cells according to the purpose. For instance, because of the potential dispersion of Ag- and TiO₂-NPs in the respiratory system, studies of their effects were conducted on A549 lung cancer cell line and permit the determination of some adverse effects, from DNA damage to apoptosis^{279,298,300}. In the same spirit, the use of immortal skin cell line like HaCaT is consistent with the fact that TiO₂-NPs is found in everyday products such as cosmetics and with the purpose of uncovering their effect on skins³⁰². Noteworthy that TiO₂-NPs are still considered as inert for animals and humans, even though some advancements are made on their pulmonary effects^{303,304}. For other NPs like gold, the conclusion is still unclear since some studies demonstrated their cytotoxicity^{276,305} and other their harmlessness^{306,307}.

However, some studies showed the potential of 3D culture in assessing the nano-toxicity in a more relevant way (Table I.1). Indeed, by recreating cell-cell interactions and tissue-like behavior, the impact of NPs is clearly influenced. In some studies, 2D cell culture were found to overestimate some harming effects of NPs when compared to 3D cell culture^{308–311}. In 3D spheroid of central nervous system cells cultured in suspension in ultra-low attachment (ULA) wells, IONPs (Fe₃O₄) have a concentration and time-dependent effects on cell mortality comparable to those measured *in vivo*³¹². Thus, the cell mortality seems attenuated compared to 2D cell culture results³¹³. Same results were previously obtained in IONPs toxicity assessment in 3D culture of other cell type, with a higher toxicity in 2D monolayer compared to 3D³⁰⁹.

Table 1. Brief of NPs toxicity in 2D vs 3D: cell line/ NPs used/ 3D system/ analysis

NPs	NP size (nm)	NP coating	NP concentration	Cell line	3D system	Cytotoxicity assays	Cytotoxicity and comparison to 2D cell culture	Ref
ZnO	24; 56; 87	-	10; 25; 50; 75; 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Caco-2 (colorectal adenocarcinoma)	Agarose gel	ROS expression (CellROX orange reagent); measurement of pro-inflammatory cytokines (IL-8 and IL-1 β); cell proliferation (PicoGreen); modes of cell death (AnnexinV_FITC/PI)	Increased ROS expression; size-independent toxicity; decreased DNA amount at high concentrations; cell death: apoptosis in 3D vs necrosis in 2D; less toxic in 3D than in 2D	299
	222.0 (in water); 142.2 (in FBS-DMEM)	-	31.5; 125; 500; 1000 μM	SW480 and NCM460 (colorectal cancer)	Agarose gel	Mode of cell death (AnnexinV-PI); Immunofluorescence staining of NF- κB ; metabolic activity (MTT method)	Increased ROS expression in NCM460 cells upon NPs uptake but no ROS increased in 3D SW480; higher basal ROS expression in 3D SW480 than in 2D; ROS-independent inflammatory response increased in both cell lines in 2D and 3D; 3D is more resistant to DNA damage than 2D	304
ZnO TiO ₂	ZnO: 41 \pm 5 (in water); 190 \pm 3 (in DMEM); 106 \pm 11 (in standard culture medium); TiO ₂ : 79 \pm 25 (in water);	-	0.5-2.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$	A549 (human lung carcinoma); NIH-3T3 (mouse fibroblasts)	ULA well plates (spheroids)	Cell viability (CellTiter-Blue Viability test; reduction of blue resazurin to purple resofurin monitored by fluorescence); (CellTiter-Glo luciferase reaction in presence of Mg/ATP/oxygen; monitored by luminescence); cell morphology (microscopy)	ZnO : similar toxicity in NIH-3T3 in 2D and 3D; A549 more sensitive in 3D than in 2D; both toxicity displayed in concentration-dependent manner; TiO ₂ : small toxic effect in 3D; no toxicity in 2D	302

	142 ± 29 (in DMEM); 118 ± 28 (in culture medium)							
TiO ₂ Au Ag	Au “15 nm”: 51±6; Au “80 nm”: 116±5; TiO ₂ : 896±133; Ag: 120±4 (in DMEM)	Au : phosphine TiO ₂ : PVP	1.25-625 µg cm ⁻²	Caco2 (colorectal adenocarcinoma) mono-cultured of co-cultured with THP-1 (human macrophages) and MUTZ-3 (human dendritic cells)	Collagen hydrogel	Inflammatory response (IL-8); cell viability (Alamar blue assay; LDH assay)	No impact of Au on cell viability or inflammation in Caco2 mono-culture but slight increase of IL-8 in co-cultured cells; mono-cultured cells more sensitive to Ag; inflammatory response from Ag at any concentration in co-culture; no toxic or inflammatory effect for TiO ₂ in both mono- and co-cultured cells	296
Ag ZnO SiO ₂	Ag: 6.873 ± 3.330 (in water) ; 6.887 ± 4.176 (in cell culture medium) ; ZnO: 43.58 ±9.113 and 292 ±42.50 (in	-	Ag: 5-50 µg mL ⁻¹ ; ZnO: 10-120 µg mL ⁻¹ ; SiO ₂ : 0-2000 µg mL ⁻¹	HepG2 (hepatocarcinoma)	Gelatin; collagen hydrogel; Matrigel	Metabolic activity (Albumin and urea assays); cell viability (trypan blue and alamar blue); colorimetric cell proliferation assay (CellTiter96); morphology (microscopy)	3D show less toxicity than 2D; FBS hinder toxic effect of NPs but no change cell survival; Increase spheroids disaggregation at higher frequency of low concentration of NPs uptake compared to lower frequency of high concentration	19

	water); 134.7 ±108.2 and 3902.0 ±1119.0 (in cell culture medium) ; SiO ₂ : 30.99±20 .0 (in water); 41.65 ±22.09 (in cell culture medium)							
CdTe Au	CdTe: 2.4-6; Au: 3.5±0.7 (in citrate); 5.5±0.6 (in CTAB ¹)	CdTe- NPs : L- cysteine monolay er; Au- NPs : citrate/C TAB	CdTe: 10 µg mL ⁻¹ ; Au: 98.5 µg mL ⁻¹	HepG2 (hepatocarcino ma)	Polyacrylamid e hydrogel	Cell morphology (SEM; light microscopy); membrane integrity; metabolic activity (LDH and MTT methods); cell death mechanism (caspase assay for apoptotis; LDH for necrosis); live/dead assays (confocal microscopy)	Drop of cells metabolism and change in phenotype upon CdTe and CTAB-Au uptake; no toxicity reported for citrate-Au; less toxic in 3D than in 2D	306
IO	fluidMA G-D: 150;	D : neutral starch	25 µg cm ⁻²	HBMEC (Human brain microvascular	Spheroids suspension in inverted plate	Real-time cell analysis based on electronic impedance measurement via	Increased Akt activation in 2D vs. 3D upon NPs uptake; NPs distribution is coating charge-	297

¹ cetyltrimethylammonium bromide

	fluidMA G-PEI: 100; fluidMA G-CMX: 150	PEI : cationic polyethyl eneimine CMX : anionic carboxy methyde xtran		endothelial cells)		electrode at the bottom of wells; immunoblotting (Akt signalling); stained cell observation (confocal microscope)	dependent; cell death more pronounced in 2D vs. in 3D	
	Fe ₃ O ₄ : 48.7 (in sodium citrate); 10; 25; 70; 700 (in cell culture medium)	Polyvinylpyrrolidone (PVP)	0.1-25 µg mL ⁻¹ (long term exposure); 1-100 µg mL ⁻¹ (short term exposure)	D384 (astrocyte); SH-SY5Y (neuroblastoma)	ULA well plates (spheroids)	Cell viability (Trypan blue); cell morphology (microscopy)	Concentration-dependent cell mortality and spheroid disaggregation; at highest concentration: 50% and 34% cell viability decrease of D384 and SH-SY5Y respectively in 3D vs 75% and 45% in 2D	300; 305
	5 and 30	Dextran; PEG or no coating	100; 250; 500 µg mL ⁻¹	PAEC (Porcine aortic endothelial cells)	Alginate hydrogel	Cell viability (live/dead assay; alamar blue assay); ROS level; cell shape (actin cytoskeleton labeled and microscopy)	Bare NPs decrease cell viability and increase ROS expression in dose-dependent manner; any coating reduces cytotoxicity and ROS expression with no effect of the size in both 2D and 3D; bare NPs more toxic at low concentration in 3D vs. 2D	296
PELGA ²	PELGA10: 79.2 ± 5.7; PELGA20: 90.5 ± 5.0; PELGA40	-	2 µg mL ⁻¹	HeLa (human epithelioid cervix carcinoma)	Collagen hydrogel	Cell viability (Alamar blue assay); cell morphology (microscopy)	Sub-100 nm NPs more internalized and toxic in 3D than in 2D	289

² poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA)–block–poly(ethylene glycol) (PEG). Numbers 10, 20 and 40 indicate the concentration (mg ml⁻¹) of PEG-PLGA used during NPs preparation

	0: 175.8 ± 4.3							
Polymicells drug nanocarrier	151.9	-	100 µg mL ⁻¹	95-D (lung cancer); U87 (glioblastoma) ; HCT 116 (colorectal cancer)	Collagen hydrogel	Metabolic activity (MTT method); cell morphology (microscopy)	Attenuation of antitumoral effect and drug sensitivity in 3D vs. in 2D.	298

Relatively, cell sensitivity to nanoparticle is 3D environment dependent. Some 3D cultured cells can be more sensitive to NPs effect, as shown using human lung carcinoma spheroids developed in ULA wells³¹⁴. They displayed a higher sensitivity regarding ZnO-NPs compared to 2D cell monolayer. This study also showed that TiO₂-NPs induce a minor decrease in cell viability in 3D, whereas they do not exhibit any toxicity in 2D. 3D cells cultured in alginate matrix are more sensitive to IONPs used as nano-carrier for drug delivery and that coating NPs could enhance their biocompatibility³¹⁵. However, 3D cells cultured on agar plate, in which the architecture is less complex, are less sensitive to nano-toxic effects in general, but some inflammatory responses were found to be higher in 3D cells exposed to ZnO-NPs by comparison to 2D³¹⁶.

Difference in NPs impact between 2D and 3D cell culture is explainable by many considerations. As previously presented, the spatial cell organization is crucial for an extended recovery of molecular and biochemical mechanisms of the cell in *in vitro* conditions, such as cell behavior when exposed to exogenous factors. Moreover, cell clustering will influence the NPs penetration and thus their hazardous effect. The fact that some 3D models tended to reproduce *in vivo* results is also a promising clue of their legitimate use^{317,318}.

A 3D *in vitro* model is considered as a bio-indicator when used for measuring nano-toxicity. The 3D systems used in these studies demonstrated primary behavior of 3D spheroids when put in contact with nanoparticles. Taking this into account, an upgrade in the implementation of these experiments can render the nano-toxicity assays more predictive and reproducible.

1.2.5 Conclusion and perspectives

3D cell culture demonstrated over the recent years great capacities in cancer research, regenerative medicine and tissue engineering. 3D culture can be produced using either scaffold-free systems like spheroids and organoids, or scaffold-based systems like solid scaffolds or hydrogels.

In this matter, hydrogels displayed abilities to overcome many limitations that other types of 3D culture impose on researchers like biodegradability, biocompatibility and most importantly, its inner matrix consists of a complex structure that mimics the physiological ECM hence getting us closer to human conditions. LMWG based hydrogel are capable of producing multicellular tumor spheroids with an initial low-density cell seeding. More importantly, owing to its high reproducibility, an LMWG-based hydrogel can ensure a reproducible production of MCTS, an important feature for reliable results concerning any type of imminent experiments.

This *in vitro* model still manifests today major importance in cancer research in regards of understating tumor progression and therapeutic resistance. However, due to its reproducibility and long cancer cell life span, it could also be used as a bio-indicator to assess the toxicity of chemical elements, molecules or particles that we may encounter in the environment that we live in.

Today, with the emergence of nanoparticles of many sorts, the implementation of a reproducible *in vitro* model that can host NPs will allow the investigation of their impact and inevitably their burden on public health.

Based on the previously established NPs toxicity trials, a guideline for the anticipated experiments can be suggested in an attempt to get reproducible and comparable results, more representative of the real-life toxicity of NPs. The guideline consists of choices and alterations to be considered on different key points.

First, the choice of the cell line that will be the biological matter of interest is primordial. As described before, the majority of the toxicity experiments are done on cancer cell lines and for all the right reasons. Cancer cell lines are and will always be ideal candidates for such experiments. However, the choice of the cancer cell line is correlated with the type of toxicity in hand. Meaning if we are studying nano-toxicity in food products, the cancer line could be colorectal cancer line, that of the digestive tract. If the study concerns aerial toxicity, the cancer model could be pulmonary cancer line, that of the respiratory tract. These cell lines grown in a 3D system will produce MCTS.

We would like to restate that one of the key points of a successful and repeatable toxicity experiment is the repeatability of the MCTS itself. However, the majority of cancer cell lines derived from solid tumors like Glioblastoma present a high heterogeneity that can compromise the standardization of the MCTS. For this reason, we recommend exploiting cell sorting techniques to sort specific subpopulations from heterogeneous populations. The use of these subpopulations will ensure the standardization of the *in vitro* cellular model^{122,319}.

Second, at the light of the previously discussed 3D systems, an LMWG based hydrogel, which is a biomimetic synthetic scaffold, is a more fitting candidate that offers the ideal architecture for 3D culture as well as molecules and nanoparticle diffusion. In a system like the latter, the discrimination between NPs and colloidal natural entities becomes easier³²⁰. These gels should be well characterized and optimized so properties like stiffness and structural stability resemble that of the ECM hosting the cells inside the human body³²¹. Moreover, since the biophysical properties of the cellular microenvironment influence the cellular behavior, such as cell differentiation, morphology and proliferation, gel characterization should be done in parallel

with biological characterization of the encapsulated cells in order to relate the 3D system to the cellular model features. Then, the reproducible standardized MCTS grown inside these gels can serve as predictive models for quantifying NPs effects on cell functionalities. Several mathematical equations were conceived to better quantify these responses on the following hallmarks. The binding of the NPs on cell surface by means of ligand-receptor association, the occurrence of endocytosis meaning the uptake of NPs inside the MCTS cells and vice versa the expulsion of NPs by exocytosis and the interaction of NPs and the ECM will influence a specific movement of the NPs in the interstitial space of the MCTS. An understanding of these responses will give a clearer insight on NPs behavior in a human-mimicking microenvironment^{322,323}. In addition, the entry of NPs into solid tumors can serve as vectors for potential treatment of these cancers³²⁴.

Third, prior to studying the impact of an exogenous factor on a biological entity, the latter should be characterized beforehand. This means that before the NPs are put in contact with the 3D MCTS, the latter must undergo biological characterizations. These characterizations that define the initial state of the MCTS (t_0) (Figure I.4), will give us information about the structure of the MCTS (the three previously described layers), the state of differentiation of the cells, the state of viability and proliferation of the cells, etc.

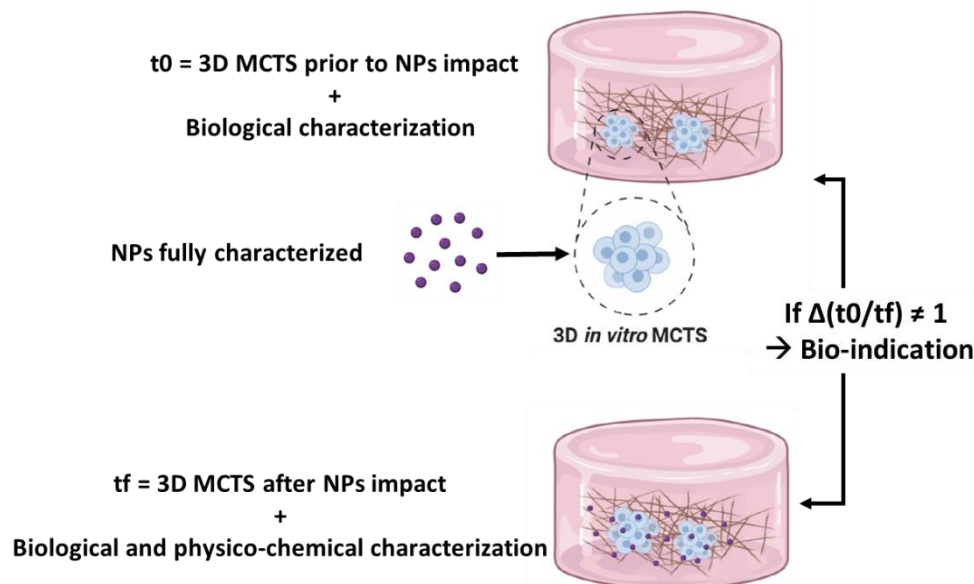


Figure I.4. Initial state t_0 vs final state t_f of the MCTS. In order to assess the effectiveness of the bio-indicator, a comparison between t_0 and t_f is inevitable for the understanding of the impact of NPs on the living *in vitro* 3D model.

Fourth, manufactured nanoparticles disseminated in the environment are emerging pollutants present in the air, water and soil and likely to contaminate and affect the quality of the environment, water resources and agricultural production. It is important to evaluate, in a thorough manner, the characteristics of these entities of interest: their multidimensional state significantly the size of the NPs, their morphological state, chemical composition, their concentration, their size distribution and state of aggregation (homo or hetero aggregation). This information should be acquired throughout the experiment for a controlled experiment and in order to correlate the given results with a given environment. Most of the size characterizations are done by transmission electron microscopy (TEM)¹²⁸ that provides an effective representation of the spheroid ultra-structure on a nano scale and dynamic light scattering (DLS) among zeta potential characterization³²⁵. Taking into account the NPs surrounding environment during the experiment should be a reflection of the environment in which given NPs were found and which motivated the study. For example, assessing the effect of NPs on gut environment needs to be preceded by characterization of these NPs in a medium having at least similar acidity and ionic strength, also their interaction with the components of culture media. FBS-supplemented (Fetal Bovine Serum) cell medium contains many factors that can influence NPs behavior, such as protein adsorption on NPs surface that can change their surface charge³²⁶⁻³²⁸, influence their aggregation and eventually hinder their harmful effect. Moreover, the influence of the time point of NPs exposure needs to be taken into account to define a representative 3D model for in vitro nano-toxicity assay³¹⁴.

Until this day, quantitative information is still needed regarding the concentration-dependent size distribution of the particles at any given time. We must insist that knowing the nanoparticle physico-chemical state before, during and after the experiment is the only true indicator of the cross-effect of these NPs and their given environment. Along with the analytical run, sample preparation is also a crucial step. Data is regularly published on the subject. However, hardly any of these publications have validated the approach and/or tested it in biological or environmental monitored system.

Associated with sample preparation, the preparation of the study medium, typically for hosting NPs and biological cells, or for studying the behavior of NPs in environments simulating the environment remains a totally open question to this day.

For this in vitro model to be considered as a bio-indicator, NPs distribution and time points studies as well as series of biological analysis must be performed on the in vitro cellular model subsequent to NPs contact, which constitutes the final state of the MCTS (t_f) (Figure I.4 below).

Which brings us to the fifth target, the time points of NPs exposure to the MCTS inside the hydrogel. The use of hydrogel as a cell culture scaffold leads to thinking about how to expose encapsulated cells to external factors. The fibrillar architecture and network permit the diffusion of molecules and NPs through the interfibrillar spaces, like molecules and NPs. Although, the diffusion kinetic of these entities from outside to inside the gel have to be determined in order to take into consideration the delay between their administration and their effective uptake by the cells. We must also ensure that the administered factors are homogeneously diffused in the whole volume of the hydrogel. Noteworthy that this concerns NPs as well as reagents for biological analysis. The 2D cell culture cannot give this kind of information since it lacks intercellular organization, so 3D cell culture is a suitable model to study the impact on NPs on multicellular formation and physiology. 3D system like ULA to study the spheroid development upon NPs exposure facilitates NPs uptake³¹⁴, but as previously mentioned, also diffusion kinetic through hydrogel is a parameter to be considered. Finally, in a context of NPs dissemination in the environment or human being exposed to NPs from everyday products or professional activity, the frequency of NPs uptake by 3D cultured cells must be determined according to the issue (e.g. chronic or acute exposure). This also brings another layer of complexity to be treated, for instance knowing how the hydrogel reacts to long term exposure to NPs or if there is some architecture disruption upon high dose on short term. In all cases, the interaction between NPs and the 3D-cells system must be fully explored by integrating the timescale that will be considered for the experiment, for the sake of results relevance.

Finally, just like for the initial state (t_0), a series of biological analysis must be performed at the final state (t_f) of the in vitro cellular model. For example, cell viability is one of the first factors investigated during toxicology assays to assess the impact of entities on the life cycle of the cellular model. For this matter, tetrazolium-based colorimetric like MTT, WST-1 and MTS are used to assess the cell metabolic activity consequently their viability^{230,329,330}. Cell membrane integrity can also be evaluated using lactate dehydrogenase (LDH) assay²³⁰.

Noteworthy, that using a hydrogel matrix might influence the diffusion and the dilution of reagents used in cell viability tests, so it has to be taken into account when deciding about the conditions of these assays³³¹. Since cell death can either occur by apoptosis, which is a programmed regulated cell death, or necrosis, which is an incidental cell death due to non-physiological factors such as infection or particle impact; discriminating between both types is inevitable. Scanning and flow cytometry are the perfect technique that allows single-cell study and is able to discriminate between both forms of cell death³³². The cell inflammatory response can also be induced by NPs and has to be examined using ELISA targeting inflammatory

biomarkers in the likes of IL-8, IL-6 and tumor necrosis factor²³⁰. Oxidative injury is also a significant biological incident that needs to be assessed by determining the levels of total antioxidant capacity (TAC) and total oxidative stress (TOS)³³³, using ELISA or spectrophotometric methods³³⁴.

We also recommend a genotoxicity study using a bioluminescent whole-cell bioreporter, like E-coli bioreporter, for quantitative evaluation of the DNA damage induced by the NPs and other mutagenicity like clastogenic and aneugenic effects and chromosomal structure abnormalities. Furthermore, assessing organelles dysfunction can also be predictive of NPs impact on cells physiological function by potentially inducing cell autophagy. For example, examining mitochondrial dysfunction by studying ATP production for respiratory control ratio.

An extra advantage for using cancer models is assessing tumor aggressiveness and progression following NPs impact. These observations can be done by studying the state of differentiation of the cells forming the MCTS and by doing cell invasion assays that are naturally correlated with metastatic features. Such studies can be reflective of a potential cancer development subsequent to NPs interaction with human organisms.

The production of repeatable MCTS, by the means of 3D culture of cancer lines inside hydrogels, and the characterization of NPs and control of their spatiotemporal behavior, consist of the ideal cartography of a bio-indicator for nanoparticle toxicity assays. The biological analysis of MCTS at t_f will inform us on the cellular behavior and state subsequent to their exposure to NPs.

Thus, the study of $\Delta(t_0/t_f)$ (Figure I.4) is informative of the difference of cellular properties before and after NPs impact. If $\Delta(t_0/t_f)$ truly demonstrates a significant difference, then this 3D in vitro cellular model can be considered as an ideal successful bio-indicator. This will allow the standardization of the 3D system in a global manner that might help in obtaining results that are more concordant.

However, some of the targeted information should be unified in an intra and inter-laboratories manner. What is the best cartography of this 3D system? What are the most relevant tests to be performed in order to highlight a significant impact?

I.3 Le support tridimensionnel

I.3.1 Un modèle adapté à la culture cellulaire

Afin qu'un support 3D soit envisagé pour être utilisé en tant que matrice convenable pour la culture cellulaire, des critères clés doivent être définis en termes de structure et de propriétés physico-chimiques.

I.3.1.1 La mécano-biologie

Contrairement à la culture 2D qui n'offre aucun environnement recouvrant les cellules, la culture 3D est souvent basée sur une distribution spatiale de cellules au sein d'un support matriciel. Ce phénomène engendre des forces physiques sur la cellule.³³⁵ En effet, les cellules adaptent leur comportement et leur métabolisme global à leur microenvironnement et en retour agissent dessus.³³⁶ Elles sont capables de détecter les propriétés mécaniques de ce microenvironnement (défini par mécano-détection) et répondre d'une manière correspondante (défini par mécano-transduction).^{336,337}

De ce fait, les caractéristiques mécaniques de l'environnement de la cellule (pression osmotique, forces de cisaillement, viscoélasticité, etc.) induisent des altérations de sa morphologie, ses capacités invasives et son contenu génomique et phénotypique.^{135,136} Il est donc primordial de maîtriser les propriétés mécaniques du matériau qui traduisent son adaptabilité à une culture de lignée cellulaire précise. La viscoélasticité fait partie de ces propriétés mécaniques informant sur la rigidité du matériau, qui joue un rôle primaire dans l'évolution ou l'inhibition d'une culture cellulaire en termes de prolifération, viabilité et organisation.^{338,339}

Suite à une déformation, un matériau montre des réponses à la fois visqueuses et élastiques relatives à sa constitution.³³⁸ Les matériaux qui présentent une forte viscosité s'adaptent à la déformation appliquée avec une contrainte proportionnelle à l'évolution temporelle de l'application de cette déformation en dissipant de l'énergie. Parallèlement, les matériaux à forte élasticité peuvent revenir à leur état originaire suite à une déformation en conservant et restituant de l'énergie. Les hydrogels par exemple ont un comportement viscoélastique, c'est-à-dire une superposition des propriétés des fluides visqueux et des solides élastiques. Ceci est également le cas des tissus *in vivo*, qui présentent des degrés de rigidité qui sont quantifiés par la mesure de leur module élastique.^{337,340} (Figure I.5)

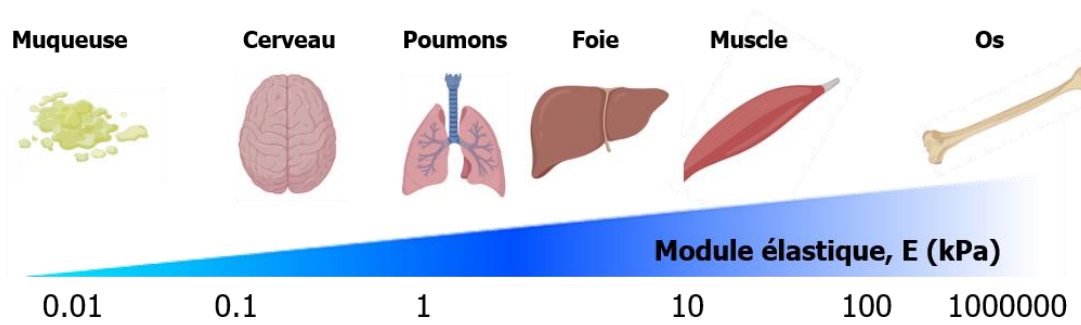


Figure I.5. Echelle de rigidité de certains tissus définie par leur module d'élasticité.

Les signaux induits par le changement de cette élasticité engendrent des réponses au niveau des signaux biochimiques (comme les phosphorylations, les changements conformationnels des protéines, etc.)^{338,341,342}, induisant au niveau cellulaire une réorganisation dynamique du cytosquelette, la relocalisation subcellulaire de protéines régulatrices et de l'expression de certains gènes. De ce fait, il est nécessaire d'adapter la viscoélasticité d'un gel à celle du tissu d'origine de la lignée cellulaire.

I.3.1.2 L'architecture fibrillaire

Une culture cellulaire 3D vise à établir un modèle qui mime le microenvironnement *in vivo*, notamment la matrice extracellulaire. La MEC est une structure complexe naturelle et hautement dynamique qui héberge les cellules et qui est présente dans tous les tissus. Elle joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité tissulaire.^{101,225,343} Elle est composée d'une variété d'éléments fibrillaires (collagène, fibronectine, élastine, etc.) et d'autres éléments non fibrillaires (protéoglycanes, hyaluronane, glycoprotéines, etc.)³⁴³ Ces éléments macromoléculaires sont interconnectés pour former un réseau complexe qui permet une adhésion aux cellules via des récepteurs transmembranaires comme les intégrines.^{344,345}

La MEC est soumise régulièrement à des remodelages contrôlés par les cellules. C'est un phénomène qui est médié par des enzymes spécifiques sécrétées par les cellules (par exemple les métalloprotéinases) qui induisent des changements quantitatifs et qualitatifs de la MEC.³⁴³

Le complexe d'interactions cellule-MEC joue des rôles cruciaux de régulation des processus cellulaires clés comme la morphologie, la migration, la communication intercellulaire et la signalisation intracellulaire.^{346,347} De ce fait, durant la progression de certaines maladies comme la tumorigenèse, l'interaction des cellules avec leur microenvironnement fibrillaire affecte largement le processus de prolifération et de croissance.^{101,225} Par conséquent, un matériau qui vise à mimer la MEC doit respecter cette structure fibrillaire qui permet de recréer le même type d'interaction cellule-cellule et cellule-ECM, régulant ainsi les comportements

phénotypiques de ces cellules. Il est donc primordial de choisir des supports dont la structure permet de former un maillage mimant celui de la MEC.

I.3.1.3 La diffusion des molécules

Les cellules cultivées en 2D ou en 3D nécessitent un apport constant en nutriments et facteurs de croissance durant le temps de culture. Un maintien de culture est assuré par un ajout en routine de milieu de culture cellulaire qui comprend tous les éléments nécessaires au développement cellulaire (sérum de veau fœtal, acides aminés, etc.).³⁴⁸ Dans le cas de la culture 2D, le milieu de culture est en contact direct avec la totalité des cellules dans la flasque ou le puits. En culture 3D, notamment en hydrogel, les cellules sont introduites au sein du support et l'entretien cellulaire est effectué par un ajout de milieu au-dessus du gel. Le milieu de culture n'est donc pas en contact direct avec les cellules.¹ Les protéines et molécules composant le milieu de culture doivent donc migrer à travers le gel depuis le milieu surnageant ce dernier afin d'arriver aux cellules. En outre, la réalisation d'analyses expérimentales en aval de la culture cellulaire (XTT, MTT, live/dead, etc.) étant indispensables pour étudier le comportement cellulaire à des points d'incubation précis, un échange d'entités et de molécules entre les deux compartiments doit nécessairement s'effectuer.^{349,350} Dans les cas des hydrogels par exemple, la structure interne est formée par une architecture fibrillaire dont la porosité doit permettre d'un côté la mise en place des cellules, et d'un autre côté le transport passif des molécules entre le gel et le surnageant.³⁵¹

I.3.2 De la molécule gélifiante à l'hydrogel : un autoassemblage supramoléculaire

Dans le domaine de la matière molle, les hydrogels forment une classe de matériaux qui est importante. Un hydrogel par définition, est l'organisation de molécules dans un solvant avec rétention d'une partie du solvant lors de l'agencement du maillage des fibres composantes du gel.³⁵² Un des exemples d'hydrogel supramoléculaire qui existent sont ceux qui sont formés par un processus d'autoassemblage de molécules gélifiantes de faible poids moléculaires (*low molecular weight gelators, LMWG*) gouverné par des interactions faibles de types liaisons hydrogènes, Van der Waals, etc.^{81,215,353} Dans la revue exposée au début de ce chapitre, nous avons examiné la structure des LMWG et leurs différents dérivés. Nous exposons dans cette

partie en particulier le phénomène d'assemblage supramoléculaire qui permet la fabrication de ce type d'hydrogel ainsi qu'une vue plus détaillée sur les GNB.

I.3.2.1 L'autoassemblage supramoléculaire

Les hydrogels supramoléculaires sont conçus à partir de petites molécules précurseurs de faible poids moléculaires, inférieur à 3000 g.mol^{-1} .³⁵³ Ces molécules possèdent une caractéristique unique et intéressante qui est la capacité à s'autoassembler.^{77,354,355} Différents types d'autoassemblage existent : micelle sphérique, bicouche plane, micelle cylindrique, etc.^{352,356} L'autoassemblage des molécules est un phénomène qui permet la transition sol-gel.³⁵⁷ C'est le passage d'un état désordonné des molécules gélifiantes en solution (sol) vers un état autoorganisé d'éléments de plus grande dimension qui forment un réseau capable de retenir l'écoulement macroscopique du solvant (gel).^{352,357,358} Plusieurs stimuli physiques (température, lumière, champs électriques et magnétiques, agents chimiques, etc.) existent en tant qu'éléments déclencheurs de la transition sol-gel.^{359,360} La technique la plus étudiée est la formation d'hydrogel sensible à la température³⁶⁰, qui se résume à chauffer la solution à une température au-delà de la limite de solubilité, puis de refroidir la solution ainsi formée pour la sursaturer.

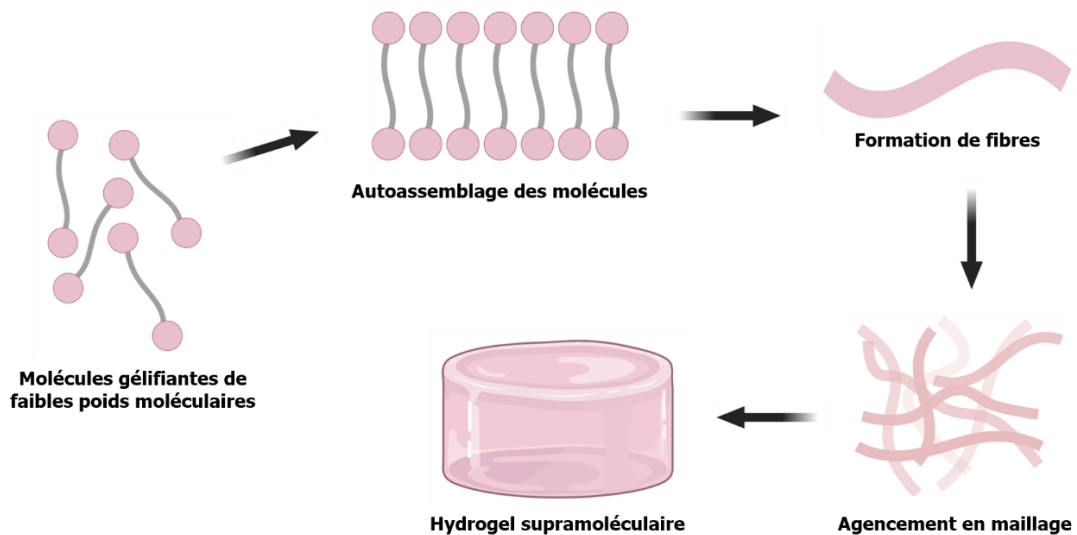


Figure I.6. Schématisation du processus d'assemblage supramoléculaire qui souligne la transition sol-gel, qui forme à partir de molécules gélifiantes de faibles poids moléculaires un hydrogel supramoléculaire.

Les molécules gélifiantes de faibles poids moléculaires sont formées en majeure partie de structures amphiphiles^{215,361}, qui s'autoassemblent en solution dans des solvants de polarité

différente. L'autoassemblage est donc le résultat d'un équilibre entre des interactions, des molécules gélifiantes entre elles mais également avec le solvant.^{354,361} L'aspect amphiphile des molécules gélifiantes est donc un facteur primordial dans l'autoassemblage. Alors, les molécules gélifiantes qui forment les hydrogels supramoléculaires, sont assemblées par des liaisons faibles : liaisons hydrogènes, π - π stacking, interactions de Van der Waals, interactions électrostatiques, etc.^{362,363} A l'issue de l'élément déclencheur de la transition sol-gel comme la température³⁶⁰, les molécules gélifiantes qui se trouvent solubilisées dans leur solvant, s'autoassemblent pour former des fibres durant le refroidissement du système.³⁵⁹ Les fibres ensuite s'agencent en maillage complexe qui retient une partie du solvant en passant en phase gel avec une diminution de la température du système. Par conséquent, l'hydrogel supramoléculaire ayant une architecture fibrillaire est formé (Figure I.6).^{354,355,364} Les types de liaisons faibles que nous retrouvons dans cet hydrogel leur confère son avantage majeur par rapport aux autres support 3D qui est la réversibilité du processus de gélification qui permet de maîtriser la transition gel-sol et de moduler les propriétés physico-chimiques du gel pour atteindre un modèle avec les propriétés d'intérêt.^{352,359}

I.3.2.2 Les glyco-nucléo-bolaamphiphile

Les LMWG comportent plusieurs sous-familles de molécules gélifiantes. Dans ce projet de thèse, nous nous intéressons en particulier à la sous-famille des GNB, synthétisés et caractérisés par l'unité ARNA partenaire de ce projet.^{77,192,204,215,353} Les GNB sont des molécules gélifiantes qui détiennent une structure "bola" connue pour des propriétés supramoléculaires.³⁶¹ En effet, la structure amphiphile de ces molécules induit un autoassemblage supramoléculaire.^{354,361}

Les GNB sont formés en structure bola de deux têtes polaires, séparées par une chaîne apolaire, correspondant chacune à un dérivé de thymidine comportant un groupement triazole de part et d'autre et portant chacun un groupement glucose en position 3 de la base et un groupement variable selon les GNB en position 5' du ribose :^{192,365} amide (BA) (Figure 7A) ou urée (BU) (Figure I.7B).

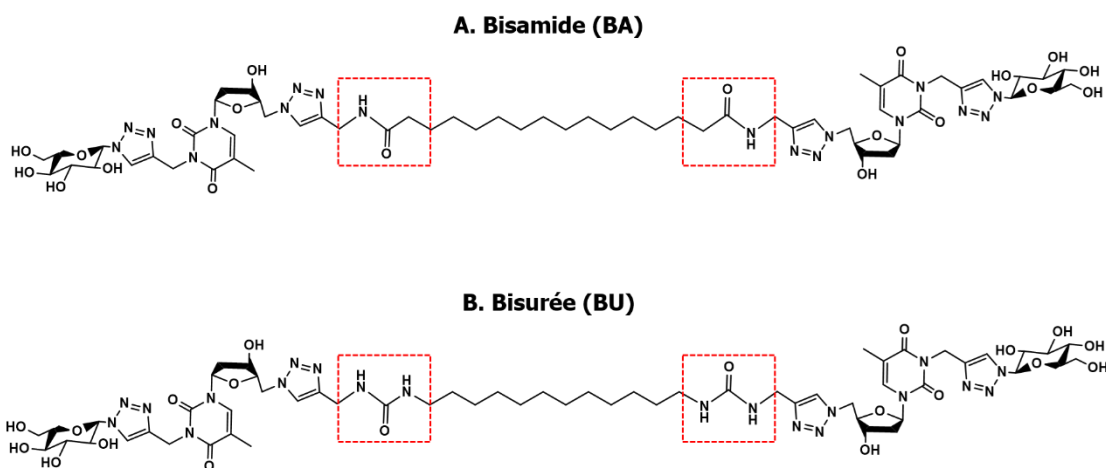


Figure I.7. Structure chimique des GNB : (A) Bisamide et (B) Bisurée

I.3.2.3 Les GNB : un support idéal pour la culture 3D

Comme décrit au début de cette partie, un modèle adapté à la culture cellulaire doit répondre à des propriétés clés. Les GNB forment des hydrogels via assemblage supramoléculaire, qui leur offre un contrôle sur leurs propriétés physico-chimiques ainsi que sur la structure du gel.^{192,365} En effet, les propriétés physico-chimiques telles que la viscoélasticité sont facilement modulables par le choix de la nature du groupement variable et de la concentration en molécules gélifiantes mises en solution, et ce afin de s'adapter à la lignée cancéreuse en question. De plus, l'assemblage supramoléculaire offre un maillage de fibres représentatif du complexe architectural de la MEC, avec un espace interfibrillaire qui permet la diffusion des molécules et le support des cellules. L'avantage majeur de l'assemblage supramoléculaire est la répétabilité et reproductibilité du réseau 3D qui se forment dans le gel. La répétabilité est assurée grâce à la structure chimique des petites molécules qui est bien définie et le contrôle du procédé qui est facile (choix de la température, temps de gélification etc.) et qui assure par conséquent un contrôle sur les types d'interactions mises en jeu. Etant donné que la reproductibilité du système 3D est la cible majeure de ce projet de thèse, les GNB offrent a priori un hydrogel qui répond aux exigences de la culture cellulaire 3D et constitue un candidat idéal pour cette étude.

I.4 Les cellules souches cancéreuses dans le Glioblastome

I.4.1 Glioblastome : un cancer hétérogène

Le GBM est la tumeur gliale la plus agressive et récurrente que nous retrouvons au niveau du système nerveux central. Il s'agit d'une tumeur solide qui appartient à la famille des tumeurs de haut grade (un astrocytome de Grade IV).^{89,112,366} La thérapie conventionnelle du GBM suit le protocole de Stupp qui consiste en une combinaison entre ablation par chirurgie, chimiothérapie à base de temozolomide et irradiation.^{366,367} Malgré l'innovation de diverses autres approches thérapeutiques (immunothérapie contre les facteurs de croissance endothélial vasculaire, les inhibiteurs des récepteurs de la tyrosine kinase, etc.)³⁶⁷⁻³⁶⁹, la médiane de survie des patients post diagnostic est relativement faible, avoisinant les 18 mois. Ceci est causé par trois facteurs majeurs : l'absence de possibilité de diagnostic précoce corrélé avec un pronostic souvent erroné, l'hétérogénéité et la complexité histologique du GBM, et la présence de cellules initiatrices de tumeurs au sein de la niche tumorale.^{89,366,370}

En effet, le GBM est situé dans le système nerveux central dans un microenvironnement complexe qui devient de plus en plus inflammatoire en fonction de l'évolution de la tumeur.³⁷¹ Sur le plan histologique, il consiste en une niche tumorale dans laquelle co-existent différentes populations de cellules différenciées et indifférenciées, présentant des variabilités en termes de morphologie, capacités d'auto-renouvellement et capacités prolifératives et réparties sur différentes couches au niveau de la tumeur (Figure I.8).^{90,370,372,373}

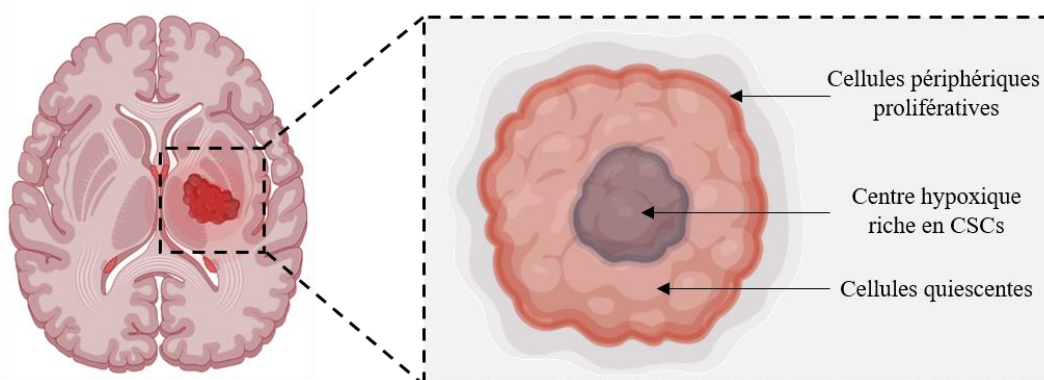


Figure I.8. Schématisation de la tumeur de Glioblastome qui comprend différentes couches cellulaires de phénotypes variables.

D'un point de vue diagnostique, l'hétérogénéité cellulaire du GBM rend son identification difficile et variable selon les cliniciens. D'un point de vue pronostique, la présence de cellules initiatrices de tumeurs, résistantes aux thérapies, est à la base de re-progressions tumorales non anticipées.^{89,374,375} La localisation ainsi que l'hétérogénéité du Glioblastome *in vivo* font de ce dernier un modèle difficile à étudier et limitent la conception d'approches thérapeutiques innovantes. Pour surmonter ces problèmes, il y a le recours à des modèles 3D qui offrent une plateforme relativement facile à mettre en place permettant de suivre la progression tumorale du début à la fin et de modéliser des approches diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques.³⁷⁶ Dans ce cadre, des études antérieures ont montré que l'utilisation de cellules issues de patients ou des lignées cellulaires de GBM n'est pas suffisante pour recréer l'environnement et la progression tumorale, et présentent des limitations de reproductibilités en termes de taille de sphéroïdes, de nombre de sphéroïdes et d'organisation spatiale.^{377,378} Plusieurs théories proposent que l'hétérogénéité observée provient du support 3D utilisé, aboutissant à plusieurs essais dans le but d'améliorer le rendement en sphéroïdes uniformes, par l'utilisation de systèmes 3D moins complexes (culture sur plaques non adhérentes par exemple)³⁷⁹⁻³⁸² ou de systèmes avec une architecture complexe mais manquant encore l'optimisation nécessaires pour réaliser des analyses post culture (système micro-fluidique par exemple)³⁷⁹⁻³⁸¹. Ces approches font perdre le plus grand avantage de la culture 3D qui est la matrice fibrillaire et/ou rendent les analyses post cultures très difficiles à réaliser. Si ces systèmes permettent la formation de sphéroïdes uniformes, il n'est pas toujours possible de mener des approches thérapeutiques ou des études de toxicité. Nous avons formulé dans ce projet l'hypothèse que l'hétérogénéité en taille et évolution au cours du temps pourrait être causée par l'hétérogénéité basale de la population cellulaire implantée. La culture d'une lignée cellulaire de GBM dans laquelle trois différents types de cellules (différenciées, quiescentes et souches) co-existent dans les puits de culture, sans contrôle sur la proportion de chacune, peut mener à une progression différente d'un puits à un autre et d'une expérience à une autre. De ce fait, nous spéculons dans cette étude sur de la nécessité de choisir des sous-populations composées d'un modèle cellulaire plus homogène, notamment les CSCs qui présentent des critères clés pour l'initiation et la progression tumorale.

I.4.2 Les cellules souches cancéreuses

Au sein des tumeurs solides comme le GBM, existent diverses sous-populations cellulaires variables sur les plans génomiques et phénotypiques, notamment une sous-population de cellules souches cancéreuses.

I.4.2.1 Définition et rôles des CSCs

Les CSCs sont une population qui se trouvent en proportion très faible au sein de la tumeur, composant 1 à 5% de la population cellulaire totale.^{98,100,112} Les CSCs jouent des rôles primordiaux dans l'initiation tumorale, l'agressivité tumorale, l'échappement thérapeutique et les récurrences des patients.^{97,105,383–385} Elles sont en majorité situées au cœur de la tumeur solide dans une zone fortement hypoxique qui leur permet d'acquiescer un état de quiescence.^{90,373} Les CSCs possèdent des phénomènes clés comme l'activation des pompes d'efflux pour éliminer le médicament après exposition à une thérapie¹⁰⁶, la réparation de l'endommagement d'ADN causé par les molécules thérapeutiques¹⁰⁷, une protection accrue contre les espèces réactives de l'oxygène¹⁰⁸ et la capacité de plasticité qui leur fait transiter facilement entre un état souche et un état quiescent.³⁸⁶ Ces phénomènes permettent aux CSCs échapper aux traitements anti-cancéreux^{97,383}, aboutissant dans certains cas à une ré-initiation et progression tumorale après éradication des cellules tumorales sensibles (comme les cellules différenciées trouvées en périphérie de la tumeur) par chimio/radiothérapies. Les CSCs sont également très invasives, favorisant la dissémination tumorale et la métastase en changeant de profil phénotypique et en colonisant d'autres organes.³⁸⁷

I.4.2.2 Propriétés des CSCs

Les CSCs peuvent d'une part donner des cellules filles spécialisées qui alimentent la tumeur par des cellules différenciées et qui permettent de soutenir la progression tumorale, et d'autre part donner des copies de CSCs leur permettant de s'auto-maintenir au sein de la niche tumorale.^{97,100,105} Cette division asymétrique⁹⁹ basée sur deux phénomènes, la multipotence^{388,389} et l'auto-renouvellement^{390–392}, est à l'origine des caractéristiques des CSCs les plus intéressantes dans notre contexte (Figure I.9). De plus, elles présentent une plasticité^{93,386} qui leur permet d'altérer leurs phénotypes en fonction des stimuli du micro-environnement ainsi que des stimuli induits par les molécules thérapeutiques durant les traitements³⁹³ ou les nanoparticules durant les études de toxicité.³⁹³ Cette plasticité est à la base

d'une variation permanente en contenu de CSCs dans la tumeur, ce qui par conséquent se traduit par un changement du profil de la progression tumorale : gain d'agressivité ou réduction en masse tumorale.^{93,386,389}

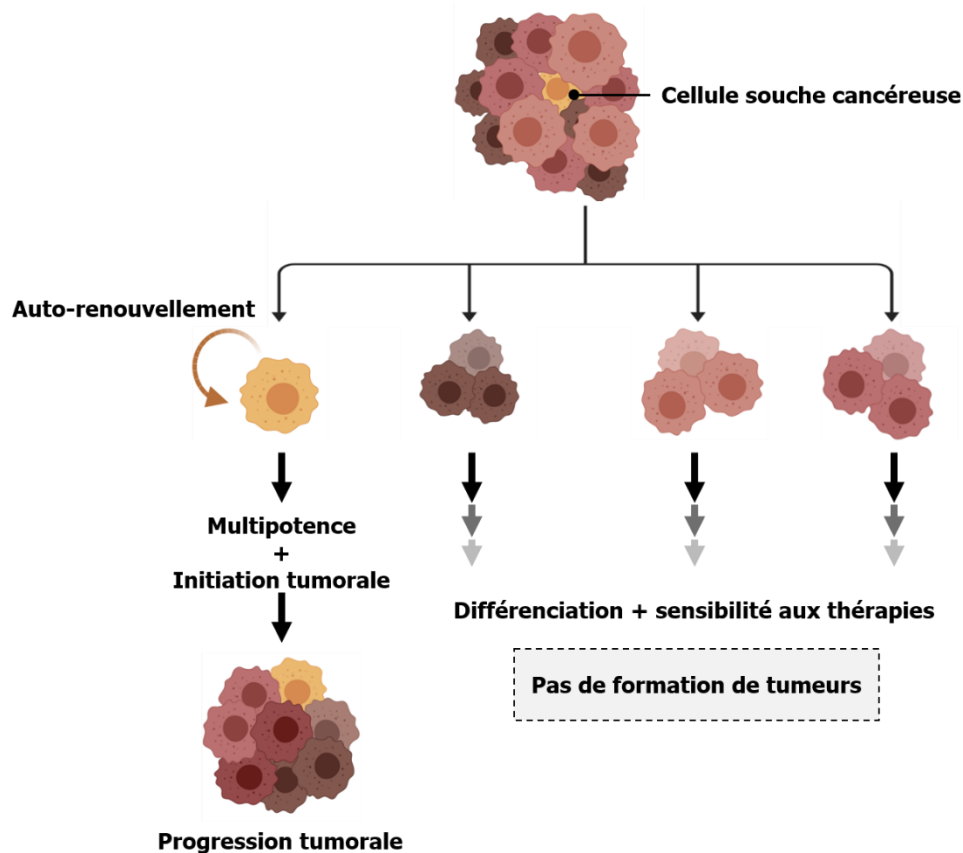


Figure I.9. Schématisation des sous-populations cellulaires trouvées dans une tumeur solide soulignant les deux caractéristiques clés des CSCs : l'auto-renouvellement et la multipotence.

Au vu de leurs caractéristiques particulières, il semble intéressant de remplacer les populations hétérogènes utilisées dans les cultures 3D par une sous-population de CSCs, dans l'optique d'avancer vers un système 3D reproductible. Dans la mesure où les CSCs introduites dans un support 3D sont capables de se comporter similairement à l'*in vivo*, elles seront potentiellement capables de générer des sphéroïdes uniformes en taille et d'une manière reproductible.

Néanmoins, afin de concevoir des thérapies innovantes qui peuvent mieux cibler les CSCs et/ou de se servir de leurs caractéristiques particulières pour concevoir des plateformes d'analyses 3D de nano-toxicité, il est primordial de pouvoir isoler et caractériser les CSCs de leur micro-environnement hétérogène. Il existe diverses méthodes de tri et caractérisation cellulaire ayant différents avantages et inconvénients, que nous listons par la suite.

I.5 Le tri cellulaire des CSCs

Afin d'isoler et caractériser une population de CSCs, une variété de méthodes qui permettent de trier des cellules à partir de populations hétérogènes existe aujourd'hui.

I.5.1 Les méthodes de tri basées sur un marquage cellulaire

Une grande catégorie des méthodes de tri cellulaire est basée sur le concept de marquage cellulaire (membranaire, cytoplasmique ou intranucléaire). Comme exemples de ces techniques, nous retrouvons :

- *La cytométrie en flux et "Fluorescent-activated cell sorting" (FACS)* : Des populations biologiques hétérogènes sont marquées avec des anticorps couplés à des chromophores fluorescents ciblant des antigènes membranaires ou intracellulaires d'intérêt. Les populations sont ensuite mises en suspension et acheminées en file indienne sur un ou plusieurs points d'interrogations par un laser. Ensuite, on procède à une collecte des signaux lumineux émis par les chromophores qui sont corrélés à des entités biologiques tels que la morphologie (cellularité et granularité), l'expression génique et protéique, la physiologie cellulaire, etc. En déterminant les propriétés d'intérêt recherchées, les cellules peuvent être séparées et collectées en sous-populations homogènes.³⁹⁴⁻³⁹⁶
- *"Magnetic-activated cell sorting" (MACS)* : La méthode développée par Miltenyi Biotec est basée sur une interaction entre des nanoparticules super paramagnétiques et une colonne placée entre deux aimants. Les NPs d'ordre de 100 nm sont utilisées pour marquer les cellules cibles au sein de la population hétérogène qui sera acheminée ensuite dans la colonne de tri. Les complexes cellules-NPs seront retenus dans la colonne grâce aux forces magnétiques et le reste sera exclus.³⁹⁷
- *"Raman activated cell sorting" (RACS)* : Cette technique de tri cellulaire est basée sur la relation entre les cellules individuelles et leurs propriétés chimiques et profils phénotypiques, à partir du concept de "single cell Raman spectra" via un biomarqueur. Cette technique demeure limitée par les signaux Raman naturellement

faibles. Si la population d'intérêt est en faible proportion (comme les CSCs) le tri devient plus difficile.³⁹⁸

Il n'existe pas un marqueur unique et suffisant capable d'identifier les CSCs. De ce fait, il est nécessaire d'utiliser un ensemble de marqueurs qui permettent de se baser sur l'expression de divers gènes normalement exprimés proportionnellement à l'état souche des cellules. Les marqueurs qui existent pour les CSCs sont spécifiques selon le cancer étudié et existent à différents niveaux cellulaires⁶ :

- Marqueurs de surface membranaire (cluster of différenciation CD) comme le CD133³⁹⁹, CD44⁴⁰⁰ et CD90⁴⁰¹
- Marqueurs de surface membranaires (non CD) : LGR5⁴⁰², EpCAM⁴⁰³
- Marqueurs intracellulaires Sox2^{404,405}, Oct4^{406,407}, Nanog⁴⁰⁸, BMI-1⁴⁰⁹, ALDH⁴¹⁰

L'utilisation d'un ensemble de marqueurs spécifiques de différentes cibles engendre des changements phénotypiques et par conséquent altère l'intégrité cellulaire au niveau phénotypique, génomique et morphologique.⁴¹¹⁻⁴¹⁵ Donc, la sous-population de CSCs peut fortement changer de comportement et faire perdre aux cellules leur caractère souche par induction de différenciation. De ce fait, nous avons eu recours dans ce projet de thèse à une méthode moins invasive et qui ne nécessite pas d'immunomarquage.

I.5.2 Fractionnement par couplage flux-force de sédimentation

Cette technique est conçue et optimisée par l'équipe CAPTuR de l'Université de Limoges.

I.5.2.1 Principe de la SdFFF

La SdFFF est une méthode de tri cellulaire douce et non-invasive, qui ne nécessite pas de pré-marquage cellulaire, se basant principalement sur les propriétés biophysiques des cellules telles que la taille, la densité, la forme et la déformabilité des cellules, ce qui permet de s'affranchir des immunomarquages.^{109,110,416}

L'instrumentation de la SdFFF comprend quatre parties principales :⁴¹⁷⁻⁴¹⁹

- Un système de rotation qui permet de créer et de contrôler un champ multi-gravitationnelle,
- Un canal (formé par une bande de Mylar) placé entre deux plaques de polystyrènes,
- Un bol de centrifugation qui maintient la géométrie du canal et empêche les fuites,

- Des joints tournants qui permettent le passage d'une phase mobile à travers le canal,
- Un spectrophotomètre UV-visible qui permet de détecter les cellules à leur sortie de la machine.

La SdFFF fait intervenir une force multi-gravitationnelle (force \ggg 1g) par la mise en rotation du bol de centrifugation comprenant le canal, produisant ainsi des champs d'intensités élevées, variables et contrôlables selon la vitesse de rotation appliquée. Simultanément, l'écoulement de la phase mobile selon un débit modulable à l'intérieur du canal, permet l'établissement d'un profil de vitesse parabolique qui est nulle au niveau des parois et maximale au centre du canal.^{109,419,420}

L'avantage primaire de la SdFFF demeure sa capacité à limiter d'une manière importante les interactions cellules-surfaces solides par l'usage d'une part d'un canal dépourvu de phase stationnaire et la définition d'autre part des conditions d'élutions (champ et débit) favorables à la mise en œuvre d'un mode inertiel taille- et densité-dépendante. (Cf. Annexe 1)

I.5.2.2 Tri cellulaire par SdFFF

La séparation d'une population hétérogène de cellules introduites dans le canal via le flux de la phase mobile est basée sur le couplage flux et force créé par les différentes forces décrites. Sous l'effet du champ, les cellules se positionnent à des hauteurs différentes de la largeur du canal, et avancent dans celui-ci à la vitesse moyenne de la ligne de flux parabolique dans laquelle elles se trouvent. En fonction des caractéristiques biophysiques des cellules, ces dernières seront placées dans des lignes de vitesse différentes, et seront par la suite éluées à des vitesses différentes. Ces différentes vitesses qui sont à l'origine de la séparation des cellules sont induites par l'application du champ externe. Par conséquent, il y aura une différence de temps de rétention.^{109,110,416}

Dans une population de forte polydispersité en taille et densité comme dans le cas des populations hétérogènes de Glioblastome,¹¹² les cellules les plus grandes et les moins denses seront éluées en premier, tandis que les plus petites et les plus denses sont éluées en dernier (Figure I.10).

Ceci permet la collecte de trois types de fraction :

- La fraction totale correspondant à la collection de l'ensemble des cellules éluées dans le pic spécifique hors volume mort,
- La première fraction qui inclut les premières cellules éluées (grandes et moins denses) consistant d'une population enrichie en cellules différenciées,

- La deuxième fraction qui inclut les dernières cellules éluées (petites et denses) consistant d'une population enrichie en CSCs.

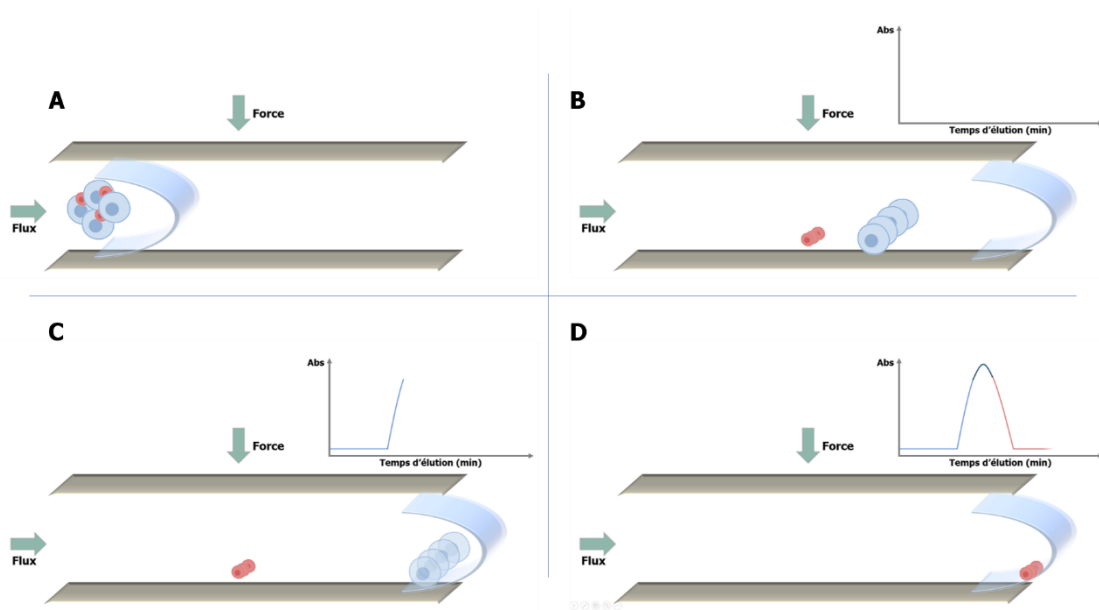


Figure I.10. Schématisation du canal de la SdFFF montrant la séparation des sous-populations cellulaires qui dépend des tailles et densités cellulaires.

Contrairement à d'autres méthodes de tri cellulaire, la SdFFF permet de préserver l'intégrité et les caractéristiques originelles des populations éluées. Elle permet notamment de maintenir une forte viabilité cellulaire des CSCs à l'issue du tri, mais également l'intégrité fonctionnelle, telle que les propriétés phénotypiques, génotypiques et protéomiques, dont l'expression des récepteurs et des antigènes de surface, et les capacités d'adhésion. Par conséquent, les états de maturation et de différenciation des cellules sont conservés.

Suite au tri par SdFFF, un ensemble de caractérisations biologiques est requis afin de vérifier qu'il y a bien une différence des propriétés cellulaires, en particulier en termes de différenciation entre les fractions collectées. Par exemple, des caractérisations phénotypiques sont effectuées, telles que la mesure de la taille des cellules, étant une des propriétés biophysiques sur lesquelles se base le tri¹¹⁰, et l'évaluation des taux d'expression de marqueurs souches comme Sox2, Nanog et Oct4^{405,407,408}. D'autres caractérisations fonctionnelles visent l'évaluation de la capacité des sous-populations à former des clones par test de clonogénicité⁴²¹ qui est une propriété spécifique aux CSCs liée à leur capacité d'auto-renouvellement.

Pour conclure, un système 3D reproductible *in vitro* reflétant le microenvironnement *in vivo* est un modèle qui comprend deux composants majeurs : un support 3D de structure complexe qui mime l'architecture de la MEC physiologique, et un modèle cellulaire qui se développe et s'organise au sein du support 3D de la même manière que le développement *in vivo*. Dans ce projet de thèse, la stratégie s'est constituée autour de l'utilisation d'un hydrogel supramoléculaire caractérisé dans l'objectif de s'adapter à la lignée cellulaire cancéreuse de Glioblastome, qui sera triée par SdFFF pour obtenir une sous-population enrichie en CSCs. Dans les chapitres qui suivent nous exposons en détails la conception de l'hydrogel à partir de deux molécules gélifiantes de faibles poids moléculaires, ainsi que les caractérisations physico-chimiques qui ont permis d'aboutir à des gels dont les propriétés sont proches du micro-environnement cérébral et les premières approches de culture 3D sans tri de la lignée cancéreuse hétérogène U87-MG. Ensuite, nous présentons le tri cellulaire de la lignée U87-MG par SdFFF qui nous a fourni trois populations de caractéristiques phénotypiques et génomiques différentes et leurs caractérisations biologiques. Ces populations seront par la suite toutes les trois étudiées en culture 3D dans l'hydrogel retenu afin d'examiner leurs comportements et de déterminer le modèle cellulaire qui permet la conception d'un système reproductible avec des sphéroïdes tumoraux uniformes en taille. Une fois le système maîtrisé et bien défini, nous nous sommes intéressés à l'impact de NPs sur le développement et le comportement des sphéroïdes dans l'hydrogel après caractérisation physico-chimique des NPs. Cette plateforme n'est pas restreinte à ce type d'études, cependant celle qui est présentée dans ce manuscrit montre son potentiel pour un panel d'applications tirant partie des interactions des cellules avec leur micro-environnement (la culture de cellules issue de patients comme approche de médecine personnalisée, la conception et/ou optimisation d'approches thérapeutiques, etc.).

Chapitre II : Le support tridimensionnel

II.1 Introduction

Dans le chapitre précédent, la liste de types de culture 3D présentée montre que diverses approches permettent la formation d'agrégats ou de sphéroïdes à partir de cellules cancéreuses ou normales dans un milieu tridimensionnel.⁸⁰ Certains systèmes sont dépourvus de matrices comme les plaques non adhérentes dans lesquelles les cellules restent en suspension et par conséquent forment des agrégats⁴²² ; ou des plaques avec un revêtement de milieu de différenciation qui est souvent utilisé avec les cellules souches normales pour former des organoïdes,⁴²³ etc. Ces systèmes sont faciles à utiliser, permettent d'avoir une approche plus avancée que la culture 2D et permettent d'obtenir des modèles uniformes en tailles mais ne reproduisent pas la complexité de la MEC. Ainsi elles sont dépourvues de l'avantage majeur que la culture 3D offre pour avoir un comportement cellulaire ainsi que des réponses cellulaires similaires à ceux de l'*in vivo* surtout en terme d'interactions cellule-cellule et cellule-ECM⁸⁰, ce qui affecte le phénotype des cellules et leur développement au cours du temps. D'autres approches qui se basent sur l'utilisation de matrices solides comme les membranes poreuses asymétriques^{424,425} ont permis de recréer un encombrement 3D entourant les cellules et permettant d'établir les interactions cellule-MEC qui manquaient dans les supports précédents. Ces matrices sont souvent utilisées en médecine régénératrice et présentent des propriétés viscoélastiques (~1000 kPa) difficile à moduler. Ces propriétés ne sont pas adaptées à toutes les lignées cellulaires, puisque comme présenté dans la Figure I.5 du chapitre 1, chaque tissu présente une rigidité particulière. Par conséquent, les cellules issues d'un certain micro-environnement de rigidité spécifique devraient être cultivées dans un support dont les propriétés viscoélastiques sont conformes à la rigidité d'origine. Les matières molles comme les hydrogels répondent à ces caractéristiques.^{68,338,426} Les hydrogels présentent une architecture interne qui mime celle de la MEC ainsi que des propriétés physico-chimiques dont la viscoélasticité et la porosité sont modulables selon la concentration du gel.^{338,427} Les hydrogels peuvent être à base de polymères naturels (gélatine⁷¹, chitosane⁷³, collagène,⁴²⁸ etc.) qui malgré leur grand potentiel à permettre une culture 3D représentative de l'environnement physiologique, ils présentent une variabilité en termes de structures et interactions polymériques résultant en l'obtention de systèmes 3D dont l'architecture n'est pas répétable. Par conséquent le comportement cellulaire 3D sera aussi non répétable. De ce fait, l'utilisation de polymères synthétiques comme le poly(acide lactique)⁴²⁴ et le poly(acide glycolique)⁴²⁹ permettent de surmonter ce manque de répétabilité en offrant un réseau stable et surtout répétable entre les hydrogels. Cependant, ces hydrogels à base de polymères synthétiques souffrent d'une mauvaise cytocompatibilité qui

peut engendrer l'activation de certaines voies de signalisations intracellulaires non anticipées comme les voies pro-inflammatoires affectant la fonction et le phénotype de la cellule.⁸⁰ Par conséquent, les hydrogels synthétiques à base de molécules gélifiantes à faibles poids moléculaires (*low molecular weight gelators (LMWG)*) ont émergé,^{365,430} pour garantir une reproductibilité architecturale, une modularité des propriétés physico-chimiques (viscoélasticité et porosité) ainsi qu'une conservation de l'intégrité intracellulaire aux plans fonctionnels, génomiques et phénotypiques. Parmi ces LMWG, nous trouvons les carbohydrates⁴³¹, les peptides⁴³² et les dérivés d'acides nucléiques⁴³³.

Les LMWG étudiés dans cette thèse sont des molécules bio-inspirées dérivés d'acides nucléiques synthétisées au sein du laboratoire ARNA à l'Université de Bordeaux. Deux grands types de molécules gélifiantes amphiphiles ont été étudiées : le glyco-nucléoside fluoré (GNF)^{434,435} et les glyco-nucléo-bolaamphiphiles (GNB)^{81,365}.

La structure du GNF consiste en une thymidine au sein d'un noyau hydrophile entourée par un triazole glycosylée en 3' et un triazole avec fonction amide en 5', liées à une chaîne perfluorée constituant la partie hydrophobe.

La structure du GNB consiste de deux thymidines liées par une chaîne aliphatique, avec un groupement glucose en 3' et un groupement variable en 5' : soit une fonction urée (BU) ou amide (BA). Cette structure typique des GNB avec deux têtes polaires reliées par une chaîne apolaire, sont décrits comme bola-amphiphile.

Les hydrogels issus de GNF et GNB sont formés par assemblage supramoléculaire fondé par des liaisons faibles (de types hydrogènes, van der Waals, etc.) dans un solvant à l'issue d'un stimulus thermique.^{81,359,435} Ceci permet d'obtenir des fibres par un phénomène d'autoassemblage de ces molécules, qui ensuite s'agencent en maillage fibrillaire pour former l'hydrogel supramoléculaire. Ce type d'hydrogel possède des propriétés physico-chimiques modulables en fonction de la concentration masse/volume des molécules de GNB et GNF utilisées. Le processus de formation de l'hydrogel commence par un ajout de milieu de culture (DMEM) de volume précis sur une masse de molécules précise pour obtenir la concentration d'intérêt (par exemple 1 mL de milieu de culture sur 10 mg de molécules pour une concentration de 1% w/v qui équivaut 1mg/100µL). Le mélange est ensuite déposé dans un bain ultrasonique pour 15 secondes qui permet de suspendre les molécules agrégées et enfin placé dans un bain marie à 80°C pour 10 min qui permet de chauffer la solution à une température au-delà de la limite de solubilisation des molécules dans le milieu de culture ce qui assure une solubilisation absolue des molécules. L'autoassemblage supramoléculaire des molécules gélifiantes est déclenché lors de la sortie du bain avec la diminution de la température du milieu. Cette

transition sol-gel est de l'ordre d'une heure pour GNF et de quelques minutes pour GNB (3 min pour BU et 7 min pour BA) (Figure II.1). A la sortie du bain-marie, les hydrogels sont laissés au repos à température ambiante pendant 20 min pour GNF et 1 min pour les GNB, ce qui permet de descendre suffisamment en température tout en restant en phase sol pour l'incorporation de la suspension cellulaire déjà préparée sans causer un choc thermique aux cellules.

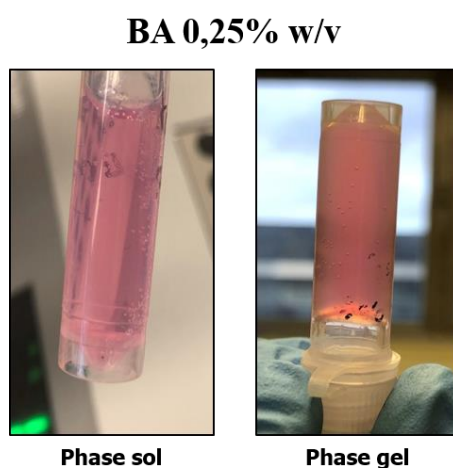


Figure II.1. Un exemple de la transition sol-gel de durée de 7 min pour BA 0,25% w/v alimentée par l'autoassemblage supramoléculaire à la sortie du bain marie de 80°C.

Les plus grands avantages de l'utilisation des molécules de GNF et de GNB sont la facilité de formation de l'hydrogel et la modularité des propriétés viscoélastiques vis-à-vis la concentration du gel.

Afin de choisir les conditions de culture 3D et standardiser un protocole expérimental, au début de cette thèse, nous avons commencé à faire des gammes de concentrations de gel et des gammes de densité cellulaire à implémenter. Les premières approches ont consisté à tester différentes concentrations d'hydrogels, de 1%, 2% et 3% w/v pour GNF, BU et BA. (Cf. Annexe 2) Et des densités d'ensemencement cellulaire de large gamme de 500, 1000, 5000, 10000 et 20000 cellules par puit de U87-MG. Nous avons observé du point de vue macroscopique, que les hydrogels formés pour GNF, BU et BA avaient un aspect trop dense et compact. Cette observation macroscopique s'est confirmée ultérieurement microscopiquement avec une difficulté d'observation des cellules et une absence de prolifération cellulaire au cours d'un mois de culture. De ce fait, nous avons décidé d'essayer des concentrations d'hydrogels plus faibles simultanément avec des caractérisations physico-chimiques pour mesurer la rigidité des hydrogels à tester, afin de viser des concentrations dont la rigidité correspond à celle du tissu

cérébral (0,1 à 1 kPa) vu que la lignée cellulaire utilisé est U87-MG dont le lieu d'origine est le cerveau. Malheureusement, la limite minimale de concentration du GNF est de 1% w/v car le gel de GNF formé à des concentrations < 1% ne sont pas suffisamment stables (dégradation, détachement du fond du puit, etc.) au cours du temps. Etant donné que le GNF possède une rigidité de 6,6 kPa à 1% w/v, il permet de conserver une viabilité cellulaire durant le temps de culture mais sans prolifération et organisation spatiale. Comme nous ne pouvons pas descendre en concentration pour ce gel, le GNF a été éliminé de l'étude.

De ce fait nous nous sommes focalisés sur des essais avec BU et BA. Les concentrations retenues qui permettent de former des hydrogels stables c'est-à-dire qui maintiennent le même aspect morphologique macroscopique au cours du temps sont BU 0,1 % w/v de rigidité 0,9 kPa et BU 0,2% w/v de rigidité 3 kPa ; BA 0,25% w/v de rigidité de 0,4 kPa et BA 0,5% kPa de rigidité de 1,1 kPa. (Une rigidité dans la gamme cérébrale 0,1-1kPa, et une rigidité en dehors cette gamme pour comparer l'impact de la viscoélasticité.)

En ce qui concerne la densité cellulaire qui sera implémenté dans la matrice 3D, d'une part il ne faut pas partir d'un nombre de cellules trop faible qui pourrait inhiber la croissance cellulaire dû à l'absence de communications cellule-cellule ou sécrétion de facteurs de croissance limitée et par conséquent stimulation insuffisante des signalisations cellulaire de survie, prolifération et organisation.⁴³⁶ Et d'autre part un très grand nombre de cellules peut engendrer une inhibition par contact rapide de la prolifération, une croissance excessive des amas de cellules entraînant le développement de conditions hypoxiques, un flux limité de nutriments ou une consommation rapide de nutriments avec une accumulation importante de déchets.⁴³⁶ Ce dernier point était observé en implémentant 10 000 et 20 000 cellules par puit, vu que le rouge phénol dans le milieu de culture servant d'entretien changeait de couleur d'une manière très rapide (au bout de 24h) indiquant ainsi une nécessité d'entretien trop fréquente qui peut altérer l'intégrité du gel. En plus, à ces densités d'ensemencement nous avons observé beaucoup de débris cellulaires et d'agrégats cellulaires au bout d'une journée qui peuvent affecter le développement tumoral. De ce fait le choix a été de prendre 1000 cellules dans 100 μ L de gel par puit, un intermédiaire de la gamme 500, 1000 et 5000 cellules, et qui permet d'aller du plus faible nombre de cellules possible distribué dans le volume du gel tout en simulant la progression physiologique *in vivo*. Enfin, la culture 3D est étudiée pour 35 jours, car nous avons observé qu'au-delà de ce temps, aucune modification en termes de taille et de morphologie est observée, donc elle consiste au seuil de temps de culture.

Ce chapitre consiste d'un article scientifique intitulé "Nucleoside derived low molecular weight gelators as a synthetic micro-environment for 3D cell culture" soumis en 2021 dans

ACS Biomaterials Science and Engineering (en cours de révision : manuscrit numéro ab-2021-01136j).

Dans cet article nous présentons en première partie une étude détaillée des propriétés des hydrogels supramoléculaires sélectionnés (BU 0,2% w/v, BU 0,1% w/v, BA 0,5% w/v et BA 0,25% w/v) en termes de morphologie interne de la matrice 3D pour vérifier l'aspect fibrillaire et les propriétés viscoélastiques des gels pour obtenir la rigidité simulant le tissu cérébral. En outre, nous étudions les cinétiques de gélification afin de définir le temps de l'implémentation des cellules, l'internalisation de molécules de différents poids moléculaires du surnageant vers le gel pour assurer que les molécules trouvées dans le milieu de culture notamment les protéines du sérum de veau fœtal arrivent aux cellules, et la diffusion des molécules du gel vers le surnageant pour vérifier la possibilité de faire des analyses post culture donc post contact avec les cellules et relargage vers le surnageant (comme le test d'activité métabolique).

En deuxième partie, nous montrons les premières approches de culture cellulaire surtout avec BU 0,1% w/v et BA 0,25% w/v, qui possèdent des rigidités convenables à la gamme du tissu cérébral, servant de preuve de concept de l'utilisation de ces hydrogels comme matrice de culture 3D de la lignée U87-MG afin de produire des sphéroïdes tumoraux multicellulaire.

II.2 Nucleoside derived low molecular weight gelators as a synthetic micro-environment for 3D cell culture

Omar El Hamoui,^{‡1,2} Tarek Saydé,^{‡1,3} Isabelle Svahn,⁴ Antoine Gudin,¹ Etienne Gontier,⁴ Philippe Le Coustumer,^{2,4} Julien Verget,¹ Philippe Barthélémy,¹ Karen Gaudin,¹ Serge Battu,³ Gaëtane Lespes,^{*,2} Bruno Alies^{*,1}.

¹. Université de Bordeaux, INSERM U1212, UMR CNRS 5320, F-33076 Bordeaux, France.

². Université de Pau et des Pays de l'Adour (E2S/UPPA) CNRS, Institut des Sciences Analytiques et de Physico-Chimie pour l'Environnement et les Matériaux (IPREM), UMR 5254, 2 Avenue Pierre Angot, 64053 Pau Cedex, France

³. EA3842- CAPTuR, GEIST, Faculté de Médecine, Université de Limoges, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges Cedex, France

⁴. Université de Bordeaux, CNRS, INSERM, Bordeaux Imaging Center, BIC, UMS 3420, US 4, F-33000 Bordeaux, France

[‡] These authors contributed equally to the paper as first authors

Abstract: For the last few decades, many efforts have been made in developing cell culture methods in order to overcome the biological limitations of the conventional two-dimensional culture. This paradigm shift is driven by a large amount of new hydrogel-based systems for three-dimensional culture, among other systems, since they are known to mimic some living tissues properties. One class of hydrogel precursors has brought interest in the field of biomaterials, low molecular weight gelators (LMWG). In comparison to polymer gels, LMWG gels are formed by weak interactions upon external trigger between the molecular subunits, giving them the ability to reverse the gelation, thus practical interest for many applications. This study presents the use of nucleoside derivative LMWG as 3D cell culture scaffold. Physicochemical characterization was done in order to reach the optimal features to fulfill requirements of cell culture micro-environment, in terms of mechanical properties, architecture, molecular diffusion and porosity, and experimental practicality. The retained conditions were tested by culturing glioblastoma cells for over a month. The cells viability, proliferation and spatial organization showed during the experiments demonstrate the proof-of-concept of nucleoside derived LMWG as a soft 3D cell culture scaffold. These systems offer many advantages, as they consume very few matters within the optimal range of viscoelasticity for cell culture, and the thermo-reversibility of these hydrogels permits their use with few instruments.

II.2.1 Introduction

Biomaterials are exploited in the fields of tissue engineering and regenerative medicine in order to enhance the regeneration or replacement of tissue function; and in oncology for three-dimensional (3D) culture to mimic physiological extracellular matrix (ECM) in order to create a micro-environment close to *in vivo*. A panel of 3D systems exist today⁴³⁷, one of them is based on low molecular weight gelators (LMWG). LMWG are a class of small molecules (< 3000 Da) capable of self-assembling in order to form a supramolecular gel^{438–440}. Hydrogels in general are used in a wide range of applications, such as tissue engineering^{136,141,220,441,442}, therapeutic assays^{219,443,444}, pollution removal^{445,446,193} and cell culture^{184,188,192,195,437,447}. Contrary to polymer gels where polymers are made of monomers linked by covalent bond, LMWG-based hydrogels consist of building blocks self-assembled by weaker interactions (hydrogen bonds, van Der Waals interactions, π -stacking, electrostatic interactions, etc.). This type of labile supramolecular structure gives them an important and interesting feature: reversibility of the gelation upon external trigger (temperature, pH, ionic strength, etc.). With other characteristics of interest (precise molecular weight, ease to dissociate and replace by ECM, etc.), these advantages explain why the use of LMWG is growing in the fields of life sciences, especially in cell culture applications where they act as matrixes.

Conventional cell cultures also known as two-dimensional (2D) cell cultures are basic methods for *in vitro* studies. In this type of culture, cells tend to grow in a monolayer manner, non-representative of their real physiological state. Thus, this raises issues and inconsistencies in the results they provide. Cells are flattened, meaning that their morphology has drastically changed, as well as cell polarity and cell-cell interactions, that impact considerably their phenotypical properties and survival traits^{448–450}. Plus, cells also interact with their microenvironment, equally in a biochemical and biophysical manner, by sensing the mechanical forces surrounding them, which influences their growth, development and differentiation^{156,451}. 2D cell cultures deviate from the physical characteristics of *in vivo* environments of the cells. This major difference participates to the loss of some of their features. Because of all these limitations, a paradigm shift is processing for the past few years, by going from 2D to 3D cell cultures. 3D cell cultures in general consist of imitating the physiological microenvironment of the cells, hence providing a spatial organization in which cells can grow and behave in a spatial organization very similar to that *in vivo*. One of these different methods is based on soft scaffolds, such as hydrogels, acting as matrixes for cells.

LMWG-based hydrogels offer a promising way to develop 3D microenvironment for cell cultures. Many LMWG designs are inspired from natural moieties, such as peptides^{197,200,201,452–455}, nucleic acids^{202,204,210,215,216,456–458} and carbohydrates^{193,195,196}, making most of them biocompatible materials. Moreover, they usually display fibrillar architecture, mimicking ECM, known to facilitate cell development in a more native way. Here, we propose the use of two LMWG that could be good candidates for 3D cell culture, glycosyl-nucleo-bola-amphiphile (GNB) derivatives. Their structures consist of two glyco-modified thymidines linked by a hydrophobic segment, triazole moieties and either urea or amide group (Figure II.2).

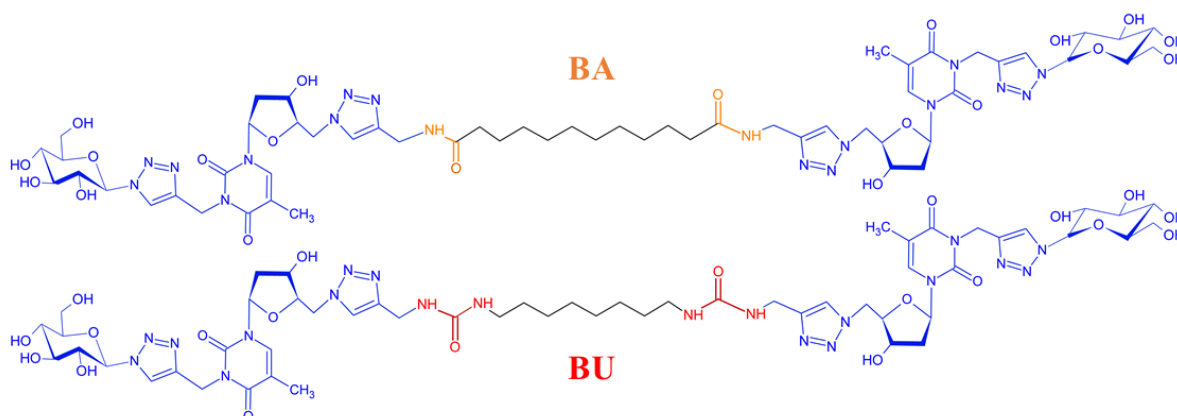


Figure II.2. Chemical structure of the two molecules studied named Glyco-Nucleo-Bola-Amphiphiles (GNB). Color emphasizes the polar end (blue), linear aliphatic linker (black) and the only subtle difference between these molecules: amide (orange) or urea (red). Abbreviations are BA and BU for amide (top) and urea (bottom) GNB, respectively.

These LMWG were previously studied and characterized, especially their kinetics, mechanical and thermal properties^{216,459}. They are thermo-reversible and form hydrogels upon supercooling after solubilization at a relatively high temperature (80°C). They form a gel in buffers such as phosphate saline and display mechanical properties of interest for biological applications⁴⁶⁰, with stiffness in the 1-100 kPa range at a concentration of 1% w/v. Although, in order to be used as cell culture scaffold, some requirements must be reached and verified.

First, among the ECM-like topology, the hydrogel must give the desired viscoelasticity. It is now well established that the elasticity and the viscous properties of living tissues are important features impacting the fate of the cells growing within them³²¹. To optimize the mechanical properties of the 3D system for cell culturing, the stiffness of the hydrogel has to be set according to the cell lineage and type. For instance, the brain tissue is considered as one of the softest tissues in the human organism, with a stiffness ranging from 0.1 to 1 kPa^{461–463}, whereas

10 to 100 kPa will fit for chondrocytes for example⁴⁶⁴. Therefore, reaching a controlled viscoelasticity in this interval for the cell scaffold is a crucial task.

Second, the hydrogel must have practical properties rendering it easy and fast to use during an experiment with minimal stressful impacts on the cells. For instance, by using thermo-reversible hydrogelators, the supercooling that drives the gelation has to be sufficiently slow in order to enable the cells to be implemented without inducing a thermal shock, but it also must be fast enough to respect the time scale of the culture experiment. In other words, the kinetics of gelation must be determined and permit a relatively easy use of these materials.

In addition, the matrix needs to be sufficiently permeable in order to allow gas exchange, nutrients from culture medium and delivery of external factors, such as reagents for biological analysis, to the subcultured cells. Although, unlike 2D cell cultures where cells are directly in contact with the delivered entities, the latter have to migrate from a free medium to the cells through a different viscoelastic environment that can impact their mobility. For this reason, the timescale of passive mass transport has to be quantified in order to verify the possibility of delivery without disturbing the system, and also to adapt their concentration.

This study shows the potential application of GNB as biomaterials for 3D cell cultures, by characterizing all these features, using oscillatory shear rheology, electron microscopy and spectroscopy techniques. Once the properties meeting the requirements for optimal 3D cell cultures matrix are acquired, cell culture is performed as a proof of concept for GNB-based 3D scaffold. The culture is examined during 35 days, simultaneously with cell viability assays in order to evaluate cell behavior, especially in terms of cytocompatibility of the gel and potential proliferation into tumor spheroids

II.2.2 Materials and methods

II.2.2.1 Sample preparation

Gels were formed in polypropylene microtube by weighting the right amount of GNB powders and solubilizing them in the appropriate volume of PBS (Phosphate-buffered saline, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM K₂PO₄, pH = 7.4 at 25 °C) (Fisher Scientific, France) or cell medium in order to get the desired concentration. Cell medium is made of Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) (Fisher scientific, France) supplemented with 10% Fetal bovine serum (FBS) (Seqens, France), 50 units mL⁻¹ penicillin, 50 units mL⁻¹ streptomycin, 1% nonessential amino acids, 1.5 g L⁻¹ sodium bicarbonate. GNB used were

synthesized according to previous procedures²¹⁶. The mixtures were heated at 80°C for 10 min to ensure complete solubilization, then they were maintained at room temperature to trigger gelation.

IV.2.2.2 Rheology experiments

Rheological measurements were carried out on a Malvern KinexusPro + rheometer with steel cone-plate geometry (1°, diameter: 20 mm). The lower plate is equipped with a Peltier temperature control system. A solvent trap was used to ensure homogeneous temperature and to prevent water evaporation. Sample placement on the rheometer was done by solubilizing the gels and by depositing 60 µL of the mixture on the lower plate. Once the geometry was placed on the resulting cured gel, the sample chamber was re-heated at 80 °C for 2 min, then cooled back to 20°C, hence ensuring a homogeneous gelation all over the surface of the plates.

Frequency sweeps were performed at 37 °C within the linear viscoelastic regime (LVER) at a strain of 0.1%. Rheological moduli were taken at an angular frequency of 1 Hz (6.283 rad s⁻¹). Stress relaxation experiments were done at 37 °C with a controlled strain of 15%. The constant strain value is reached in the first 100 ms of the experiment and the shear modulus G is measured over time, converted then in terms of stress value σ .

II.2.2.3 Cryo-scanning electron microscopy (cryo-SEM)

Cryo-SEM microscopy experiments were conducted on a ZEISS GEMINI 300. The samples were cryo-fixed by high pressure freezing with a LEICA EM-HPM100. Cryo-SEM micrographs were obtained after sublimation (30 min for BU and 20 min for BA) and 30 s of sample platinum metallization. Observations of cells within the hydrogels were done on fixed samples after 1 month of culture.

II.2.2.4 Gelation kinetics

Gelation kinetics were determined by turbidimetry. 300 µL of gels were solubilized at 80 °C and poured into quartz UV-vis small volume cuvettes (1 mL). The cuvettes were heated with a Peltier device at 80 °C until obtaining a sol phase, then the resulting samples were placed in an Agilent Technology Cary 8454 UV-Vis spectrophotometer at room temperature for interval measurements at 700 nm every 10 s.

II.2.2.5 Molecule diffusion

Passive mass transport of molecules between gels and supernatant experiments were performed by pouring solubilized gels into quartz cuvette and adding a supernatant after gelation, then follow the migration by spectroscopy techniques. All the molecules were purchased from Sigma Aldrich.

Diffusions from the gel to the supernatant were assessed by entrapping 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (0.41 kDa), cytochrome C (CytC) (12 kDa) and hemoglobin (Hb) (64 kDa) in gels in separated experiments. In 3 mL quartz cuvettes, 400 μL of gels + probed molecules mixtures in PBS were poured (probed molecule/gel volumes in μL as follow: 40/360 for MTT 5 mg mL^{-1} , 25/375 for CytC 8 mg mL^{-1} and 8/392 for Hb 50 mg mL^{-1}). The probed molecules were added to the solubilized gels after cooling for 1 minute in order to prevent thermal denaturation (although thermal denaturation cannot be completely excluded). After 5 minutes of resting, 1600 μL of PBS were added on top of the gels as a supernatant. The migration was followed by UV-vis spectroscopy measurement with the beam aiming at the supernatant, using a Perkin-Elmer UV-vis spectrometer coupled with a Peltier device at 37 °C by interval scanning every 10 min for the first 3 h of the experiment, then every 30 min overnight. The band intensity of interest for each molecule (380 nm, 408 nm and 406 nm for MTT, CytC and Hb, respectively) over the time was plotted by normalizing all the values by the expected intensity if the probed molecule diffused in the whole volume (2000 μL) (Molar attenuation coefficient: 7250, 106 000 and 354 000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ for MTT, CytC and Hb, respectively). These values were measured directly prior to the migration monitoring.

Diffusion from the supernatant to the gel was assessed by pouring 150 μL of gels into small volume (< 1 mL) quartz cuvettes and adding 150 μL supernatant containing the probed molecules on top of the gels. The migrations were followed by fluorescence spectroscopy, with the light beam aiming at the gels. Fluorescent antibody goat anti-rabbit IgG (R633) (~150 kDa), in PBS at 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, diffusion into the gel was followed with a fluorimeter (FP-8300 Jasco) by acquiring its emission spectrum ($\lambda_{ex} = 630 \text{ nm}$, $\lambda_{emi} = 643 \text{ nm}$ slit: 5/5 nm) daily and conserving the cuvette at 37°C between acquisitions. Riboflavin (RF) (0.38 kDa), in PBS at 2 μM , diffusion into the gel was probed by interval emission spectrum scanning every 20 minutes ($\lambda_{ex} = 450 \text{ nm}$, $\lambda_{emi} = 530 \text{ nm}$ slit: 3/3 nm) at 37°C in a spectrofluorometer FS5 (Edinburgh Instruments) with a SC-25 temperature-controlled holder and a Peltier device (Quantum Northwest). The emission band intensity of interest for each molecule (643 nm and 530 nm for R633 and riboflavin, respectively) over time was plotted by normalizing all the values by the

expected intensity if the probed molecule diffused in the whole volume (300 μ L). This intensity was measured prior to the migration monitoring.

II.2.2.6 2D cell culture

The human glioblastoma cell line U87-MG was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and grown in previously described cell medium (DMEM + FBS). Cells were cultured at 37 °C in a 5% CO₂ incubator with 20% O₂. After culture time, cells are dissociated using Versene solution (Thermofisher scientific, France) and centrifuged at 300 g for 5 min. Cells are then resuspended with DMEM and counted using trypan blue (Sigma) exclusion and Malassez cell counting chamber.

II.2.2.7 3D cell culture

The gel is formed by adding an adequate volume of cell culture medium (DMEM+FBS) on a specific mass of measured gelator molecules powder in order to get the concentration desired. The mixture is then sonicated for 15 s and placed in a water bath at 80°C for 10 min. Then, a cell suspension of 1000 cells per 100 μ L, counted with trypan blue (sigma), is prepared. The gels (BA or BU) is taken out of the water bath and left at room temperature for 1min to lower its temperature. While the gel is still in its sol phase, it is mixed with the cellular suspension. The suspension is gently homogenized within the final mixture by pipetting and distributed in a 96 wells plate (100 μ L per well). After a few minutes' gelation process is over, and 200 μ L of cell culture medium is added to each well and the plate is incubated for 35 days. and cell medium is changed every 48 hours.

II.2.2.8 Live/Dead assay

Cell survival of encapsulated cells was determined by a fluorescent viability/cytotoxicity assay (Thermofisher scientific, France). Live cells fluoresce green due to the uptake and fluorescence of calcein-AM in response to intracellular esterase activity; dead cells fluoresce red as a result of the entry of ethidium homodimer-1 through damaged cell membranes and subsequent binding to nucleic acids. Cells were then imaged using LEICA DMi8 microscope and cells sizes were assessed by ImageJ.

II.2.3 Results and discussion

II.2.3.1 Mechanical characterization

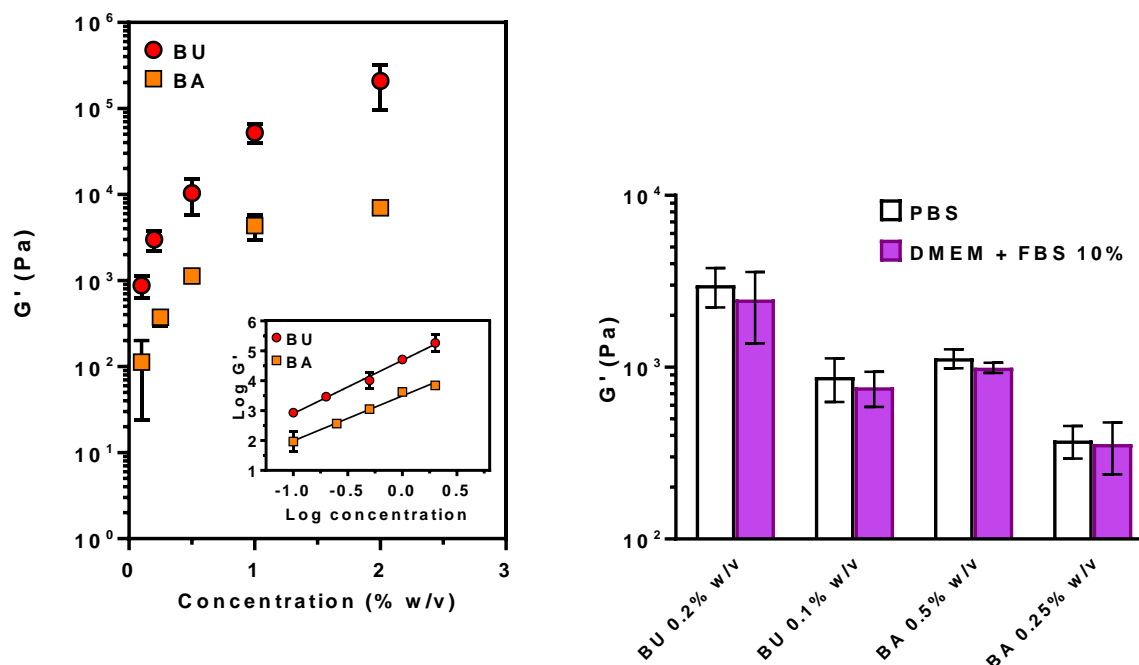


Figure II.3. Stiffness characterization of GNB. Left: Concentration dependency of the GNB stiffness in PBS buffer (inset: power law of the G' -concentration relationship); Right: Stiffness of the GNB at different concentrations in PBS and in cell culture medium. All experiments were executed at 37° C.

In order to serve as cell culture scaffolds, hydrogel-based matrixes must share similar biophysical properties as the ECM. The appropriate stiffness depends on the cell type that is cultured; soft materials are more suitable for brain cell cultures and stiff materials are more appropriate for bone cell cultures^{156,321}. Frequency sweeps in oscillatory shear rheology permit the determination of the storage modulus G' and the loss modulus G'' , expressing respectively the elastic and the viscous responses of the material to shear stress. Gels usually exhibit a G' higher than the G'' , meaning that they display a solid-like behavior. Figure II.3 left shows that the GNB hydrogels have tunable stiffness, represented by the G' , by varying their concentration. From these results, concentration conditions for each gel can be determined in order to reach the stiffness that suits 3D cell culture. From these requirements, retained gel concentrations to achieve an appropriate G' for a wide range of cell cultures are BU 0.1% w/v ($0.9 \text{ kPa} \pm 0.2$), BU 0.2% w/v ($3 \text{ kPa} \pm 0.7$), BA 0.25% w/v ($0.4 \text{ kPa} \pm 0.08$) and BA 0.5% w/v ($1.1 \text{ kPa} \pm 0.1$). Indeed,

numerous tissues (brain, lung, liver, etc.) are found in this range of mechanical modulus³²¹. Plus, the stiffness of each gel in different biological media does not change at a fixed concentration, meaning that the latter is the only factor that is crucial for the mechanical properties of the gels (Figure II.3 right).

Another mechanical key feature is the stress decay under strain application. Indeed, cells exert mechanical forces on their environment in order to adhere, migrate, self-organize, adapt their shape etc.¹⁵⁶ The strain applied by the cells goes from 2% in 2D cell culture up to 30% in 3D cell culture^{465,466}. This strain generates a stress that the matrix will store and dissipate depending on its elastic and viscoelastic properties, in a certain timescale. Many living tissues exhibit a stress relaxation owing to their viscoelastic features, and because cells respond to mechanical forces in the range of seconds to minutes, a biomimetic scaffold has to share not only the elastic properties of living tissues but also their viscoelastic characteristics with time-dependent mechanical responses⁴⁶⁷⁻⁴⁶⁹. Recent works have shown that stress relaxation half time ($\tau_{\frac{1}{2}}$) regulate the cell development and fast $\tau_{1/2}$ of seconds of cell culture hydrogel matrixes promotes spreading and proliferation⁴⁷⁰⁻⁴⁷³. Here, the GNB exhibit a fast stress decay with $\tau_{\frac{1}{2}}$ around 20 seconds, fitting the timescale of cellular activities induced by mechanical responses of their environment (Figure II.4). In addition, most of the living tissues present loss moduli G'' higher than 10% of their G' values⁴⁷⁴⁻⁴⁷⁶. Here, the GNB display a G'' with a value around 10% of the value of their G' for BA 0.25% w/v and BU 0.1% w/v respectively (Figure II.S1). Therefore, these GNB substrates mimic well the viscoelastic features of living tissues, with fast stress decays and viscous dissipation.

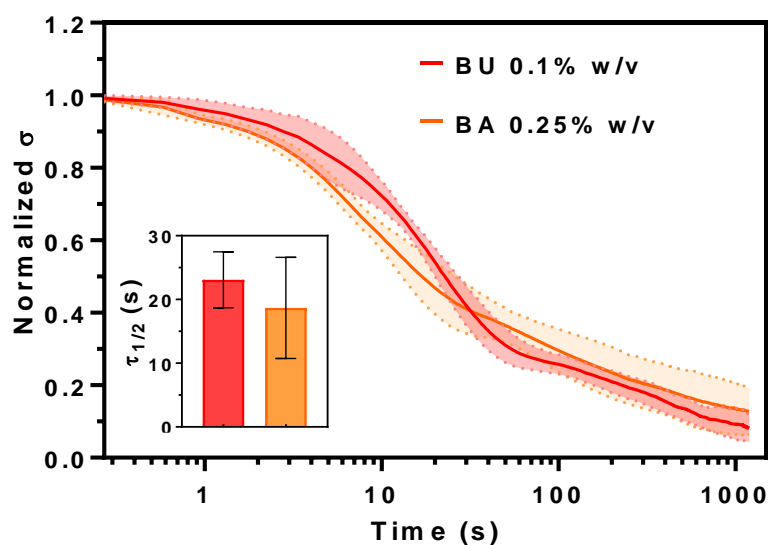


Figure II.4. Stress relaxation of GNB. Inset: half time characteristics of the stress relaxation of GNB in PBS. Means and standard deviations were determined through three independent experiment replications. Stress relaxation experiments were done with a controlled strain of 15% at 37°C.

II.2.3.2 Structural properties

Another important feature for cell culture scaffolds is their microstructure. In order to culture cells in an *in vivo*-like condition, the scaffold must mimic the ECM architecture. The porous architecture of the hydrogel is a primary feature for molecules transfer between the cells and the external medium. At the chosen concentrations for the GNB hydrogels, cryo-scanning electron microscopy experiments show the fibrillar architecture of these hydrogels, meaning that they structurally mimic the ECM (Figure II.5). BU shows a relatively highly branched network, whereas BA shows fiber joints and entanglements instead. Previous cryo-SEM experiments where hydrogels were prepared in PBS at 1% w/v showed the same architecture as in here, meaning that the cell culture medium and the chosen concentration for the purpose do not impact the network organization⁴⁵⁹. These observations are consistent with the fractal dimension D_f determined from the power law dependency of the G' on the concentration for each gel, using the Marques and Jones model^{477,478}(Figure II.3 left inset). The self-assembly units being fibers, the dimensionality is expected to be one-dimensional, hence $D_f \approx 1$. The storage modulus depends on the concentration following the power law $G' \sim kTC^\beta$ with $\beta = \frac{3}{(3-D_f)}$, so $D_f \approx 1$ implies $\beta \approx 1.5$. This is verified with β equals to 1.5 and 1.8 for BA and

BU respectively, their D_f being 1 and 1.3 respectively, matching the more branched network for BU whereas BA exhibits mostly jointed and entangled fibers as shown in Figure II.5. We draw attention here to the fact that even if cryo-scanning electron microscopy sample preparation tends to preserve the sample in its native structure by high-pressure freezing, the sample will undergo physical fracturing and sublimation before observations, meaning that alterations, such as fibers collapsing for example, cannot be entirely avoidable.

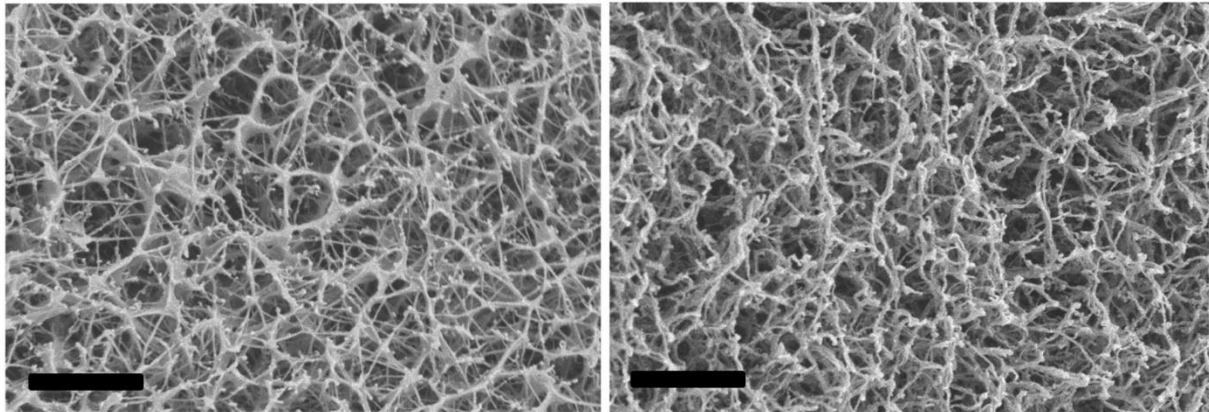


Figure II.5. Cryo-scanning electron micrographs of LMWG prepared in cell culture medium (DMEM +10% FBS). Left: BU 0.2% w/v; right: BA 0.5% w/v. Scale bar: 1 μm

II.2.3.3 Gelation kinetics

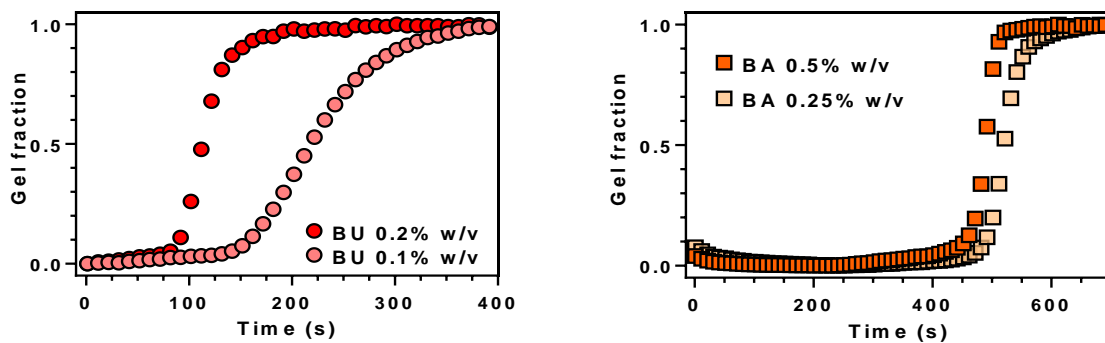


Figure II.6. Gelation kinetics of BU (left, circle) and BA (right, square) at two concentrations in DMEM + 10% FBS at 20°C.

Since the gelation process is driven by thermal solubilization and sol-gel transition, one must ensure that the LMWG solution is cool enough before mixing with cell suspension, and also that the gelation kinetics enable the solution to be easily handled. Previous studies have shown relatively fast gelation for BU and BA 1% w/v at room temperature after solubilization at 80°C,

being respectively < 1 min and 3 min²¹⁶. Gelation kinetics for each gel at the above determined concentrations were assessed by measuring their optical density at 700 nm after solubilization at 80°C, owing to the transparent sol phase and the turbid gel phase. Figure II.6 shows that gelation kinetics depend on the nature of the hydrogels and on their concentration. BU is displaying faster gelation than BA, both taking minutes to complete their gelation. After solubilization, they show an induction time, before a linear growth of their gel fraction corresponding to fibrillogenesis. During this amount of time, they can be easily manipulated as they are still in sol phase. The induction times fall in minutes times scale range (1 - 8 min). These results show that their kinetics give enough time for the gels to slightly cool down and for the experimenter to stir together the LMWG solution with the cells before gelation to occur. Noteworthy that the induction time for BU and BA corresponds to the supercooling time, as it was shown that these hydrogels undergo non-isothermal gelation during cooling⁴⁵⁹.

II.2.3.4 Porosity and molecular diffusion timescales

To host cells for culture, the matrix must permit molecular mobility through it, small molecules to biomolecules. It is necessary to make sure that nutrients, reagents and proteins can diffuse in the whole cell micro-environment, for their viability and proliferation but also for their analysis, drug assays and others uses that required to reach the cells through hydrogel. Based on the fibrillar architecture of the hydrogels (Figure II.5), it seems the porous structure could allow molecule diffusion. Since the scaffold can impact the passive mass transport, because of fiber adsorption and viscosity, the kinetic of migration must be quantified in order to determine the timepoint of treatment and the concentration to be adjusted according to the timescale of migration. To assess the passive mass transport kinetics of some molecules through the hydrogels, experiments were done in two different ways.

One assessment consisted of the quantification of initially entrapped molecules in hydrogels diffusion to a supernatant by UV-vis spectroscopy, at 37°C (Figure II.7 Top). Three molecules were assessed: MTT (0.41 kDa), CytC (12 kDa) and Hb (64 kDa). These molecules / proteins have different molecular weight, and their absorption band (MTT 380 nm, CytC 408 nm and Hb 406 nm) is significantly different from GNB molecules (267 nm). The features render the diffusion study of these molecules / proteins easier compare to other protein where major absorption are found around 280 nm (absorption band too close from thymine UV-spectra found in GNB). In addition, molecules such as MTT are widely used in 3D culture analysis to assess metabolic activity of the cells⁴⁷⁹⁻⁴⁸¹.

Another experiment was performed consisting of depositing a supernatant containing the compounds of interest that are expected to migrate towards the cells through the hydrogel matrix and monitoring their entrance (Figure II.7 Bottom). For this purpose, fluorescence spectrophotometry experiments were conducted. This technique allows detection of a specific signal through the hydrogel despite turbidity. Two molecules were assessed: fluorescent antibody goat anti-rabbit IgG (R633; ~150 kDa) and Riboflavin (RF; 0.38 kDa). The antibody acts as a control for proteins migration through the gels and knowing its migration can be of great interest, for example in context of therapeutic assays or simply to ensure FBS can penetrate the gels. Riboflavin, on the other hand, is a relatively small molecule which the dynamic of migration through the gel can give indication of the penetration of other small molecules such as reagents for biological analysis (e.g., metabolic assays, live/dead assay, etc.).

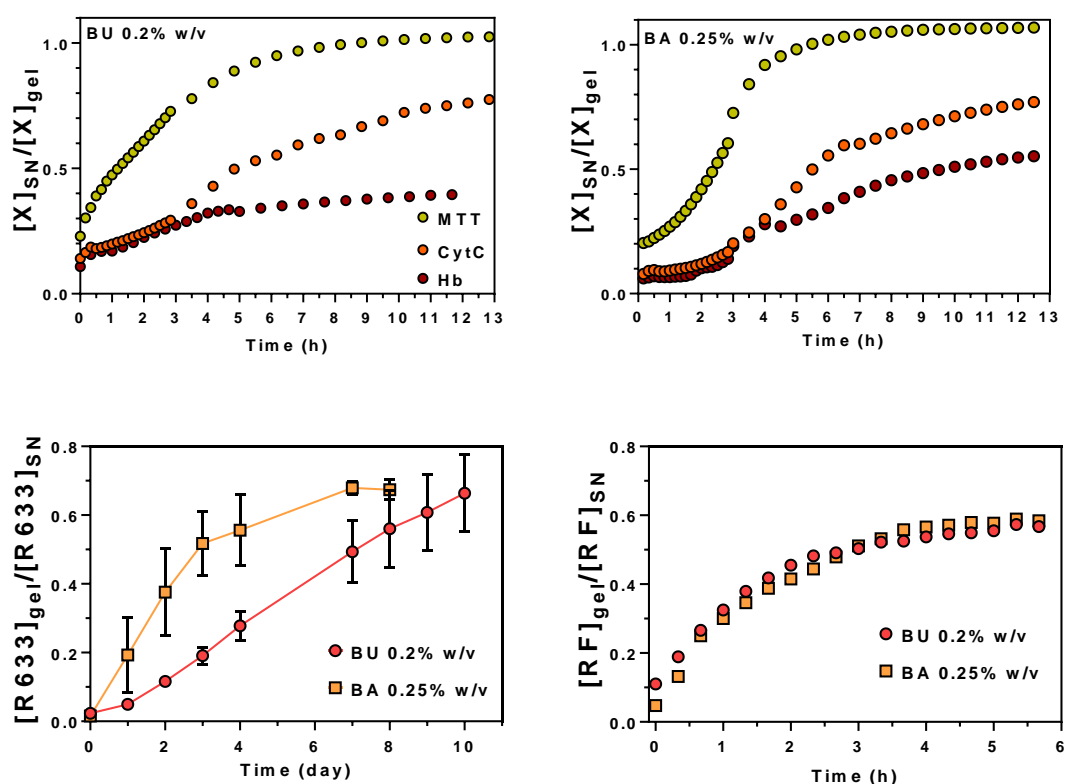


Figure II.7. Molecule migration of different molecular weights. Top: diffusion from hydrogel made of BU 0.2% w/v (left) or BA 0.25% w/v (right), in PBS to supernatant. Bottom: diffusion of antibody R633 (left) and Riboflavin (RF) (right) from supernatant to hydrogels made of BU 0.2% w/v (red circle) or BA 0.25% w/v (orange square) in PBS at 37 °C. $[X]_{gel}$ and $[X]_{SN}$ correspond to the concentration of the compound in the gel and in the supernatant, respectively. Mean values and error bars for the antibody internalization experiment correspond to 3 independent experiments.

The MTT fully diffuses after 6h whereas CytC and Hb do not reach a full release likely due to entrapping in the fibrillar structure during hydrogel formation (Figure II.7 top). CytC reaches a releasing plateau around 80% for BU and BA. Hb plateaus are about 40% and 55% in BU and BA, respectively. Globally the hydrogels allow passive mass transport at reasonable timescales, and it is worth to note that it largely depends on the temperature, the same experiment at room temperature giving timescales of days long (Figure II.S2). Although, it also depends on the molecular weight of the entity: the largest the molecule is, the less released in the supernatant it is and the longest it takes to reach equilibrium. Small molecules, such as MTT, can easily diffuse through the porous structure of the hydrogel, but larger molecules such as proteins may be more retained, probably because of entrapping in the lattice, more fiber adsorption or aggregation. In any case, molecular components, such as those in cell culture medium, metabolic wastes and other nutrients are passively mobile in our system (scaffold + supernatant) and do not need active and invasive intervention to allow their transport.

The supernatant to gel diffusion experiments show biomolecules, with molar weight ranging from less than 1 kDa to ~150 kDa, can penetrate into gels from a supernatant, with different timescales depending on their size and on the gel (Figure II.7, Figure II.S3 and II.S4). Antibody R633 can migrate through the scaffold, but with a slower migration in BU 0.2% w/v than in BA 0.25% w/v. Riboflavin will penetrate within a day, with a plateau around 60% for BA and BU. A possible explanation to understand why the plateau does not reach an equal distribution value between hydrogel and supernatant (*i.e.* 100% or $[X]_{\text{gel}} / [X]_{\text{SN}} = 1$) is a partition between the latter. To test this hypothesis, we measured the concentration of three small molecules, being Fluorescein (0.33 kDa), Rhodamine B (0.48 kDa) and Riboflavin (0.38 kDa), in the supernatant after 72h (Figure II.S5). Whereas fluorescein is equally distributed between the hydrogel and the supernatant, Rhodamine B is more concentrated in the hydrogel contrary to Riboflavin, which is more concentrated in the supernatant. This experiment confirms the existence of partition coefficient between supernatant and hydrogel phase and could explain why some plateaus do not reach equal distributions between hydrogel and supernatant. Overall, these experiments suggest reagents for proliferation or live/dead assay can be introduced in the system without disturbing the scaffold.

II.2.3.5 3D cell culture

As previously described, a gel suitable for a 3D culture has to answer to key characteristics: 1) having a micro-environment that resembles the *in vivo* physiological tissue suitable for hosting cells, 2) a precise viscoelasticity that supports cell proliferation and 3) a sufficiently porous

matrix for nutrient diffusion as well as post culture analysis. Until this point, we proved that GNB gels check every mark from a physico-chemical aspect in order to be used in 3D cell culture. For proving the feasibility of these gels use in biological applications, a 3D culture was performed using U87-MG Glioblastoma cell line. In fact, U87-MG is known to be highly clonogenic and heterogeneous⁴⁸²⁻⁴⁸⁴. These are two key characteristics that allow on one hand to obtain spheroids out of a small number of cells, and on another hand the formation of multicellular tumor spheroids, having different layers within the latter.

Since the stiffness of the *in vivo* cerebral tissue is known to be around 0.1 to 1 kPa, the gel's parameters should be carefully considered, therefore the concentrations of the gels chosen are BA 0.25% w/v and BU 0.1% w/v. We also wanted to examine the effect of higher concentrations (BA 0.5% w/v and BU 0.2% w/v) on cellular behavior in order to prove that physical parameters such as viscoelasticity have to be adjusted to every cell line.

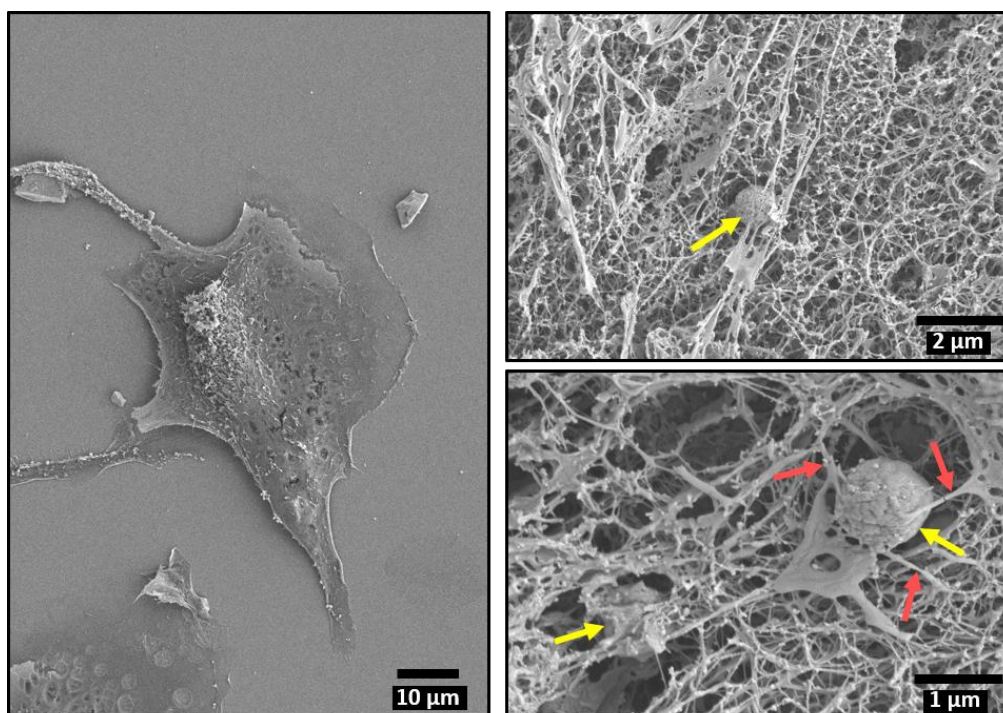


Figure II.8. Cryo-SEM of U87-MG cells. Left: scanning electron micrography of cells cultured in 2D. Right: cryo-scanning electron micrography of hosted cells (yellow arrows) and their interaction with their micro-environment (red arrows) in BU 0.2% w/v gel. Samples were fixed after 35 days of culture.

First, because the cell culture support impacts the spatial organization and the structure of the cells, thus their behavior, the spatial morphology of the cells was verified by cryo-SEM in both 2D and 3D culture (Figure II.8). Cells which possess a flattened structure in 2D culture, were observed to have round shaped structures in 3D culture similar to cells in suspension. In addition, cells seemed to be well incorporated in the gel, and showed interactions with the fibers constituting the gel, that could be the start of organizing their own ECM-like micro-environment. This result validates a significant incorporation of the cells in the gel by following the previously described 3D culture protocol.

The decrease in cell diameter observed in 3D can be explained by the fact that the cells in 2D culture are in a monolayer, therefore they extend their shape within the flat surface. Whereas in 3D culture they have a spherical morphology. This results in a decrease of their diameter especially after the loss of cytoplasmic extensions that we normally observe in 2D. However, the decrease in diameter in these micrographs seems to be exacerbated by the experimental condition of the sample preparation. Indeed, frozen samples undergo sublimation prior to their observation in order to remove the ice generated by cryofixation. Images of the cells before sublimation show their expected size ($\sim 8\mu\text{m}$) (Figure S10) and confirm that this experimental step impacted the sample dimensions.

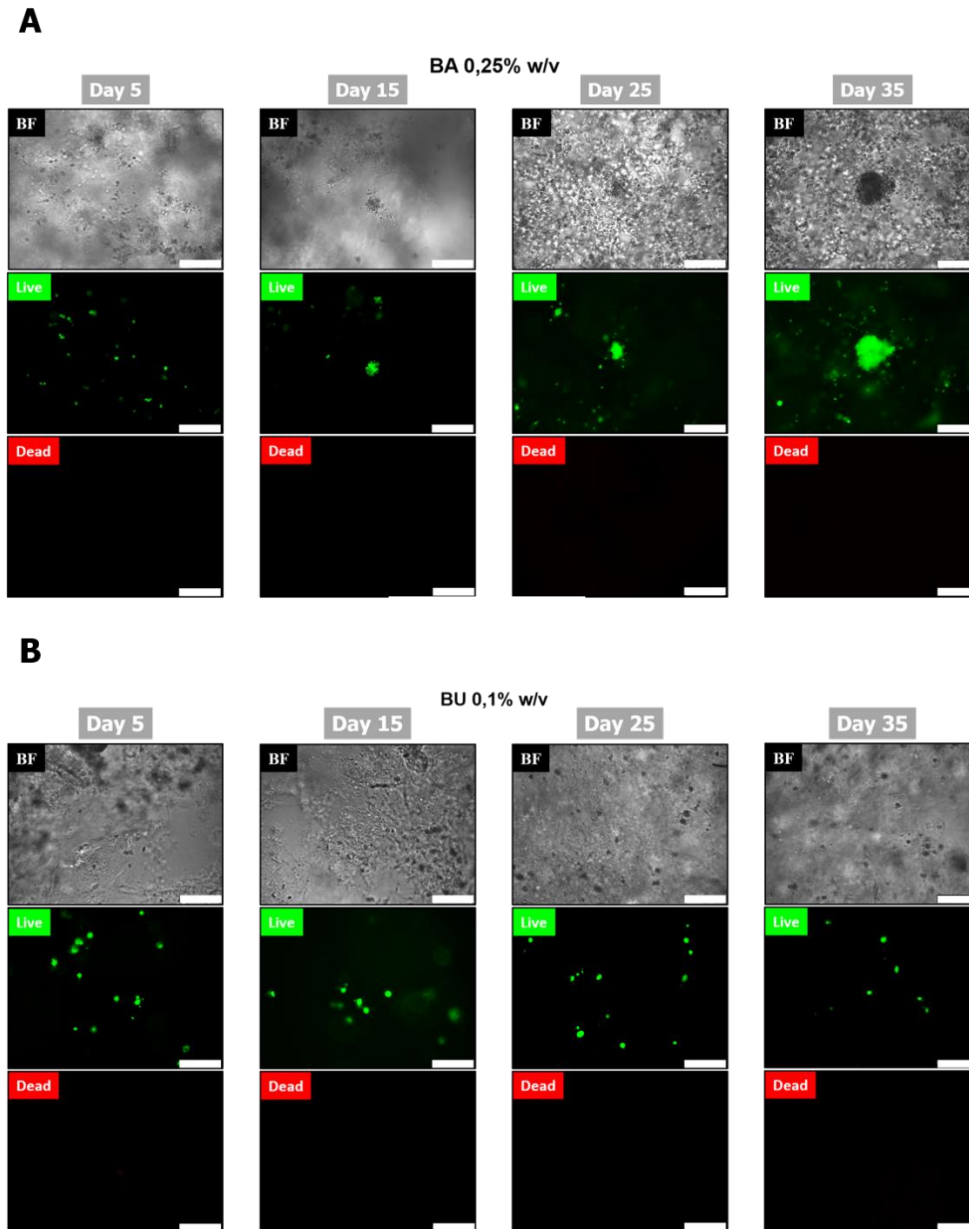


Figure II.9. 3D culture of U87-MG cell line in (A) BA 0.25% w/v and (B) BU 0.1% w/v after 5, 15, 25 and 35 days. Top panel represents imaging using bright field (BF), middle and bottom panel represent imaging using the Live/Dead kit to evaluate the live cells with calcein AM dye (in green) and dead cells using ethidium homodimer-1 dye (in red). Scale bar = 250 μ m.

The second step consists of verifying the viability and growth of U87-MG cells in BA 0.25% w/v and BU 0.1% w/v. Figure II.9A shows micrographs and fluorescent images of 3D culture of U87-MG cell line in BA 0.25% w/v at different time during the cell culture. The cells were shown to be viable from day 5 and maintained high viability throughout the entire culture time with no dead cells to report inside this micro-environment, and have managed to organize in a

spatio-temporal manner. In fact, at day 5, the cells were well distributed in the gel and had a mean size around 10 μm . Between day 5 and day 35 cells started to proliferate, migrate and organize. On day 35, the spheroid is about 200 μm in diameter. Likewise, repeated 3D cell culture of U87-MG in BA 0.25% w/v (Figure II.S6) generated spheroids at day 35 having a size around 120 μm (Figure II.S6). Due to basal cellular heterogeneity of implemented U87-MG cells, different sub-populations exist within the cells thereby different cellular behaviors were expected at throughout the culture. For example, at day 25 the cells demonstrated an organization of different sizes and by consequence at day 35 all of the generated spheroids differ in size and spatial organization meaning we observed a diffused aspect in Figure II.S6B, whereas in Figure II.9A and Figure II.S6A, the spheroids were observed to be less diffused and more compact. This result shows BA 0.25% w/v micro-environment that has characteristics for cell implementation and proliferation. Molecule diffusion has also proven effective during the live/dead assays, where molecules such as calcein AM (0.99 kDa) and ethidium homodimer-1 (0.86 kDa) added in the supernatant managed in 1-hour incubation time to diffuse throughout the porous matrix and interact with the cells.

On the other hand, BU 0.1% w/v was able to maintain cell viability from day 5 till day 35 (Figure II.9B). We observed that even if cells were viable throughout the culture time with no dead cell reported, there was no sign of proliferation nor organization of the cells like in BA 0.25% w/v. The cells remained dispersed in the entire volume of the gel.

The viability observed by live/dead in both BU 0.1% w/v and BA 0.25% w/v, is further supported by the qualitative observation of the color change in culture media due to operational metabolic activity after 2 weeks of culture with a culture medium maintenance every 48h. From day 1 till day 14, an increase of cell density in the gel occurs due to cell growth and proliferation, is manifested by a color shift from red to yellow due to the acidification of the phenol red⁴⁸⁵ (Figure II.S7). The higher the cell density at day 1, the higher the intensity of the color shift (10 000 vs 20 000 cells) after 2 weeks.

All these results show that both gels were formed using the same protocol and they have the same behavior and stability at a macro scale. Even though both gels possess similar viscoelastic properties, the difference in the cellular behavior between BU 0.1% w/v and BA 0.25% w/v can be traced to the softer scaffold of the BA that may be more adapted to these cells in terms of viscoelasticity. Another difference is the chemical structure of GNB that constitute both gels. In fact, BA chemical structure include two amides that are considered as peptide bonds, meaning that they offer more flexibility, and likely prone to hydrolysis by peptidase. Hence, the cells are free to form their own micro-environment and initiate communication, proliferation

and growth. Whereas the BU is based on urea moiety making the gel too rigid to culture this type of cell line.

We also performed a 3D culture using BU 0.2% w/v (3 kPa \pm 0.7) and BA 0.5% w/v (1.1 kPa \pm 0.1) to study the impact of varying the physical parameters of the gels on the cellular behavior (Figure II.S8). We observed that both concentrations formed a stable gel but did not permit cell proliferation and growth. This result was expected because the viscoelastic properties of the gel became outside of the range of a cerebral soft tissue, therefore not adapted for neural cells such as Glioblastoma U87-MG cell line but for another type of cells that grow in this specific tissue stiffness. This also proves that in order to achieve a successful 3D culture and depending on the purpose of the latter, all parameters should be carefully considered and adapted to the cell line of interest.

IV.2.3.6 Hydrogel stability during 3D culture

We wanted to evaluate the gel's behavior following the impact of cell implementation and 35 days cell culture. Thus, frequency sweeps in oscillatory shear rheology were performed on gels with and without cells at day 0 and day 30 of culture in order to determine the G' expressing the elastic response of the material to shear stress. (Figure II.10)

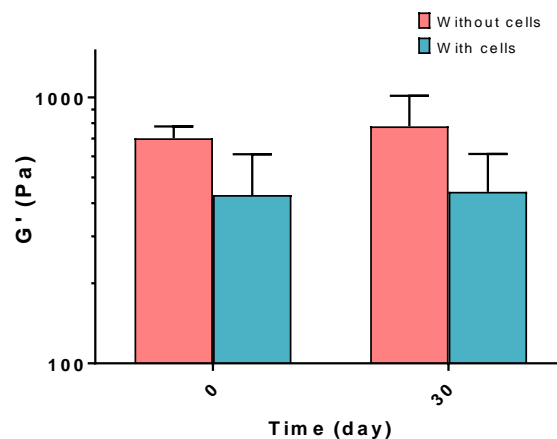


Figure II.10. Rheological data showing the gel stability of BA 0.25% w/v with and without cells, at day 0 and day 30 of culture measured with a rheometer. G' values were taken at a frequency of 1 Hz (6.283 rad s⁻¹).

We did not observe significant difference in G' during 30 days of culture with or without cells. (Figure II.10) This result demonstrates that BA 0.25% w/v retains physical properties adapted to the cells in the stiffness range of the cerebral ECM during culture time, even following the

formation of tumor spheroids. Whereas, a drop in the G' value is observed at day 0 and day 30 when cells are implemented in the gel. Even though there's no significant difference in G' between with and without cells conditions, the tendency suggests an impact of the cellular implementation on the rheological properties of the scaffold without disturbing its stability. This finding proves that BA 0.25% w/v hydrogels have the ideal physical parameters that remain stable throughout the culture time and help promote the growth and organization of U87 cells in order to grow into a spheroid without altering the initial physical characteristics of the gel. Therefore, the gel serves as an ideal hosting environment for cellular implementation and development.

II.2.4. Conclusion

This study shows the proof-of-concept of the use of based LMWG as scaffold for 3D cell culture. The properties of these cell hosting systems were determined and tuned, from their mechanical features to their molecular permeability, in order to maximize the ECM mimicking, hence the culture viability in a more biologically consistent way. These results have confirmed the viability for soft tissue cells and serve as a proof-of-concept for other cell types cultures, since the parameters can be adjusted in order to match the mechanical requirements, by varying the GNB concentration. BU could be used at 0.5% w/v at most ($G' = 10.4 \text{ kPa} \pm 4.6$), since higher concentrations exhibit too fast gelation kinetics, where BA can go up to 1% w/v ($G' = 4.4 \text{ kPa} \pm 1.4$) and still be handled during the time experiment. Thus, GNB hydrogels form an appropriate soft matrix for a wide range of cell types. Finally, GNB based scaffold take major advantages over other existing 3D systems. First, the gelation is triggered by thermodynamic force, meaning that gel preparation requires very few equipment (*i.e.* a water bath is sufficient). Second, these gelators can be considered as very efficient since they are able to form hydrogels at low concentrations. Here, the required concentrations are below 0.5% w/v, meaning that these cell cultures consume very few materials. All these data suggest that BA gels can be implemented among others in the 3D cell culture engineered biomaterials landscape. However, the cell line used during this study (U87-MG) is known to be highly heterogeneous, meaning it contains different cell types having variable phenotypical behaviors (in terms of differentiation, proliferation, quiescence etc.) The implementation of such a heterogeneous population could cause a non-repeatable tumor progression within and between cell culture experiments, generating spheroids of different sizes, morphology, proliferation rates etc. It would be

interesting to implement sub-populations with homogeneous phenotypes, in particular cancer stem cells known for having tumor initiation properties *in vivo*. The use of these cells can help better recapitulate the morphology and size of solid tumors on one hand, and produce uniform-sized tumors with repeatable growth kinetics on another hand.

II.2.5 Supplementary information

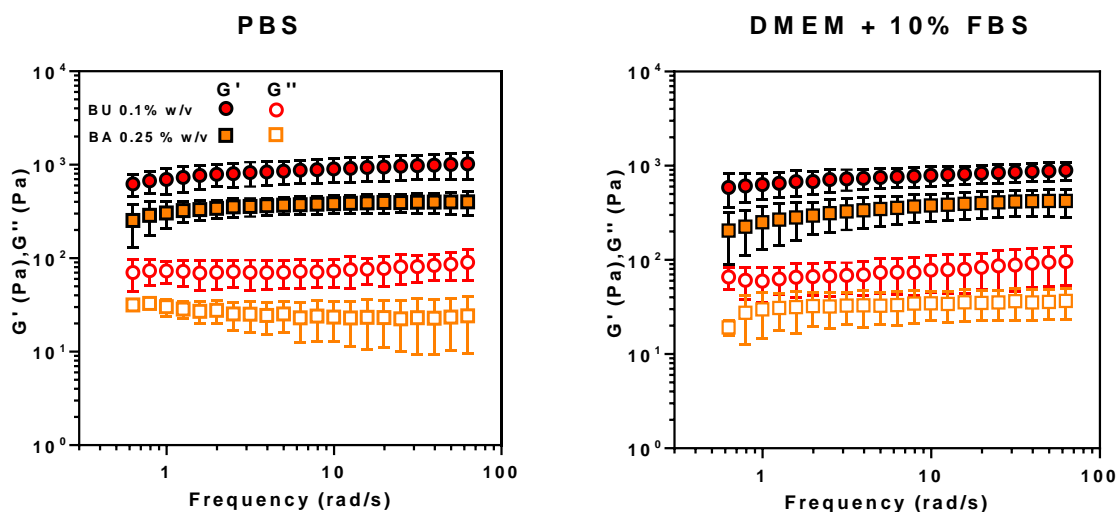


Figure II.S1. Frequency sweep of BA 0.25% w/v and BU 0.1% w/v at 37°C with a controlled strain of 0.1%. These show the contribution of a viscous behavior to their viscoelastic properties, with a G'' value around 10% of their respective G' value.

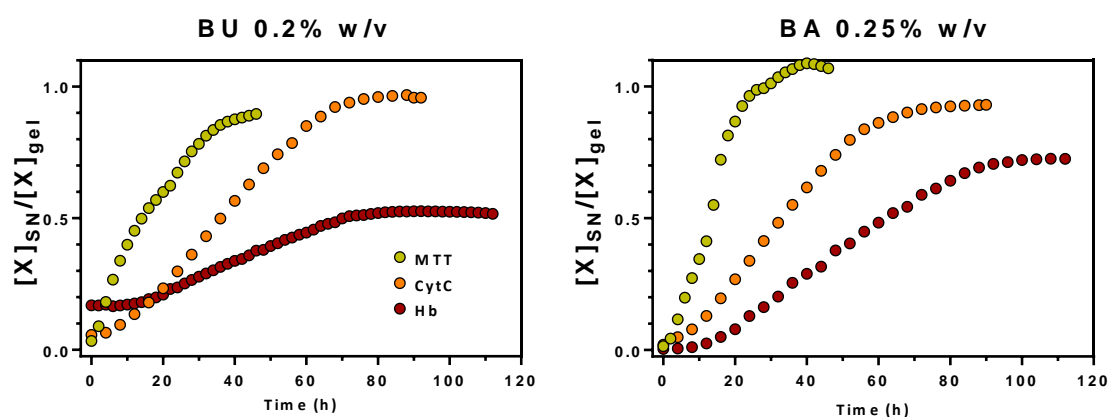


Figure II.S2. Kinetics of molecule migrations from the gel to the supernatant at 20°C.

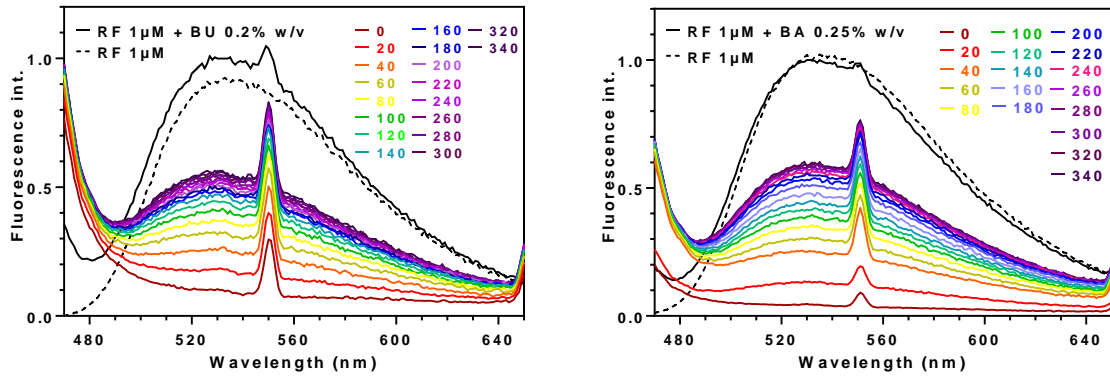


Figure II.S3. Fluorescence emission spectra of riboflavin (RF) migrating from the supernatant to the hydrogels. At t_0 , the supernatant contained RF $2 \mu\text{M}$ in PBS. Each spectrum was acquired every 20 minutes and normalized by the emission spectrum of the hydrogel + RF $1 \mu\text{M}$.

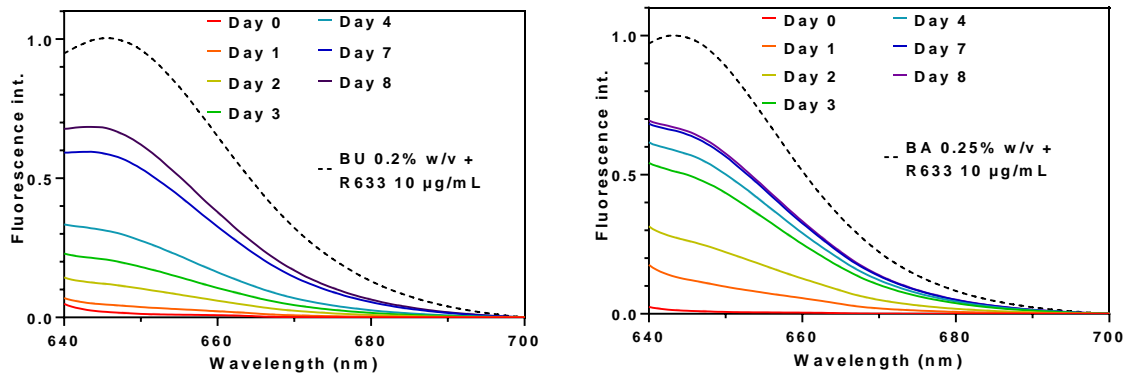


Figure II.S4. Fluorescence emission spectra of antibody R633 migrating from the supernatant to the hydrogels. At t_0 , the supernatant contained R633 $20 \mu\text{g/mL}$ in PBS. Each spectrum was normalized by the emission spectrum of the hydrogel + R633 $10 \mu\text{g/mL}$.

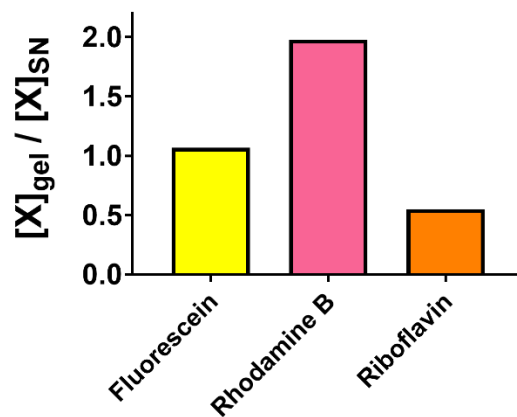


Figure II.S5. Partition of three small molecules between gel (BA 0.1% w/v) and supernatant (SN) made of PBS. Molecules were introduced in the supernatant and concentration were measured in SN after 72h at 37 °C (concentration in gel was deduced from remaining concentration in SN).

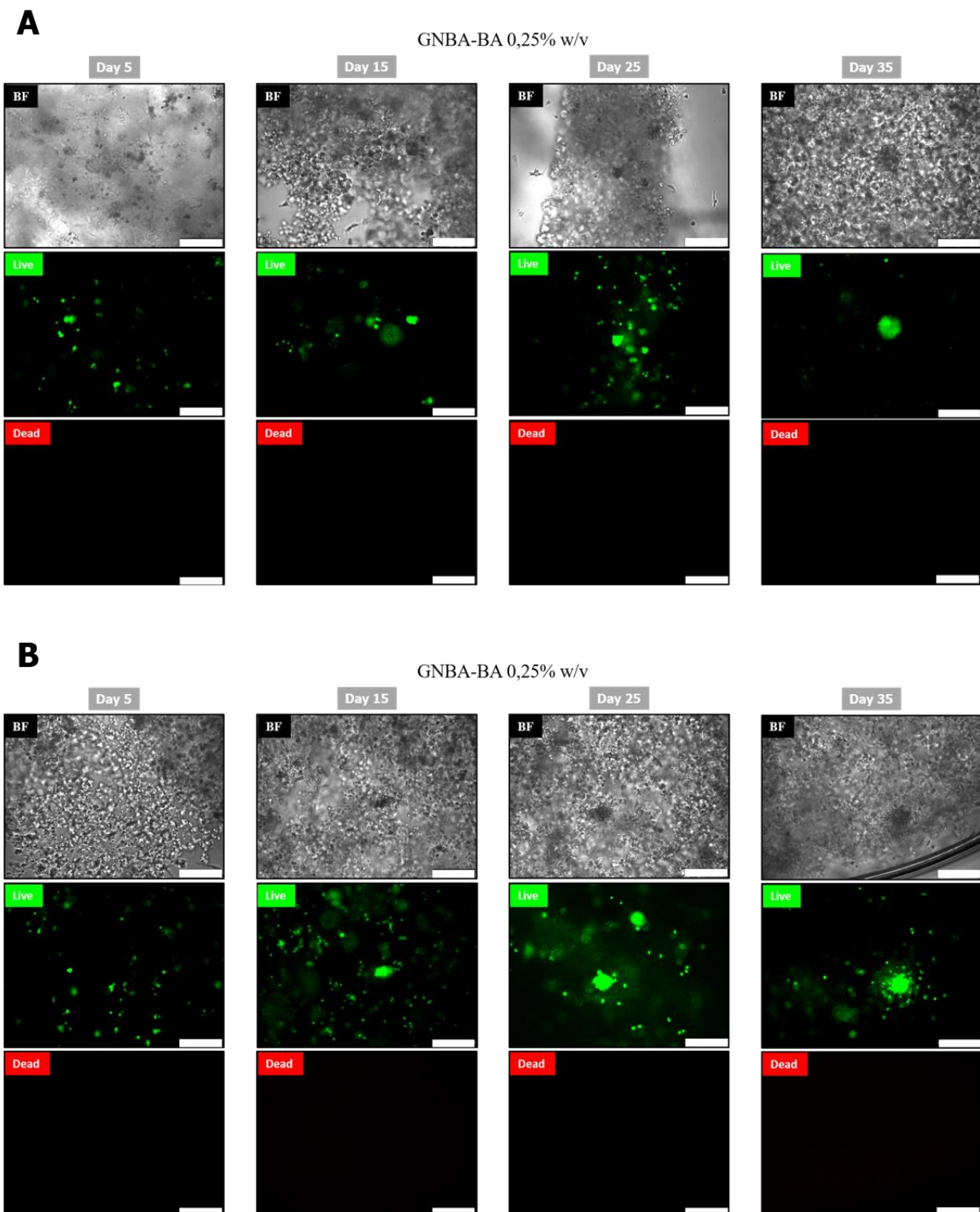


Figure II.S6. Repeated 3D culture of U87-MG cell line in BA 0.25% w/v for 35 days generating different spheroids: top panel represents imaging using bright field (BF), middle and bottom panel represent imaging using the Live/Dead kit to evaluate the live cells with calcein AM dye (in green) and dead cells using ethidium homodimer-1 dye (in red). Scale bar = 250 μ m.

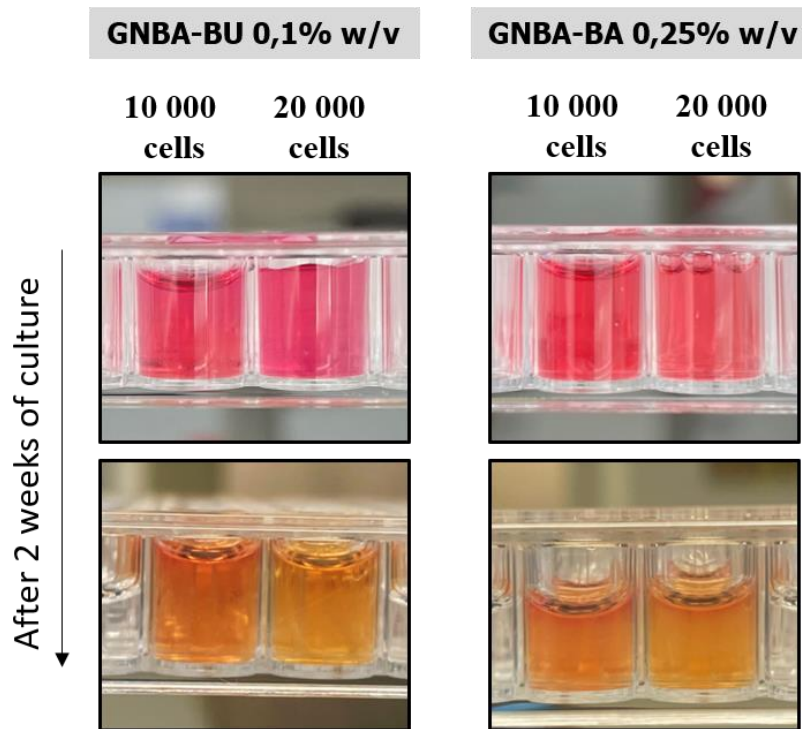


Figure II.S7. 3D culture of different cell densities of U87-MG (well 1: 10 000 cells; well 2: 20 000 cells) in order to demonstrate the operational metabolic activity of the cells after 2 weeks cultured in left: BU 0.1% w/v and right: BA 0.25% w/v.

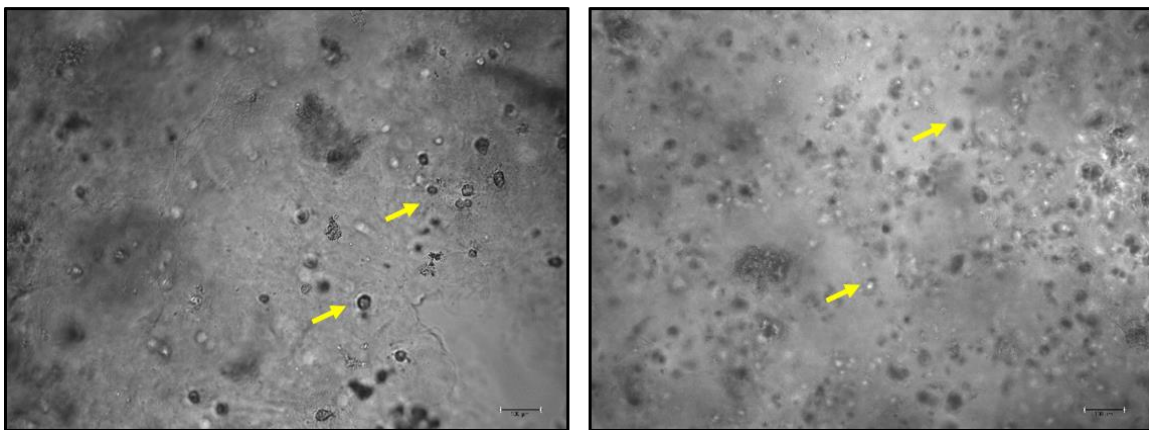


Figure II.S8. Micrographs by BF imaging of U87-MG cells after 30 days of culture in BU 0.2% w/v (left) and BA 0.5% w/v (right). Cells are shown with yellow arrows.

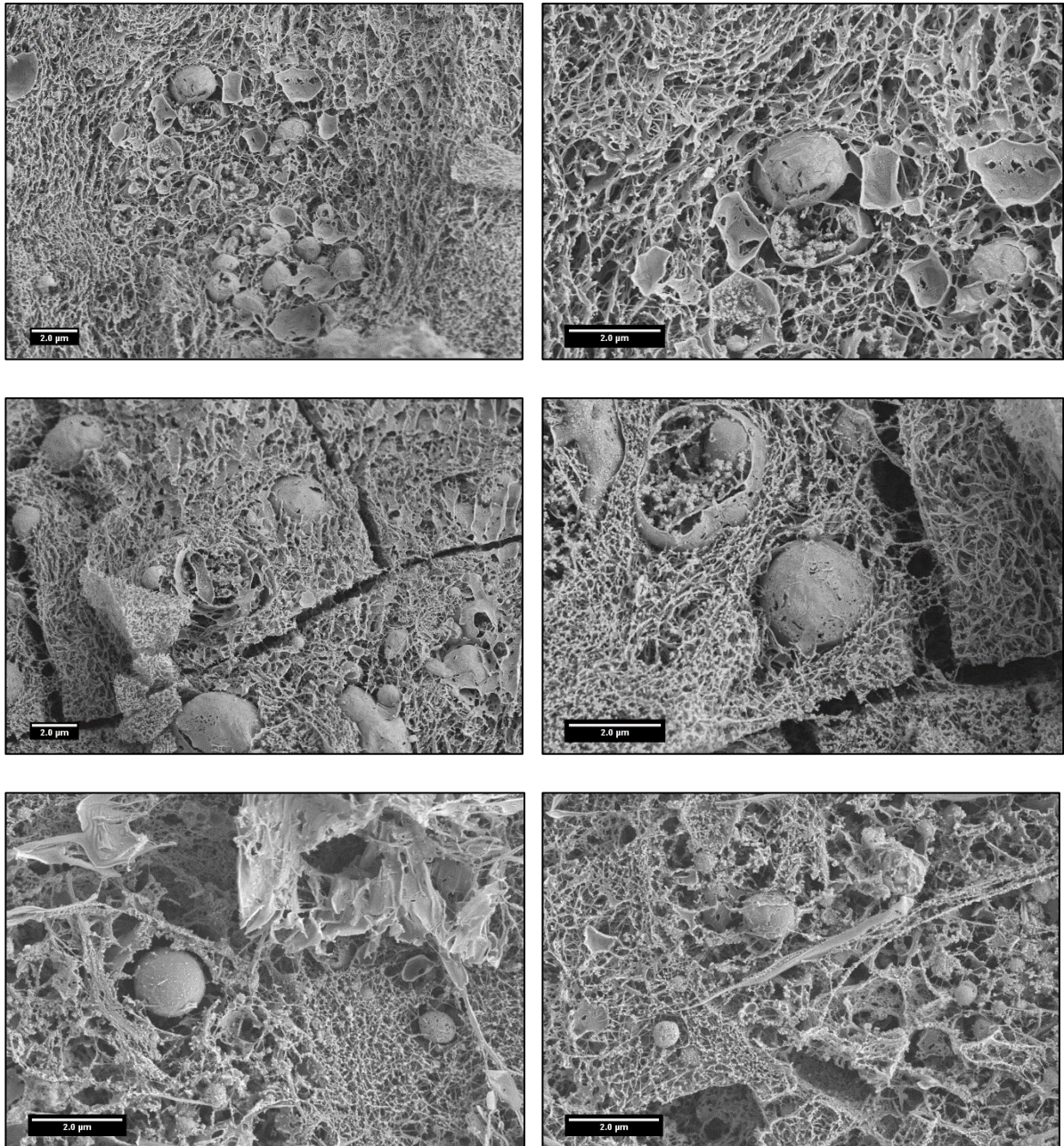


Figure II.S9. Cryo-scanning electron micrographs of hosted U87-MG cells and cell debris in BU 0.2% w/v gel.

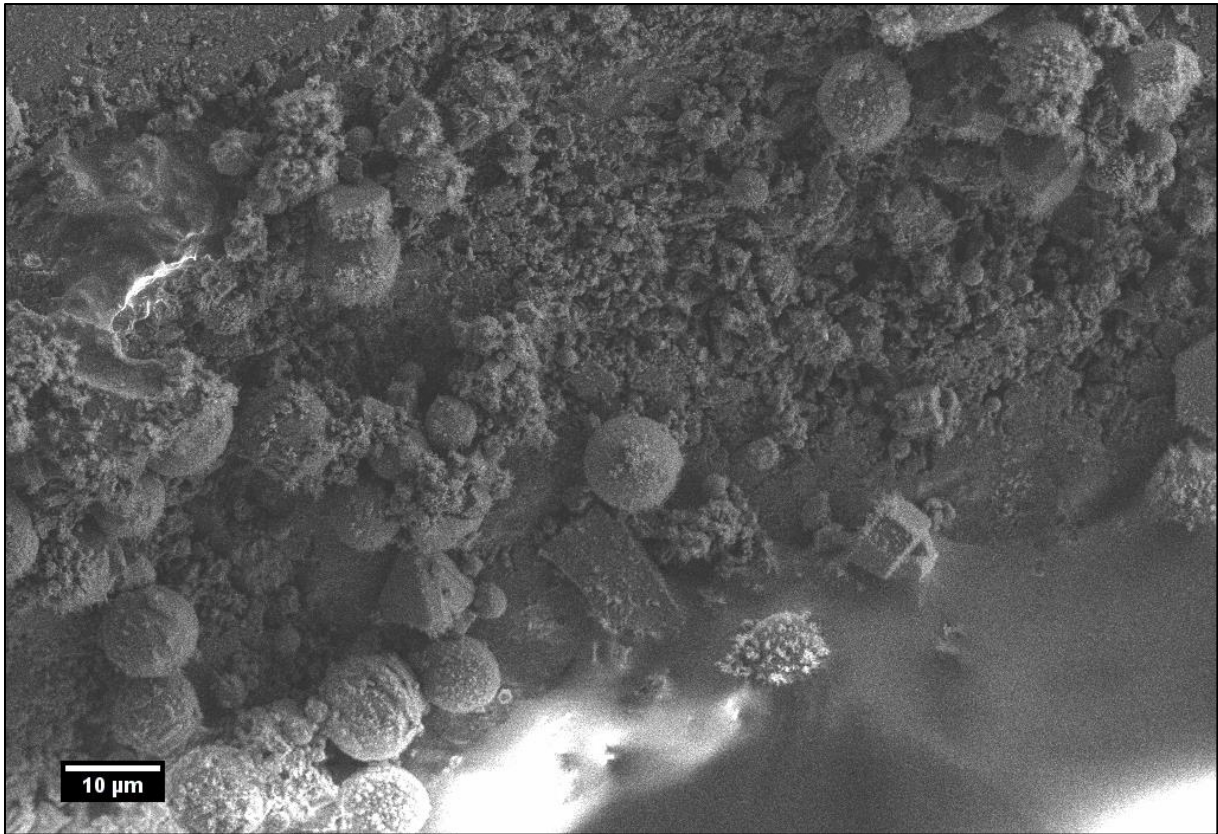


Figure II.S10. Cryo-scanning electron micrograph of hosted U87-MG cells and cell debris in BU 0.2% w/v gel prior to sublimation, showing the impact of the latter on the dimension of the cells observed under the microscope.

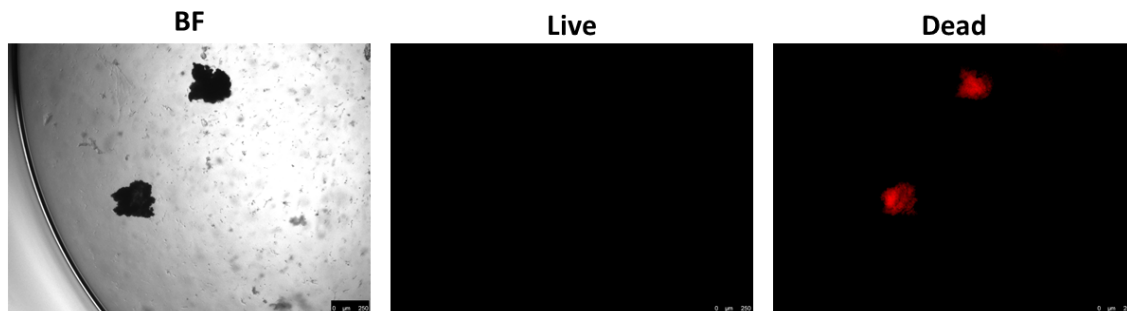


Figure II.S11. U87-MG cells killed with ethanol to control the “dead” dye interaction with the nuclear dead cell components within the BA 0.25% w/v gel. Left panel represents imaging using bright field (BF), middle and right panel represent imaging using the Live/Dead kit to evaluate the live cells with calcein AM dye (in green) and dead cells using ethidium homodimer-1 dye (in red). Scale bar = 250 μm.

II.3 Conclusion

L'objectif de ce travail de thèse est de concevoir un système 3D reproductible formé d'un modèle cellulaire bien défini et un support 3D avec des caractéristiques physico-chimiques modulables. Après criblage de diverses conditions expérimentales, des concentrations d'hydrogel (0,1%, 0,2%, 0,25%, 0,5%, 1%, 2% et 3% w/v) pour GNF, BU et BA, ainsi que diverses densités d'ensemencements cellulaires (500, 1000, 5000, 10000 et 20000 cellules par puit), le choix des études physico-chimiques et de culture 3D a été fait pour BU 0,1% w/v et BA 0,25% w/v avec 1000 cellules par puit de culture de U87-MG qui est une lignée cancéreuse de GBM. Ce choix est justifié par le fait que la rigidité de ces gels qui est 0,9 kPa et 0,4 kPa respectifs, correspond à la gamme de rigidité pour le tissu cérébrale (entre 0,1 et 1 kPa) et qu'ils présentent une stabilité ciblée pour 35 jours de culture. Dans ce chapitre nous présentons une série de caractérisations physico-chimiques sur ces deux hydrogels supramoléculaires. L'architecture fibrillaire observée par microscopie électronique à balayage, montre un agencement complexe de fibres qui permet d'obtenir une matrice 3D de structure similaire à la MEC. En outre, les molécules qui forment ces hydrogels subissent un assemblage supramoléculaire déclenché après une diminution en température de 80°C à température ambiante. Le temps d'induction nécessaire pour cette transition est de 3 min pour BU 0,1% w/v et de 7 min pour BA 0,25% w/v, ce qui permet en pratique d'attendre 1 min pour que le gel descend en température dans la phase sol avant l'implémentation des cellules. Ceci permet d'éviter de causer un choc thermique qui pourrait engendrer une forte mortalité cellulaire. De plus, les études d'échanges de molécules ont montré qu'il y a diffusion et internalisation de molécules entre les deux compartiments du puit (gel et surnageant). Ceci permet de vérifier que les nutriments ajoutés dans le surnageant, qui sont nécessaires pour le maintien et le développement cellulaire, diffusent à travers la porosité du gel et arrivent au niveau cellulaire. Ensuite, ces hydrogels supramoléculaires ont été testés comme matrices 3D pour la culture cellulaire avec la lignée U87-MG. Après 35 jours de culture, les cellules implémentées dans BU 0,1% w/v ont montré une distribution dans le volume du gel ainsi qu'une viabilité maintenue sur la durée de culture sans mortalité, mais aucune prolifération et/ou organisation en sphéroïdes n'a été observée. Tandis que la culture avec BA 0,25% w/v, a montré en plus d'une forte viabilité des cellules, une augmentation en nombre de cellules observées dans les puits au fur et à mesure reflétant une prolifération cellulaire, qui se termine par une organisation en sphéroïde au jour 35 de la culture. Cette différence de comportement cellulaire est

potentiellement liée à la variable majeure entre les deux hydrogels qui est la fonction urée versus la fonction amide. Donc contrairement à la fonction amide, la fonction urée peut affecter les communications cellule-MEC et engendrer des inhibitions du phénotype prolifératif. Par conséquent, pour la suite des études qui vont être présentées ultérieurement, nous utilisons comme support 3D l'hydrogel BA 0,25% w/v.

Cependant, le handicap majeur de cette étude est le manque de reproductibilité du comportement cellulaire en termes de cinétique de croissance, organisation spatiale et tailles de sphéroïdes. En fait, en répétant la culture 3D de U87-MG dans BA 0,25 % w/v, nous avons remarqué que dans certaines cultures les amas se forment rapidement au sein du gel alors que dans d'autres cultures il y a une cinétique de croissance plus lente. C'est-à-dire qu'aux différents jours étudiés (J5, J15, J25 et J35) le nombre de cellules viables ainsi que leur distribution spatiale étaient différents entre les cultures. En plus, nous avons obtenu des sphéroïdes à jour 35 de tailles aux alentours de 150 μm avec un écart type de 70 μm qui marque un manque de reproductibilité du système vivant et dans certains sphéroïdes nous avons observé des cellules diffuses dans le volume du gel alors que dans d'autres les sphéroïdes étaient plus compacts. Donc, nous concluons que l'hydrogel choisi présente les propriétés physico-chimiques clés pour une culture 3D (viscoélasticité, porosité, facilité de conception, etc.) et une cytocompatibilité avec la lignée cancéreuse étudiée. Mais comme attendu, une population cellulaire hétérogène ne conduit pas à un résultat homogène entre les cultures. Alors afin d'essayer d'atteindre notre objectif de reproductibilité, nous visons pour la suite à comparer la culture 3D d'une population hétérogène de U87-MG à des sous-populations de Glioblastome de phénotypes homogènes dont une sous-population enrichie en CSCs présente des critères requis pour l'initiation tumorale et la progression tumorale répétable. Donc la prochaine étape consiste à isoler et caractériser ces sous-populations de U87-MG.

Chapitre III : Le modèle cellulaire

III.1 Introduction

Le chapitre précédent présente en partie le criblage qui a été réalisé sur différentes conditions de concentrations de gel et de densité d'ensemencement cellulaire afin de maîtriser un protocole détaillé qui permet de mettre en place une approche de culture 3D.

Ce criblage nous a permis de choisir comme condition de support 3D BA 0,25% w/v, un hydrogel supramoléculaire caractérisé dans la deuxième partie du chapitre 2, possédant une viscoélasticité dans la gamme du tissu cérébral, qui est stable et ne présente pas de déformation macroscopique durant la culture, possédant une architecture fibrillaire complexe ciblée car elle mime la structure de la MEC, permet une diffusion de molécules entre le surnageant et le gel et qui désormais va être utilisé dans la suite des études. Les premières approches de culture 3D de la lignée U87-MG dans BA 0,25% w/v, ont démontré une forte viabilité cellulaire au sein de l'hydrogel, une augmentation en nombre de cellules observées au cours du temps (de jour 1 à jour 35) et des formations de sphéroïdes en fin de culture. Cependant, en évaluant les tailles des sphéroïdes entre les puits et en examinant leurs morphologies, nous avons observé une hétérogénéité de tailles et de structures. Donc même si la preuve de concept est validée et que cet hydrogel permet la mise en place d'une culture 3D d'une lignée de Glioblastome, l'objectif décrit dans l'introduction, qui est la production de modèles 3D reproductible, n'est pas atteint. Dans la synthèse bibliographique, nous avons exposé l'idée d'utiliser des sous-populations homogènes pour espérer un résultat d'un système 3D reproductible. En particulier, nous sommes intéressés à évaluer le comportement d'une sous-population de CSCs, qui grâce à leurs caractéristiques d'auto-renouvellement et de multipotence,^{97,100,105,112} possèdent des propriétés clés comme la capacité d'initier une progression tumorale¹⁰¹ et de maintenir un apport de cellules de différents phénotypes (différenciées, quiescentes et souches) à la niche tumorale⁹⁹. Etant donné que les CSCs sont présentes en très faibles proportions au sein de la lignée cancéreuse (1 à 5%)¹¹², il est primordial de les isoler et les caractériser préalablement à la culture 3D. Nous avons déjà listé les techniques de tri cellulaire qui permettent d'isoler les CSCs de leur population mère hétérogène (FACS³⁹⁵, MACS³⁹⁷ etc.). Néanmoins, ces techniques nécessitent un pré-marquage cellulaire par des anticorps ciblant les marqueurs souches. Au vu que les CSCs présentent une haute plasticité³⁸⁶ phénotypique, elles perdent facilement leur caractère souche suite à des stimuli externes. Ainsi l'immunomarquage peut engendrer un stress résultant conduisant à des modifications génomiques et phénotypiques de la sous-populations de CSCs qui par conséquent engendre une perte des propriétés clés ciblées pour la culture 3D

reproductible.¹⁰⁻¹³ De ce fait, nous avons eu recours à la méthode de SdFFF qui est une méthode de tri douce, non-invasive qui ne nécessite pas de pré-marquage cellulaire.^{109,110,112,416}

La SdFFF est une méthode utilisée en routine au sein du laboratoire CAPTuR de l'Université de Limoges, connu pour son potentiel de trier des sous-populations cellulaires en se basant principalement sur les propriétés biophysiques de la cellule comme la taille, la densité, la forme et la déformabilité. Plusieurs types de cellules normales et cancéreuses peuvent être trier par cette méthode démontrant ainsi sa versatilité. Cependant, contrairement aux méthodes de tri par FFF de particules nanométriques qui possèdent un outil de caractérisation post tri (par exemple le couple A4F-MALLS⁴⁸⁶), la SdFFF manque un outil de caractérisation après élution des sous-populations. Donc nous avons besoin de faire des caractérisations biologiques à l'issue du tri pour valider les propriétés phénotypiques et fonctionnelles des cellules, qui est coûteuse et nécessite un long temps de pratique. En fait, ce que l'on aimerait développer, notamment pour des études cliniques, c'est un système de détection/caractérisation on-line des CSCs dès leur élution par SdFFF. Ce chapitre est constitué d'un article scientifique intitulé "Characterization of Glioblastoma cancer stem cells sorted by Sedimentation field-flow fractionation, using Ultra High Frequency range Dielectrophoresis biosensor" publié en 2021 dans *Analytical Chemistry* (Ref : Saydé, T. et al. ; *Anal. Chem.* **2021**. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c02466>). Il consiste d'évaluer le couplage de la SdFFF avec un détecteur micro-fluidique qui consiste d'un outil de tri et d'identification et caractérisation cellulaires. Vu que l'avantage majeur de la SdFFF réside sur l'absence de marquage cellulaire, il fallait conserver cette propriété en utilisant un détecteur qui également est capable de caractériser les cellules sans nécessité de marquage. Le laboratoire Xlim de l'Université de Limoges, a développé au sein d'un projet européen (SUMCASTEC), une technique prouvée capable de discriminer entre des populations de Glioblastome (lignées U87-MG et LN18) riches en cellules différenciées cultivées dans un milieu de culture normal (+SVF) et des populations riches en CSCs cultivées dans un milieu défini gold standard (-SVF). En effet, les cellules présentent différentes propriétés intracellulaires de polarisation que celles du milieu DEP (milieu osmotique à base de sucre) utilisé pour les acheminer dans un canal micro-fluidique.⁴⁰⁵ Une fois ces cellules soumises à un champ électrique non-uniforme, une force diélectrophorèse (DEP) est générée, induisant le mouvement des cellules. Des champs dans la gamme des ultra haute fréquences (50 MHz à 500 MHz) induit le mouvement des cellules dépendamment de leurs propriétés membranaires et intracellulaires diélectriques. Le canal micro-fluidique dans lequel les cellules sont acheminées, dispose des quadripôles qui permettent de piéger la cellule. Une fois la cellule est

piégée à une certaine fréquence, le champ est diminué de 1 Mhz par 1 Mhz jusqu'à ce que la cellule bouge à une des deux électrodes (de droite ou gauche). La fréquence à laquelle la cellule a bougé, consiste en sa fréquence de transition. (cf. Annexe 3) Le biosenseur a permis d'établir des fréquences de transitions hautes pour les cellules différenciées et des fréquences de transitions basses pour les CSCs, consistant de signature standards discriminant entre deux populations de différents états de différenciation. De ce fait, nous avons décidé d'essayer de coupler la SdFFF au biosenseur comme un outil de tri, identification et caractérisation cellulaires qui peut être utiliser comme outil de diagnostic et pronostic.

La SdFFF utilise classiquement comme phase mobile un milieu tampon phosphate salin (PBS, pH =7,4) alors que le biosenseur est basé sur milieu DEP riche en sucre. Au vu de la différence entre ces deux phases, il fallait unifier le choix d'une seule phase mobile pour les deux techniques. Le choix est tombé sur le milieu DEP qui joue un rôle dans la polarisation des cellules dans la mesure des fréquences de transition, donc il était plus judicieux de modifier le tampon de la SdFFF et donc tester le tampon DEP comme phase mobile. En SdFFF le tampon a principalement un rôle vecteur dans le canal donc on attend que l'impact biologique (phénotypique et fonctionnel) de ce changement soit minime. Le fractogramme des cellules avec le milieu DEP a montré des changements au niveau des temps d'éluion (pour U87-MG et LN18) par rapport aux fractogrammes avec PBS, surtout une séparation nette entre le volume mort et le temps d'éluion de la première fraction pour les deux lignées, un pic cellulaire élargie et une meilleure résolution possible entre les fractions des deux fractions (F1 et F2) pour LN18. Donc afin de démontrer que ce changement de milieu n'impactait pas les propriétés biologiques des cellules triées, dans la première partie de cet article nous caractérisons les populations obtenues après SdFFF (TP, F1, F2 et crude) sont caractérisées aux plans phénotypiques par mesure de taille cellulaire qui est une propriété biophysique importante pour le tri et évaluation de l'expression de marqueurs de CSCs comme Sox2⁴⁰⁵, Oct4⁴⁰⁶ et Nanog⁴⁰⁸ qui se trouvent normalement surexprimées dans les CSCs par rapport aux cellules différenciées. Et aux plans fonctionnels en évaluant par soft agar leur capacité clonogénique⁴²¹ qui est normalement une propriété attribuée aux CSCs grâce à ses critères d'auto-renouvellement et enfin leur niveau au sein du cycle cellulaire en soulignant les tendances des CSCs d'être en état de quiescence⁴⁸⁷ et les cellules différenciées en état prolifératif.

Une fois les propriétés biologiques des différentes populations et sous-populations vérifiées après le tri par SdFFF avec le milieu DEP comme phase mobile, la mesure des fréquences de transition est faite par le biosenseur afin de les comparer avec les signatures des populations de référence (gold standards) et confirmer ainsi la possibilité de coupler la SdFFF au biosenseur.

III.2 Characterization of Glioblastoma cancer stem cells sorted by Sedimentation field-flow fractionation, using Ultra High Frequency range Dielectrophoresis biosensor

Tarek Saydé^{1,2}, Rémi Manczak³, Sofiane Saada¹, Gaele Bégaud¹, Barbara Bessette¹, Gaëtane Lespes⁴, Philippe Le Coustumer⁵, Karen Gaudin², Claire Dalmay³, Arnaud Pothier³, Fabrice Lalloué¹, Serge Battu^{1*}

1. EA3842-CAPTuR, GEIST, Faculté de Médecine, Université de Limoges, 2 rue du Dr Marcland, 87025 Limoges, France
2. ARNA, INSERM U1212, UMR CNRS 5320, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France
3. XLIM-UMR CNRS 7252, Université de Limoges, Limoges, France, 123, avenue Albert Thomas - 87060 LIMOGES CEDEX
4. CNRS, Institut des Sciences Analytiques et de Physico-Chimie pour l'Environnement et les Matériaux (IPREM), UMR 5254, Université de Pau et des Pays de l'Adour (E2S/UPPA), 2 Avenue Pierre Angot, 64053 Pau, France
5. Bordeaux Imaging Center, UMS 3420 CNRS-INSERM, Université de Bordeaux, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France

Abstract: Cancer Stem Cells (CSC) appear to be an essential target for cancer therapies, in particular in brain tumors such as Glioblastoma. Nevertheless, their isolation is made difficult by their low content in culture or tumors (< 5% of the tumor mass), and is essentially based on the use of fluorescent or magnetic labeling techniques, increasing the risk of differentiation induction. The use of label-free separation methods such as sedimentation field flow fractionation (SdFFF) is promising, but it becomes necessary to consider a coupling with a detection and characterization method for future identification and purification of CSCs from patient-derived tumors. In this study we demonstrate for the first time the capability of using an Ultra High Frequency range Dielectrophoresis (UHF-DEP) fluidic biosensor as a detector. This implies an important methodological adaptation of SdFFF cell sorting by the use of a new compatible carrier liquid DEP buffer (DEP-B). After SdFFF sorting, subpopulation derived from U87-MG and LN18 cells lines, undergo biological characterization, demonstrating that by using DEP-B as a carrier liquid, we sorted by SdFFF subpopulations with specific differentiation characteristics: F1 = differentiated cells / F2= CSCs. These sub-populations presenting high frequency crossover values similar to those measured for standard differentiated (around 110 MHz) and CSC (around 80 MHz) populations. This coupling appeared as a promising solution for the development of an online integration of these two complementary label-free separation/detection technologies.

III.2.1 Introduction

Cancer stem cells (CSCs) are a key point and rare cell type found within a solid tumor, they constitute 1 to 5% of the cells harboring the tumor niche.¹¹² CSCs are involved in three key processes that control tumor development.³⁸⁴ First, it has been proven that CSCs can be involved in the growth and development of a tumor mass, due to their multipotency and self-renewal properties that mean the capacity to generate copies of themselves while simultaneously producing different types of differentiated cells.^{100,489} Second, CSCs are also involved in metastatic dissemination. They are able to revert to an epithelial phenotype and thus promote tumor dissemination and metastasis in order to colonize distant organs.³⁸³ Third, CSCs are known to be quiescent, a feature that helps them avert death caused by chemotherapy and radiotherapy.⁴⁸⁷ This explains the fact that after initial reduction of the size of the tumor mass, cancer could be regenerated giving rise to relapses.^{104,489} CSCs are present in numerous solid tumors such as Glioblastoma (GBM)⁹⁶ and are responsible for tumoral heterogeneity due to their stemness properties.¹⁰⁴ Since CSCs play a key role in tumor initiation, invasion, metastasis and most importantly therapeutic resistance and therapy failure,^{100,112,383,384,487,488} the design and development of new CSC-targeted therapies are of prime importance.^{104,490} Thus, the CSC isolation is crucial for evaluating new therapeutic strategies. However, their characterization and isolation are still limited due to the small percentage of CSCs in the tumor niche or in the cell lines as well as their high plasticity.^{98,490}

Classical approaches in order to characterize CSCs are phenotypic based on membrane markers expression such as CD133⁴⁹¹ and CD44¹²³, intracellular or intranuclear markers expression such as Sox2⁴⁰⁵, Nanog⁴⁰⁸ and Oct4⁴⁰⁶. They can also be functional like colony forming assays and orthotopic xenograft model on immunosuppressed mice.⁴⁹² Because of their plasticity, CSCs are often identified using more than one marker.⁹³ However, phenotypic changes take place often because of this reversible aspect due to their stemness features; promoting therefore a continuous change in the expression of CSC markers.⁴¹⁵ For example, CD133 was focused on as a major Glioblastoma CSC marker to the point where if a cell is CD133+, it is automatically considered as a CSC.⁴⁹³ Other studies have proven that Glioblastoma CSCs are found to be CD133- but positive for other markers like Oct4 and Nanog, hence the need for a pool of markers in order to track down CSCs in a certain cell line.⁴⁹⁴ Cell-sorting technologies such as fluorescence activated cell sorting (FACS) and magnetic-activated cell sorting (MACS) are

mainly based on these markers to purify specific CSC subpopulations. However, the need of cellular labeling can induce functional changes consequently altering their stemness.¹¹²

In that way, label-free methods that ensure limited cellular changes in CSCs could be used. One of the most interesting label-free cell sorting methods is the now well-known sedimentation field-flow fractionation (SdFFF) technique.^{109,110,495} The SdFFF is a gentle and noninvasive technique.¹⁰⁹ The advantage that the SdFFF holds over other sorting techniques is the lack of need of immunolabeling.^{109,496,497} It relies on cell biophysical properties: size, density and rigidity. The cells are subjected in an empty ribbon-like separation channel (no stationary phase) to two types of forces (1) hydrodynamic lift forces generated by flowing a carrier liquid through the channel and (2) an external field applied perpendicularly to the flow direction.^{109,110,416} Cells are then eluted under the “Hyperlayer” elution mode, a size/density driven separation mechanism; that ensure a drastic limitation of cell-solid panel interactions.

The end-goal of our work is to investigate the implementation of a label-free method to isolate and characterize CSCs simultaneously, serving as a diagnostic and prognostic approach, based on SdFFF cell sorting. Nevertheless, to perform both cell sorting and population characterization, there is not yet a hyphenated detector like what exists for the asymmetric flow-field flow fractionation (AF4) and multi-angle light scattering (MALS) for entities at a nanoscale.^{498–500} Hence, after SdFFF cell sorting; the sub-populations of cells undergo offline biological characterizations. Even though they are effective for routine preparation of CSC from cell line and primary cell culture¹¹⁰; they are cost and time consuming, and not adapted for CSC isolated from highly variable and heterogeneous population for example patient derived tumor sample. To overcome this limitation, a hyphenation of the SdFFF with a label-free based biosensor as a post-sorting online characterizing detector was investigated.

A first step of the development of this solution was previously published¹¹⁰, that consisted of a combination approach of the SdFFF with a microwave dielectric spectroscopy technique. The latter is based on resonance disturbance principles, corresponding to the microwave range of the electromagnetic spectrum, and permits characterization of cell contents and a mean to discriminate and analyze cells. This technique discriminate between different subpopulations having opposite differentiation status by relying on their intrinsic intracellular dielectric permittivity.¹¹⁰ While SdFFF combined with a dielectric spectroscope proved its potential to sort and characterize subpopulations of Glioblastoma cell lines, this approach’s major limitation resides in the need of fixating cells before introducing them individually between electrodes in

a dry non-fluidic system.¹¹⁰ Therefore, the investigated dead cells can no longer be used in further analysis.

This the reason why we aim to improve the post SdFFF characterization on living cells, by combining SdFFF with a new Ultra High Frequency range Dielectrophoresis (UHF-DEP) biosensor.⁵⁰¹ UHF-DEP is a label-free, accurate, fast, and low-cost characterization method that uses the principles of polarization (in ultra-high frequency range from 50 MHz up to 600 MHz) and the motion of living cells in applied electric fields : DEP cell electro-manipulation inside a microfluidic device.⁵⁰¹ UHF-DEP characterization brings information about individual cell cytoplasm content own physical property (dielectric), without lyse nor implied denaturation. The DEP buffer (DEP-B) used as a carrier liquid for the UHF-DEP is osmotic sucrose-based survival buffer. Previously, two sub-populations of Glioblastoma cell lines, one enriched with CSCs by cultivating the cells in a gold standard define medium (DM) and another cultivated in a normal medium (NM) with high percentage of differentiated cells, were discriminated using the UHF-DEP.⁵⁰¹ The population with the high percentage of CSCs (in DM) exhibited lower high frequency crossover (HFC) values than that of a population with high percentage of differentiated cells (in NM). In this manner, we now consider the HFC or electromagnetic signature (EM) as a marker for CSCs discrimination, confirming the UHF-DEP biosensor's potential.⁵⁰¹

The foreseen target of this work is an online hyphenation of SdFFF and the biosensor. In this paper, we have to prove, via an offline coupling, the compliance between cell sorting by SdFFF and the characterization by UHF-DEP. In view of a future online hyphenation, it was logical to use from this point forward one common carrier liquid for both systems. The choice is made on the buffer compatible with the detector, DEP-B, which implies the validation of the elution conditions by SdFFF with DEP-B as a carrier liquid instead of the usually used phosphate buffer solution (PBS).¹¹⁰ After cell sorting by SdFFF with this new carrier liquid, cell sub-populations undergo biological characterizations, generating populations enriched or not in CSCs. The HFC values of each sub-population were measured by UHF-DEP by comparison to a gold standard. The HFC values of the SdFFF sub-population enriched in CSCs is similar to the reference population, proving the validity of this approach and the practical application of the future online hyphenation and its clinical relevance in the future.

III.2.2 Materials and methods

Schematic representations of the offline hyphenation of SdFFF and UHF-DEP biosensor are presented in Figure III.S1.

III.2.2.1 Cell culture

The human glioblastoma cell lines U87-MG and LN18 were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and grown under two conditions: NM (normal medium with fetal bovine serum [FBS]) and DM (define medium [serum-free]). The schematic representation of the experimental conditions is represented in Figure III.S2. The NM and DM compositions are previously described.¹¹⁰ Cell culture is conducted at a $500 \cdot 10^3$ density rate for 72h for U87-MG and $750 \cdot 10^3$ for 48h for LN18. After culture time, cells are dissociated using versene solution (Thermofisher scientific, France) and centrifuged at 300 g for 5'. Cells are then resuspended in DEP-B, an ion free osmotic medium TRIS buffer-based, composed by a water/sucrose mixture with magnesium chloride (pH: 7.4; conductivity: 26 mS/m) conventionally used for DEP experiments.⁵⁰¹ Cells are then counted using trypan blue (Sigma) exclusion and Malassez cell counting chamber. Volume is adjusted to obtain $2,5 \cdot 10^6$ cells per 1000 μ L.

III.2.2.2 SdFFF device and cell elution conditions

The SdFFF separation device used in this study was previously described.¹¹⁰ Optimal elution conditions were as follows: flow injection through the accumulation wall of a 100 μ L U87-MG and LN18 cell suspension (2×10^6 cells/mL). Flow rate: 1.0 mL/min. Carrier liquid: sterile DEP-B, pH 7.4 and conductivity 24 mS/m. External multigravitational field strength: 15 g for U87-MG (312.5 rpm) and 25 g for LN18 (402.5 rpm) \pm 0.2 g. Time dependent fraction collection: **F1**: 2'40" to 4'20" for U87-MG; and 2'30" to 4'45" for LN18. **F2**: 5'55" to 8'00" for U87-MG; and 8'30" to 12'00" for LN18. **TP** (total peak: fractions constituting the collection of the total eluted population (except the void volume, see figure III.2) as an internal control): 2'00" to 8'00" for U87-MG; from 2'00" to 12'00" for LN18. The **crude** population constitute the remaining unsorted cells suspension is used as the external control population. In order to obtain a sufficient quantity of cells for further analysis and subculture, consecutive (10 - 12 injections) SdFFF fraction collections were performed.

III.2.2.3 Tools and methodology for cell crossover frequency measurement

In this study we aim to characterize sub-populations of GBM cell lines subsequent to their sorting, by measuring their cross-over frequencies in the ultra-high frequency range. The measurement process was fully described previously.⁵⁰¹ It consists in submitting individual cell to a High Frequency electric field and monitoring under microscope, while tuning by signal frequency, the induced cell motion. When cells are submitted to negative DEP forces, they are repelled, to the contrary they are attracted by a positive DEP force. When the electric field frequency reaches the cell crossover frequency, the DEP force become null, and it can be measured from the optically observable cell change of motion behavior.

For the present study, a dedicated microfluidic chip has been used based on aluminum passivated microelectrodes forming a 90° quadrupole sensor (Figure III.1 A). This sensor has been implemented on [®]*IHP Innovations for High Performance Microelectronics* BiCMOS silicon technology substrate, diced into cm² chip and packaged with a Polydiméthylsiloxane (PDMS) cover to form a 200 µm wide and 40 µm high microfluidic channel above the sensor (Figure III.1C). As shown in figure III.1, led experiments were done using a 40×40µm gap electrodes design that combines a pair of thick electrodes (9 µm, see figure III.1A and III.S1B), that crossed the microfluidic channel width, with another pair of thin electrodes (0.45 µm, Figure III.1A) implemented in the middle of the channel where most of the cells flow (Figure III.1C). Such design allows generating an electric field gradient configuration presenting a very localized low magnitude field spot in the middle of the structure to the contrary with high magnitude barriers surrounded electrode edges (Figure III.1B simulated electric field insert). Hence properly biasing the left and right electrodes with a high frequency signal, whereas top and bottom ones are grounded, it is hence possible to form an efficient electrical trap to catch biological cells flowing in the main central channel part (Figure III.S1B). The sensor is biasing through 50-ohm (10µm wide) microstrip lines implemented under the PDMS cap until the chip edges thanks to a microwave signal generator (R&S®SMB100A) associated with a wide band amplifcator (Bonn Elecktrik BLWA 110-5M) able to generate high purity continuous wave signal with magnitude up to 10Vpp. For current experiment the typically magnitude of the applied voltage ranges between 2 and 4 Vpp.

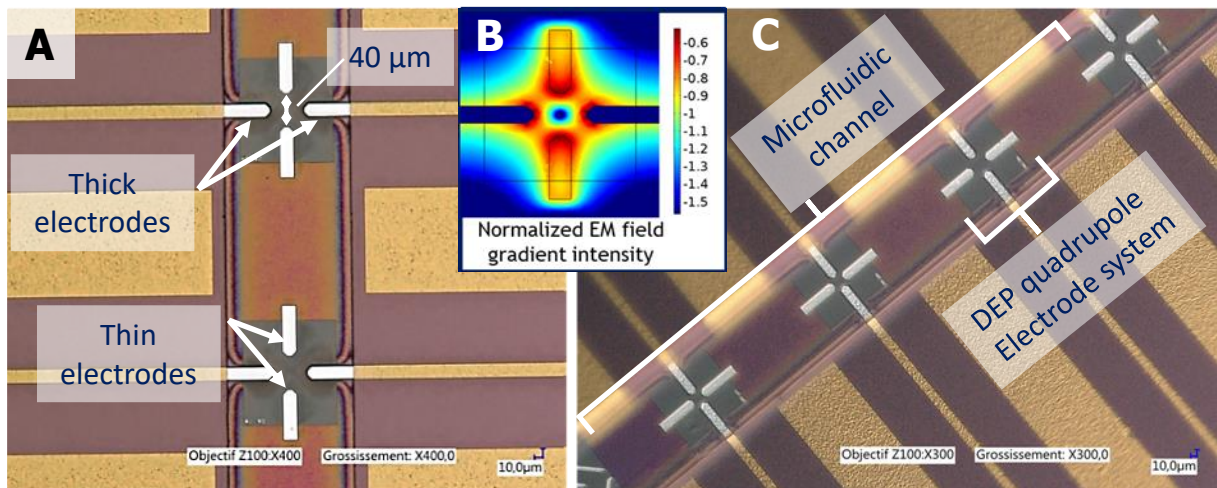


Figure III.1 UHF-DEP detector: **A:** Top view of quadrupole electrode sensor used for HFC frequency measurement. Two types of electrodes are present, thin (top and bottom) and thick (left and right), with a gap of 40 μm. **B:** simulated electric field into the Dep quadrupole electrode system. **C:** angle view through the PDMS cap of sensor array under PDMS cap implemented at the bottom of a microfluidic channel.

III.2.2.4 Cellular characterizations

A complete description of the phenotypical and functional characterization of cell subpopulations is shown in the Supporting Information (see SI-1 and SI-2).

Analysis of cell size using a Coulter counter: Cell size means of different populations are measured subsequent to SdFFF cell sorting.

RTqPCR: mRNA expression levels of CSC markers are evaluated in the different populations.

Soft agar clonogenic assay: a method used to test the ability of the cells to form clones in soft agar for CSCs are known to have high clonogenic properties by comparison to differentiated cells.

DNA cell cycle analysis: a method that most frequently employs flow cytometry to distinguish cells in different phases of the cell cycle: CSCs are known to be quiescent hence in the G1 phase whereas differentiated cells are proliferative and ready to undergo mitosis hence tend to be in the G2 phase.

III.2.2.5 Statistical Analysis

Statistical analysis was performed on three independent experiments using Prism graphpad. Analysis of variance (ANOVA), t student and Mann-Whitney tests were conducted to compare different conditions. P values of ≤ 0.05 were considered statistically significant.

III.2.3 Results and discussion

III.2.3.1 Methodological development of SdFFF cell sorting.

SdFFF with DEP-B as a carrier liquid

In the goal of combining SdFFF and UHF-DEP, which are two fluidic devices having each their own carrier liquid, we decided to use the detector compatible carrier liquid, the DEP-B, because UHF-DEP is not operational with PBS due to high content of salt whereas SdFFF could be investigated with either DEP-B or PBS as a carrier liquid.

Nevertheless, the use of DEP-B as carrier liquid for SdFFF, requires a new methodological development and validation step for SdFFF cell sorting. The presence of sucrose (8.5%⁵⁰¹) in the DEP-B medium leads to an important change in the elution profile of U87-MG and LN18 (Figure III.2), most likely due to the slight change in density (PBS: 1.0034 / DEP: 1.031). A better resolution of cell peak vs. dead volume peak, facilitating fraction collection, was observed (Figure III.2A and 2B). This is particularly true concerning U87-MG compared to previously published fractograms.¹¹⁰ These profiles also present reproducibility and repeatability with $CV < 5\%$ in terms of elution time. Finally, the cell viability throughout the conservation of cells in DEP-B remains higher than that observed in PBS for both cell lines. (see Table III.S1)

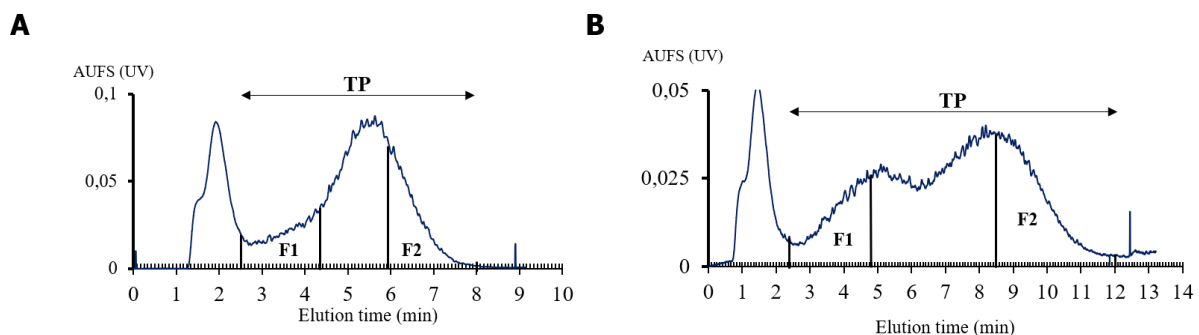


Figure III.2. SdFFF fractograms of cells cultured in NM prior to sorting: (A) U87-MG cell line, carrier liquid: sterile DEP-B; (B) LN18 cell line, carrier liquid: sterile DEP-B. Elution

conditions flow and field 1.0 mL/min and 15g or 25g for U87-MG and LN18 respectively. Time dependent fraction collections: see materials and methods section.

The usually described SdFFF elution mode for cells is the “hyperlayer” mode^{109,110,502,503} in which subpopulations of cells are focused into a thin layer at an equilibrium position in the channel thickness, depending on their biophysical properties: size and density as first-order parameters, along with shape and rigidity.⁴⁹⁵ Hyperlayer elution order is size- and density-dependent: larger and less dense cells are focused in the faster streamlines, and are consequently eluted first. The experimental retention ratio, R_{obs} (void time divided by retention time [t_0 / t_R], measured by the first moment method)⁵⁰⁴, was calculated to determine the average velocities and elution modes.

Under our elution conditions (see Material and Methods section), we obtained for both cell lines, fractograms with two (U87-MG) or three (LN-18) (Figure III.2A and 2B) major peaks, the first corresponding to non-retained species (void volume peak, $R_{obs} \approx 1$), and the second (and third) corresponding specifically to cell subpopulations with $R_{obs} < 1$. (see below)

Hyperlayer elution mode was first determined based on the field and flow rate dependence of R_{obs} .^{110,416,502,503} Then, at equivalent flow rates, the increase in field strength focused cells in slower stream lines, increasing retention and decreasing R_{obs} . In that way U87-MG shown a decrease in R_{obs} of 33% by increasing the field from 10 to 20g, and 13% for LN18 by increasing the field from 20 to 30g. This low difference could be explained by the fact that LN18 were eluted with higher field strength.

In hyperlayer elution mode, samples were lifted away from the accumulation wall, limiting harmful cell–surface interactions. By using the following equation⁵⁰⁵

$$s = \frac{R_{obs} \times \omega}{6}$$

in which ω is the channel thickness (175 μm), we calculated the value of s , the average distance from the center of the cell to the channel wall,⁵⁰⁵ which should be greater than the particle radius r , calculated from the mean cell diameter. The mean R_{obs} value calculated for U87-MG is 0.361 ± 0.004 , and 0.273 ± 0.004 for LN18, leading respectively to $s = 10.5 \mu\text{m}$ and $s = 8.0 \mu\text{m}$. These values appeared greater than the mean radius measured using coulter counter (see materials and methods) on the total peak population which are $8.0 \mu\text{m}$ for U87-MG and $7.0 \mu\text{m}$ for LN18.

Finally, the hyperlayer elution mode relies mainly on biophysical properties of the cell such as cell size and density.^{109,110,416,502} As described before, bigger and less dense, are eluted in first, whereas smaller and denser cells are eluted last. Subsequent to their sorting and fraction

collection (see Material and Methods section), the mean of sub-populations size was investigated using a Coulter Counter. The F1 fraction displayed a significantly higher size mean than that of the F2 fraction with a difference of $\Delta d = 1.9 \mu\text{m}$ for U87-MG (Figure III.3A) and $\Delta = 2.7 \mu\text{m}$ for LN18 (Figure III.S3A). Then according to the results of R_{obs} variation, s measurement and size variation, we can assume that cells are eluted under hyperlayer elution using DEP-B as a carrier liquid.

Nevertheless, a major change in the elution parameters, such as changing the mobile requires a series of biological characterization for both cell lines in order to validate the SdFFF's efficiency to sort CSCs.

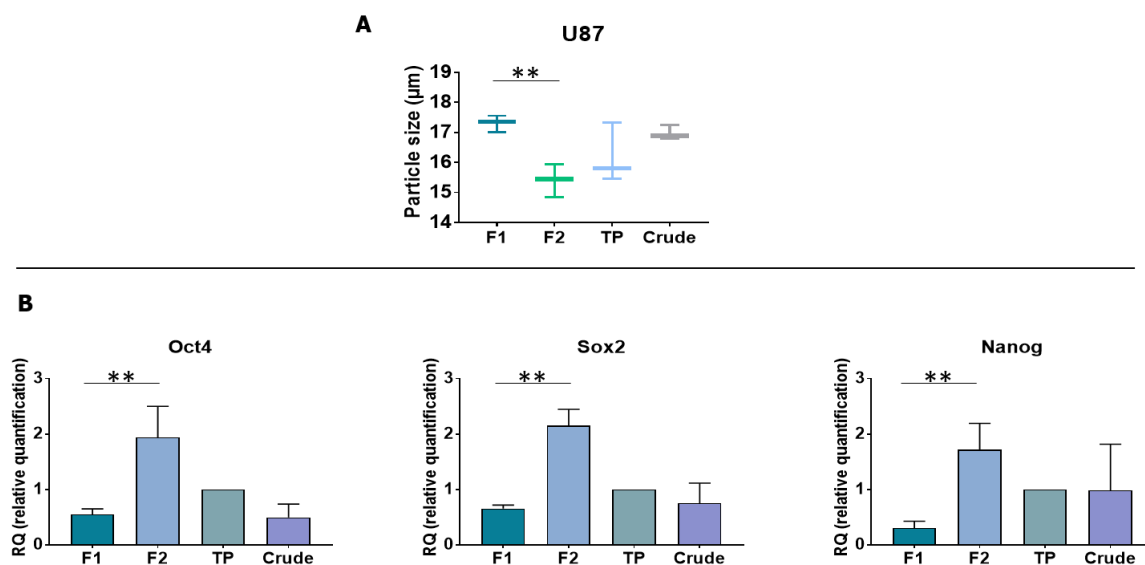


Figure III.3. Phenotypical characterizations of the different sub-populations of U87-MG sorted by SdFFF (A) Biophysical property: cell size analysis by coulter counter of post SdFFF populations (F1, F2, TP and crude) (B) Comparative analysis of gene expression of three CSCs markers: Oct-4, Sox2 and Nanog, in U87-MG cell line, of the post SdFFF populations (F1, F2, TP and Crude), measured by Real Time quantitative PCR (Polymerase Chain Reaction) and normalized compared to TP. (see SI-1) The p value was determined using t student test or Mann-Whitney test. ** represents p value < 0.01.

Phenotypical characterization

CSCs plasticity results in an intratumoral heterogeneity observed in solid tumors such as Glioblastoma.³⁸⁶ For this matter, evaluating the expression of one marker is not enough to conclude on stemness properties, but a pool of CSCs markers is mandatory. Many markers have

been identified to be overexpressed in CSCs such as the transcription factors Sox2⁴⁰⁵, Nanog⁴⁰⁸ and Oct4^{110,406}. This increase in expression is often evaluated at a transcriptomic level. Differential analysis of CSCs mRNA expression levels was assessed in the sub-populations F1 and F2 by RTqPCR for U87-MG and LN18 cell lines. All three CSCs markers (Oct4, Sox2 and Nanog) for U87-MG are significantly overexpressed in F2 enriched in undifferentiated cells compared to F1 enriched in differentiated cells: 3.5 folds higher in F2 than F1 for Oct4, 3.2 folds higher in F2 than F1 for Sox2 and 5.6 folds higher in F2 than F1 for Nanog (Figure III.3B, see Figure III.S3B for LN18). The overexpression of CSC markers confirms that F2 cell subpopulation is efficiently enriched in CSC.

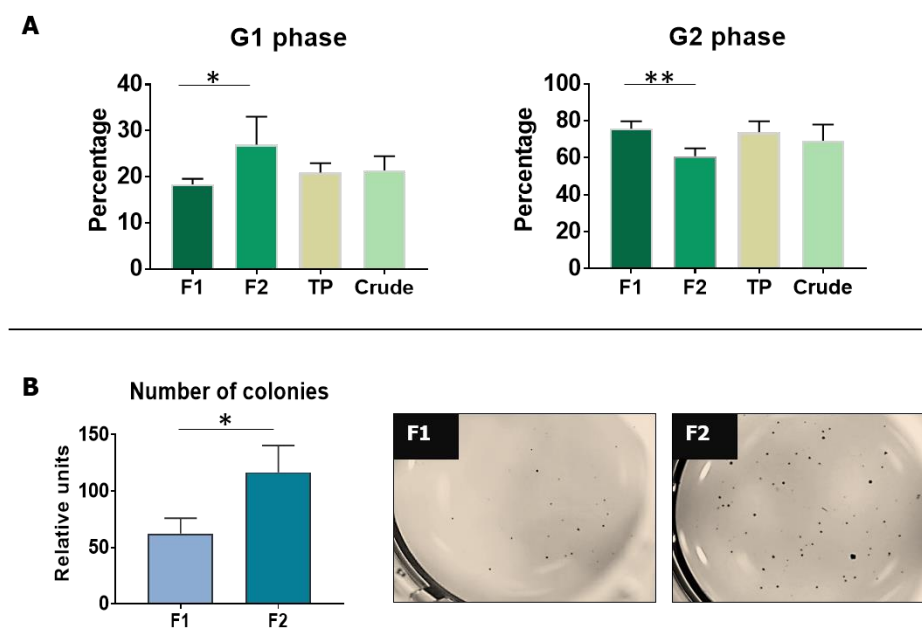


Figure III.4. Functional characterizations of the different sub-populations of U87-MG sorted by SdFFF (A) Cell cycle analysis by DNA content measurement: showing that CSCs (F2), the quiescent cells, are more likely found in the G1 phase, vice versa to differentiated cells. (B) Soft agar assay for colony formation examination evaluating the sub-populations capacity to form clones when cultured in soft agar (see III.SI-2) The p value was determined using t student test. ** represents p value < 0.01 and * represents p value < 0.05

Functional characterization

CSCs tend to remain quiescent within the tumor niche so they can maintain their multipotency, consequently the main source supplying tumor growth.^{506,507} For this matter, CSCs are often found at the G1 phase of the DNA cell cycle, also known as the quiescence phase. Whereas

differentiated cells, the more mature and readier to proliferate, are found at the G2 phase, also known as the growth phase.³⁹² Our DNA cell cycle analysis showed a higher tendency for the U87-MG F1 sub-population to be in the G2 phase of the cell cycle, while the U87-MG F2 sub-population enriched in CSCs is found to be in the G1 phase (Figure III.4A, see Figure III.S3C for LN18). This confirms that we have managed to isolate and enrich a sub-population of cells having high stemness characteristics as revealed transcriptomic and cell cycle analysis.

CSCs have the capability to form an important quantity of colonies due to their self-renewal properties.⁴⁹² Soft agar colony formation assay is considered as one of the most rigorous and effective techniques for evaluating this capability *in vitro*⁴²¹ and characterizing stemness properties of cells.⁵⁰⁸ Our soft agar assay shows that the U87-MG F2 sub-population managed to form a high number of colonies within 30 days of culture in soft agar, therefore exhibiting a stem-like behavior unlike U87-MG F1 (Figure III.4B, see Figure III.S3D for LN18). This test validates the functional aspect of the CSCs population.

This series of biological characterization proves that, after cell line culture in NM, the F2 sub-population, consists of a population of cells enriched in CSCs, whereas the F1 sub-population is enriched in differentiated cells for both U87-MG and LN18 cell lines. Therefore, the SdFFF is validated as a cell sorting label free method using DEP-B as a carrier liquid instead of PBS.

III.2.3.2 Cell characterization with UHF-DEP biosensor subsequent to their sorting

Crossover frequencies of GBM cells cultured in NM before SdFFF

The SdFFF technique has proven its potential to isolate a population enriched in CSCs using the DEP-B as a carrier liquid. In order to validate the possibility of an association between SdFFF and UHF-DEP, the sub-populations (F1, F2), TP and crude of the two GBM cell lines, U87-MG and LN18, were characterized by measuring their HFC values with UHF-DEP. The HFC considered, corresponds to the frequency at which the trapped cell begins to move away from the center of the quadrupole electrodes. (see figure III.S2 for abbreviations and experimental conditions)

In previous work, it has been demonstrated that the more the population is enriched in CSCs, the lower the HFC values of the cells are, by comparison to differentiated cells cultured.⁵⁰¹ In a same way, we cultured in this study the two glioblastoma cell lines (U87-MG/LN18) in normal medium (NM) and in the define medium (DM) known to enrich the population in CSC.

First, the sub-populations of U87-MG and LN18 cultured in NM sorted by SdFFF with DEP-B were characterized by UHF-DEP biosensor. As shown in Figure III.5A and Table III.S2, for

U87-MG, the median HFC value of the F1 sub-population (U87-MG F1 NM) is similar to that of the unsorted cells cultured in NM (U87-MG NM) (respectively 103 MHz and 111 MHz). Whereas the median HFC value of the F2 sub-population (U87-MG F2 NM) is similar to that of the unsorted cells cultured in DM (U87-MG DM) (respectively 81 MHz and 85 MHz). Similar results were observed in Figure III.S4 and Table III.S2, with LN18 where the median HFC value of the F1 sub-population (LN18 F1 NM) is similar to that of the unsorted cells cultured in NM (LN18 NM) (respectively 109 MHz and 119 MHz). Whereas the median HFC value of the F2 sub-population (LN18 F2 NM) is similar to that of the unsorted cells cultured in DM (LN18 DM) (respectively 74 MHz and 77 MHz).

This finding indicates that the sub-populations F1 and F2 sorted by SdFFF with DEP-B as a carrier liquid, exhibited crossover frequencies respective of differentiated cells for F1 and CSCs for F2. These results obtained with an offline approach, validate the relevance of an online hyphenation of SdFFF as a cell sorting technique and UHF-DEP as a post sorting detector.

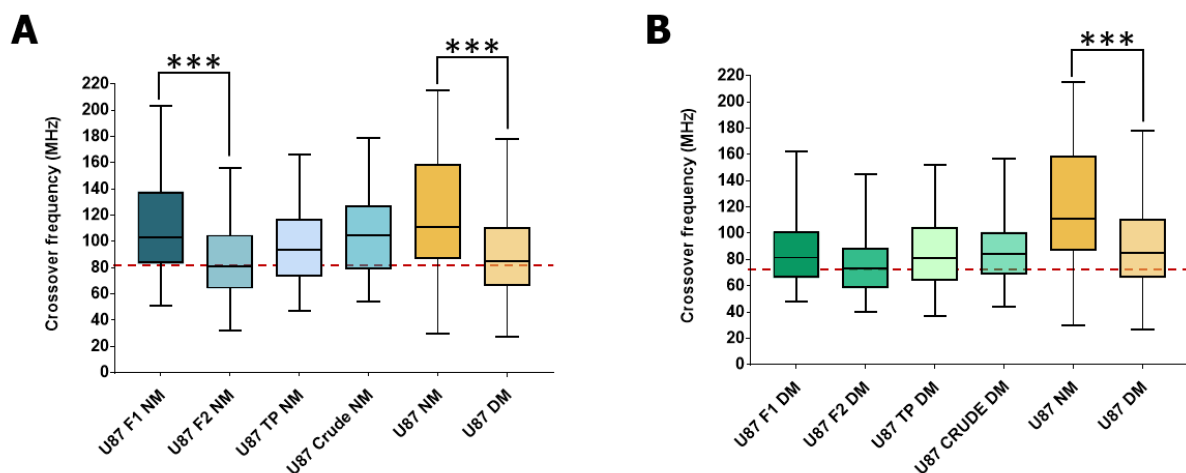


Figure III.5. Graphic box plots representation of the high frequency crossover values of U87-MG cells (A) cultured in NM and sorted by SdFFF (U87 F1 NM and U87 F2 NM); (B) cultured in DM and sorted by SdFFF (U87 F1 DM and U87 F2 DM). Cells cultured in NM and DM without sorting (U87 NM and U87 DM). The red threshold represents the median of U87-MG F2 NM. The p value was determined using One-way ANOVA test. *** represents p value < 0.001.

Thus far, all of these characterizations have been done on cells cultured in NM prior to their sorting by SdFFF with DEP-B. However, as previously done¹¹⁰, we wanted to examine the possibility of purifying even further the population of CSCs, by cultivating the cells in DM,

sorting the population with SdFFF and finally characterizing the generated sub-populations by UHF-DEP. Both cell lines were cultured in DM for 6 days, and then sorted by SdFFF with DEP-B (see figure III.S5)

The median HFC value of the F1 sub-population post DM culture (U87-MG F1 DM) is 81.5 MHz and of the F2 sub-population post DM culture (U87-MG F2 DM) is 73 MHz. Both HFC values are very close to that of the previously measured U87-MG F2 NM population (81 MHz) (Figure III.5B, see Table III.S2). This result was expected because even before cell sorting, the entire population was highly enriched in CSCs because of the DM, therefore both sub-populations are equally enriched in CSCs. Similar results were obtained with LN18 where the median HFC value of LN18 F1 DM is 80 MHz and LN18 F2 DM is 72 MHz, similar to that of the unsorted cells cultured in DM (LN18- DM) with a median of 77 MHz (see Figure III.S4 and Table III.S2).

These results indicate that the SdFFF has successfully managed to purify to the highest extent a sub-population enriched in CSCs. It conveys a population sorted by SdFFF and characterized by UHF-biosensor without the need of a DM for CSCs enrichment. In addition, the NM conserves the heterogeneity of the CSCs population. The clear advantage that was observed is that the cells cultured in NM maintain a high viability rate (95% for U87-MG and 93% for LN18) after SdFFF cell sorting with UHF-B, whereas cells cultured in DM before SdFFF are subjected to highly stressful conditions that result in a significant decrease in cell viability (60% for U87-MG and 40% for LN18). The preservation of this high viability of CSCs after normal elution conditions by SdFFF, opens the door to a wide variety of applications, most importantly the design of diagnostic approaches, targeted therapies and a deeper understanding of CSCs in general.

III.2.4 Conclusion

Unlike other types of FFF separation techniques, the SdFFF used as a cell sorter lacks an online label-free characterization. In previous studies, an association between SdFFF and a label-free detector has been investigated.¹¹⁰ This approach failed to maintain cell viability after characterization. For this matter, in this study, we aimed to investigate a possible association between SdFFF and a microfluidic label-free biosensor in the ultra-high frequency range. Both SdFFF and UHF-DEP biosensor have individually proven their potential to respectively sort and characterize cells without labeling while maintaining high cell viability. First, this coupling required a compatibility investigation between both techniques that revealed the need of a methodological development of SdFFF in order to adapt to the detector. By unifying the carrier liquid for a DEP-B compatible medium, our work has shown that the SdFFF was capable of sorting two sub-populations of glioblastoma cell lines having opposite states of differentiation. All the physical and biological parameters studied (phenotypical and functional) proved the enrichment of CSCs in the F2. The high frequency crossover values of the sub-populations subsequent to FFF sorting showed a unique HFC to each population similar to that of gold standard measurements. This study aims to prove the feasibility and re-adaptation of the separation method to be compatible with the detection method. These two label-free techniques allowed cell separation on the basis of orthogonal properties: size, density, shape, rigidity for FFF; and the dielectrophoretic properties for UHF-DEP, for the diagnostic management of complex tumor populations originating from the patient. In the context of an application using patient derived cells, it is practically impossible to use a gold standard medium such as the DM to enrich the population in CSCs. Therefore, an online device SdFFF/UHF-DEP is inevitable for these sorts of applications and analysis. An ongoing development consists of determining the setting up of one single fast, low cost and effective tool that enhances the evaluation of CSCs in tumors opening the door to novel diagnostic, prognostic and theranostics approaches.

III.2.5 Supplementary information

III.S1: Phenotypical characterization

Analysis of cell size using a Coulter counter: A Multisizer 4e Coulter counter (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) was used to determine the mean cell diameter in a population. Cells were diluted in Isoton® to a final volume of 15 mL. The sample volume was 500 µL, and the results of three successive assays were combined. Results are displayed as means ± standard deviation of three independent experiments.

Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction (RTqPCR): RNA isolation from cells was performed with RNeasy Mini Kit (# 74106; QIAGEN, Germany). After quantification, 2µg of total RNA was reverse transcribed with a high-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). qPCRs on 100 ng of cDNA were performed with Premix Ex Taq™ (#RR39WR, TaKaRa®) on QuantStudio 3 real-time thermal cycler (Applied Biosystems) with TaqMan™ probes for each reaction. Reactions were performed in triplicate from each biological replicate. Relative gene expression was quantified using Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) as house-keeping gene. The $\Delta\Delta C_t$ quantitative method was used to normalize expression of the reference gene and to calculate the relative expression levels of target genes. Probes used for quantitative RT-qPCR :

Gene	Supplier	Reference
GAPDH (GAPDH)	Thermofisher	Hs02758991_g1
NANOG (Nanog)	Thermofisher	Hs02387400_g1
POU5F1 (Oct4)	Thermofisher	Hs00999634_gH
SOX2 (Sox2)	Thermofisher	Hs01053049_s1

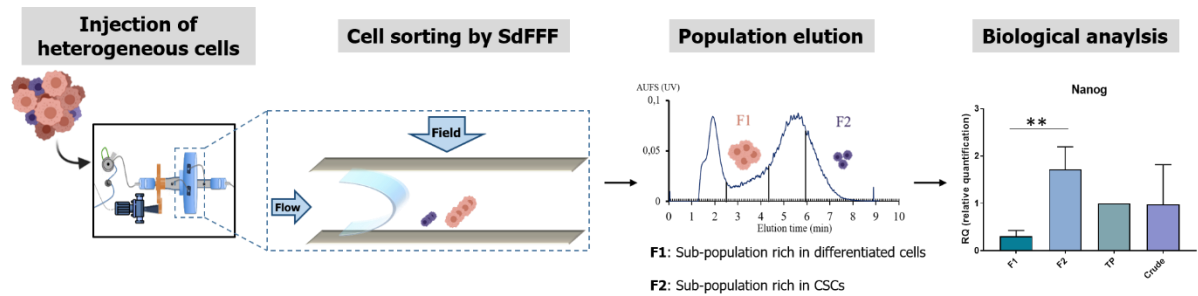
III.S2: Functional tests

DNA cell cycle analysis: Cells are centrifuged at 1000 RPM for 10 min. Supernatant is eliminated, and pellet is suspended with 1 mL of cold PBS (Thermofisher scientific, France). Another centrifugation and resuspension are done for washing purposes. After wash and elimination of the supernatant, cells are suspended with 300 µL of cold PBS, followed rapidly by 700 µL of -20°C Ethanol. Solutions containing the cells are put at 20°C overnight. The following day, tubes are left on RT for several minutes, and then centrifuged at 1500 RPM for 5 min. Supernatant is discarded with a micropipette to prevent the loss of the pellet. Wash is repeated three times. After wash, cells are suspended with 500 mL PBS. 60 µL of RNase A

(Sigma Aldrich) are added. Tubes are then left for 20 min at RT. 50 μ L of propidium Iodide (Sigma Aldrich) were added and then DNA cell cycle were analyzed by flow cytometry.

Soft agar clonogenicity assay: Wells of a 24 wells plate are coated with 200 μ L of 1% agar agar (BD Diagnostics). Cells were then mixed with 0.6% agar agar in a concentration of 1000 cells per 200 μ L that are then added to coated wells. Once the agar is hard enough, 200 μ L of complete DMEM cell culture media were added to each well. Culture maintenance was done every 72h. After 30 days of culture, clone reveal was done by performing a crystal violet staining. The culture medium is removed and 200 μ L of PFA 8% were added in each well for 10 min at RT. 5 μ L of 1% crystal violet (Hopkin and Williams, Chadwell health, Essex, England) are then added for 10-15 min at RT. Several washings were then done until the crystal violet is severely diluted and only the clones are visible. Images of the wells were then taken by a fluorescence stereo zoom microscope (LEICA MZFLIII, Wetzlar, Germany), and images were analyzed by ImageJ.

A. SdFFF cell sorting technique



B. UHF-DEP crossover frequency measurement

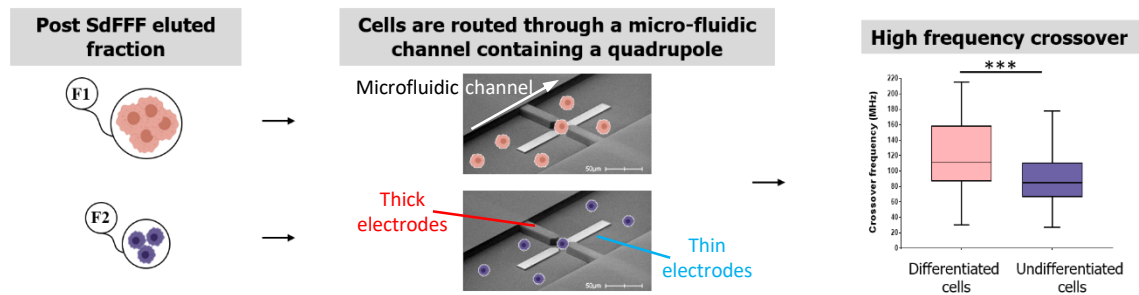


Figure III.S1: Schematic representations of both technique's offline coupling: A. The SdFFF cell sorting of glioblastoma cell lines: F1 (differentiated cells) and F2 (cancer stem cells). B. The UHF-DEP biosensor measuring, in a micro-fluidic chamber, the high frequency crossover of each cell trapped thanks to a quadrupole electrode microsystem. ** represents p value < 0.01 and *** represents p value < 0.001

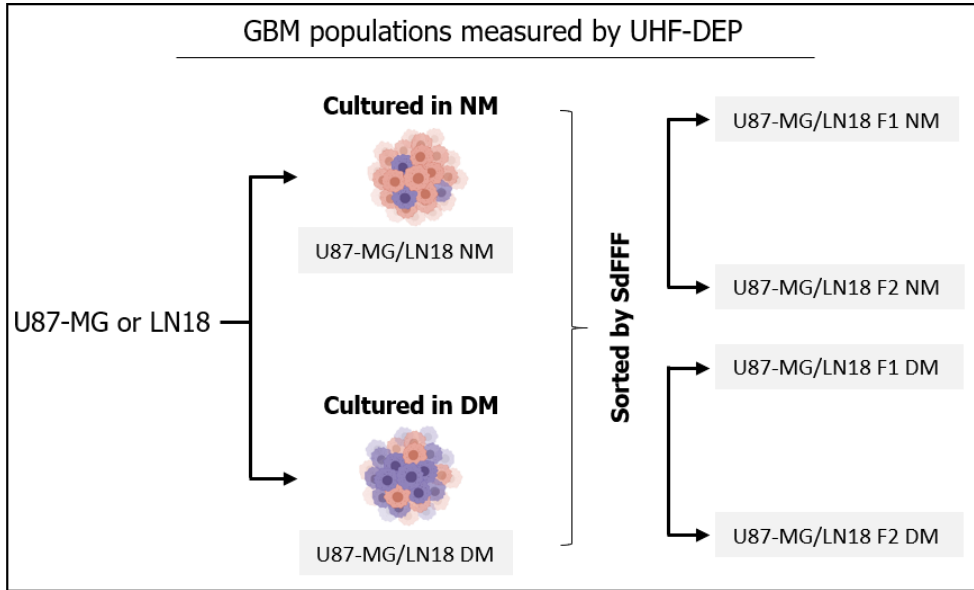


Figure III.S2: Schematic representation of the experimental conditions and abbreviations in corresponding mediums.

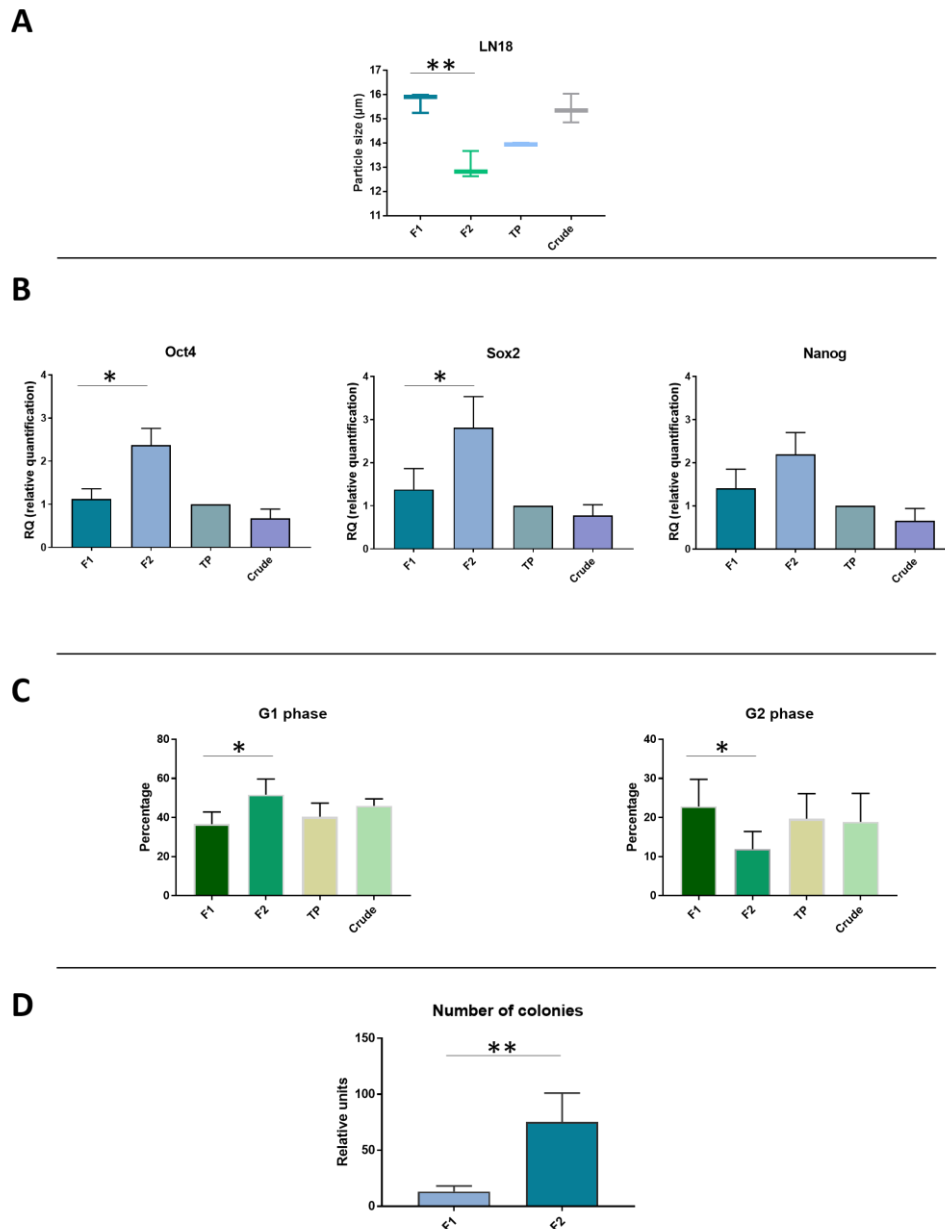


Figure III.S3: Phenotypical characterizations of the different sub-populations of LN18 sorted by SdFFF (A) Biophysical property: cell size analysis by coulter counter of post SdFFF populations (F1, F2, TP and crude) (B) Comparative analysis of gene expression of three CSCs markers: Oct-4, Sox2 and Nanog, in LN18 cell line, of the post SdFFF populations (F1, F2, TP and Crude), measured by Real Time quantitative PCR (Polymerase Chain Reaction). Functional characterizations of the different sub-populations of LN18 sorted by SdFFF (C) Cell cycle analysis by DNA content measurement: showing that CSCs (F2), the quiescent cells, are more likely found in the G1 phase, vice versa to differentiated cells. (D) Soft agar assay for colony formation examination evaluating the sub-populations capacity to form clones when cultured in soft agar. The p value was determined using t student test. ** represents p value < 0.01 and * represents p value < 0.05.

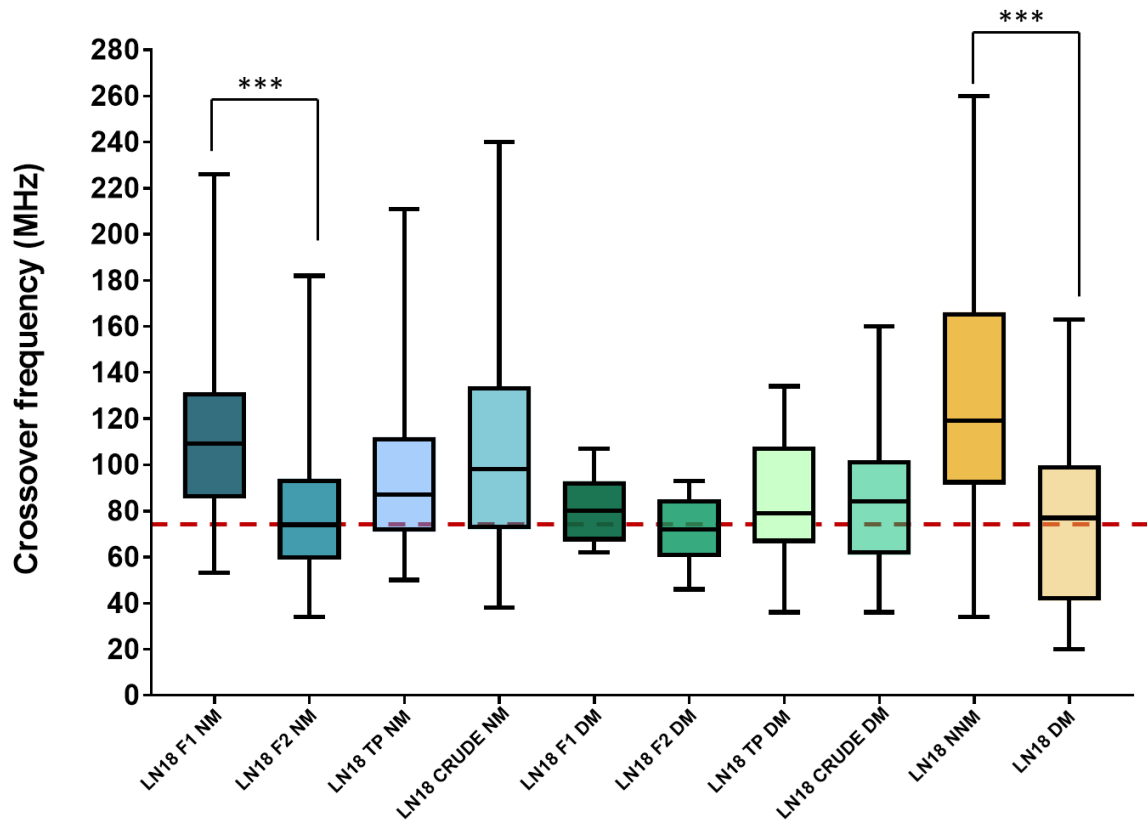


Figure III.S4: Graphic box plots representation of the high frequency crossover values of LN18 cells cultured in NM and sorted by SdFFF (LN18 F1 NM and LN18 F2 NM), cultured in DM and sorted by SdFFF (LN18 F1 DM and LN18 F2 DM), cells cultured in NM without sorting (LN18 NM) and cells cultured in DM without sorting (LN18 DM). The red threshold represents the median of LN18 F2 NM. *** represents p value < 0.001

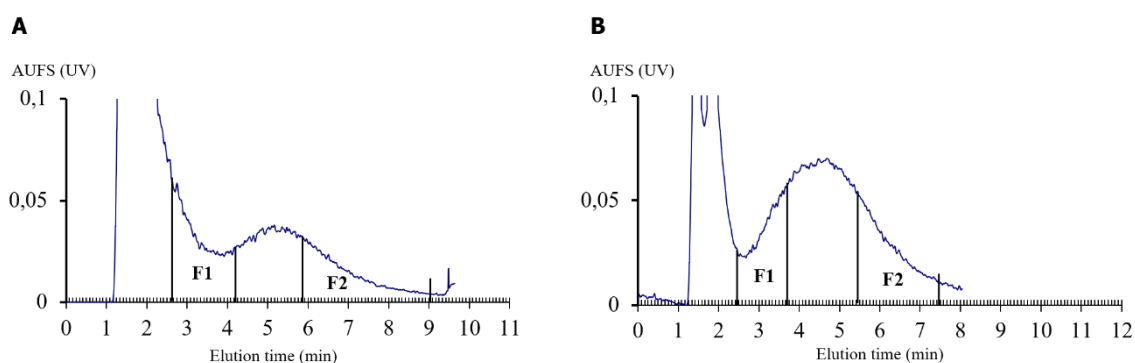


Figure III.S5: SdFFF fractograms and elution conditions for U87-MG and LN18 cells cultured in DM prior to sorting: (A) U87-MG, 100 μL , 2.5×10^5 cells; flow rate: $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (sterile DEP-B), external multigravitational field: 15g. Time dependent elution time: F1: 2'40'' till 4'10'', F2: 5'55'' till 9' (B) LN18, 100 μL , 2.5×10^5 cells; flow rate: $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ (sterile DEP-B), external multigravitational field: 25g. Time dependent elution time: F1: 2'30'' till 3'45'', F2: 5'30'' till 7'30''. Spectrophotometric detection at $\lambda=254 \text{ nm}$. AUFS: arbitrary unit full scale. Time dependent fractions elution times are described in materials and methods.

Table III.S1: Viability percentage of U87-MG and LN18 in PBS vs DEP-B after 2 hours of exposure executed by trypan blue exclusion.

U87-MG	
PBS	83.3%
DEP-B	94.34%
LN18	
PBS	78.9%
DEP-B	92.59%

Table III.S2: Summary of high frequency crossover values (in MHz) of U87-MG and LN18 cell.

HFC in MHz					
Cell population	Average	Median	Cell population	Average	Median
U87-MG NM	119	111	LN18 NM	128	119
U87-MG F1 NM	111	103	LN18 F1 NM	113	109
U87-MG F2 NM	84	81	LN18 F2 NM	80	74
U87-MG TP NM	97	93.5	LN18 TP NM	96	87
U87-MG Crude NM	104	104.5	LN18 Crude NM	107	98
U87-MG DM	91	85	LN18 DM	76	77
U87-MG F1 DM	86	81.5	LN18 F1 DM	80	80
U87-MG F2 DM	76	73	LN18 F2 DM	73	72
U87-MG TP DM	85	81	LN18 TP DM	83	79
U87-MG Crude DM	86	84.5	LN18 Crude DM	83	84

Chapitre IV : Un système 3D reproductible

IV.1 Introduction

La culture 3D permet de rétablir la complexité du réseau de la MEC perdu en 2D, afin d'avoir un comportement cellulaire plus réaliste en termes de morphologie, activation/inhibition des voies de signalisations intracellulaires, interactions cellules-cellules et cellules-MEC. L'objectif de cette étude est de concevoir un système 3D reproductible, dont les éléments constitutifs de sa construction (système 3D et modèle cellulaire) sont maîtrisés. Dans le chapitre 2, nous avons exposé que le BA 0,25% w/v, est un hydrogel à base de molécules gélifiantes de bas poids moléculaire formé par autoassemblage supramoléculaire obtenu par des interactions faibles (de types liaisons hydrogènes, π -stacking, liaisons de Van Der Waals, etc.). D'une part cet hydrogel possède des propriétés physico-chimiques nécessaires pour une culture 3D comme une architecture fibrillaire mimant la structure de la MEC, ce qui permet d'établir des interactions cellules-cellules et cellules-MEC important pour avoir un comportement similaire à celui *in vivo*. Il possède une viscoélasticité de 0,4 kPa, ce qui correspond au tissu cérébral (0,1 à 1 kPa), et est donc convenable pour la lignée cellulaire U87-MG de Glioblastome. D'autre part, la culture de la lignée U87-MG a montré une conservation de la viabilité des cellules durant 35 jours de culture, ainsi qu'une prolifération cellulaire et une organisation spatiale. Les approches de culture 3D ont montré le développement de sphéroïdes au jour 35, mais la cinétique de croissance ainsi que les tailles des sphéroïdes n'étaient pas répétables.

Grâce à nos collaborateurs de l'équipe ARNA, le protocole de conception de l'hydrogel est maîtrisé et il présente une reproductibilité en termes de propriétés physico-chimiques. En effet, l'objectif est d'avoir des MCTS en 3D reproductibles afin de proposer un système qui permette d'évaluer de manière fiable les impacts de différents types de particules (surtout les nanoparticules de l'environnement dans cette étude) et ainsi de corrélérer les résultats obtenus à l'impact des particules et non pas à l'hétérogénéité du système.

Nous avons donc décidé de remplacer la population hétérogène de la lignée U87-MG par une population enrichie en CSCs. Ces dernières possèdent les caractéristiques clés comme l'auto-renouvellement et la multipotence, qui permettent *in vivo* d'assurer une initiation tumorale et soutenir le développement cellulaire en sphéroïdes tumoraux multicellulaires. Donc il est primordial d'isoler la sous-population de CSCs à partir de la population hétérogène de GBM. Pour faire cela, nous avons eu recours dans le chapitre 3 à la SdFFF qui permet de trier des sous-populations sans marquage immunologique tout en préservant les propriétés phénotypiques et fonctionnelles propres au caractère souche. Après caractérisation des sous-populations cellulaires post SdFFF, nous avons démontré que nous obtenons une sous-

population riche en cellules différenciées et une sous-population riche en CSCs. Cette dernière possède des caractéristiques importantes et absentes dans la sous-population de cellules différenciées comme la surexpression de certains facteurs de transcription (Sox2, Oct4 et Nanog) qui sont considérés comme des marqueurs de CSCs, et un fort potentiel de clonogénicité par rapport aux cellules différenciées ce qui souligne le critère d'auto-renouvellement propre aux CSCs.

Alors les deux éléments cibles, pour essayer d'élaborer un modèle 3D reproductible, sont prêts pour les études de culture 3D : l'hydrogel BA 0,25% w/v et la sous-population de CSCs. Ce chapitre est présenté sous forme d'article intitulé "Design of reproducible 3D systems : uniform-sized tumor spheroids based on cancer stem cells in a supramolecular hydrogel". (En cours de préparation pour une soumission envisagée dans le journal "Cell Proliferation")

Nous comparons dans la partie suivante la culture d'une population hétérogène (TP) correspondant la lignée cellulaire ayant subi le procédé SdFFF mais sans avoir été triée considéré comme contrôle (Figure IV.2), à une sous-population de cellules différenciées et à une sous-population de CSCs. Nous soulignons en premier lieu les différences de cinétique de croissance, de la viabilité et de l'organisation spatiale. En deuxième lieu, nous effectuons des études d'activité métabolique par test MTT, afin de mettre en évidence la différence des propriétés intrinsèques des populations étudiées durant le temps de culture. Enfin, étant donné que les MCTS formés miment la structure interne des tumeurs solides *in vivo*, ils possèdent également une structure en multicouches (couche périphérique proliférative, couche intermédiaire quiescente et un centre hypoxique contenant des pools de CSCs). Afin de souligner ce caractère multicellulaire des MCTS, nous exécutons des imageries à l'intérieur des sphéroïdes en essayant de montrer un gradient de prolifération ainsi qu'une reconstruction spatiale.

IV.2 Design of reproducible 3D systems: uniform-sized tumor spheroids based on cancer stem cells in a supramolecular hydrogel

Tarek Saydé^{1,2,‡}, Omar El Hamoui^{2,3‡}, Philippe Barthélémy², Gaëtane Lespes³, Bruno Alies², Karen Gaudin², Serge Battu¹

1. EA3842-CAPTUR, GEIST, Faculté de Médecine, Université de Limoges, 2rue du Dr Marcland, 87025 Limoges Cedex, France
2. Université de Bordeaux, INSERM U1212, UMR CNRS 5320, F-33076 Bordeaux, France.
3. Université de Pau et des Pays de l'Adour (E2S/UPPA) CNRS, Institut des Sciences Analytiques et de Physico-Chimie pour l'Environnement et les Matériaux (IPREM), UMR 5254, 2 Avenue Pierre Angot, 64053 Pau Cedex, France

‡ These authors contributed equally to the paper as first authors

* Corresponding authors: karen.gaudin@u-bordeaux.fr , serge.battu@unilim.fr

Abstract: The conception of a 3D system relies mainly on a well-defined 3D scaffold and a characterized cellular model. Supramolecular hydrogels based on low molecular weight gelators consist of mastered 3D scaffolds that mimic the architecture of the extracellular matrix (ECM) by creating an intrinsic fibrillar network in which cancer cells could develop into multicellular tumor spheroids (MCTS) representative of *in vivo* tumors. However, the reproducibility of the spheroids generated in the hydrogel in terms of size and growth kinetics remains a challenge. In this study we evaluate for the first time the 3D culture of a sub-population of cancer stem cells (CSCs) of a Glioblastoma cancer cell line (U87-MG) in a supramolecular hydrogel BA 0,25% w/v having a viscoelasticity of 0.4 kPa in the range of the cerebral one (0.1 to 1 kPa). CSCs are rare but have the ability of self-renewal and multipotency that allow them to generate fully grown tumors from a small number of cells *in vivo*. However, they remain in low proportions in cancer cell lines, therefore we resorted to cell sorting by sedimentation field-flow fraction (SdFFF) in order to isolate CSCs without hindering their intrinsic biological properties. Our results show that CSCs were able to generate reproducible uniform-sized spheroids (350 μ m +/- 30) from CSCs in the hydrogel, with repeatable growth kinetics. Therefore, the platform generated is mastered and reproducible opening the door to a variety of applications in therapy, toxicity assays etc.

IV.2.1 Introduction

Cell culture is a fundamental method used in drug therapy assays, research in oncology, regenerative medicine and stem cells studies.^{1,12,55,509} During the last decade, there is a shift observed from applying conventional two-dimensional (2D) cell culture to the use of three-dimensional (3D) cell culture. The latter provides compelling evidence in being a worthy, easy to use and low cost *in vitro* model.⁵⁰⁹ 3D cell culture recapitulates realistic cellular morphology, the *in vivo* cell-to-cell and cell-to-matrix interactions.^{6,8} Thus, the applications of these 3D models are witnessing an increase, notably in biological and medical research; and they are becoming an alternative for the use of animal models who present many challenges in ethical, financial and scientific controversies.^{26,510}

In cancer research, 3D models consisting of cancer cells present in a 3D scaffold, allow to mimic the physic-chemical properties of the physiological extracellular matrix (ECM).^{80,337} As a result cancer cells behave in the same manner as *in vivo*, which means they develop into multicellular tumor spheroids (MCTS) representative of solid tumors.^{30,511,512} These models are useful for a wide variety of applications,⁸⁰ especially in oncology, understanding cancer progression, for drug design in personalized medicine, to study the impact of therapeutic nanoparticles as drug vectors etc.

When a therapeutic molecule is being tested for its anti-cancer properties on a 3D *in vitro* model for example, the experiment consists of depositing the molecules on different tumor spheroids cultured in different wells to ensure repeatability of the therapeutic effect. Therefore, the spheroids should be uniform in size and spatial organization prior to molecule impact. So, if there is a reduction in tumor mass observed, it could be correlated to the impact of the molecule and not to the heterogeneity of the 3D system.

Three key compounds should be well considered for a successful 3D culture: The culture method, the 3D scaffold and the cellular model. Several studies have shown that controlling the evolution of spheroid progression and obtaining uniform-sized spheroids is not an easy task.^{377,379–381,513} Several culture methods were developed in order to produce 3D tumor spheroid models like hanging drops^{27,514}, spinner flask or rotary cell vessel^{2,20} etc. Nevertheless, these methods show very low spheroid generation yield together with high variability in size and morphology of the spheroids. Therefore, they were replaced with more efficient approaches such as ultra-low attachment plates, microfluidic systems, microarrays etc.^{379–381} Even though these methods allow the generation of uniform-sized aggregates they either do not recapitulate

the complex ECM-like architecture therefore the cellular behavior cannot be correlated to realistic *in vivo* cellular response or most importantly present technical challenges in terms of handling, maintenance, uniformity and automation therefore post culture assays cannot be easily performed.³⁷⁹⁻³⁸¹

It is also important that the 3D scaffold answers to key characteristics such as retaining a fibrillar ECM-like structure and easy handling for assays in subsequent experiments. It will allow to easily recreate the 3D network in a repeatable manner that will influence the reproducibility of the cellular development within the 3D scaffold. In fact, all these studies focus on the 3D culture methods to achieve size and morphology reproducibility instead of the cellular model itself. However, we hypothesize that the heterogeneity observed in the size and morphology of the spheroids during and at the end of the 3D culture is due to the heterogeneity of the cellular model implemented at the beginning of the 3D culture.

Therefore, the implementation of a homogeneous population having specific tumor initiation properties could help overcome this obstacle. In fact, cancer stem cells (CSCs) are a very rare sub-population found in cancer cell lines in low proportions (1-5%).¹¹² CSCs possess two key characteristics: the high ability of self-renewal also defined by a low proliferation rate and their multipotency that gives rise to a subset of phenotypically heterogeneous cells.^{99,100,488} They play a key role in tumorigenesis processes⁵¹⁵ due to their ability to initiate and sustain tumor development³⁸⁴ and for being the main cause for drug resistance.⁴⁸⁷ Consequently, CSCs are known as tumor initiating cells.¹⁰¹ They are therefore good candidates for cell culture aimed at the development of spheroids.

During a 3D culture experiment, a precise number of cells are implemented in each well with no control over the proportion of differentiated cells and CSCs. Therefore, the heterogeneous populations implemented in each well are phenotypically variable in an intra and inter experiment manner.

Could the implementation of homogeneous populations with controlled phenotypical properties in a 3D scaffold help acquire uniform-sized spheroids with a reproducible size and morphology evolution? To answer this question, we aim in this study to perform for the first time a 3D culture of two different populations of a GBM cell line in a supramolecular hydrogel: a sub-population of differentiated cells and a sub-population of CSCs. GBM is a heterogeneous tumor, containing CSCs in its core region. In GBM cell lines such as U87-MG that will be used in this study, CSCs are found in very low proportions (<5%), therefore cell sorting of CSCs is inevitable.

To reach this goal, on one hand, sub-populations must be sorted first from the heterogeneous cell line. However, sorting cells without undermining the integrity of their intrinsic properties (for example by cellular labeling) is one of the biggest challenges. As previously described,^{110,111} we successfully used a label-free non-invasive cell sorting method called sedimentation field-flow fractionation (SdFFF), which relies on the biophysical properties of the cells such as size and density in order to routinely prepare specific sub-populations of differentiated cells and CSCs.¹¹¹ In fact, cell sorting of heterogeneous cancer cell lines like GBM permits the elution of two types of sub-populations by SdFFF: a sub-population of differentiated cells and a sub-population of cancer stem cells. We will also use as a control a heterogeneous population consisting on the collection of all the cells eluted by SdFFF. On another hand, synthetic scaffolds must be used and are indeed generally used due to their low batch-to-batch variability in chemical composition, their ECM-like architecture and most importantly their reproducibility in terms of structure and physic-chemical properties. In this family of synthetic scaffolds, low molecular weight gelators (LMWG) based 3D systems are found. They consist of small molecules that undergo supramolecular self-assembling to form a hydrogel based on weak interactions, an important feature for reversibility and tunable physical characteristics.⁴³⁰ LMWG-based hydrogels are considered as one of the ideal scaffolds that provide promising platforms for biological research. Here, the choice has been focused on using hydrogels that are based in particular on a family of LMWG called Glycosyl-nucleo-bola-amphiphiles (GNBA) that possess an amide group (BA)^{77,516} and have been proven effective for 3D culture. (Previously observed in chapter 2) From a practical standpoint, the manipulation of BA into a hydrogel ready for cell culture is relatively easy. In fact, it has been demonstrated that they possess gelation kinetics that allow an easy handling of the gel during a 3D culture experiment. In addition, the porous structure of this hydrogel permits molecular mobility of particles such as nutrients and proteins that are mandatory for 3D culture process and analysis. In order to acquire a reproducible 3D system, that allows the production of MCTS of uniform sizes, high viability, repeatable growth kinetics and spatial organization, we culture for the first time, post SdFFF populations in BA supramolecular hydrogel.

IV.2.2 Materials and methods

IV.2.2.1 Cell culture

The human glioblastoma cell line U87-MG was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) and grown in Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium cell medium (DMEM), 10% fetal bovine serum, 1% non-essential amino acids and 1% penicillin/streptomycin. Cells were cultured at 37 °C in a 5% CO₂ incubator with 20% O₂. After culture time, cells are dissociated using Versene solution (Thermofisher scientific, France) and centrifuged at 300 g for 5 min. Cells are then resuspended with DMEM and counted using trypan blue (Sigma) exclusion and Malassez cell counting chamber.

IV.2.2.2 SdFFF device and cell elution conditions

The SdFFF separation device used in this study was previously described.^{110,111} Optimal elution conditions were as follows: flow administration through the accumulation wall of a 100 µL U87-MG cell suspension ($2 \cdot 10^6$ cells/mL). Flow rate: 1.0 mL/min. Carrier liquid: sterile Dielectrophoresis (DEP) buffer (osmotic sucrose-based survival buffer¹¹¹), pH 7.4 and conductivity 24 mS/m. External multigravitational field strength: 15 g for U87-MG. Time dependent fraction collection: Differentiated cells (F1): 2min 35s to 4min 20s; CSCs (F2): 6min 2s to 8 min 5s. And total peak (TP) which constitutes the collection of the entire eluted population (except the void volume, as an internal control): 2min 35s to 8min 5s. The crude population constitutes the remaining unsorted cells suspension of the experiment. In order to obtain a sufficient quantity of cells for further analysis and subculture, consecutive (10 - 12 injections) SdFFF fraction collections were performed.

IV.2.2.3 Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction (RTqPCR)

RNA isolation from cells was performed with RNeasy Mini Kit (# 74106; QIAGEN, Germany). After quantification, 2µg of total RNA was reverse transcribed with a high-capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). qPCRs on 100 ng of cDNA were performed with Premix Ex TaqTM (#RR39WR, TaKaRa®) on QuantStudio 3 real-time thermal cycler (Applied Biosystems) with TaqManTM probes for each reaction. Probes used for quantitative RT-qPCR are listed in Table SI-1. Reactions were performed in triplicate from each biological replicate. Relative gene expression was quantified using Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GADPH) as house-keeping gene. The $\Delta\Delta C_t$ quantitative method was used to

normalize expression of the reference gene and to calculate the relative expression levels of target genes. Probes used for quantitative RT-qPCR were purchased from ThermoFisher France: GAPDH (Hs02758991_g1), NANOG (Hs02387400_g1), POU5F1 (Oct4; Hs00999634_gH) and SOX2 (Hs01053049_s1).

IV.2.2.4 3D cell culture

The hydrogel is formed by adding an adequate volume of cell culture medium (DMEM+FBS) on a specific mass of measured gelator molecules powder in order to get the concentration desired. For example, for a concentration of 0.25% w/v 1000 μ L of cell medium are added on 2.5 mg of gelator powder. The mixture is then sonicated for 15s and placed in a water bath at 80°C for 10min. Then, a cell suspension of 1000 cells per 100 μ L is prepared and mixed with the BA in their sol phase. The suspension is homogenized within the final mixture and distributed in a 96 wells plate (100 μ L per well). Once the gelation process is over, 200 μ L of cell culture medium is added to each well and the plate is incubated for a month and cell medium is changed every 48 hours. Cell culture is examined for 35 days because a growth threshold is observed at this time. The 3D culture of the cellular populations is investigated in BA 0.25% w/v following the procedure described in Figure IV.1. The chemical structure of BA is previously described in chapter 2.

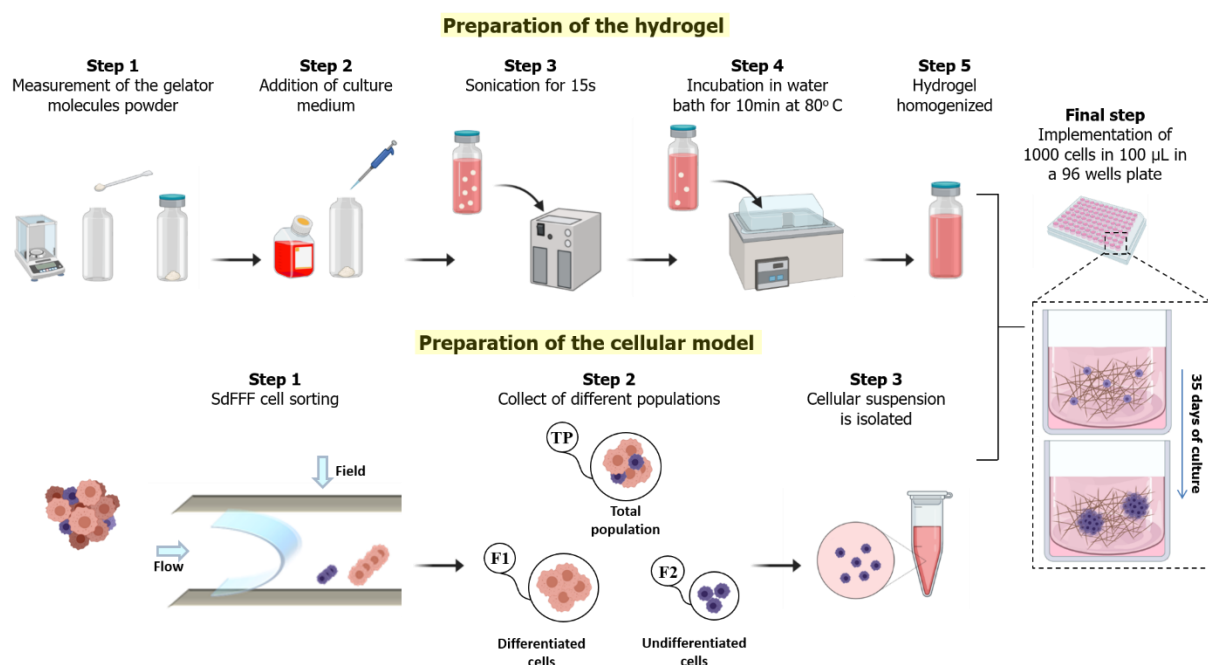


Figure IV.1. Schematic representation of the 3D culture process from the production of the hydrogel to the formation of tumor spheroids, with the steps of gel preparation, cell sorting and implementation of the cells in the hydrogel.

For the 3D culture of F2 sub-population, three different repetitions of experiment at different days are conducted: each experiment consists of a cell sorting by SdFFF and a conception of BA 0,25% w/v hydrogel, and the cells are then implemented in three wells of a 96-wells plate.

IV.2.2.5 Live/dead assay

Cell viability assessed by a fluorescent viability/cytotoxicity assay (Thermofisher scientific, France). Live cells fluoresce green due to the uptake and fluorescence of calcein-AM in response to intracellular esterase activity; dead cells fluoresce red as a result of the entry of ethidium homodimer-1 through damaged cell membranes and subsequent binding to nucleic acids. Cells were then imaged using LEICA DMI8 microscope.

IV.2.2.6 Growth kinetics

In order to evaluate tumor growth over time, growth kinetics were studied by measuring tumor diameters at different timepoints using ImageJ software. Mean size and standard deviations are presented for each timepoint of the culture (day 5, 15, 25 and 35) that were measure on different culture assays to represent repeatability or lack thereof.

IV.2.2.7 MTT assay

MTT assay is used to evaluate cellular metabolic activity at different timepoints of a 35 days culture. Preexistent culture medium, that formed the supernatant above the gel, is discarded and replaced with 100 μ L of culture medium slowly without disturbing the gel. Then, 20 μ L of MTT solution are added to each well and the plate wax incubated for 4 hours. Afterwards, 100 μ L of mixture is extracted from each well to a new 96 wells plate and absorbance was read at 492nm using a plate reader.

IV.2.2.8 Immunofluorescence

Isolated spheroids are embedded in OCT, and cryo-sectioned in 4 μ m sections via an ultramicrotome. Sections are then stained with an anti-ki67 marker (sigma) overnight and DAPI for 15min and observed using LEICA DMI8 microscope.

IV.2.2.9 Confocal microscopy imaging

Isolated spheroids are acquired by manual removal using scalpel alongside pipette tip cone. They are then fixed using paraformaldehyde 4% and then washed with PBS on a glass slide at

room temperature. Calceine-AM was then added for 1 hour. To avoid disturbing the architecture of the spheroid, there is no addition of a small glass slide on top. Then the spheroid is imaged using Zeiss LSM 880.

IV.2.3 Results and discussion

IV.2.3.1 Cell sorting of a GBM cell line

As previously indicated, heterogeneous Glioblastoma cell line (U87-MG) is routinely sorted by SdFFF based on size and density following the previously described protocols.^{110,111} The routine cell sorting by SdFFF generates two different populations (Figure IV.2): Fraction 1 (F1) which constitutes the sub-population of differentiated cells and Fraction 2 (F2) which constitutes the sub-population of CSCs.¹¹¹ Another population which corresponds to the collection of the entire heterogeneous population eluted after the SdFFF sorting, is the Total peak (TP) used as an internal control. The TP population is used in comparison with the crude sample which corresponds to the unsorted U87-MG in order to assess if the SdFFF process impact the characteristic of the cell line. In order to verify the sub-population's state of differentiation, the previously published series of phenotypical and functional characterization are regularly performed.¹¹¹

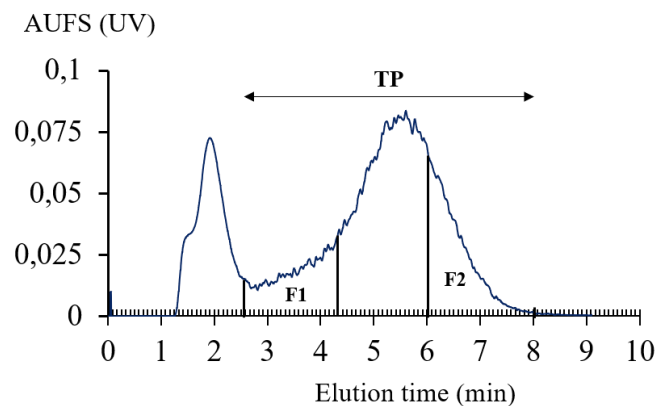


Figure IV.2. SdFFF fractogram of U87-MG cell line. Elution conditions: flow 1.0 mL/min and field 15 g. Time dependent fraction collection: see the Materials and Methods section.

The evaluation of the expression of CSCs markers is done by measuring the level of gene expression at the transcriptomic level by RTqPCR. (Figure IV.3) The high expressions of intracellular and intranuclear transcription factors Oct4, Sox2 and Nanog are considered CSCs markers.^{405-407,517} Figure IV.3 shows a differential analysis of CSCs mRNA expression levels,

assessed in the sub-populations F1 and F2 for U87-MG cell line. All three CSCs markers (Oct4, Sox2 and Nanog) for U87-MG are significantly overexpressed in F2 compared to F1: 3.3 folds higher in F2 than F1 for Oct4, 3 folds higher in F2 than F1 for Sox2 and 4.9 folds higher in F2 than F1 for Nanog.

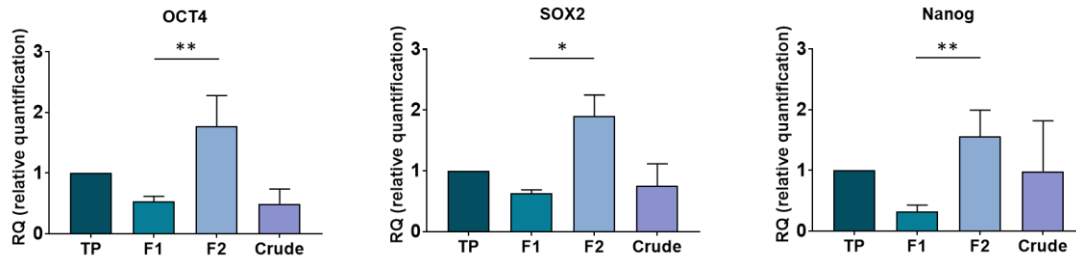


Figure IV.3. Comparative analysis of gene expression of three CSCs markers: Oct-4, Sox2 and Nanog, in U87-MG cell line, of the post SdFFF populations (F1, F2, TP) and Crude population, measured by Real Time quantitative PCR (Polymerase Chain Reaction) and normalized compared to TP. ** represents p value < 0.01 and * represents p value < 0.05

Therefore, subsequent to cell sorting by SdFFF, we obtain the three sub-populations of interest: TP a heterogeneous population, F1 a sub-population of differentiated cells and F2 a sub-population of CSCs. Next, they are implemented in the BA 0.25% w/v hydrogel to study their behavior in 3D culture.

IV.2.3.2 Three-dimensional culture of post SdFFF populations

We previously examined the behavior of Glioblastoma cancer cell line, U87-MG, and observed a production of spheroids with heterogeneous shapes and sizes. (Storm 1) Here, we evaluate the 3D culture of the control population (TP) and the sub-populations acquired after SdFFF cell sorting (F1 and F2).

First, we examine the 3D culture of the TP population (Figure IV.4) that consists on the collection of all the cells of an injection in SdFFF, rendering it a heterogeneous population having cells of all stages of differentiation analogous to the unsorted U87-MG that were previously tested (Chapter 2). Figure IV.4 shows the 3D culture of the TP population that exhibits a behavior similar to that observed with the unsorted cells. (Chapter 2) We observe that cells are able to proliferate and maintained high viability throughout the entire culture time. Nevertheless, Figure IV.S1 shows 5 different 3D cultures of TP population issued from three different cell-sorting experiments and three different batches of gel. We observe very stochastic cellular behavior and that result in 5 different spheroids with sizes ranging between 50 and 300

μm . Culturing an unsorted GBM cell line (chapter 2) or TP (in this case) will generate spheroids, but the end result lack uniformity in size and morphology. Therefore, we subsequently aim to assess the behavior of sorted sub-populations, differentiated and undifferentiated cells, in the light of acquiring uniform-sized tumor spheroids in the hydrogel.

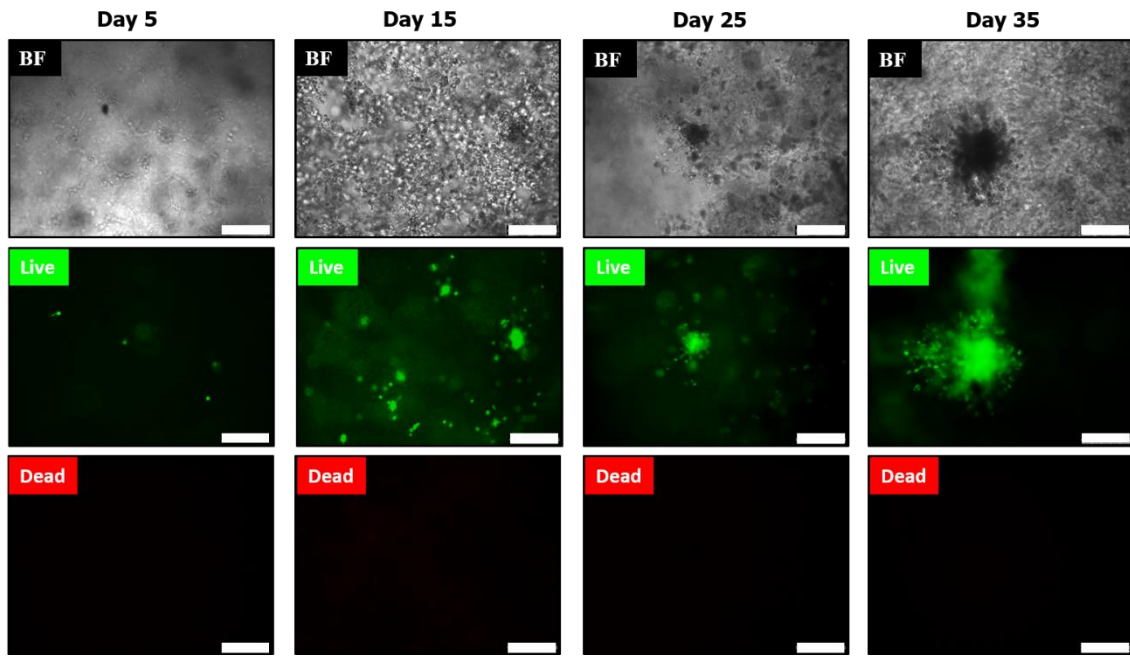


Figure IV.4. 3D culture of TP post SdFFF in BA 0.25% w/v for 35 days. Top panel represents imaging using bright field (BF), middle and bottom panel represent imaging using the Live/Dead kit to evaluate the live cells with calcein AM dye (in green) and dead cells using ethidium homodimer-1 dye (in red). Scale bar = $250\mu\text{m}$.

Second, the F1 fraction that consists of a sub-population enriched in differentiated cells is examined in 3D culture. Due to the lack of stemness properties (autorenewal and multipotency), differentiated cells are not expected to generate tumor progression.^{92,93} Figure IV.5 shows the 3D culture of the F1 fraction sorted by SdFFF in BA 0.25% w/v displaying only viable cells throughout the 35 days of culture with no reported proliferation. Figure IV.S2 shows the repeated cultures of F1 issued from three different cell sorting experiments and three different batches of gel. We observe that when F1 is implemented in the hydrogel, cells are unable to proliferate nor organize into a tumor spheroid but remain viable until day 35.

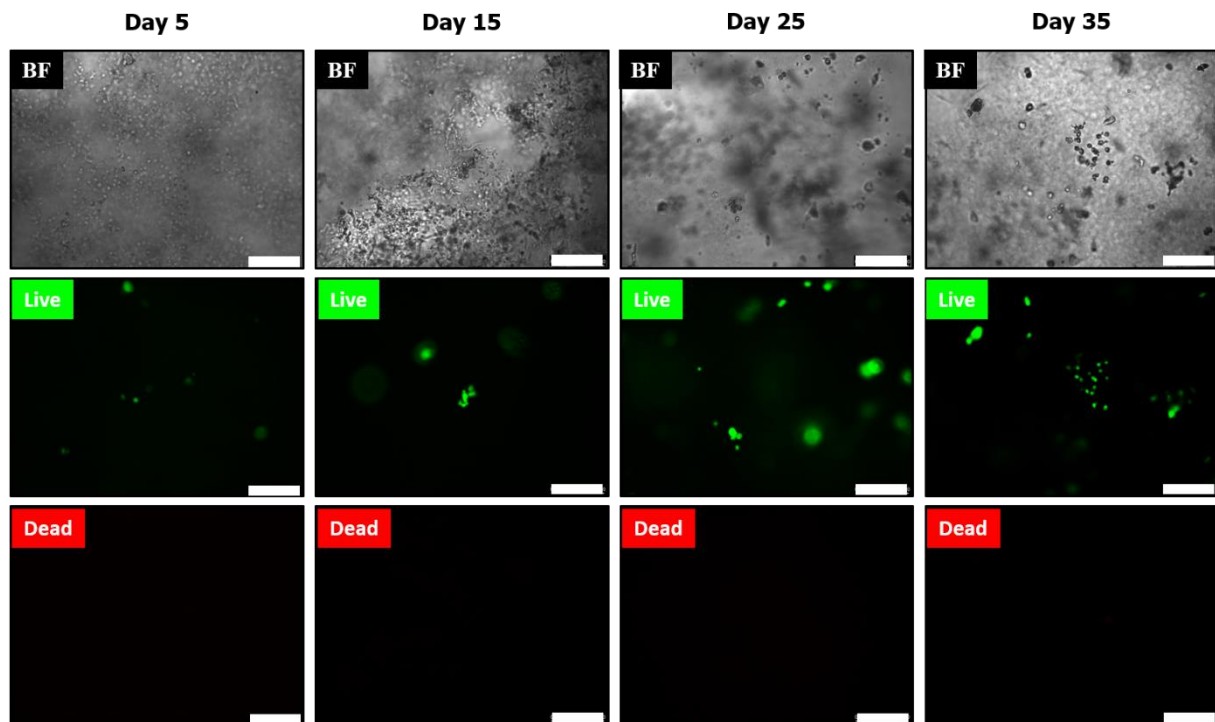


Figure IV.5. 3D culture of F1 sorted by SdFFF in BA 0.25% w/v for 35 days. Top panel represents imaging using bright field (BF), middle and bottom panel represent imaging using the Live/Dead kit to evaluate the live cells with calcein AM dye (in green) and dead cells using ethidium homodimer-1 dye (in red). Scale bar = 250 μm .

Third, we evaluate the behavior and development of F2 sub-population in BA 0.25% w/v. F2 is a population of CSCs sorted by SdFFF, known for being tumor initiating cells.^{101,112} We observe a high viability of the cells in the gel throughout the culture time from day 5 until day 35 (Figure IV.6). Repeated 3D culture of F2 population issued from three different cell sorting experiments and three different batches of gel. (see materials and methods) are presented in Figure IV.7. The generated spheroids with F2 have larger sizes by comparison to those produced with TP, hence more representative of *in vivo* solid tumors.

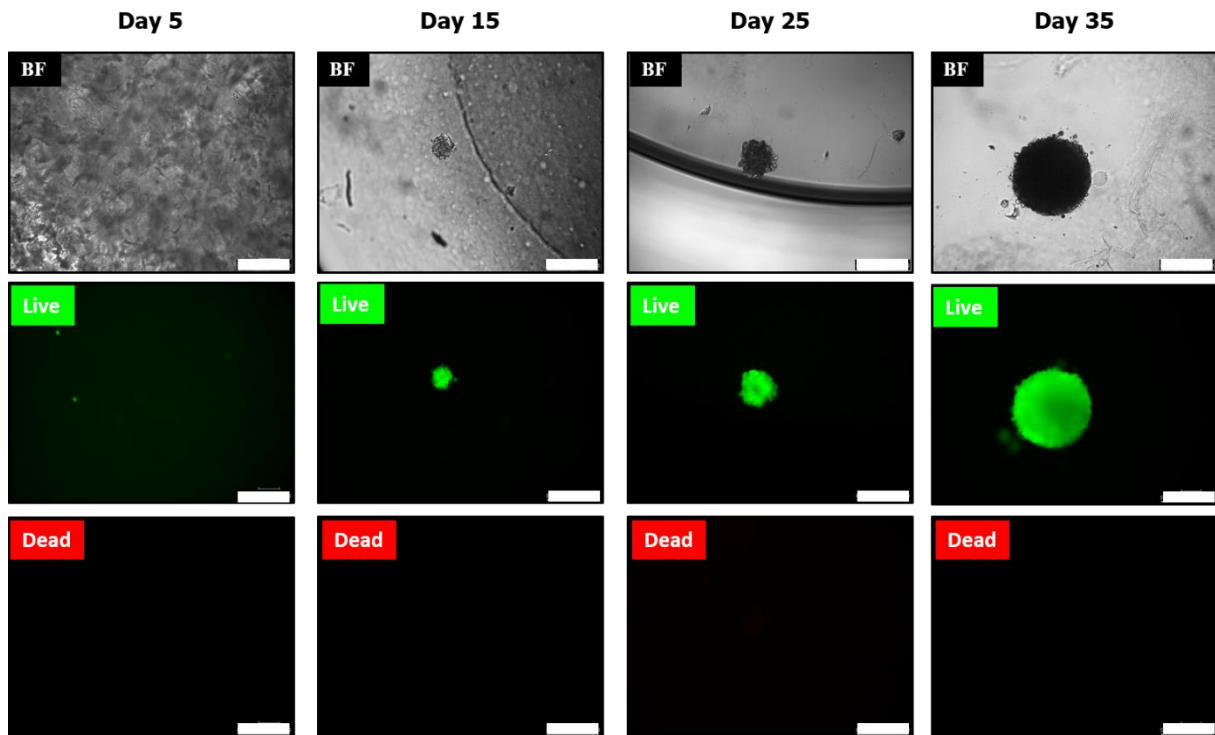


Figure IV.6. 3D culture of F2 sorted by SdFFF in BA 0.25% w/v for 35 days. Top panel represents imaging using bright field (BF), middle and bottom panel represent imaging using the Live/Dead kit to evaluate the live cells with calcein AM dye (in green) and dead cells using ethidium homodimer-1 dye (in red). Scale bar = 250 μ m.

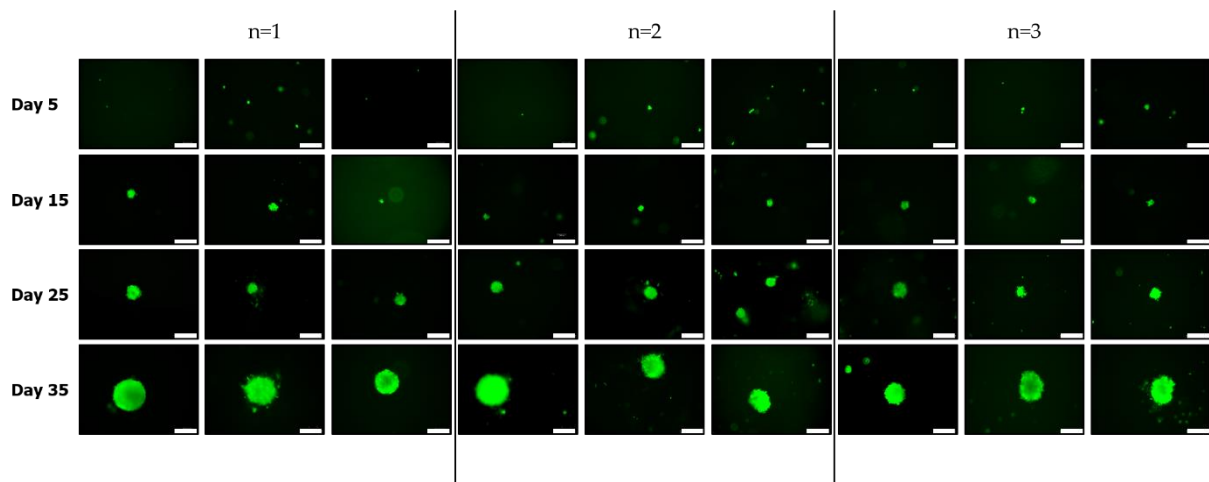


Figure IV.7. Timeline of three replicates of repeated 3D cultures of U87-MG F2 sub-population from day 5 till day 35 represented by fluorescent imaging using calcein AM dye showing the production of uniform-sized spheroids from CSCs. Scale bar = 250 μ m.

Furthermore, image analysis of TP repeated cultures is shown in Figure IV.8A top. Five curves are represented, each reflecting a culture of a TP population in the BA 0.25% w/v from day 5 until day 35 with. This result shows very variable evolution of growth kinetics for TP heterogeneous cells during culture time. In addition, graphic box plots show a wide distribution of spheroid size for each time point with large standard deviation (Figure IV.8A bottom), proving the absence of repeatability of the experiment with a mean of 203 μm and standard deviation of 103 μm at day 35.

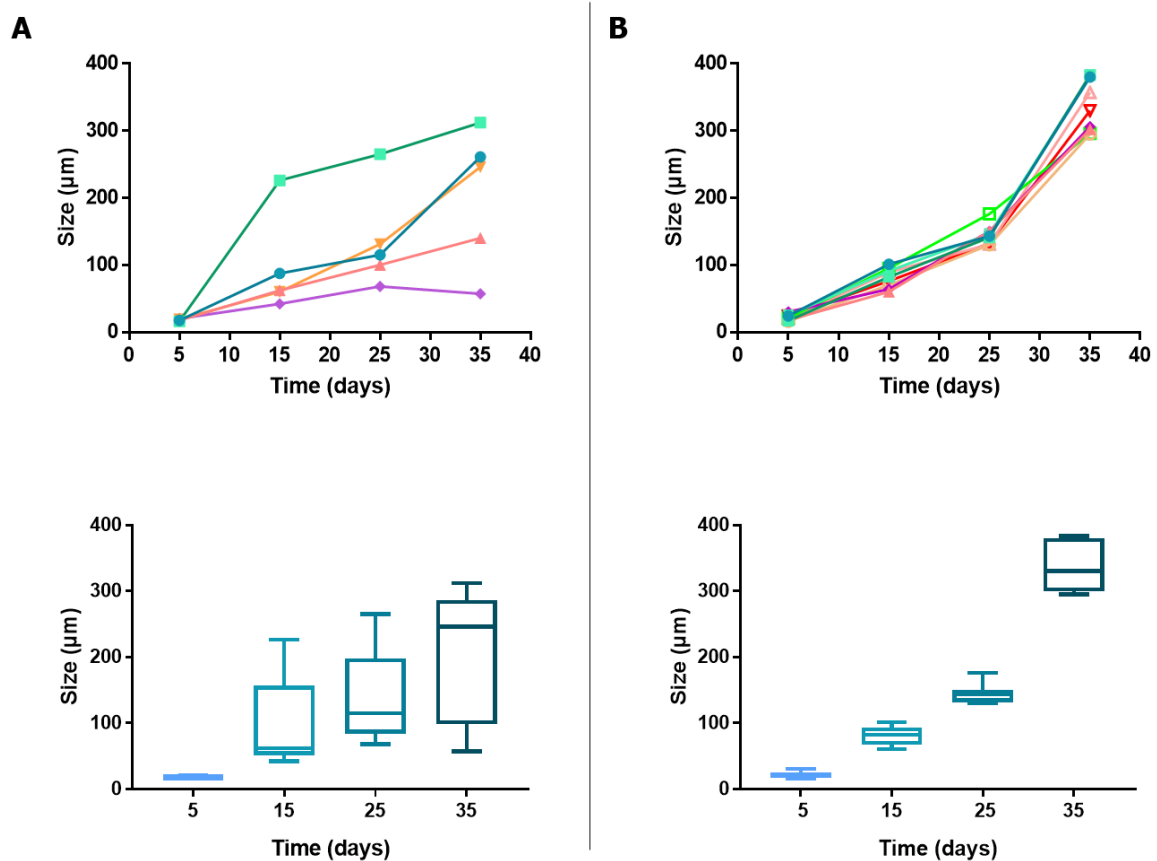


Figure IV.8. Assessment of spheroid growth kinetics of U87-MG TP and F2 population grown in BA 0.25% w/v were evaluated over a period of 35 days by ImageJ image analysis of five 3D cultures for TP and nine 3D culture for F2. Data represent (A top) the average cell growth of each individual culture of TP, (A bottom) a graphic box plots representation of spheroid size distribution for TP culture, (B top) the average cell growth of each individual culture of F2, (B bottom) a graphic box plots representation of spheroid size distribution for F2 culture.

On the other hand, image analysis of F2 repeated cultures is shown in Figure IV.8B top. Nine curves are represented, each reflecting a culture of an F2 population in the BA 0.25% w/v from day 5 until day 35 with. We observe repeatable size evolution between all individual cultures, with an almost perfect overlay of the nine curves proving the repeatability and reproducibility

not only of the size evolution throughout culture time, but also in the size of the spheroids generated by the end of the culture. In addition, graphic box plots show the distribution of spheroid size for each time point with very small standard deviation by comparison to TP, proving the repeatability of the experiment by consequence the homogeneity of the population. (Figure IV.8B bottom) Thus, by implementing 1000 cells per well of CSCs in our 3D system, we were able to generate repeatable uniform-sized tumor spheroids with a mean of 350 μ m and a standard deviation of 30 μ m.

Taken all together, the 3D culture of TP, F1 and F2 proves that (1) the reproducibility of the tumor spheroids in terms of evolution and uniformity is highly dependent of the homogeneity of the implemented population; (2) the consideration of the nature of the cellular model rather than the method for 3D culture might be a right trajectory to achieve reproducibility and (3) CSCs that are known to be tumor initiating cells *in vivo* were the only population able to generate large, viable and uniform-sized spheroids.

IV.2.3.3 Comparative analysis of the metabolic activity of the different sub-populations in 3D culture

During tumor progression, cells adapt their metabolic activity to cope correspondingly with their proliferation rates. CSCs are known to have a distinct metabolic phenotype depending on high glycolytic activity as well as high oxidative phosphorylation. Differentiated cells on the other hand rely mainly on glycolysis.⁵¹⁸ This is correlated with the previously observed proliferation and growth behavior. In order to highlight the difference in metabolic activity between the populations in 3D culture, we conducted an MTT assay showing the metabolic activity of the cells post SdFFF, that is proportional to cellular proliferation. (Figure IV.9)

We observe that the CSCs (F2) population demonstrated an increase in metabolic activity from day 5 till day 35 with minimal standard deviation and registered the highest metabolic at day 35 between three populations. We can conclude that this increase of metabolic activity is resulted by the increase of cellular number due to repeatable spheroid growth. (Figure IV.7) TP population also demonstrated an increase in metabolic activity but with a high variability between the cultures which is shown with the wide standard deviation. Indeed, we observed TP cultures that exhibited an active proliferation where others remained only viable. (Figure IV.S1) This is explained by the various cell types that TP holds (differentiated cells, CSCs precursors and CSCs), mirroring the heterogeneity of Glioblastoma. Whereas the differentiated cells (F1), demonstrated relatively low and constant metabolic activity throughout culture time. This is due to the small amount but viable cells observed from day 5 till day 35. (Figure IV.S2)

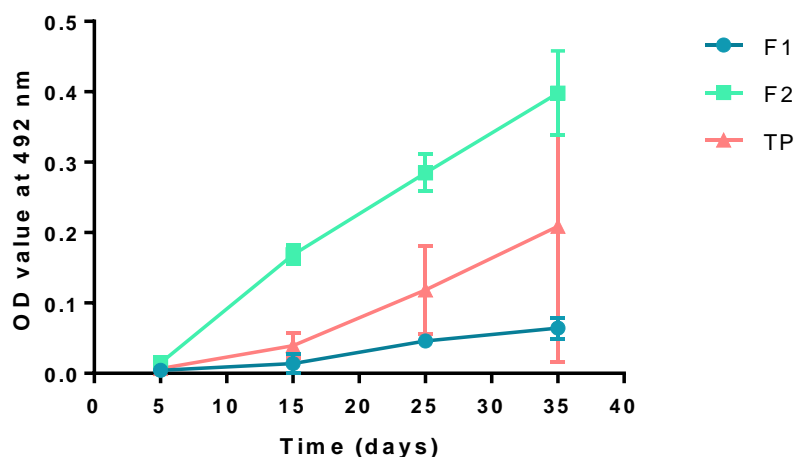


Figure IV.9. Comparison of the metabolic activity of TP, F1 and F2 during 3D culture in BA 0.25% w/v using MTT assay: OD values were measured at 492 nm.

These findings highlight the importance of using CSCs sorted by SdFFF in 3D culture, in order to obtain a repeatable end result regarding viability, proliferation, organization and metabolic activity. They also prove that 3D CSCs *in vitro* models are highly important because they generate a platform containing spheroids that are representative of *in vivo* solid tumors. However, in-depth characterizations need to be performed in order to conclude that the inner spheroid structure is also representative of GBM tumors.

IV.2.3.4 Characterization of spheroids generated by CSCs

After proliferation and growth into tumor spheroids, CSCs are generally found in the core hypoxic region of the solid tumor, which explains the protection acquired by virtue of their neighboring cells, thus generating drug resistance and relapse.⁵¹⁹ GBM spheroids grown in a 3D system should exhibit different layers of cells, with an outer layer consisting of proliferative cells, an intermediate layer consisting of quiescent cells and the inner core where the CSCs reside is hypoxic and necrotic.^{30,511,512} In order to demonstrate the multicellular aspect of the obtained spheroids, we performed an immunological staining on a spheroid section. We evaluated the expression of Ki67, a marker highly expressed in proliferative cells. In Figure IV.10, we observe that the expression of Ki67 forms a gradient of intensity with a peak at the membrane and lowest intensity at the core. This result proves that the peripheral cells are highly proliferative whereas core cells are less proliferative.

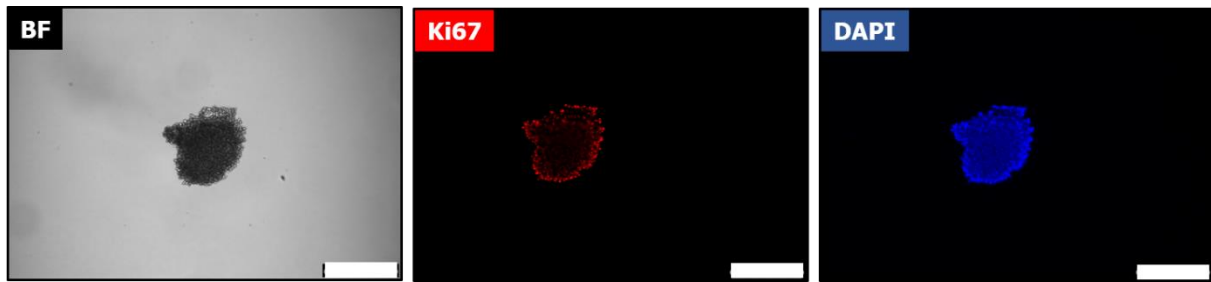


Figure IV.10. Microscopy images of a cryo-section of a spheroid after OCT embedding using: Bright field, rabbit monoclonal Ki67 antibody and an anti-rabbit IgG conjugated to Alexa Fluor 488 and DAPI staining. Scale bar = 250 μ m.

Next, in order to assess the spatial organization of the spheroid, we performed confocal microscopy on an isolated spheroid using Calcein-AM staining. Image analysis by ImageJ showed a construction on different levels of the z axis, demonstrating the three-dimensional positioning of the spheroid inside the hydrogel. (Figure IV.11) This illustrates that the hydrogel permits 3D construction of the biological system with an outer viable layer and a less viable necrotic core.

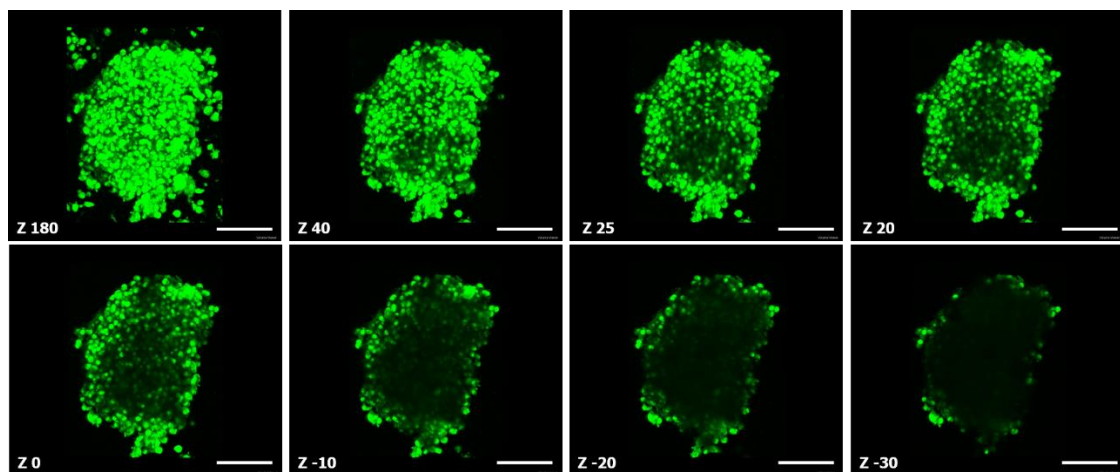


Figure IV.11. Confocal microscopy images of a spheroid stained using Calcein-AM, observed in the depth of the z axis. Scale bar = 100 μ m

IV.2.4 Conclusion

The conception of a 3D model relies on two key compounds, a 3D scaffold and a cellular model, that need to be well defined. The culture is based on a mastered 3D scaffold which in this study presented as a hydrogel obtained by self-assembly of low molecular weight gelators. The choice of its concentration allows to have the viscoelasticity of the chosen cell line. This concentration is low and thus allows to produce these gels economic in material. And the kinetics of gelation is ideal for cell implementation (7min). The 3D scaffold must retain a complex ECM-like architecture in order to mimic *in vivo* cellular development and allow the cellular model to develop into a multicellular tumor spheroid. However, the reproducibility of 3D systems remains one of the biggest challenges. In fact, in order to be used as a platform for different kinds of applications, a 3D model should be able to give a uniform starting point of analysis. Therefore, in this study we examined the implementation of a sub-population of cancer stem cells in BA 0,25% w/v. CSCs have key characteristics such as self-renewal and multipotency, that allow them to initiate tumor development *in vivo*, and form solid tumors from a small number of cells. Cell sorting of GBM cell lines (U87-MG) by SdFFF is a mastered and well-defined technique that allows to isolate CSCs sub-populations, without hindering their intrinsic biological properties. CSCs implemented in BA 0,25% w/v supramolecular hydrogel, were able to generate uniform-sized tumor spheroids with repeatable growth kinetics. The tumor spheroids retain the same inner biological complexity as the *in vivo* solid tumors in terms of multicellularity.

Thus, we observed that the reproducibility of tumor progression as well as spheroid size are highly dependent of the homogeneity of the implemented cellular model. Due to the reproducibility of this system, especially at different time of culture, it can be used for a variety of applications. For example, to assess novel drug discoveries, to optimize and verify the effect of existing therapeutic molecule, to examine the impact of therapeutic nanoparticles, the toxicity of environmental nanoparticles on a living system etc.

IV.2.5 Supplementary information

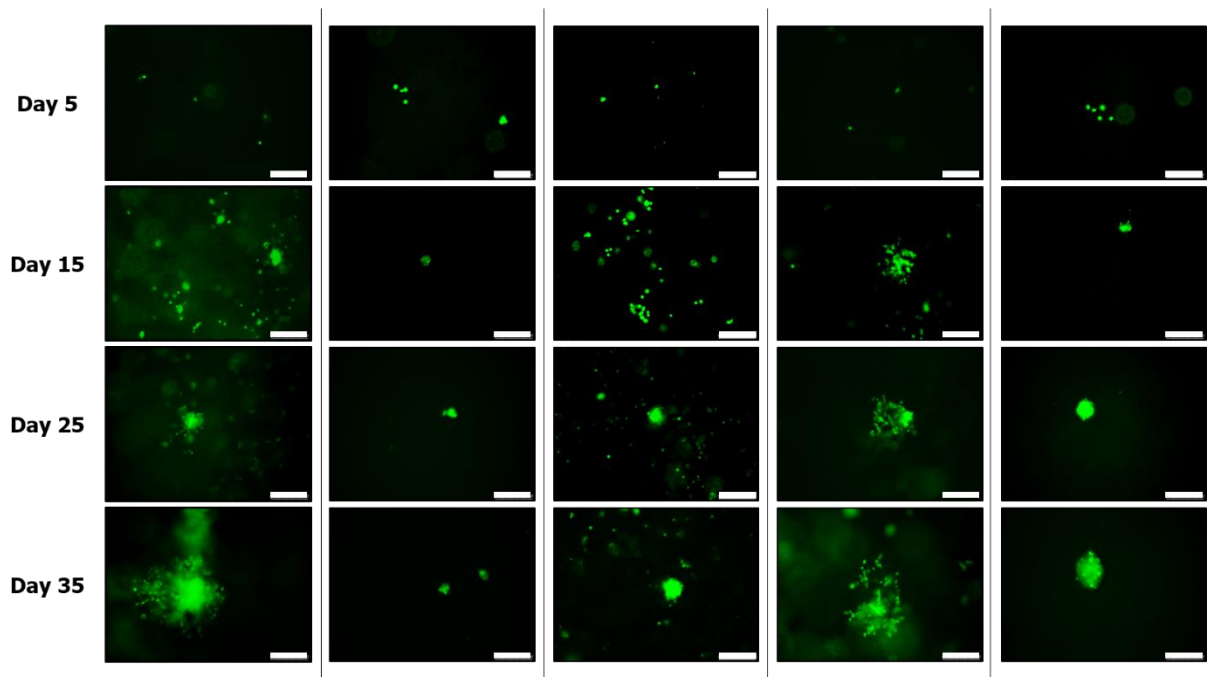


Figure IV.S1. Timeline of repeated 3D cultures of TP population from day 5 till day 35 represented by fluorescent imaging using calcein AM dye showing the production of heterogeneous spheroids in size and behavior. Scale bar = 250 μm

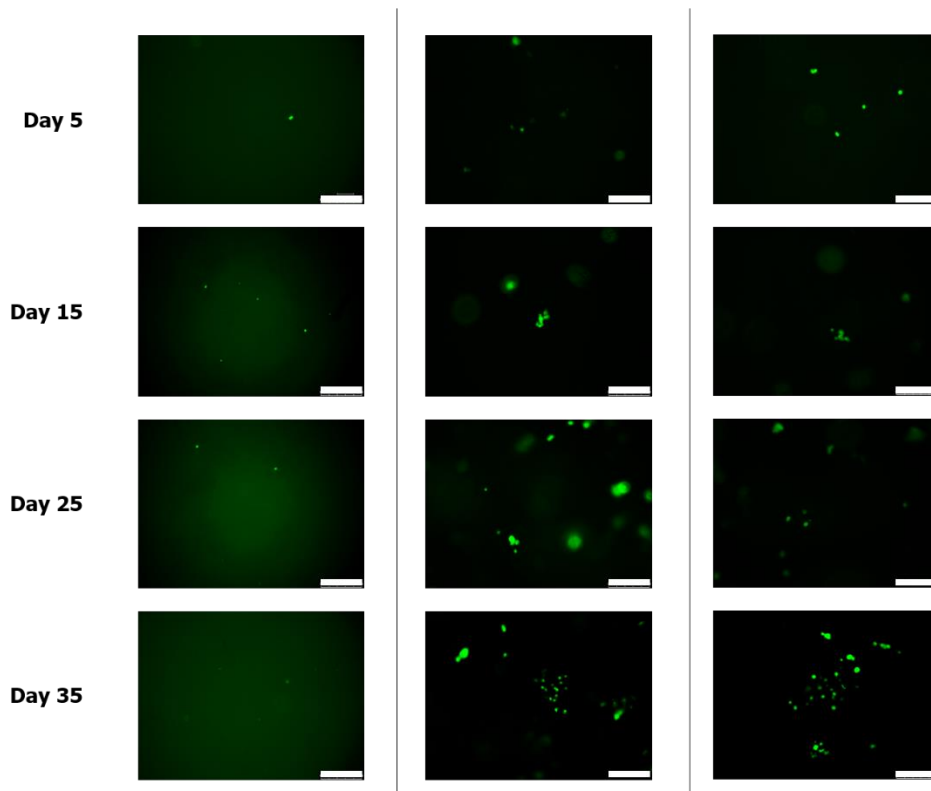


Figure IV.S2. Timeline of repeated 3D cultures of U87-MG F1 sub-population from day 5 till day 35 represented by fluorescent imaging using calcein AM dye showing the production of uniform-sized spheroids from CSCs. Scale bar = 250 μ m.

IV. 5 Conclusion

Le chemin pour concevoir un système 3D reproductible est basé sur une nouvelle réflexion scientifique différente des études antérieures. Les deux éléments constitutifs de ce modèle 3D sont bien définis.

Le premier élément est un hydrogel formé par assemblage supramoléculaire, BA 0,25% w/v, dont le protocole expérimental est maîtrisé pour donner un hydrogel avec propriétés physico-chimiques contrôlés (architecture fibrillaire, rigidité, porosité, etc.).

Le deuxième élément consiste d'une sous-population de CSCs triée en routine par SdFFF, qui possède des propriétés intrinsèques d'initiation tumorale et soutien du développement cellulaire, dont les propriétés biologiques (phénotypiques et fonctionnelles) sont définies (expression de marqueurs souches, forte capacité clonogénique, etc.).

Dans ce chapitre nous avons évalué le comportement d'une population hétérogène qui est la population totale de la lignée utilisée comme contrôle (TP), une sous-population de cellules différenciées (F1) et une sous-population de CSCs (F2). La culture de la population hétérogène a montré un comportement similaire à celui de la lignée non triée, donc une cinétique de croissance non répétable et des sphéroïdes de taille et d'organisation variables. En ce qui concerne les cellules différenciées, comme il s'agit une population dépourvue de caractéristiques d'initiation tumorale, les cellules ont maintenu une viabilité dans le gel mais sans aucun développement. Ce résultat a de plus confirmé la cytocompatibilité du gel avec tous les types cellulaires. La culture des CSCs dans BA 0,25% w/v a démontré un résultat très intéressant qui n'est pas atteint avec la lignée U87-MG non triée. Les CSCs ont permis d'obtenir des sphéroïdes de tailles uniformes avec des cinétiques de croissance répétables. En effet, nous avons observé avec la répétition de 9 cultures 3D de CSCs dans BA 0,25% w/v (avec trois tris différents et trois lots de molécules gélifiantes différents) le même taux de prolifération, de viabilité, de structure, de morphologie et de tailles cellulaires et ceci à chaque temps d'incubation étudié (Jour 5, 15, 25 et 35). En fin de ces cultures nous avons obtenus des sphéroïdes de taille moyenne aux alentours de 350 μm avec un écart type de l'ordre de 30 μm , un résultat nettement meilleur que celui obtenu avec la population hétérogène non triée, étudiée dans le chapitre 2 (moyenne de 150 $\mu\text{m} \pm 70 \mu\text{m}$) ou de la population hétérogène TP post SdFFF (moyenne de 203 $\mu\text{m} \pm 103 \mu\text{m}$). En outre, les tests MTT de TP, F1 et F2 montre une augmentation importante de l'activité métabolique pour les CSCs (F2) par rapport aux autres, ce qui est corrélée avec une augmentation du nombre de cellules observées au cours du temps.

Ce qui était intéressant et en soi attendu, c'est que l'activité métabolique de la population hétérogène (TP) était très variable entre les cultures répétées à chaque temps d'incubation étudié, ce qui démontre encore que le nombre de cellules au même temps d'incubation entre les cultures est variable, alors que le taux d'ensemencement est identique (1000 cellules/puit). Enfin, pour évaluer la multicellularité des sphéroïdes produits à partir des CSCs, nous avons évalué la formation d'un gradient de prolifération par marquage avec Ki67 (marqueur de prolifération cellulaire) qui est maximal au niveau périphérique dû à la couche proliférative et qui décroît en intensité vers le cœur hypoxique. Ce qui sera intéressant pour la suite, c'est d'évaluer plusieurs gradients pour souligner plus la multicellularité. Par exemple un gradient d'hypoxie en utilisant le marqueur HIF-1-alpha qui est un facteur induit par l'hypoxie montrant un gradient opposé à celui de la prolifération (minimal en périphérie et maximal en centre). Et un gradient ciblant le caractère souche en utilisant des marqueurs souches (Sox2, Oct4, CD133, Nanog, etc.) afin de souligner la présence maintenue du pool de CSCs dans le centre hypoxique. En effet, ce travail a permis la conception d'une plateforme d'analyses 3D reproductible qui a deux caractéristiques clés : la formation de sphéroïdes uniformes en termes d'évolution en taille, de morphologie et d'organisation spatiale ; et un réseau fibrillaire qui permet la diffusion de molécules déposées dans le surnageant vers le système vivant trouvé désormais au sein du gel. Ceci est devenu possible grâce au tri cellulaire par SdFFF qui permet d'isoler la sous-population de CSCs sans impacter l'intégrité intracellulaire. Ainsi nous pouvons proposer une plateforme d'analyse très importante et inédite qui permet la mise en place de plusieurs types d'études : de progression tumorale, d'approches thérapeutiques innovantes, d'optimisation des thérapies actuelles, etc. En particulier, nous pouvons envisager des études de toxicité de NPs. De nombreuses études sur les NPs trouvées dans l'environnement étaient menées sur des MCTS en 3D, afin d'évaluer des potentielles modifications sur la morphologie des sphéroïdes et le gain ou perte d'agressivité tumorale causée par l'impact des NPs. Ces études étaient limitées par le manque d'un système 3D reproductible convenable pour ces types d'analyses. Donc pour la suite, nous sommes intéressés à évaluer la possibilité d'utiliser notre système 3D reproductible comme potentiel bioindicateur de l'impact de NPs sur le vivant.

Chapitre V : Etude de l'impact de nanoparticules sur un système vivant

V.1 Introduction

Un système 3D à base de cellules cancéreuses est une plateforme d'études qui peut s'étendre à différents domaines dont l'optimisation des thérapies anticancéreuses conventionnelles, l'étude de la progression tumorale au niveaux cellulaires mais aussi moléculaire et génomique, la conception d'approches thérapeutiques innovantes ciblées, etc. Dans ce projet de thèse, nous nous sommes intéressés en particulier à utiliser cette plateforme pour des études de toxicité de nanoparticules. En effet, dans le premier chapitre, nous avons exposé qu'aujourd'hui les NPs de différentes origines présentent une invasion accrue de l'environnement^{520,521}, et par conséquence elles se trouvent en contact quotidien avec les organismes vivants.⁸⁰ Les NPs sont soit disséminées suite à des phénomènes naturels (éruption volcanique par exemple⁵²²), soit elles sont produites pour diverses finalités, ce que nous définissons par NPs manufacturées.⁵²³ Par exemple, de nombreuses technologie cosmétiques se basent sur l'utilisation de NPs dans les formulations de produits cosmétiques et dermopharmaceutiques.⁵²⁴ Nous retrouvons également des NPs dans des applications médicales comme vecteurs de transports de molécules thérapeutiques^{525,526} ou dans l'imagerie par résonance magnétique dû à leurs propriétés super-paramagnétiques⁵²⁷. D'autres NPs comme les NPs de titane et zinc, sont exploitées grâce à leurs propriétés photochimiques, dans les domaines de protection UV, dégradation photonique et pigmentation.^{528,529} Les NPs sont également utilisées dans des application industrielles comme la production de béton modifié⁵³⁰ et le domaine de production de l'énergie⁵³¹. Compte tenu de leur omniprésence dans les produits manufacturés, ces NPs sont inévitablement présentes dans l'environnement et peuvent avoir des impacts imprévus.

Nous sommes intéressés en particulier aux nanoparticules d'argents (Ag-NPs) et leur impact environnemental. Une augmentation d'utilisation mondiale de produits contenant des Ag-NPs⁵³² est observée aujourd'hui, notamment dans les textiles et les tissus,⁵³³ les matériaux en contact avec les aliments tels que les récipients, les appareils de cuisine,⁵³⁴ les cosmétiques,⁵³⁵ les déodorants,⁵³⁶ les filtres à eau,⁵³⁷ les jouets,⁵³⁸ etc. Des études ont montré que les Ag-NPs dont les ions Ag⁺ peuvent être facilement lessivés tout simplement en immergeant et secouant dans l'eau des chaussettes commerciales contenant des Ag-NPs.⁵³⁹ Certaines marques de chaussettes peuvent même perdre près de 100 % de leur contenu total en argent au cours de quatre lavages consécutifs.⁵³⁹ Les Ag-NPs peuvent être relarguées dans l'environnement via les flux d'eaux usées et les effluents,⁵³⁴ se retrouver dans les stations d'épuration des eaux usées, et retenues dans les boues d'épuration. Ceci suggère que les individus et l'environnement peuvent

être exposés indirectement et plus fréquemment qu'attendu à ces NPs.^{534,538,540-542} Cette exposition peut se produire au cours de plusieurs phases de la durée de vie des Ag-NPs, depuis la synthèse et la fabrication, la distribution, l'utilisation du produit final et l'élimination en fin de vie des produits de consommation courante.⁵³⁴

L'origine de la toxicité des Ag-NP fait l'objet d'un débat animé. Bien que de grands efforts aient été faits, il est toujours difficile de déterminer si la toxicité est liée aux nanoparticules ou à leur nature chimique et la libération incontrôlable d'Ag⁺ et de leur cooccurrence avec les Ag-NPs.^{543,544} Cependant, en raison de l'incertitude entourant la concentration des Ag-NPs dans l'environnement et du manque de compréhension de leur impact environnemental, l'utilisation croissante des Ag-NPs dans de nombreuses applications différentes a suscité des inquiétudes quant à leur dissémination probable dans les écosystèmes. Il n'est pas possible de supposer que les Ag-NPs ont peu ou pas d'impact sur l'environnement et ses habitants, vu l'incertitude quant au niveau de dissémination de ces Ag-NPs. Par conséquent, une étude systématique de la toxicologie des Ag-NPs est nécessaire avant une utilisation excessive de produits à base de Ag-NPs.⁵⁴²

Les études évaluant la toxicologie des NPs sont souvent menées sur des cultures cellulaires cancéreuses, en majorité en 2D et très peu en 3D.⁸⁰ Les cellules cancéreuses sont utilisées grâce à leurs potentiels de fournir du matériel biologique d'une façon illimitée et sans modifications des propriétés intrinsèques des cellules.⁵⁴⁵ Cependant, la culture 2D n'est pas suffisante pour tirer des conclusions en ce qui concerne l'impact des NPs sur le vivant vu que les réponses cellulaires, vis-à-vis des stimuli externes, sont beaucoup plus représentatives de la réalité en 3D qu'en 2D.⁸⁰ Ceci est dû au fait que les cellules sont présentes dans un réseau complexe reproduisant leur micro-environnement physiologique. Ces études présentent surtout un écart remarquable des résultats entre 2D et 3D,⁵⁴⁶⁻⁵⁴⁸ et une non-conformité des résultats entre différentes études.^{19,549-551} En effet, c'est une aberration d'évaluer la toxicité de NPs en 2D au vu que la surface d'échange NPs et cellules est beaucoup plus large en 2D donc presque la majorité des cellules en culture sont en contact avec les NPs. Alors qu'en 3D, qui est plus représentatif de l'impact *in vivo*, le modèle prend en compte les dimensions et morphologie de ces entités nanométriques, et la surface d'échange cellules/NPs est beaucoup moins importante ce qui pourrait expliquer la différence de résultats entre 2D et 3D. Nous observons souvent une toxicité accrue en 2D traduite par une forte mortalité cellulaire, mais certaines études 2D montrent avec le même type de NPs une absence de toxicité.⁵⁴⁷ Alors qu'en 3D certaines études démontrent moins de mortalité et plus de comportement de désagrégation des sphéroïdes tumoraux.^{19,552,553} D'autres montrent des phénomènes de gain d'agressivité par une atténuation

à la sensibilité aux médicaments.⁵⁵⁴ En outre de ces différences inter études, certains ont déclaré des difficultés à reproduire les résultats au sein de la même étude en 3D.⁸⁰

Ce manque de reproductibilité et de répétabilité a différentes origines. Comme décrit tout au long de ce manuscrit, en étudiant l'impact de substances en 3D, il est primordial que le système 3D présente le minimum possible d'hétérogénéité intrinsèque en termes de tailles de sphéroïdes, morphologie, comportement, viabilité, etc. Si par exemple les sphéroïdes formés en absence de NPs présentent des variations minimales non significatives et que suite à la présence de NPs la différence devient significative nous pouvons conclure que les modifications sont causées par les NPs.

D'autre part, la caractérisation et le contrôle de la suspension de NPs avant l'étude est aussi un facteur très important. Les propriétés physico-chimiques des NPs (telles que les dimensions, morphologies, état d'agrégation, etc.) peuvent jouer un rôle très important dans l'impact sur les cellules. Cependant, ces propriétés sont très susceptibles de changer après la production des NPs durant leur stockage, lors leur dissémination et même lors de leur mise en suspension dans le milieu biologique qui sert de milieu d'entretien durant la culture cellulaire. De ce fait il est nécessaire de caractériser et définir ces propriétés avant la mise en contact avec les cellules afin de pouvoir corrélérer si impact biologique il y a, avec quelles NPS et dans quel l'état a lieu le changement sur le sphéroïde. Et ainsi pouvoir établir quelles propriétés-physico-chimiques est à l'origine de l'impact sur le modèle in vitro.

Ce chapitre est présenté sous forme d'article intitulé "Physicochemical characterization of manufactured silver nanoparticles and study of their impact on 2D cell culture vs reproducible 3D MCTS". A cause de la limitation en temps de manipulation en fin de thèse, il est important de souligner que les résultats qui sont présentés dans ce chapitre, sont dans la phase préliminaire et par conséquent la plupart des expériences et des observations nécessitent des répétitions pour être affirmatives sur les discussions menées.

De base, différentes tailles de Ag-NPs ont été envisagées pour l'étude de leur impact (30nm, 60nm, 100nm et 200nm). Néanmoins, nous avons décidé d'étudier d'abord l'impact des Ag-NPs de 30nm. Ces NPs sont commercialisées par NanoComposix. Elles sont de tailles fixées et connues, sans fonctionnalisation de surface et en suspension aqueuse. La démarche scientifique qui sera adoptée dans ce chapitre est illustrée dans la figure V.1.

Etude de l'impact des Ag-NPs sur la culture 2D et 3D

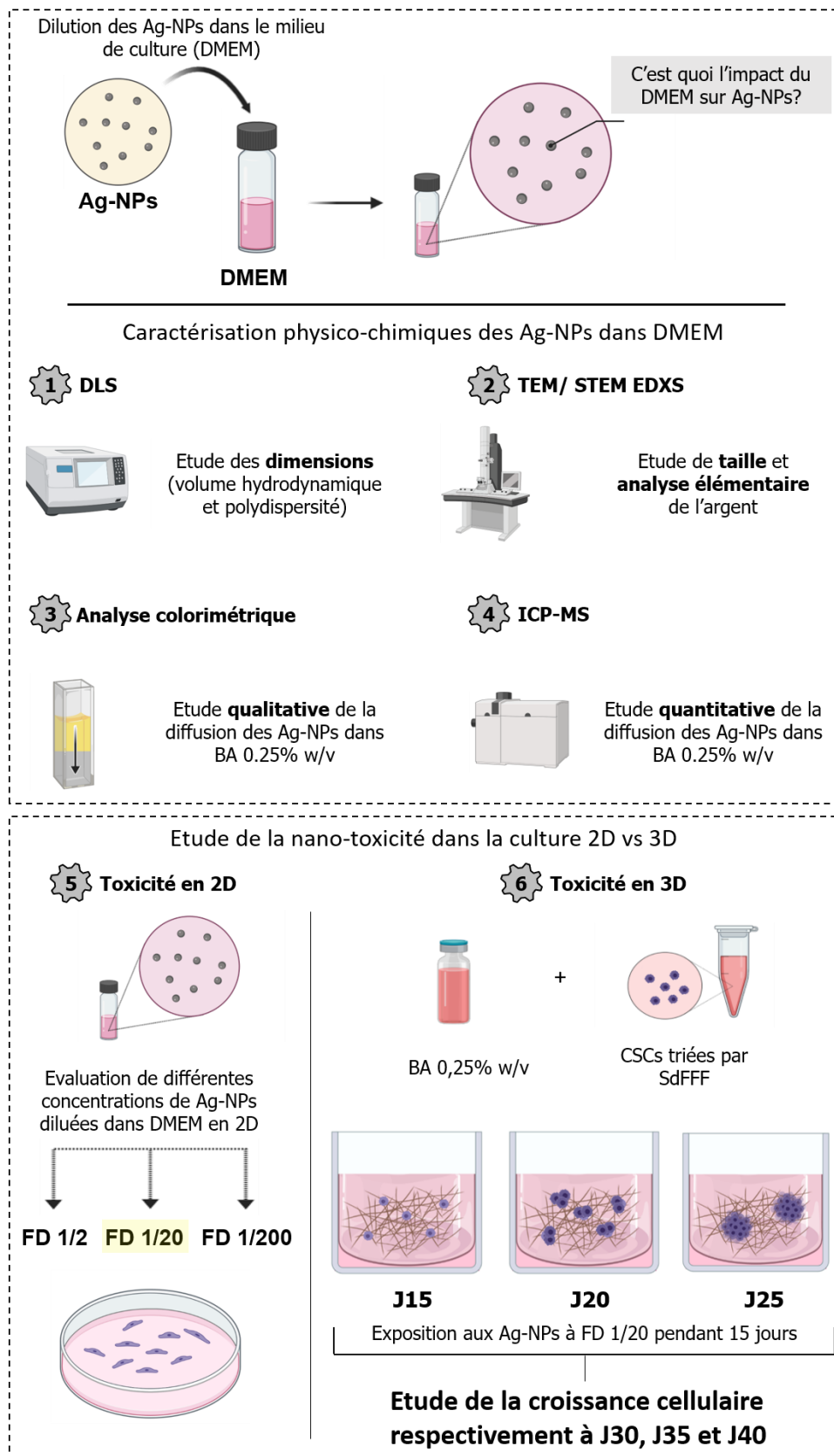


Figure V.1. Schématisation de la démarche scientifique des études de la nano-toxicité des Ag-NPs

V.2 Physicochemical characterization of manufactured silver nanoparticles and study of their impact on 2D cell culture vs reproducible 3D MCTS

V.2.1 Introduction

The emergence of nanoparticles (NPs) in the environment is witnessing today a notable increase.^{521,534,540,542} NPs are defined as entities having one or several external dimensions at the nanoscale ranging from 1 to 100 nm.⁵⁵⁵ They can originate from a natural phenomenon such as forest fires⁵⁵⁶ and volcanic eruptions⁵²² or they can have anthropogenic origins. In the latter, man-made manufactured NPs occupies the majority of disseminated NPs in the environment.⁵⁵⁷ They are used in a variety of applications especially in cosmetic materials⁵⁵⁸, energy production⁵³¹ and industrial technology⁵⁵⁹. Even though during their manufacturing they are entities of controlled materials, size range, surface composition and aggregation state, these physicochemical properties of the NPs cannot be controlled nor standardized after their dissemination.^{560–562} Therefore, they have an unforeseen and unpredictable impact on the environment and its inhabitants. Thus, we observe an increased interest in the assessment of their physiological impact on *in vitro* cellular models in order to correlate it with the real impact upon human contact.^{521,563–565} The majority of the studies conducted to evaluate the impact or/and toxicity of NPs are done on cancer cells.^{545,566} The use of cancer cell line for NPs impact is justified on one hand by the generation of unlimited supply of defined and controlled biological material in terms of gene expression, morphology and activated/inhibited signaling pathways, and on another hand unlike normal cells, cancer cell lines have little to zero change in phenotypic and genomic behavior between *in vivo* and *in vitro* models.^{87,567,568} Cellular models that were used in nanotoxicity assays are of two major categories: two-dimensional (2D) cell culture consisting of culturing cells in a monolayer manner in a cell flask and adding the NPs to the culture;^{80,552} and three-dimensional (3D) cell culture which consists of culturing the cells in a 3D system which majorly relies on an extracellular matrix-like network therefore the NPs diffuse through the network to the cells.^{80,545,569,570}

In 2D cell culture, the cellular morphology, behavior and interactions are not reflective of the real physiological state. Therefore, cellular response to external stimuli such as response to nanoparticle contact can be inaccurate. Nanotoxicity assays on 2D culture exhibited in several

studies using Ag-NPs⁵⁷¹ and TiO₂-NPs⁵⁴⁶, high cytotoxicity, inhibition of organelles function and DNA damage in a dose dependent manner. Whereas 3D cell culture allows the retrieval of the *in vivo* cellular morphology, the cell-to-cell and cell-to-ECM interactions and realistic activation/inhibition of cellular signaling pathways. Cancer cells in 3D culture tend to form multicellular tumor spheroids (MCTS) representative of *in vivo* solid tumors. Previously published list of nanotoxicity studies⁸⁰ that compare the impact of NPs in 2D cell culture versus 3D cell culture showed clear and significant difference of impact on cellular behavior. Several assays of TiO₂-NPs and Ag-NPs demonstrated less toxicity exhibited in 3D culture than in 2D, where in the latter cell death was highly pronounced.¹⁹ Other studies showed a decrease in cell viability in 3D cell culture after TiO₂-NPs administration, while 2D cell culture retained high viability throughout the culture with NPs.⁵⁴⁷ Several studies also demonstrated a disaggregation in spheroid structure destabilizing cell-to-cell and cell-to-ECM interactions.^{19,569} Therefore, we observe a significant gap in the results between 2D and 3D culture and non-repeatable between different experimentations with the same type of NP. However, the biggest limitation reported in the current NPs assays in 3D culture is the lack of reproducibility in the results in terms of cellular behavior, viability and morphology subsequent to NPs impact.⁸⁰ This is most probably caused on one hand by the fact that the majority of NPs assays that were carried out on 3D cell culture, were performed on 3D systems that lack reproducibility of the biological system itself. It is crucial that the MCTS models produced in a 3D system have the same biological characteristics such as size of spheroids, viability, morphology, spatial organization and growth kinetics. This point is important for two reasons: so the change in these characteristics can be correlated to the presence of NPs in the culture and so the results can be repeatable so the NPs impact can be standardized and further examined.

And on another hand, the NPs could vary in physicochemical properties between their manufacturing, dissemination and use in toxicity studies, therefore their characterization is of utmost importance.⁵⁶⁰⁻⁵⁶² In fact, if the NPs were not fully characterized just before their implementation in the 3D culture, when repeating the experiment, the NPs administrated each time could have different physicochemical properties such as difference in state of aggregation that induces a divergence in the diffusion manner of the NPs in the 3D systems and their contact with the cells, and/or size range that could vary proportionally to the biological medium used.⁵⁷² In a previously published review⁸⁰, we demonstrated a guideline that consists of six crucial steps that could help acquire a reproducible 3D model as well as reproducible NPs impact on the cells. First, the use of a well-characterized and mastered 3D scaffold that presents important reproducible physicochemical properties for cell culture as well as NPs diffusion. Second, the

choice of a cellular model that encloses key characteristics for tumor initiation and reproducible uniform-sized spheroids formation in the 3D scaffold. Third, characterization of the biological features of the uniform-sized spheroids produced in the 3D scaffold consisting of the initial state prior to NPs impact. Fourth, thorough characterization of the NPs upon their presence in the biological medium used for 3D culture, in terms of size distribution and aggregation state before their implementation in the 3D model. Fifth, specification of the concentration of NPs used for 3D assays, as well as the time of culture before NPs administration and the time of exposure of NPs to the cells in 3D before final state analysis of the spheroids. And sixth, a series of biological characterizations such as viability assays, metabolic activity, in order to compare the state of the spheroids before and after exposure.

In previous studies, we were successful in validating the three first steps. We generated reproducible 3D models based on the implementation of cancer stem cells (CSCs) in a supramolecular hydrogel. The mastered experimental design consists of firsthand the previously elaborated conception of a hydrogel formed by supramolecular assembly of low molecular weight gelators in particular glycosyl-nucleoside-bola-amphiphile with an amide group (BA). This supramolecular hydrogel present defined and reproducible key features for 3D culture assays such as an ECM-like fibrillar architecture and physicochemical stability. Secondhand, the design consists also of isolating Glioblastoma (U87-MG) CSCs that have interesting features such as self-renewal and multipotency, known *in vivo* to play an important role in tumor initiation and sustainability of tumor progression. Given that CSCs are found in very low proportions within the cell line, we routinely sort sub-populations of CSCs by sedimentation field-flow fractionation (SdFFF) which is a label-free non-invasive cell sorting method previously proven capable of sorting a sub-population of CSCs of a heterogeneous population. We also demonstrated that by implementing CSCs sorted by SdFFF in an adapted concentration of the supramolecular hydrogel, we obtain MCTS of uniform sizes and reproducible growth kinetics throughout culture time. (as seen in chapter IV) The spheroids maintain high viability, high metabolic activity and proliferation rate during culture time. They also mimic intrinsic properties of *in vivo* solid tumors by reproducing the multicellular layers inside of the spheroid consisting primarily of a peripheral proliferative layer and a hypoxic non-proliferative core containing pools of CSCs.

In this study, we investigate the impact of silver nanoparticles (Ag-NPs) of 30 nm in size on the development of the spheroids inside the hydrogel on different timepoints of culture (day 15, day 20 and day 25) after 15 days of exposure. The Ag-NPs are first characterized subsequent to their presence in the culture medium in order to assess the impact of culture medium on size

distribution and composition of the Ag-NPs. We also assess the diffusion kinetics of Ag-NPs from the supernatant to the hydrogel to ensure that the contact with the cells during 3D culture can occur. Next, we perform a nanotoxicity assay in 2D culture at different Ag-NPs concentrations to determine the concentration with the most relevant impact that will be carried on in 3D culture. In these 2D cultures, we study the viability as well as the metabolic activity correlated with proliferation rates during time of exposure. We also investigate the internalization of Ag-NPs in the cells in 2D culture in order to understand the nature of the communication between the cells and the NPs (membrane level, interstitial space between cells, intracellular, etc.). And finally, we examine the impact of these Ag-NPs on spheroid formation on the stated timepoints in terms of cellular capacity to form an MCTS.

V.2.2 Materials and methods

V.2.2.1 Silver Nanoparticles

The suspensions of 30nm Ag-NPs are purchased from nano-Composix NanoXact™ having the following parameters: diameter 29 +/- 3nm, coefficient of variation 10.9%, surface area 9.2 m²/g, mass concentration (Ag) 0.021mg/ml, particle concentration (Calc'd) 1,5.10¹¹ particles/mL, molar particle concentration 2.6.10⁻¹⁰M, hydrodynamic diameter 33nm, zeta potential -46mV, pH of solution 7.6, silver purity 99.99%, particle surface bare (citrate) and solvent is aqueous 2mM sodium citrate.

V.2.2.2 Dynamic Light Scattering (DLS)

Dynamic Light Scattering (DLS) measurements are performed using Zetasizer 3000 HAS MALVERN at 25°C in a volume of 400µL of Ag-NPs suspension.

V.2.2.3 Transmission electron microscopy (TEM)

Cells were fixed with 2.5 % (v/v) glutaraldehyde in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) during 1 hour at room temperature (RT) and overnight at 4°C, then washed in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) and then post-fixed in a mix 1% osmium tetroxide (v/v) / 1% potassium ferricyanide K₃Fe (CN)₆ (p/v) in 0.1M phosphate buffer during 2 hours on ice in the dark.

After washing in water, samples were stained in block in 0.5% (p/v) aqueous uranyl acetate solution during 30min, in the dark, at RT.

Subsequently, cells were washed in water then dehydrated through a series of graded ethanol and embedded in a mixture of pure ethanol and epoxy resin (Epon 812; Delta Microscopies, Toulouse, France) 50/50 (v/v) during 2 hours and then in 100% resin overnight at RT. The polymerization of the resin was carried out over a period between 24-48 hours at 60 ° C.

Samples were then sectioned using a diamond knife (Diatome, Biel-Bienne, Switzerland) on an ultramicrotome (EM UCT, Leica Microsystems, Vienna, Austria). Ultrathin sections (70 nm) were picked up on copper grids with carbon film above and then stained with Uranylless (Delta Microscopies, Toulouse, France) and lead citrate.

Grids were examined with a Transmission Electron Microscope (Talos F200S G2 FEG - Thermofisher - Eindhoven) at 200kV, equipped with a 4K*4K camera One View (Gatan, Paris (France)).

V.2.2.4 Elemental analysis of Ag-NPs by TEM/STEM EDXS

The different TEM mode used are: Bright Field (BF) and High Resolution (HR) up to 500k maximum magnification to image the morphology, dimension and texture of the material (current around 0,250nA) and Selected Area Electron Diffraction (SAED) to resolve the state of the material (amorphous or crystallized) using a camera length of 1m and a diffraction aperture of 10µm (nominal diameter).

For STEM/EDXS mode, the operational parameters are a condenser aperture C2 of 50 µm (converge angle of 7.5 mrad), a current around 0,250nA, a camera length of 260mm (HAADF: 29-177mrad) to optimize the spatial resolution and X photons rate (around 520counts/s – 1% dead time).

The TEM pictures are done using Digital Micrograph software (Gatan company).

The STEM pictures and EDXS spectra and maps are done using Velox software (Thermofisher company).

The TEM/STEM images and the spectra/elemental maps have been converted in tiff or jpg format after their treatment under software used.

V.2.2.5 Qualitative analysis of Ag-NPs diffusion in the hydrogel

The qualitative diffusion of Ag-NPs is performed by relying on the NPs staining diffusion through a transparent hydrogel prepared in water because the culture medium is red because of the presence of the phenol red in DMEM. Therefore, the color change of the hydrogel due to 30nm-Ag-NPs suspension diffusion is hidden. The 30nm-Ag-NPs suspension is yellow. For this matter, BA 0.25% w/v is formed in pure water (based on previously presented protocol and

having the same fibrillar architecture as hydrogel formed in culture medium) and Ag-NPs are added in the supernatant suspended in their solvent. The assay is conducted over 24h by studying the color change at the hydrogel level. If the hydrogel remains transparent, it means the NPs did not diffuse and vice versa.

V.2.2.6 Quantitative analysis of Ag-NPs diffusion in the hydrogel

In this assay, BA 0.25% w/v hydrogel are formed in culture medium (based on previously presented protocol) in a 96-wells plate, with a volume of 150 μL per well for a total of 9 wells, and 150 μL of Ag-NPs supernatant diluted by 10 in culture medium is added over each gel. The plate is then stored at 37 °C. For each well, the amount of silver is determined on 3 different fractions: the first 100 μL of the supernatant (SN), the remaining 50 μL at the interface of the supernatant and the gel + 50 μL of culture medium used in rinsing the interface (INT), and the hydrogel itself (GEL). Each fraction is mineralized in 70% nitric acid and silver is quantified at 2°C by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) (Agilent Technologies 7900). Fractions are collected at 3 different times, with a total of 3 wells per sampling point: 0h, 8h and 24h after the deposition of the supernatant.

V.2.2.7 Impact of Ag-NPs on 2D culture

U87-MG cell line purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) are cultured in a 96 wells plate with an implementation density of 1000 cells per well and left in an incubator for 24h at 37°C in order to ensure cell adherence to the plate bottom. After 24h, Impact of Ag-NPs is studied at different concentrations side by side with a control group:

- For a concentration of $1.3 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$: 100 μL of Ag-NPs suspension (experimental) or 100 μL of sodium citrate (control) + 100 μL of Dulbecco's modified eagle medium supplemented by 10% bovine fetal serum (DMEM) culture medium are added at t_0
- For a concentration of $0.13 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$: 10 μL of Ag-NPs suspension (experimental) or 10 μL of sodium citrate (control) + 190 μL of Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented by 10% bovine fetal serum (BFS) culture medium are added at t_0
- For a concentration of $0.013 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$: 1 μL of Ag-NPs suspension (experimental) or 1 μL of sodium citrate (control) + 199 μL of Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented by 10% bovine fetal serum (BFS) culture medium are added at t_0

After adding the suspensions, the impact of Ag-NPs is studied at different times of incubation: t_{5h} , t_{10h} , t_{24h} , t_{48h} and t_{72h} .

V.2.2.8 Live/dead assay

Cell viability assessed by a fluorescent viability/cytotoxicity assay (Thermofisher scientific, France). Live cells fluoresce green due to the uptake and fluorescence of calcein-AM in response to intracellular esterase activity; dead cells fluoresce red as a result of the entry of ethidium homodimer-1 through damaged cell membranes and subsequent binding to nucleic acids. Cells were then imaged using LEICA DMI8 microscope.

V.2.2.9 MTT assay

MTT assay is used to evaluate cellular metabolic activity at different timepoints of the 72h culture time. Preexistent culture medium is discarded and replaced with 100 μ L of culture medium. Then, 20 μ L of MTT solution are added to each well and the plate was incubated for 4 hours. Afterwards, 100 μ L of mixture is extracted from each well to a new 96 wells plate and absorbance was read at 492nm using a plate reader.

V.2.2.10 Impact of Ag-NPs on 3D culture

3D culture is conducted following the previously stated protocol (1000 cells of CSCs sorted by SdFFF in 100 μ L of BA 0.25% w/v per well with 200 μ L of DMEM in supernatant). At a concentration $0.13 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$, Ag-NPs are added at different times of incubation (at day 15, at day 20 and at day 25) for experimental conditions and sodium citrate for control conditions. Exposure time of Ag-NPs is 15 days. Therefore, at day 30, day 35 and day 40, cellular behavior is assessed by photonic microscopy.

V.2.3 Results and discussion

V.2.3.1 Nanoparticles properties in a biological medium

As stated at the beginning, we aim in this study to examine the impact of 30 nm Ag-NPs on the cellular behavior in 2D and on the tumor progression in 3D culture. But first we must evaluate the characteristics of the Ag-NPs in the culture medium used for culture maintenance to assess the state of the NPs that will be in contact with the cells. The Ag-NPs must be first suspended in the culture medium that has typical physicochemical characteristics that differ greatly from the nanoparticle suspension medium (aqueous sodium citrate). The culture medium contains a large number of compounds (sugars, amino acids, salts, etc.) that can interact with the nanoparticles, and might alter their initial state and stability, and therefore must be defined. DLS and Electron microscopy were used to analyze suspensions of 30 nm Ag-NPs diluted in culture medium (DMEM + 10% BFS). Their migration from a supernatant to a supramolecular gel was then studied indirectly by time dependent quantification of silver in each phase.

Dimension and polydispersity of Ag-NPs in the culture medium

DLS measurements show that the Ag-NPs remain suspended in the culture medium (30 nm) with hydrodynamic volume comparable to what was measured in the solvent (33 nm) (Table V.1). However, it shows a high polydispersity (pdI = 0.47) when suspended in the culture medium, which implies a high probability of having NPs of variable sizes and/or morphology in the culture medium. This high polydispersity observed in Ag-NPs in DMEM is most probably caused by the DMEM itself, since the culture medium on its own exhibits a PdI of 0.37.

Table V.1 DLS analysis of Ag-NPs suspensions diluted in the culture medium.

Sample	Z-average (nm)	PdI
DMEM	15	0.37
Ag-NPs in solvent	33	0.16
Ag-NPs diluted in DMEM	30	0.47

Ag-NPs diameter analysis

Observations by TEM are carried out a few minutes after the Ag-NPs are suspended in the culture medium, in order to observe the immediate effect of the medium on their morphological properties compared to Ag-NPs in their commercial solvent (sodium citrate). The micrographs clearly show an impact on the dimensions of the Ag-NPs, with a decrease in their diameter from a mean of 30.8 nm in the commercial solvent to a mean of 19.1 nm in the culture medium (Figure V.2). This shows that the culture medium induced a morphological and size changes to the Ag-NPs.

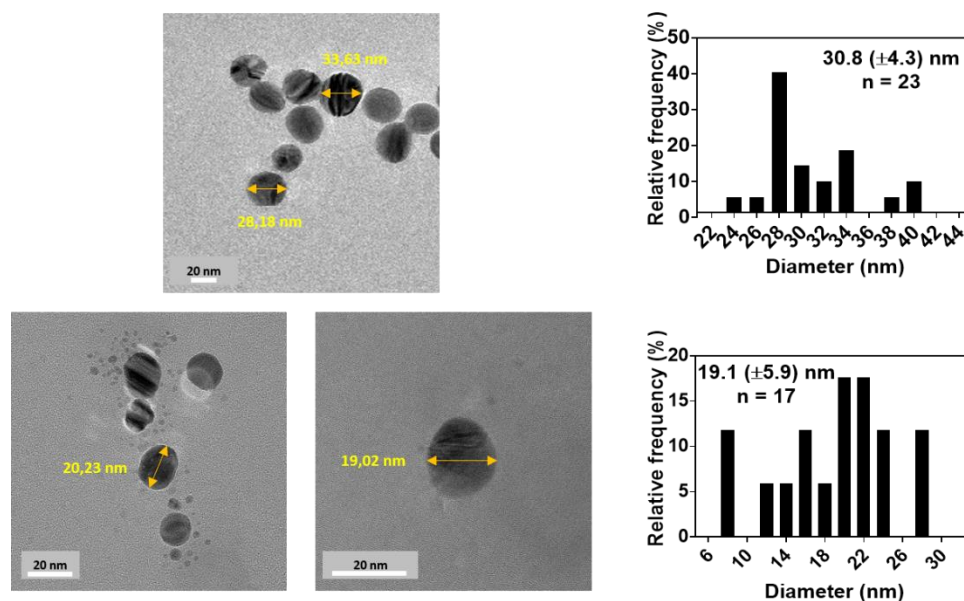


Figure V.2. TEM analysis of manufactured silver nanoparticles in (top left) commercial solvent: sodium citrate and (bottom left) culture medium: DMEM+ 10% BFS

Elemental analysis of Ag-NPs

This observation is supported by elemental analysis by STEM-EDXS mapping (Figure V.3). The aim is to ensure that the objects observed and whose sizes were reported are indeed the silver nanoparticles. The maps show high intensity of silver in the studied particles, thus confirming that they are indeed Ag-NPs. However, we observe slight diffusion of silver particles when Ag-NPs are suspended in culture medium, confirming furthermore the morphological change induced by the culture medium.

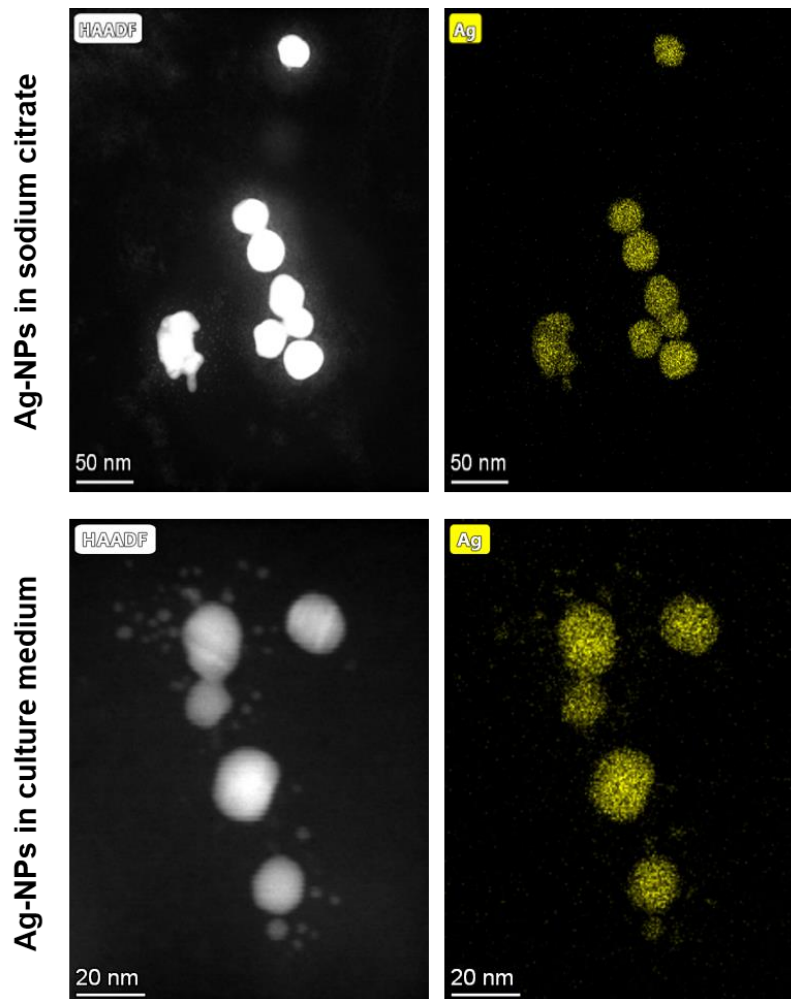


Figure V.3. STEM-EDXS mapping for elemental analysis of silver in Ag-NPs (top) in sodium citrate and (bottom) culture medium.

Several factors may explain the decrease in size of silver nanoparticles observed in the culture medium. It might be caused by the complex components and/or chemical features (salinity, protein compounds, etc.) that do not exist in the commercial solvent. Furthermore, the culture medium is a more oxidizing medium than citrate, which can cause surface oxidation of the nanoparticles and consequently decreases their size and morphology. In this case, the culture medium contains chloride ions, which can potentially shift the equilibrium of the solid silver towards the formation of the silver ion, the latter interacting with the chlorides.

V.2.3.2 Diffusion of Ag-NPs through the supramolecular hydrogel

The Ag-NPs mobility from the supernatant to the hydrogel that will be later used in the 3D culture are first determined quantitatively by relying on the staining of the Ag-NPs suspension due to their plasmonic properties. The diffusion is studied on a BA 0.25% w/v hydrogel by adding in the supernatant an equal volume of Ag-NPs suspension, incubated for 24h at 37°C. (Figure V.4)

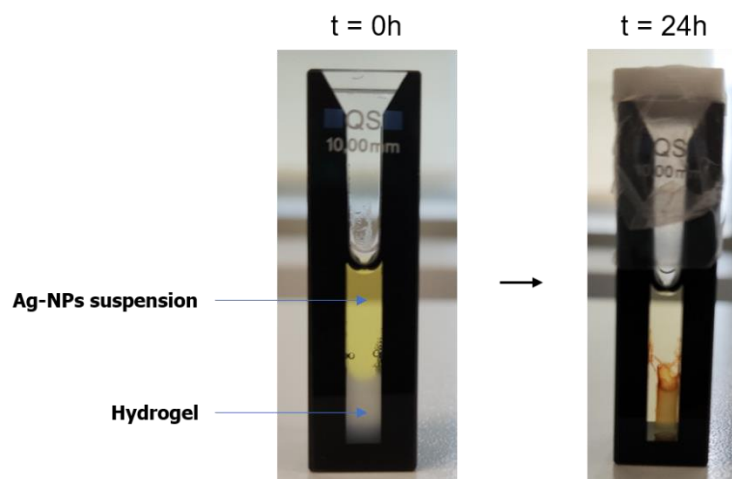


Figure V.4. Diffusion of Ag-NPs through BA 0.25% w/v after 24h at 37°C

After 24h of incubation time, the Ag-NPs suspension diffuse through the BA 0.25% w/v hydrogel as evidenced by the uniform staining of the gel and dilution of the supernatant. This observation therefore suggests that the porosity of the gel allows rapid migration of the nanoparticles within it and later achieve cellular level during 3D culture.

The second determination was quantifying the diffusion using ICP-MS. The latter is an elemental characterization technique based on the ionization of atoms contained in a sample by an argon plasma. It allows to assess the relative silver quantity in each examined sample. Three samples are analyzed: SN, INT and GEL (see materials and methods) at 0h, 8h and 24h after the introduction of Ag-NPs in the supernatant in order to follow the immediate diffusion of Ag-NPs in the gel. (Figure V.5)

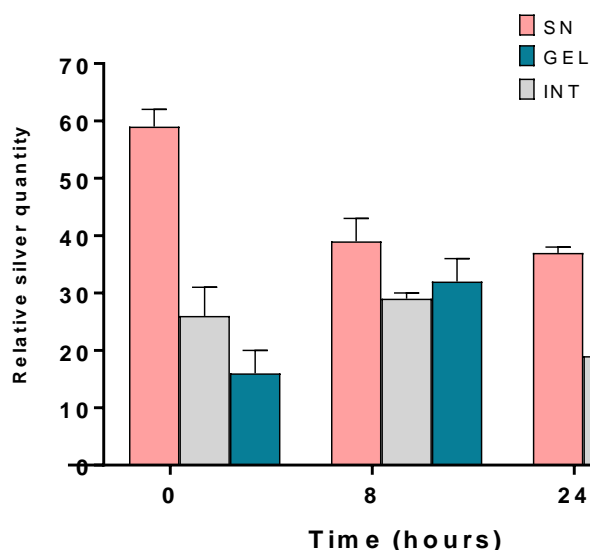


Figure V.5. Relative silver quantity measured by ICP-MS in the supernatant (SN), at the interface (INT) and in the hydrogel (GEL) at 0h, 8h and 24h after administration of Ag-Nps in the supernatant.

Quantification of silver in each sample shows that relative silver quantity in SN decreases from 0h to 24h while simultaneously increasing in the GEL. This indicates that potentially the increase in silver quantity in the gel is due to the diffusion of Ag-NPs over time, confirming the result observed with the qualitative assay. This result should be repeated by extending the time of study to fully quantify the diffusion to correlate it with the 3D culture assay.

V.2.3.3 Impact of Ag-NPs on 2D cell culture

After having defined the properties of Ag-NPs in a biological medium used during maintenance of cell culture, preliminary tests of contact between the nanoparticles and the cells are carried out. First, the Ag-NPs are put in contact with U87-MG cells cultured in 2D at different concentrations corresponding to different dilution factors (DF) in DMEM. High, intermediate and low concentrations are chosen in order to study the impact of exposure by different quantities of Ag-NPs on cellular viability, morphology, metabolic activity and proliferation rates. The initial molar particle concentration of Ag-NPs is $2.6 \cdot 10^{-4} \mu\text{M}$. The chosen concentrations to be tested are: $1.3 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$ corresponding to a DF of 1/2, $0.13 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$ corresponding to a DF of 1/20 and $0.013 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$ corresponding to a DF of 1/200.

For a concentration of $1.3 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$, after 24 hours of incubation time of 1000 cells of U87-MG in a 96 wells plate, initial medium is discarded and replaced with 100 μL of Ag-NPs suspension along with 100 μL of DMEM cell medium on the experimental well. While the control well

consisted on adding 100 μ L of sodium citrate (solvent) with 100 μ L of DMEM (Figure V.4) We observe that the control cells exhibited classic behavior of U87-MG in a 2D cell culture consisting of high viability with a slow increase in cell number during culture time, and the cells are well spread with cytoplasmic extensions clearly visible which indicates that the sodium citrate didn't have any impact on its own. (Figure V.6A) However, during the culture of the cells treated with Ag-NPs at $1.3 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$, we observe many dead cells at $t_{5\text{h}}$ followed by rounded and detached cell clusters at $t_{24\text{h}}$ and then a high cell mortality at $t_{72\text{h}}$. (Figure V.6B) This behavior is very unusual of U87-MG and indicates a clear effect of the Ag-NPs on cellular activity on one hand, promoting cell death at certain timepoints, and morphology on another hand translated by the loss of the classic spread of U87-MG and formation of small rounded clusters. The high cell death observed at $t_{72\text{h}}$ in the experimental condition may be explained by the low supply in nutrients (100 μ L of DMEM in 200 μ L of final volume) alongside the presence of a high quantity of Ag-NPs which implies that cell health is compromised.

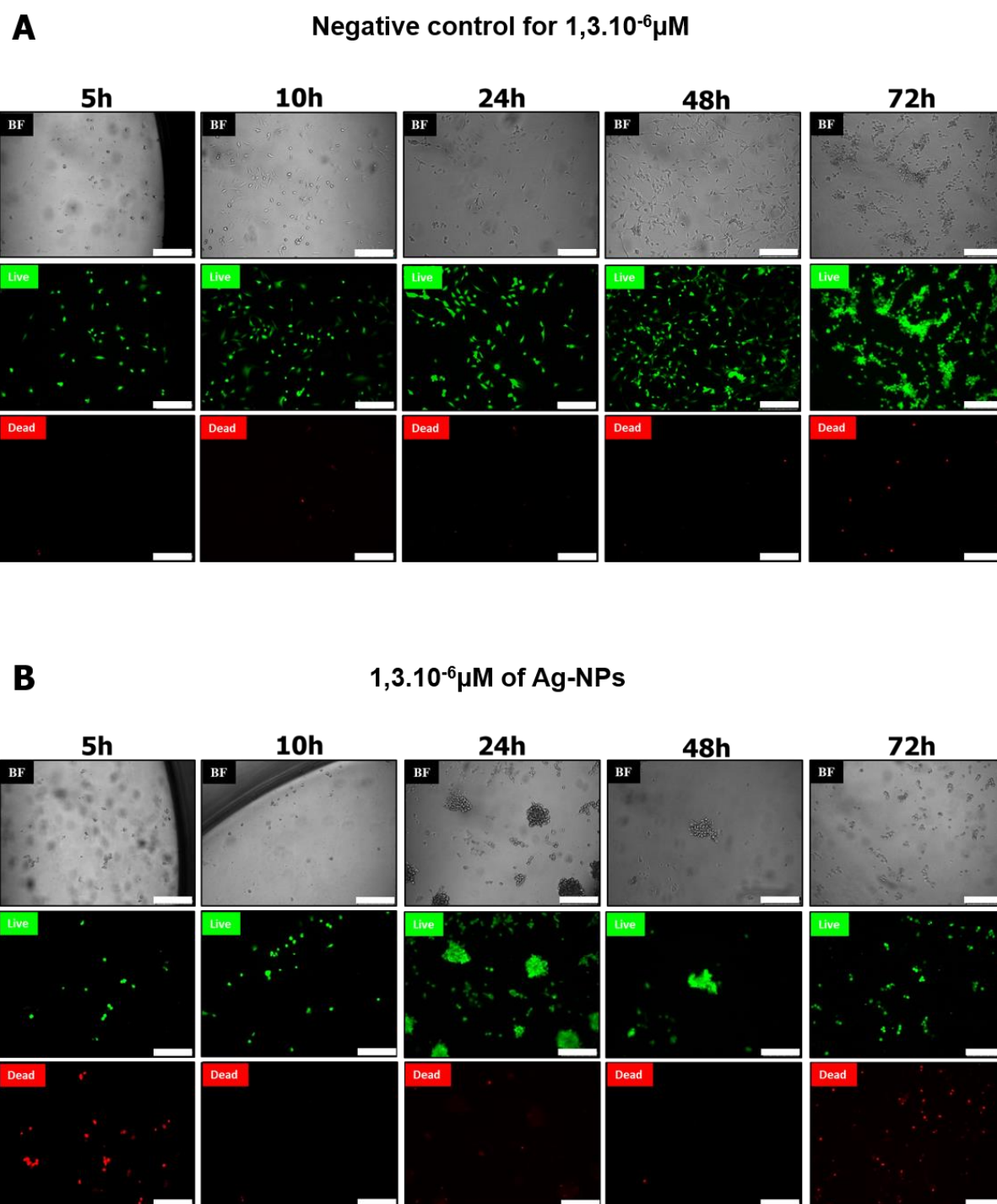


Figure V.6. 2D cell culture of U87-MG for 72h at a molar particle concentration of AG-NPs of $1,3 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$: (A) 100 μL of sodium citrate and 100 μL of DMEM were added (B) 100 μL of Ag-NPs suspension and 100 μL of DMEM were added; after initial 24h incubation time. Top panel represents imaging using bright field (BF), middle and bottom panel represent imaging using the Live/Dead kit to evaluate the live cells with calcein AM dye (in green) and dead cells using ethidium homodimer-1 dye (in red). Images were taken at $t = 5\text{h}, 10\text{h}, 24\text{h}, 48\text{h}$ and 72h after exposure to sodium citrate/Ag-NPs suspension. Scale bar = 250 μm .

In order to examine the impact of $0.13 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$ of Ag-NPs, after 24 hours of incubation time of 1000 cells of U87-MG in a 96 wells plate, initial medium is discarded and replaced with $10 \mu\text{L}$ of Ag-NPs suspension along with $190 \mu\text{L}$ of DMEM cell medium on the experimental well while the control well consisted on adding $10 \mu\text{L}$ of sodium citrate (NPs suspension solvent) with $190 \mu\text{L}$ of DMEM. (Figure V.7) In this culture, the negative control exhibits the same behavior as the previous culture. (Figure V.7A) Whereas for the culture in the presence of Ag-NPs, the cells show an important increase in number throughout the culture time and high viability with no decrease in proliferation and very few dead cells reported. (Figure V.7B) Notably, from $t_{48\text{h}}$ the cells form big clusters ($\sim 200 \mu\text{m}$) indicating the formation of neurospheres in a network of cells. The neurospheres layout, that are known to be rich in CSCs, suggests a gain in tumor aggressiveness. This concludes that the presence of NPs in this 2D culture did not have a toxic deadly effect on cells, on the contrary, it promoted cellular development and tumor aggressiveness.

And finally, when examining the impact of $0.013 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$, after 24 hours of incubation time of 1000 cells of U87-MG in a 96 wells plate, initial medium is discarded and replaced with $1 \mu\text{L}$ of Ag-NPs suspension along with $199 \mu\text{L}$ of DMEM cell medium on the experimental well while the control well consisted on adding $1 \mu\text{L}$ of sodium citrate (NPs suspension solvent) with $199 \mu\text{L}$ of DMEM. (Figure V.8) This culture has the exact same behavior as the previous culture, except the neurospheres that are formed are smaller in size ($\sim 150 \mu\text{m}$). This indicates that also with a very small quantity of Ag-NPs ($1 \mu\text{L}$) present in the culture environment, a clear impact on cellular behavior is observed.

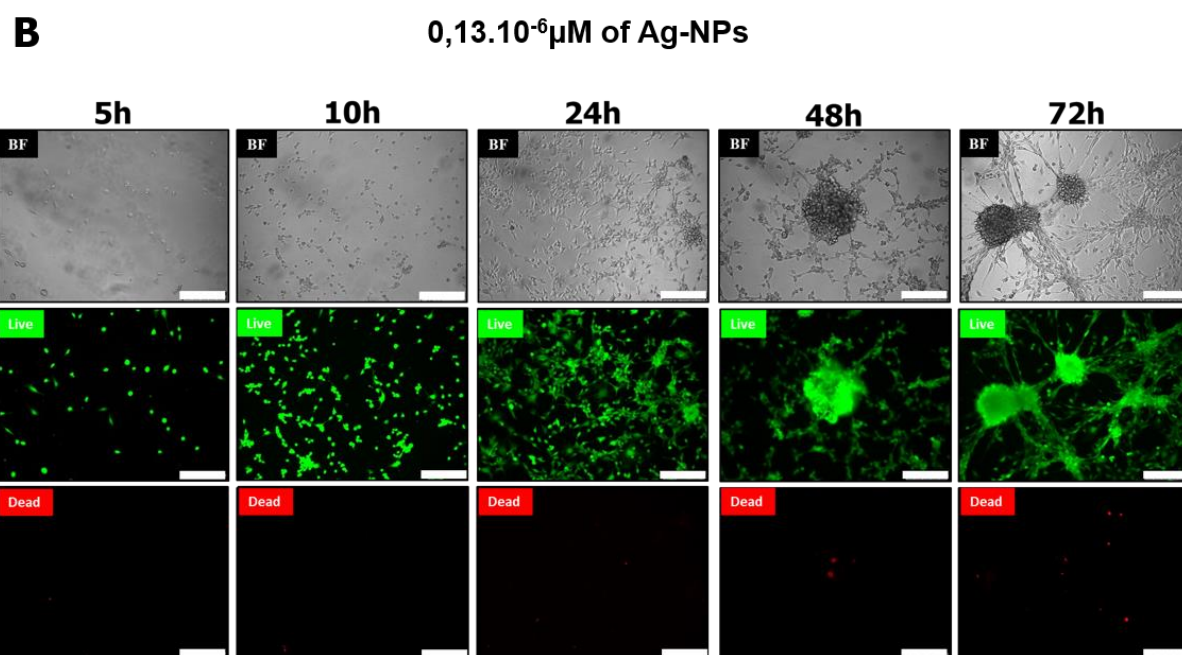
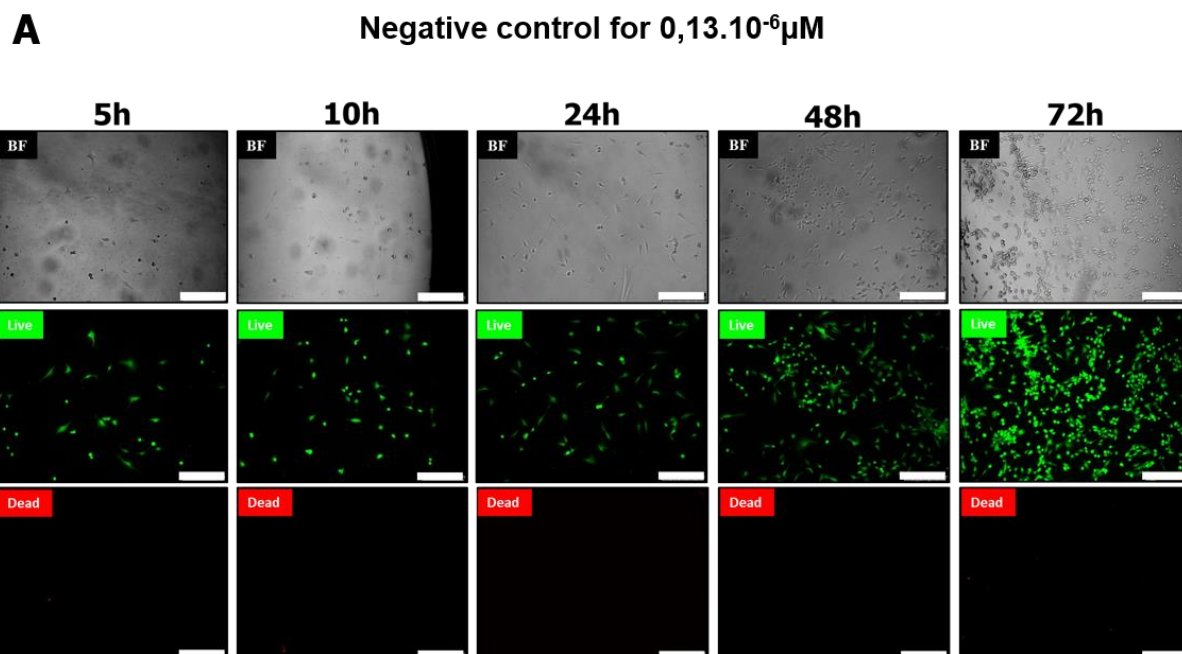


Figure V.7. 2D cell culture of U87-MG for 72h at a molar particle concentration of Ag-NPs of $0.13 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$: (A) 10 μL of sodium citrate and 190 μL of DMEM were added (B) 10 μL of Ag-NPs suspension and 190 μL of DMEM were added; after initial 24h incubation time. Top panel represents imaging using bright field (BF), middle and bottom panel represent imaging using the Live/Dead kit to evaluate the live cells with calcein AM dye (in green) and dead cells using ethidium homodimer-1 dye (in red). Images were taken at $t = 5\text{h}, 10\text{h}, 24\text{h}, 48\text{h}$ and 72h after exposure to solvent/Ag-NPs suspension. Scale bar = 250 μm .

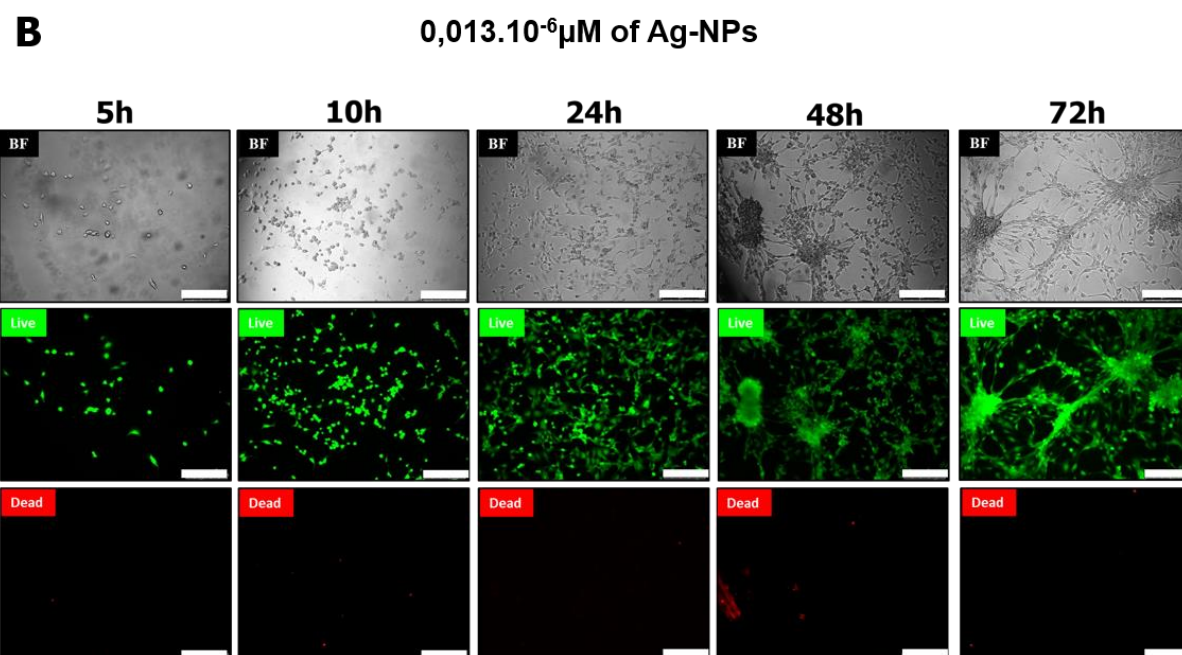
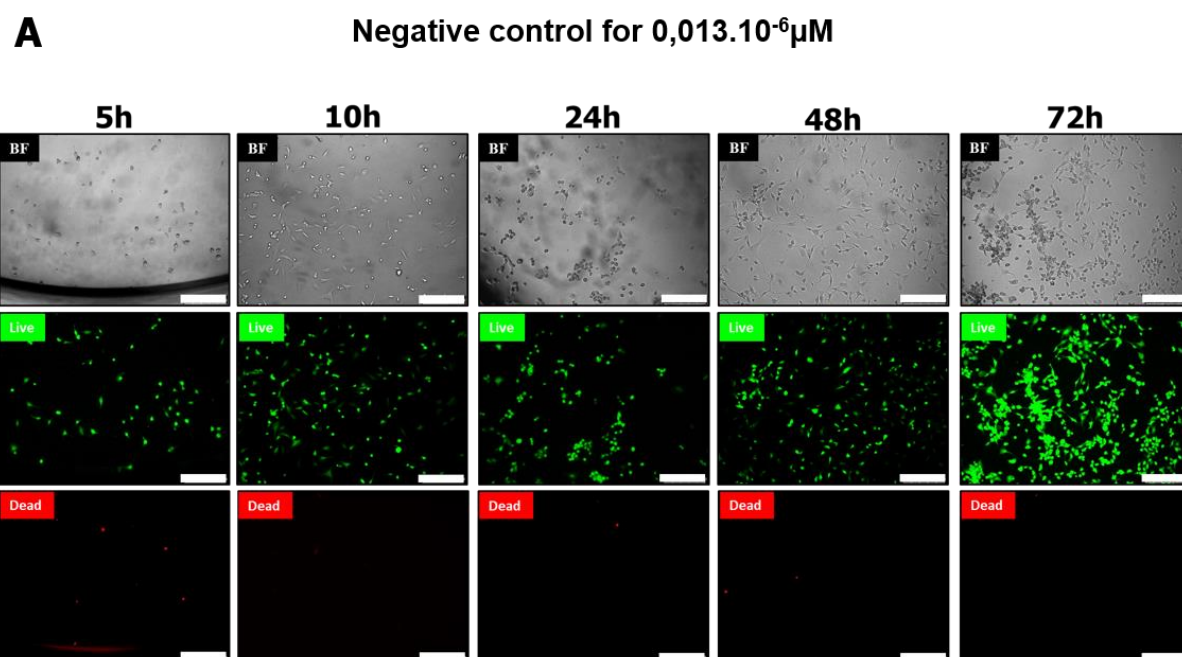


Figure V.8. 2D cell culture of U87-MG for 72h at a molar particle concentration of Ag-NPs of $0.013 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$: (A) $1 \mu\text{L}$ of sodium citrate and $199 \mu\text{L}$ of DMEM were added (B) $1 \mu\text{L}$ of Ag-NPs suspension and $199 \mu\text{L}$ of DMEM were added; after initial 24h incubation time. Top panel represents imaging using bright field (BF), middle and bottom panel represent imaging using the Live/Dead kit to evaluate the live cells with calcein AM dye (in green) and dead cells using ethidium homodimer-1 dye (in red). Images were taken at $t = 5\text{h}$, 10h , 24h , 48h and 72h after exposure to solvent/Ag-NPs suspension. Scale bar = $250 \mu\text{m}$.

The evaluation of the metabolic activity of the cells (Figure.V.9) shows for all the negative control conditions similar evolution in time, observed by a continuous increase from t_{5h} until t_{72h} . Whereas at a $1.3 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$ Ag-NPs concentration, on one hand, an increase in metabolic activity is observed until t_{24h} that is followed by a notable decrease afterwards indicating the presence of lesser number of cells that have an operational mitochondrial activity by consequence cell health seems to be compromised. On the other hand, for $0.13 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$ and $0.013 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$ concentrations, metabolic activity increases throughout culture time at much higher values than the control conditions and reaches a threshold at t_{72h} . However, the metabolic activity seems to be highest with $0.13 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$ concentration, that correlates with the large neurospheres observed in the 2D cultures that contain an important number of cells.

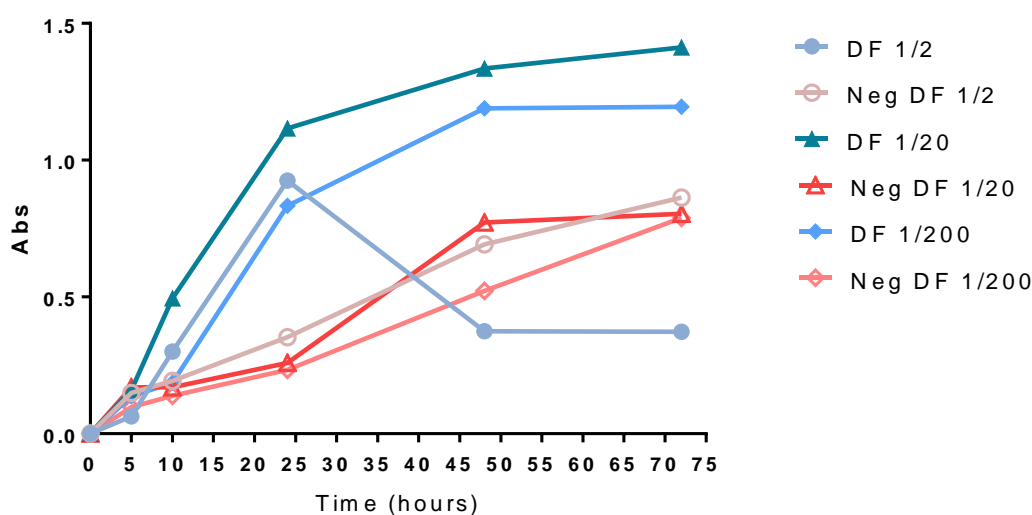


Figure V.9 Comparison of the metabolic activity of 2D cell cultures at different Ag-NPs concentrations to control conditions without Ag-NPs using MTT assay: Absorbance values were measured at 492 nm.

Taken together, our results show drastic changes in cellular morphology, viability, proliferations rates and metabolic activity that were mediated by Ag-NPs in 2D culture in a concentration dependent manner. However, the 2D culture must be repeated in order to confirm the observed cellular behavior. Nevertheless, the concentration $0.13 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$ of Ag-NPs exhibited the most important change in terms of cellular organization in large neurospheres and potential gain in tumor aggressiveness, very high viability and lastly highest metabolic activity by comparison to the control and the other experimental conditions. Therefore, we will be studying this concentration in further analysis.

V.2.3.4 Ag-NPs internalization in the cells in 2D culture

We observed a clear impact of Ag-NPs on 2D cell culture, but we want to investigate at what level the changes mediated by the nanoparticles occur. As stated above, nanoparticles may have different impact sites: cellular membrane, interstitial space between cells, or internalization into cytoplasmic/nuclear region. We refer to TEM imaging in order to observe cellular sections after exposure to Ag-NPs at different incubation times (t_{10h} , t_{24h} and t_{48h}). For the condition t_{10h} , there is absence of Ag-NPs in the examined cells, which implies that potentially the slight change in cellular behavior observed at this time may be due to the presence of Ag-NPs in the cellular environment and/or an impact on the membrane level that we were unable to observe during this analysis.

However, at t_{24h} we observe a clear internalization of Ag-NPs by the cells. (Figure V.10) We detect nanometric round shaped entities at cytoplasmic level in what seems to be cellular vesicles, that may refer to the endocytosis phenomenon by which cells uptake and transport external materials within the plasma membrane. By virtue of STEM-EDXS mapping, we confirm that the entities observed were indeed Ag-NPs, present inside the cytoplasm in very high numbers. Nevertheless, we did not observe any presence of Ag-NPs at the nucleic level. These observations imply that the change of cellular behavior at t_{24h} in the presence of $0.13 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$ of Ag-NPs is mediated by the internalization of the latter from the supernatant into the cellular cytoplasm. We cannot define yet on which biological aspect the impact has been done: activation/inhibition of proliferation and survival signaling pathways, inhibition/super activation of organelle functions such as mitochondria since we observed an increase in metabolic activity, induction of cell-to-cell interactions, etc.

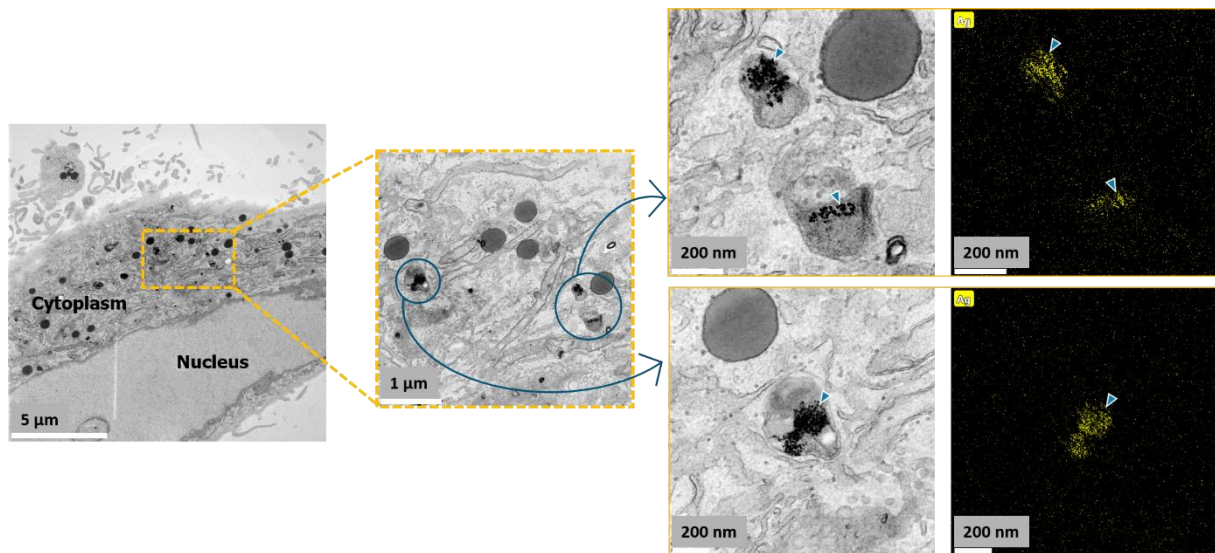


Figure V.10. TEM analysis coupled with STEM-EDXS mapping for elemental analysis of silver in Ag-NPs at $0.13 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$ inside of cells in 2D after exposure for 24h. Ag-NPs in cells are indicated by blue arrows.

Interestingly, for at t_{48h} we also observe internalized Ag-NPs in vesicles at the cytoplasmic level, but at a much inferior quantity than those examined at t_{24h} . (Figure V.11) This has potentially occurred due to the fact the Ag-NPs that were internalized by endocytosis at t_{24h} , and caused various alterations in cellular functions (viability, proliferation metabolic activity, etc.), were afterwards released from the cells by exocytosis. This is a phenomenon that occurs naturally for strange entities that the cells do not use in its physiological functions.⁵⁷³ However, this conclusion remain speculative, further assays must be performed especially by tracking the Ag-NPs and cellular activities to correlate and conclude the fate of the NPs after their uptake and impact. We did observe though, that even if the NPs are released from the intracellular level at t_{48h} , normal cellular activity is not restored at t_{72h} , which implies that the effects caused by NPs are still present. This also may be explained by the continuous endocytosis/exocytosis activity of the cells as long as Ag-NPs are present in the culture environment. It is interesting here to study longer exposure time and compare it to a culture where the medium is regularly discarded and replaced with a medium without Ag-NPs to examine of normal cellular behavior can be retrieved.

Now that impact on 2D culture of different concentrations of Ag-NPs are studied, an optimal concentration is defined ($0.13 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$) and nanoparticles fate in cells is examined, we are interested in studying the impact of Ag-NPs on the cells in 3D culture.

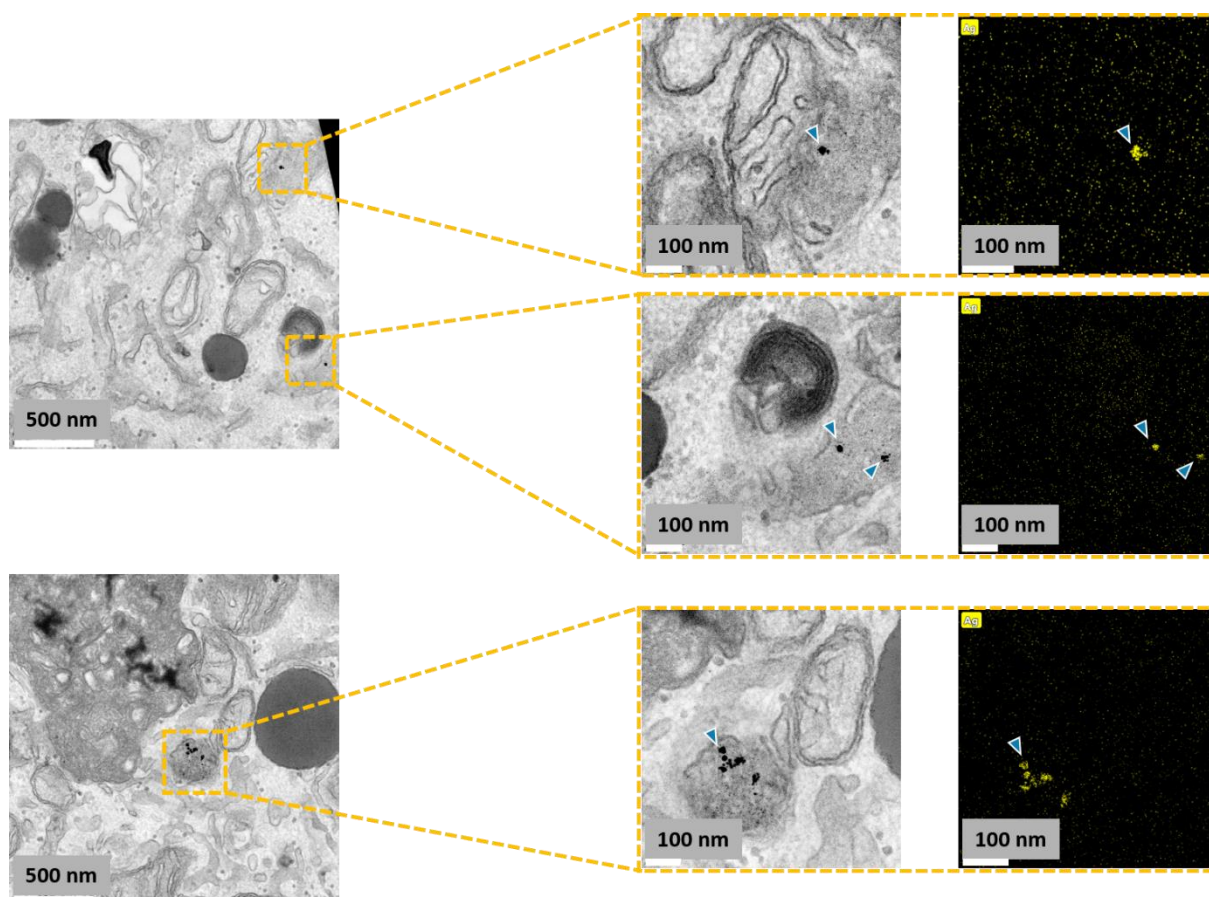


Figure V.11. TEM analysis coupled with STEM-EDXS mapping for elemental analysis of silver in Ag-NPs at $0.13 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$ inside of cells in 2D after exposure for 48h. Ag-NPs in cells are indicated by blue arrows.

V.2.3.5 Impact of Ag-NPs on 3D cell culture

In order to study the impact of Ag-NPs on cellular behavior in 3D culture, we followed our previously described protocol. Cancer stem cells that are sorted by SdFFF are implemented in BA 0.25% w/v supramolecular hydrogel at a density of 1000 cells per well. Three different time of NPs deposit are tested (at day 15, day 25 and day 30 of culture) for 15 days of exposure each at a concentration of Ag-NPs representative of $0.13 \cdot 10^{-6} \mu\text{M}$.

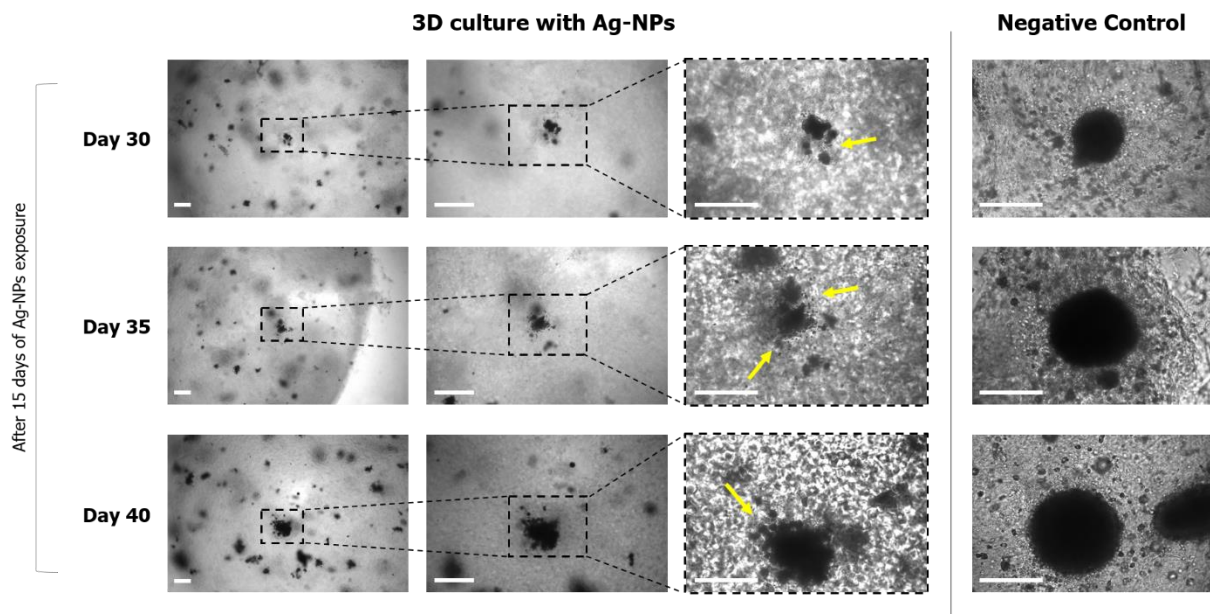


Figure V.12. 3D culture of CSCs sorted by SdFFF in BA 0.25% w/v: Bright field images taken at day 30, day 35 and day 40, 15 days after exposure to Ag-NPs for experimental conditions and sodium citrate for control conditions. Scale bar = 250 μ m.

At day 15, day 20 and day 25 of 3D cell culture, existing culture medium was discarded and Ag-NPs were diluted in culture medium and added to experimental culture wells while negative control consisted of sodium citrate diluted in culture medium at the same dilution factor.

For the condition treated at day 15, (Figure V.12) we observe after 15 days of Ag-NPs exposure very small clusters of cells by comparison to the control condition. When exposed to Ag-NPs the cluster has a diameter of 100 μ m while the spheroid formed without Ag-NPs has a diameter of 220 μ m. This shows that cellular proliferation and organization into a spheroid was inhibited by the presence of Ag-NPs.

For the condition treated at day 20, (Figure V.12) we observe after 15 days of Ag-NPs exposure a bigger cluster than the previous culture (140 μ m) but still smaller than the control condition for this timespan that has a diameter of 370 μ m representative of previously studied spheroids size at 35 days of culture (spheroids with a mean of 350 μ m and a standard deviation of 30 μ m). This proves the reproducibility of our 3D system based on CSCs in BA 0.25% w/v. (as seen in chapter IV) However, in this experimental condition we observe single cells surrounding the clusters that might indicate an inhibition of cell-to-cell contact at the surface and around the spheroid that was in progress.

Finally, for the condition treated at day 25, (Figure V.12) we observe that after 15 days of Ag-NPs exposure, a spheroid was in its final stages of development with a diameter of 220 μ m the

development was interrupted by the presence of Ag-NPs because it remains smaller than the control condition with a spheroid diameter of 380 μ m. (The latter proves once again the reproducibility of the 3D system) In this condition, we observe a disaggregation of the spheroid, presumably due to the loss in cell-to-cell contact. Interestingly, the disaggregation of cells in 3D cell spheroid reduced the diameter of cell spheroid with minimal impact on its overall spherical shape, that could indicate a disaggregation process occurring in a layer-by-layer manner.

V.2.4 Conclusion

With the emergence of nanoparticles from different origins especially manufactured NPs and their dissemination in the environment, the assessment of their impact on living organisms is of prime importance. NPs toxicity assays are generally studied on cell culture reflecting their physiological impact. While 2D culture seems to be a starting point for toxicity studies, their limitations reside in the gap they present with the *in vivo* environment. For this matter, a shift towards 3D culture has been observed, for they better represent physiological cell responses to external factors. Indeed, several 2D vs 3D nanotoxicity assays demonstrated an undeniable difference in assessing the NPs impact on cells. While 2D culture often tends to overestimate the toxicity by exhibiting high cell mortality, 3D culture usually demonstrates spheroid disaggregation that is not forcibly correlated with increase death rates.

In this study, we first studied the impact of cell culture medium on the size and morphology of 30nm Ag-NPs. We observed that Ag-NPs exhibit a slight loss in diameter upon contact with the culture medium, which most likely results from the interactions between Ag-NPs and the protein compounds present in the culture medium. We also verified that Ag-NPs are able to diffuse through the hydrogel's network to ensure impact on cells in 3D culture. The 2D cultures at different concentrations of Ag-NPs showed a concentration-dependent change in cell behavior mediated by Ag-NPs. While high concentrations promoted cells death and inhibition in proliferation rates, low concentrations promoted an important increase in proliferation, metabolic activity and high tendencies in forming neurospheres indicators of gain in tumor aggressiveness. In addition, Ag-NPs had a drastic impact on the development of the spheroid in terms of morphology and growth kinetics depending on time of exposure during culture. Most importantly, spheroid disaggregation was observed when Ag-NPs are present after spheroid formations is in its final stages. Collectively, our observations suggest that the biological effects of Ag-NPs may be contextual (2D vs 3D) and concentration/time dependent.

Also, the nanotoxicity results obtained from 2D cell models might have overestimated the toxic effects of Ag-NPs, at least in this study. Similarly, previous research also reported the tendency of 2D cell cultures to overestimate the toxicity of test substances. However, several studies need to be repeated and performed in order to clarify the nature of the impact and the fate of cells and NPs especially in 3D culture.

First, repeated 2D and 3D culture with viability assays must be performed to confirm that the cellular behavior is repeatable in the presence of Ag-NPs in terms of excessive proliferation and potential gain in aggressiveness in 2D culture, and to evaluate cell health in 3D culture especially concerning the isolated cells surrounding the spheroids. In addition, Ag-NPs intake inside the spheroids must be investigated in order to assess the level of the impact. We speculate that in 3D culture, the NPs act upon the micro-environment of the cells more than the intracellular region, because the disaggregation observed can be correlated to loss in cell-to-cell interactions. But it does not conclude that there is no intracellular internalization because the loss in tumor mass also indicates a reduction in proliferation rates which might be the result of signaling pathways inhibition. Since the impact in this preliminary study seems to affect the first layer of the spheroid, it is correlated to the cellular behavior of core region protection observed during therapies. Therefore, it is interesting to demonstrate if the pool of CSCs that is generally present in the core region of the spheroid will be able on one hand to resist to NPs impact and cytotoxicity and another hand if they will be able to recapitulate the loss in tumor mass and re-initiate tumor progression. Which also brings us to the evaluation of CSCs markers with and without NPs, because if the presence of NPs within the spheroids induces cellular differentiation and loss of stemness, this could be taken to more elevated studies such as CSCs targeting therapies.

If cell death is the result observed in 3D culture, it would be highly important to assess the nature of this fate by conducting apoptosis/necrosis assays, because it could be correlated to the nature of the impact and thus shows the huge gap between 2D culture assays and 3D culture assays. Reactive oxygen species are also an interesting target along with DNA damage assays, because if the expression of ROS increases upon NPs intake it could be correlated with high gain in mutations due to DNA damage at the genomic level explaining the observed behavior at the phenotypic level.

V.3 Conclusion

L'étude de toxicité des nanoparticules émergentes dans l'environnement devient d'une importance capitale en raison du nombre croissants de leur utilisation dans des produits de consommation courante. Aujourd'hui il est donc nécessaire de comprendre l'impact de ces NPs émergentes sur les composants d'un écosystème. Les études d'impact de NPs déjà citées dans le chapitre 1 et dans l'introduction de ce chapitre, montrent que la culture 2D classique ne suffit pas pour attribuer d'une manière affirmative une toxicité à un type de NPs. Il est important d'avoir recours aux cultures 3D qui représentent d'une manière plus importante la réponse cellulaire *in vivo*. En comparant les études 2D aux 3D en termes de nano-toxicité, il était conclu qu'un écart dans les résultats est toujours observé de façon que la 2D souvent surestime la toxicité des NPs, dont l'importance de la culture 3D. Plusieurs approches sont menées afin de concevoir une plateforme d'étude 3D maîtrisée et reproductible dont les composantes (support 3D, modèle cellulaire et NPs) sont définies aux plans physico-chimiques et biologiques pour corrélérer une réponse *in vitro* à une conséquence potentielle réelle de la dissémination des NPs. Cependant, un manque de répétabilité des données est souvent observé durant les études en 3D, ce qui ne permet pas d'avoir une conclusion définitive sur ces expériences. En effet, pour atteindre une reproductibilité des résultats, le modèle utilisé comme système vivant doit intrinsèquement présenter un minimum de modifications hors étude de la toxicité et les nanoparticules doivent être bien caractérisées avant chaque étude pour contrôler leur état après leur suspension dans un milieu biologique.

Notre travail nous a permis d'élaborer un système 3D reproductible à base de CSCs triées par SdFFF et un hydrogel supramoléculaire BA 0.25% w/v. Nous avons démontré dans le chapitre précédent, la possibilité d'obtenir avec ce système, des sphéroïdes tumoraux multicellulaires de tailles uniformes, avec une cinétique de croissance répétable et un comportement reproductible. Dans ce chapitre nous avons utilisé cette plateforme afin d'effectuer des études visant à comprendre les conséquences au niveau cellulaire de l'impact des Ag-NPs. Premièrement, nous avons caractérisé par DLS et TEM les dimensions et tailles des Ag-NPs après leur dilution dans le milieu de culture. Ceci a montré une diminution de tailles des particules et une forte polydispersité causées par le milieu de culture, ce qui pourrait être dû à la composition chimique du milieu de culture qui est différente que celle du solvant de stockage des NPs. En outre, les études qualitatives et quantitatives de diffusion des Ag-NPs dans l'hydrogel, par suivie de coloration des Ag-NPs et ICP-MS respectivement, ont montré qu'au bout de 24h nous

observons une diffusion rapide des Ag-NPs à travers le réseau fibrillaire qui permet de s'assurer du contact avec les cellules durant la culture 3D.

Les études d'impact sur le système vivant sont effectuées dans un premier temps sur les cellules en 2D et dans deuxième temps sur les cellules en 3D. Nous avons observé durant la culture 2D que le comportement cellulaire est modifié dépendamment de la concentration de Ag-NPs déposée. A forte concentration (dilution 1/2), les cellules se détachent et s'arrangent en clusters au bout de 24h, suivi par un taux de mortalité élevé au bout de 72h, par comparaison au contrôle. A concentration moyenne (dilution 1/20), les cellules présentent une vitesse de prolifération remarquable par rapport au contrôle, en formant des neurosphères au bout de 72h.

A faible concentration (dilution 1/200), les cellules reproduisent le même comportement que la concentration moyenne mais avec des neurosphères de tailles légèrement inférieures.

Nous avons confirmé également par TEM qu'il existe une internalisation des NPs par les cellules.

Alors qu'avec l'étude en 3D, une inhibition de la prolifération tumorale est observée quand les NPs sont déposées, la taille des sphéroïdes est plus petite en présence des NPs. En outre, nous observons une désagrégation de la superficie des sphéroïdes montrant que potentiellement l'impact se produit couche par couche.

Cependant, vu que ces expériences et résultats ne sont que préliminaires, pour confirmer ces divers points intéressants, il convient d'effectuer ces différentes étapes :

Premièrement, les tests de nano-toxicité de Ag-NPs en 2D et 3D doivent être répétées avec des tests de viabilité associées pour confirmer que le comportement cellulaire est reproductible en présence d'Ag-NPs. Surtout pour souligner la prolifération excessive et le gain potentiel d'agressivité en culture 2D. Et pour évaluer l'état des cellules en culture 3D, notamment en ce qui concerne les cellules isolées désagréger des sphéroïdes (mortalité, état de différenciation, etc.).

Deuxièmement, l'internalisation d'Ag-NPs à l'intérieur des sphéroïdes doit être étudié afin d'évaluer le niveau de l'impact. Nous supposons que dans la culture 3D, les NPs agissent sur le micro-environnement des cellules plus que sur le compartiment intracellulaire, car la désagrégation observée peut être corrélée à la perte d'interactions cellule-cellule. Mais cela ne permet pas de conclure qu'il n'y a pas d'internalisation. Car la perte de masse tumorale indique également une réduction de la vitesse de prolifération qui pourrait être le résultat de l'inhibition de certaines voies de signalisation.

Troisièmement, puisque l'impact dans cette étude préliminaire semble affecter la première couche du sphéroïde, ceci peut être corrélé au comportement cellulaire lors des thérapies. C'est-

à-dire, la partie périphérique consistant de cellules différenciées qui sont sensibles aux facteurs externes, seront éliminées en premier. Par conséquent, il est intéressant de démontrer si les CSCs qui sont généralement présentes dans la région centrale du sphéroïde seront capable, d'une part, de résister à l'impact et à la cytotoxicité des NPs et, d'autre part, si elles seront capables de compenser la perte de masse tumorale et de réinitialiser la progression tumorale. Quatrièmement, si la mort cellulaire est le résultat observé dans la culture 3D, il serait très important d'évaluer la nature du mécanisme mis en jeu : apoptose, nécrose, autophagie etc. Il permet de montrer également le grand écart entre les tests de toxicité en 2D par comparaison à 3D, au vu qu'en 2D nous avons observé une absence de mortalité cellulaire.

Cinquièmement, il se peut que les Ag-NPs induisent une réaction inflammatoire avec augmentation de synthèse des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces ROS sont à l'origine de cassure de l'ADN, donc l'observation de ces mutations génomiques, est un signe d'inflammation et de synthèse de ROS, donc de souffrance cellulaire induite par la présence des Ag-NPs.

En conclusion, nous avons montré une preuve de concept de l'utilisation du système 3D comme étant une plateforme d'études de la nano-toxicité. Cela ne limite pas les diverses voies d'applications que ce système permet d'établir comme des nouvelles approches thérapeutiques anti-cancéreuses, compréhension de la progression tumorale du Glioblastome, étude de nano-toxicité d'autres types de NPs etc.

Conclusion et Perspectives

Depuis longtemps les recherches en culture cellulaire conventionnelle connue comme bidimensionnelle, présentaient des incohérences avec les réponses observées au niveau clinique.^{1,12} Ceci a exigé une étude intermédiaire de la molécule d'intérêt (que ça soit à visée thérapeutique ou d'un potentiel toxique) sur des modèles plus complexes et plus représentatifs de l'organisme humain, les modèles animaux.⁵³ Certes, l'expérimentation animale fait l'objet d'une révolution scientifique fascinante, qui a permis d'élever le niveau de la recherche fondamentale et appliquée. Néanmoins, l'utilisation de modèles animaux présente plusieurs limites, notamment sur le plan éthique et en termes de coûts.⁵⁷⁴

En revanche, les organismes vivants, qu'il s'agisse de la cellule ou d'un organisme tout entier, sont des outils et des supports reprogrammables et réinscriptibles.

Afin d'élever le niveau de la recherche cellulaire sans recourir à des modèles animaux, un pont a été construit entre la culture cellulaire conventionnelle et l'expérimentation *in vivo*. Ce pont connu aujourd'hui comme la culture tridimensionnelle,⁵⁷⁵ consiste d'un environnement suffisamment complexe pour mimer le milieu physiologique absent dans la culture 2D.⁵⁷⁶ La culture 3D fait appel à des biomatériaux dont l'architecture intrinsèque permet de reconstruire la structure de la MEC, dans laquelle les cellules se comportent d'une manière réaliste.⁵⁷⁷ Les cultures cellulaires en 3D sont plus similaires aux caractéristiques morphologiques, métaboliques et fonctionnelles *in vivo* que la culture 2D.⁷

Dans le domaine de l'oncologie, la culture 3D permet de produire des sphéroïdes tumoraux multicellulaires, qui forment un modèle *in vitro* représentatif de la tumeur solide *in vivo*.²⁶ Il est démontré que les MCTS servent de plateforme d'étude pour évaluer l'impact de substances ou particules qui ont un potentiel toxique comme les nanoparticules.⁵⁷⁸⁻⁵⁸⁰ Mais également, ces plateformes peuvent servir pour des études de tumorigenèse^{22,581} notamment en ce qui concerne l'optimisation des thérapies classiques et la conception de nouvelles approches thérapeutiques.^{582,583} Quel que soit l'intérêt voulu, trois points primordiaux doivent être pris en compte. Premièrement, le support 3D doit avoir une cytocompatibilité pour maintenir la viabilité des cellules, et ses propriétés physico-chimiques doivent être adaptées à la lignée d'intérêt.⁶⁴ La structure interne du support doit être maîtrisée pour permettre une implantation sans endommagement des cellules suivi par une prolifération et une croissance de ces dernières. Deuxièmement, les sphéroïdes tumoraux élaborés en 3D doivent reproduire la construction de la tumeur d'origine.²⁶ Dans le cas des tumeurs solides qui manifestent une multicellularité intrinsèque, les MCTS doivent posséder la même structure/organisation en multicouches : une couche périphérique proliférative formée en majorité de cellules différenciées, une couche intermédiaire quiescente contenant des précurseurs de cellules indifférenciées et un centre

hypoxique riche en CSCs.^{29,59} Troisièmement, ce qui est le plus important, est de garantir une reproductibilité du système d'études.^{59,584} C'est-à-dire les MCTS doivent se développer de la même manière au plan spatio-temporel au sein de la matrice. Il faut viser le fait que la vitesse de prolifération cellulaire, ainsi que la viabilité, le métabolisme, la morphologie et surtout la taille des sphéroïdes soient reproductibles entre les cultures par rapport aux temps d'incubation. De ce fait, une altération de ces critères, suite à la présence de l'entité étudiée, peut être définie comme un effet causé par l'entité et non pas une modification intrinsèque du système en soi. Ceci permettra une évaluation plus correcte du test de toxicité ou de l'approche thérapeutique en question.

L'objectif de ce projet de thèse est de concevoir un modèle 3D reproductible formé de deux éléments : d'une part un support 3D bien défini dont l'étape de fabrication et les propriétés physico-chimiques sont maîtrisées et d'autre part un modèle cellulaire possédant des critères d'initiation tumorale capable de se développer d'une manière répétable au sein du support 3D, et dont l'isolement et la caractérisation sont également maîtrisés. Un tel système représente une plateforme d'études multifactorielles (thérapies, tumorigenèse, etc.), mais nous visons en particulier à mettre cette plateforme à l'épreuve dans l'étude de l'impact de nanoparticules à potentiel toxique sur un système vivant.

Afin d'effectuer une culture 3D, un panel de biomatériaux existe aujourd'hui, qui diffèrent en termes de méthode de conception et de structure tridimensionnelle. Dans le **Chapitre I** de ce manuscrit, nous avons discriminé entre les méthodes qui sont dépourvues de matrices et les méthodes qui se basent sur la mise en place d'un support complexe. Les cultures 3D dépourvues de matrice, comme les plaques non adhérentes par exemple, ne peuvent pas reproduire la complexité du micro-environnement physiologique. Ces types de cultures permettent au mieux la mise en place de la morphologie arrondie non adhérente des cellules. Cependant, les interactions cellule-cellule et cellule-MEC demeurent absentes. Ces dernières sont à la base de l'activation/inhibition de certaines voies de signalisations primordiales pour la survie, la prolifération, le métabolisme et la réponse des cellules aux stimuli externes. De ce fait, les supports 3D basés sur la présence de matrices de culture pour les cellules sont devenus plus populaires. De ces supports 3D, nous retrouvons notamment les hydrogels à base de molécules gélatrices de faibles poids moléculaires. Ils se forment par un autoassemblage supramoléculaire des molécules gélatrices. En effet, par le biais d'un élément déclencheur, les molécules s'assemblent en fibres qui s'agencent par la suite en matrice complexe retenant une partie du solvant, formant par conséquent l'hydrogel. Ceci est défini par la transition sol-gel, qui est facilement maîtrisée et modulable.

Donc dans ce projet de thèse nous nous sommes intéressés à une famille de ces gels, les glycosyl-nucléo-bola-amphiphile. Ce choix est argumenté par le fait que ces hydrogels possèdent deux avantages majeurs : des propriétés physico-chimiques modulables et une cinétique de gélation contrôlable. Dépendamment de la lignée cellulaire choisie, les propriétés physico-chimiques notamment la viscoélasticité, peuvent être adaptées pour mimer celles du tissu d'origine, par un simple enjeu de concentration de molécules gélatrices de départ. Ceci permettra une meilleure implémentation des cellules dans le micro-environnement 3D et par conséquent les cellules distribuées dans le volume du gel, prolifèrent et s'organisent plus facilement en sphéroïdes.

La cinétique de gélation définie pour un gel à une certaine concentration, est toujours la même. C'est-à-dire le temps de la transition sol-gel ne change pas pour une même concentration étudiée. Ceci permet de maîtriser la conception de l'hydrogel et sa pratique pour la culture cellulaire.

En ce qui concerne le modèle cellulaire, nous avons mené au sein de ce projet une hypothèse que l'utilisation de cellules souches cancéreuses, possédant des critères innés pour l'initiation tumorale, permettra potentiellement la conception d'un modèle vivant de caractéristiques reproductibles dont la cinétique de croissance au cours du temps, le métabolisme, la taille de sphéroïdes uniformes, etc.

En effet, les CSCs qui se trouvent en région centrale hypoxique des tumeurs solides, possèdent deux caractéristiques particulières clés qui sont l'auto-renouvellement et la multipotence. Ces caractéristiques permettent aux CSCs *in vivo* de se diviser d'une façon asymétrique. D'une part, les CSCs donnent des cellules différenciées et spécialisées qui soutiennent le développement tumoral et par conséquent nous observons une augmentation en masse cellulaire durant la progression tumorale. D'autre part, les CSCs se clonent en donnant d'autres copies de CSCs par conséquent s'auto-maintenir au sein de la niche tumorale.

Suite à une approche thérapeutique (chimio ou radiothérapies), les CSCs échappent aux traitements grâce à des phénomènes particuliers (par exemple l'activation des pompes d'efflux pour éliminer les molécules thérapeutiques, la plasticité quiescence/caractère souche, etc.). En conséquence, les cellules avoisinantes sont éliminées mais les CSCs demeurent toujours présentes au site tumoral. Par le biais de la division asymétrique et la multipotence, les CSCs sont capables d'initier de nouveau une progression tumorale tout en rétablissant la multicellularité de la tumeur.

Au vu de toutes ces critères connus, nous nous sommes particulièrement intéressés à étudier le comportement des CSCs dans un support 3D afin d'essayer de produire des sphéroïdes de

caractéristiques reproductibles (taille, morphologie, etc.). Cependant, les CSCs se trouvent dans des proportions très faibles au sein de la niche tumorale mais également dans les lignées cancéreuses. De ce fait, nous avons utilisé pour ce projet une lignée de Glioblastome (U87-MG) qui est un cancer hautement hétérogène et qui présente un taux élevé de CSCs par rapport à d'autres lignées.

Toutefois, un isolement de la sous-population de CSCs à partir de la lignée mère est inévitable. Pour se faire, nous avons eu recours à une méthode de tri douce et non-invasive, la SdFFF. Contrairement à d'autres méthodes de tri, la SdFFF ne nécessite pas de pré-marquage cellulaire ce qui permet de trier les cellules tout en conservant leur intégrité intrinsèque. Elle se base principalement sur les propriétés biophysiques des cellules telles que la taille et la densité, pour donner à partir d'une population mère hétérogène deux sous-populations caractérisées biologiquement et définies comme une sous-population différenciée et une autre de CSCs.

Cependant, nos premières approches de culture 3D présentées dans le **Chapitre II**, avaient comme but de définir les conditions du support 3D adaptées à la lignée U87-MG, le caractériser sur le plan physico-chimique et maîtriser un protocole de culture 3D dont les étapes sont bien définies. Suite à un criblage de diverses concentrations de BA et BU et de différentes densités d'ensemencements de cellules, deux candidats ont été retenus. BU 0,1% w/v et BA 0,25% w/v possédant respectivement une viscoélasticité de 0,9kPa et 0,4kPa, qui sont dans la gamme de la viscoélasticité du tissu cérébral (0,1 à 1kPa). En outre, l'architecture fibrillaire des hydrogels s'est avérée efficace pour le transport des molécules entre le gel et le surnageant. Le protocole expérimental de la culture 3D utilisant ces gels nécessitait des étapes clés : suite à l'ajout du milieu de culture sur les molécules gélatrices, le mélange passe par un bain sonicateur pour 15 s et puis dans un bain-marie à 80°C afin de dissoudre les molécules gélatrices dans le solvant. A la sortie du bain-marie, la diminution de la température est l'élément déclencheur de la transition sol-gel pour ces deux hydrogels. Après 1 min d'attente à T_{amb} afin que la température des gels baisse, une suspension cellulaire dans le but d'obtenir 1000 cellules par 100µL de gel, est mélangée avec le gel et distribuée dans une plaque de 96 puits. Ce protocole demeure maîtrisé et offre un moyen d'implantation des cellules dans la matrice 3D. Cependant, nous avons observé à l'issue de ces cultures, que seule la condition BA 0,25% w/v permet le développement cellulaire mais il existe une variation de la cinétique de croissance des cellules dans le support 3D, et les sphéroïdes en fin de culture présentent des tailles très variables.

Pour surmonter ce problème, nous avons décidé de remplacer la population hétérogène utilisée dans ces premières cultures, par une population de CSCs. Pour se faire, il était nécessaire de trier les CSCs tout en conservant leurs propriétés biologiques dont le caractère souche. Dans le

Chapitre III, nous avons montré que la SdFFF, permet de trier en routine des sous-populations de CSCs. Cependant, dans l'optique d'utilisation de cette méthode comme outil de diagnostic dans les recherches cliniques, nous avons évalué le couplage de la SdFFF avec un détecteur biosenseur micro-fluidique qui a également prouvé être capable de discriminer les CSCs sans marquage. Cette approche de futur couplage "online", a nécessité une étape de validation de la compatibilité des deux techniques "offline". Ceci a débuté par une unification de la phase mobile par le milieu DEP qui permet l'acheminement des cellules dans le canal de la SdFFF et de jouer un rôle de polarisation des cellules pour les discriminer dans le biosenseur. Le tri cellulaire par SdFFF avec milieu DEP comme phase mobile a mené à l'obtention de deux sous-populations collectées à des temps de rétention différents. Les caractérisations biologiques de ces sous-populations ont prouvé que la première fraction (F1) collectée consiste en cellules de grandes tailles, peu clonogéniques, n'exprimant pas de marqueurs souches et donc une sous-population de cellules différenciées. Alors que la deuxième fraction (F2) collectée consiste en cellules de petites tailles, hautement clonogéniques présentant une forte expression de marqueurs souches et donc une sous-population de CSCs. Les sous-populations sont ensuite caractérisées par le biosenseur qui a montré des fréquences de transition pour F1 et F2 représentatif respectivement pour des cellules différenciées et des CSCs. Ces études montrent qu'un potentiel couplage des deux techniques est possible pour avoir un seul outil de diagnostic et pronostic. En outre, ces études nous ont permis d'établir un moyen maîtrisé d'isolement de la population de CSCs d'intérêt pour les essais de culture 3D.

Après avoir défini le protocole de conception de la concentration d'hydrogel d'intérêt et l'isolement des CSCs, nous avons procédé à l'étude du comportement des CSCs avec l'hydrogel BA 0,25% w/v dans le **Chapitre IV**. Les objectifs étaient de mettre en œuvre les CSCs pour produire des tumeurs multicellulaires représentatives de la tumeur d'origine, et garantir une reproductibilité du système 3D. Nos résultats ont démontré que les CSCs ont présenté une forte viabilité tout au long du temps de culture tout en ayant une activité métabolique croissante. Mais ce qui était le plus remarquable, c'est qu'en répétant l'expérience avec des tris cellulaires différents et des lots de gel différents, la vitesse de croissance des CSCs était la même à chaque temps d'incubation étudié. C'est-à-dire qu'à J5, J15, J25 et J35, la viabilité cellulaire, l'activité métabolique, la taille des sphéroïdes ainsi que l'organisation spatiale étaient toutes répétables avec une variabilité négligeable ($350\mu\text{m} \pm 30\mu\text{m}$) par comparaison à la population hétérogène qui présente des variabilités significatives ($200\mu\text{m} \pm 103\mu\text{m}$) après 35 jours de culture. Ceci démontre qu'en utilisant une population de CSCs pour la culture 3D dans un hydrogel dont les propriétés physico-chimiques sont bien définies, cela permet la conception de MCTS de

cinétique de croissance et de tailles uniformes. Ceci est primordial pour les études ultérieures (tumorigenèse, thérapies, toxicité, etc.) afin de permettre de bien corréliser les modifications observées au niveau du système 3D à la présence de la substance étudiée.

Une fois le système 3D défini, maîtrisé et reproductible, il peut servir comme plateforme d'études pour diverses applications. Nous étions particulièrement intéressés pour s'en servir comme bioindicateur pour évaluer l'impact de NPs à potentiel toxique. Dans le **Chapitre V**, nous montrons une étude préliminaire d'impact de NPs d'argent sur le développement cellulaire (en 2D et en 3D). Néanmoins, étant donné qu'un milieu biologique pourrait avoir des effets sur les NPs (morphologie, agrégation, dimensions, taille, etc.), nous avons commencé par des caractérisations physico-chimiques de la suspension d'Ag-NPs diluée dans du DMEM (milieu de culture de la lignée U87-MG). En effet, il est primordial de toujours bien contrôler l'état des NPs juste avant leur mise en contact avec les cellules car cela contribue à définir l'origine de la toxicité si elle a lieu. Nous avons alors caractérisé les Ag-NPs dans le milieu de culture et nous avons observé une réduction en taille des Ag-NPs causée probablement par la composition chimique et biologique du milieu de culture (salinité, complexes protéiques, ions, etc.). En outre, nous avons évalué d'une manière qualitative et quantitative la diffusion des Ag-NPs dans l'hydrogel BA 0,25% w/v qui est utilisé dans la culture 3D. Nous avons montré qu'au bout de 8h, il y a eu un passage des Ag-NPs du surnageant vers le gel. Il serait important dans des futures analyses, d'étudier l'état des Ag-NPs dans l'hydrogel notamment l'homo ou l'hétéro agrégation des nanoparticules. Ensuite, nous avons étudié l'impact des Ag-NPs à différentes concentrations sur des cellules en 2D. L'évaluation de la viabilité, morphologie, l'activité métabolique et la vitesse de prolifération ont montré qu'à forte concentration (FD1/2), les Ag-NPs induisent une mortalité cellulaire et une inhibition de prolifération. Les cellules ont cependant perdu leur morphologie étalée qui est typique d'une culture en monocouche, et elles ont adoptées une morphologie arrondie en amas qui est signal d'un stress cellulaire. Cependant, à des faibles concentrations (FD 1/20 et 1/200), les cellules ont adopté un phénotype agressif en formant des neurosphères au sein de la culture. En outre, nous avons observé une internalisation des Ag-NPs au niveau cytoplasmique qui devra être bien définie, surtout concernant l'impact sur les organelles afin de bien comprendre le phénotype observé. Enfin, les études de nano-toxicité en 3D, ont montré que les Ag-NPs ont eu un impact potentiellement contraire à celui en 2D. Ce que nous pouvons confirmer c'est que les Ag-NPs ont montré une inhibition de prolifération et de développement des sphéroïdes, la taille des sphéroïdes en présence des Ag-NPs est significativement inférieure à celle du contrôle négatif. Lorsque les Ag-NPs sont administrées en fin de culture (à J25) nous observons une désagrégation de la

couche périphérique du sphéroïde. Cela n'est pas concluant sur la toxicité en 3D, mais nous avons remarqué un écart entre l'impact en 2D et en 3D, démontrant ainsi la nécessité d'avoir un système 3D pour des études de nano-toxicité reflétant le vrai impact sur les organismes vivants.

De ce travail de recherche se dégagent plusieurs perspectives qui permettraient d'en étendre la portée sur trois différents champs de développement.

Le tri cellulaire par SdFFF

La capacité de la SdFFF à trier des sous-populations souches a déjà été prouvée avec différentes lignées cancéreuses et saines. Cependant, en raison de la plasticité des CSCs la sous-population n'est jamais à 100% pure, il existe des précurseurs de CSCs au sein de la sous-population collectée. Il serait intéressant après plusieurs collectes de la fraction de CSCs (F2), de ré-éluer cette suspension en SdFFF. Ceci permettrait potentiellement une séparation plus poussée entre les précurseurs de CSCs et les CSCs pures. Au vu que la suspension cellulaire devient en majorité des cellules de tailles et densité très proches, donc moins polydisperse qu'une population classique de U87-MG, il faut adapter de manière correspondante le débit de la phase mobile et le champ centrifuge. Il serait intéressant d'essayer de diminuer le débit de la phase mobile donc la force parabolique générée par le flux serait plus faible ; et augmenter la vitesse de rotation du bol donc la force de sédimentation centrifuge serait plus forte. Par conséquent, il y aura une meilleure séparation de cette population. Ensuite une mesure de leur fréquence de transition accompagnée de caractérisations biologiques déterminerait si la sous-population de ce tri possède un caractère plus souche que la sous-population d'un tri classique.

L'hydrogel supramoléculaire

Au sein des premières études 3D, nous avons souligné l'importance des propriétés physico-chimiques du support 3D vis-à-vis la lignée d'intérêt. Cependant, nous avons quand même observé qu'avec l'hydrogel à base de BU 0,1% w/v, qui présente une viscoélasticité techniquement adaptée à la lignée U87-MG, une absence de développement cellulaire. Il serait très important d'examiner la source de cette inhibition de prolifération. Nous avons spéculé que c'est le groupement urée qui est à la base de cette observation puisque l'architecture fibrillaire, la viscoélasticité, le transport passif de molécules dans le gel et la cytocompatibilité de BU sont très proches de ceux obtenus avec BA. Le groupement urée est la seule variable est. Il serait donc intéressant d'essayer de créer un micro-environnement un peu plus différent, soit en augmentant la nano-porosité par un couplage BU/PEG par exemple qui potentiellement

permettrait une meilleure motilité cellulaire et par conséquent une meilleure division des cellules. Soit essayer de fonctionnaliser les molécules gélatrices avec des molécules issues de la MEC (comme l'acide hyaluronique par exemple) qui pourraient activer certaines voies de signalisations de prolifération et de migration.

En outre, même si nous n'avons pas observé un développement cellulaire avec GNF et BU, nous avons quand même remarqué que la viabilité cellulaire est restée élevée même après deux mois en incubation. Il faut étudier l'état de différenciation de ces cellules en fin de culture en récupérant les cellules du gel et évaluant l'expression des marqueurs souches par exemple. Si nous trouvons que les cellules restent souches, ces hydrogels consistent alors d'un moyen idéal de conservation de CSCs pour des études ultérieures.

Culture 3D

La visée principale de cette thèse est la conception d'un modèle 3D capable de générer des sphéroïdes tumoraux multicellulaires de tailles uniformes ayant une cinétique de croissance répétable. Nous avons décidé de tester le potentiel de ce modèle comme plateforme d'études de la nano-toxicité de NPs d'argent dans le chapitre précédent. Nous nous intéressons dans cette dernière partie à explorer, en termes de résultats préliminaires, la versatilité du support 3D et du modèle cellulaire ouvrant la porte à diverses potentielles applications qui peuvent être effectuées sur ce système.

- Comportement de différents types de lignées cancéreuses représentatives de divers cancers dans BA 0,25% w/v

Comme déjà décrit dans le premier chapitre (Figure I.5), chaque type cellulaire existant dans l'organisme humain, réside dans un tissu qui possède des propriétés physico-chimiques particulières et précises. La viscoélasticité de la MEC dans chaque tissu, est la propriété la plus importante car elle induit des forces sur les cellules hébergeant le tissu.⁶⁴ La réponse des cellules vis-à-vis de ces forces physiques est la mécano-transduction.⁵⁸⁵ Cette dernière joue un rôle crucial dans les processus de motilité cellulaire, d'invasion, d'adhésion et de métastase.⁵⁸⁶ D'ailleurs, les voies de signalisation sont importantes pour comprendre comment les signaux physiques produits ou médiés par la MEC affectent les cellules tumorales.⁶⁴ Donc les cellules issues d'un certain micro-environnement de propriétés viscoélastiques précises, présentent souvent une inhibition de prolifération et de développement cellulaire quand elles sont soumises à des forces physiques différentes que leur tissu d'origine.⁶⁵ Nous avons déjà montré que nous avons adapté les propriétés viscoélastiques de l'hydrogel BA 0,25% w/v (0,4 kPa) à celle du

tissu cérébrale (entre 0,1 et 1 kPa) afin de permettre le développement de lignée de Glioblastome, tumeur astrocytaire. Dans cette partie, nous nous sommes en particulier intéressés à tester de lignées représentatives d'autres types de cancers pour évaluer la versatilité du système. Cependant le choix du système 3D est un travail délicat et multifactoriel. Etant donné que nous n'avons pas eu le temps de moduler la viscoélasticité pour chaque lignée, nous avons effectué ces essais préliminaires sur la condition de BA 0,25% w/v pour souligner en particulier la cytocompatibilité du système. Pour des finalités d'utilisation de ces lignées en culture 3D, il faudra bien sûr moduler la viscoélasticité en adéquation avec les tissus.

La première lignée testée est celle du cancer du poumon (A549). (Figure P.1) Nous avons observé au bout de 35 jours de culture, une forte viabilité prouvant la cytocompatibilité du système. Cependant, le développement n'est pas remarquable puisqu'en comparant au GBM (~350µm), la croissance cellulaire observée avec A549 est plus faible (~100µm). Or les cellules cancéreuses pulmonaires se trouvent dans un milieu de viscoélasticité entre 1 et 4 kPa dans l'organisme.⁵⁸⁷ Par conséquent, ce serait intéressant par exemple d'essayer la culture 3D de ces cellules avec BU 0,2% w/v de rigidité 3 kPa et BA 0,5% w/v de rigidité 1,1 kPa.

En ce qui concerne le cancer colorectal, (Figure P.1) les cellules se trouvent physiologiquement dans un microenvironnement de rigidité aux alentours de 25 kPa.⁵⁸⁸ Cependant, ces études ont montré que dépendamment de la lignée de cancer colorectal, les cellules de phénotype épithélial soumises à une certaine force viscoélastique, se sont progressivement transformées en cellules morphologiquement similaire, de phénotype arrondies et séparées. De plus la E-cadhérine (protéines de surface qui permettent les jonctions cellule-cellule) entre les cellules a montré une diminution significative, indiquant que les cellules étaient plus susceptibles de métastaser. D'autres études⁵⁸⁹ ont également démontré que la lignée SW480 subit cette transformation dans un gel de 1 kPa. En implémentant cette lignée dans BA 0,25% w/v, nous avons observé une viabilité élevée associée à une formation de grand amas non organisés. Nous ne pouvons pas confirmer si c'est le produit d'une progression tumorale, pourtant à la rigidité de 0,4 kPa nous n'avons pas observé cet état dissociatif préalablement décrit pour 1 kPa. Les signaux physiques engendrés par le micro-environnement semblent avoir un impact drastique sur le phénotype cellulaire.

Et enfin, le mélanome qui se développe normalement dans un milieu de rigidité entre 6 et 86 kPa^{590,591}, n'a montré aucun signe de croissance et organisation dans notre système. (Figure VI.1)

A partir de ces études préliminaires, nous remarquons l'importance des signaux physiques du micro-environnement 3D sur le comportement cellulaire. Ce sont ces signaux qui contrôlent

l'activation/inhibition des voies de signalisations et par conséquent le phénotype cellulaire observé. Il serait important dans des futurs essais, de moduler les propriétés physico-chimiques de BA afin de cibler les critères viscoélastiques exigées par ces différentes lignées. Une autre approche peut consister d'utiliser BU ou GNF afin de comparer le comportement cellulaire dans des gels à base de différentes molécules gélatrices. Il serait aussi intéressant d'évaluer des sous-populations de CSCs de ces lignées triées par SdFFF notamment le cancer colorectal dont le tri est déjà maîtrisé au sein de CAPTuR.

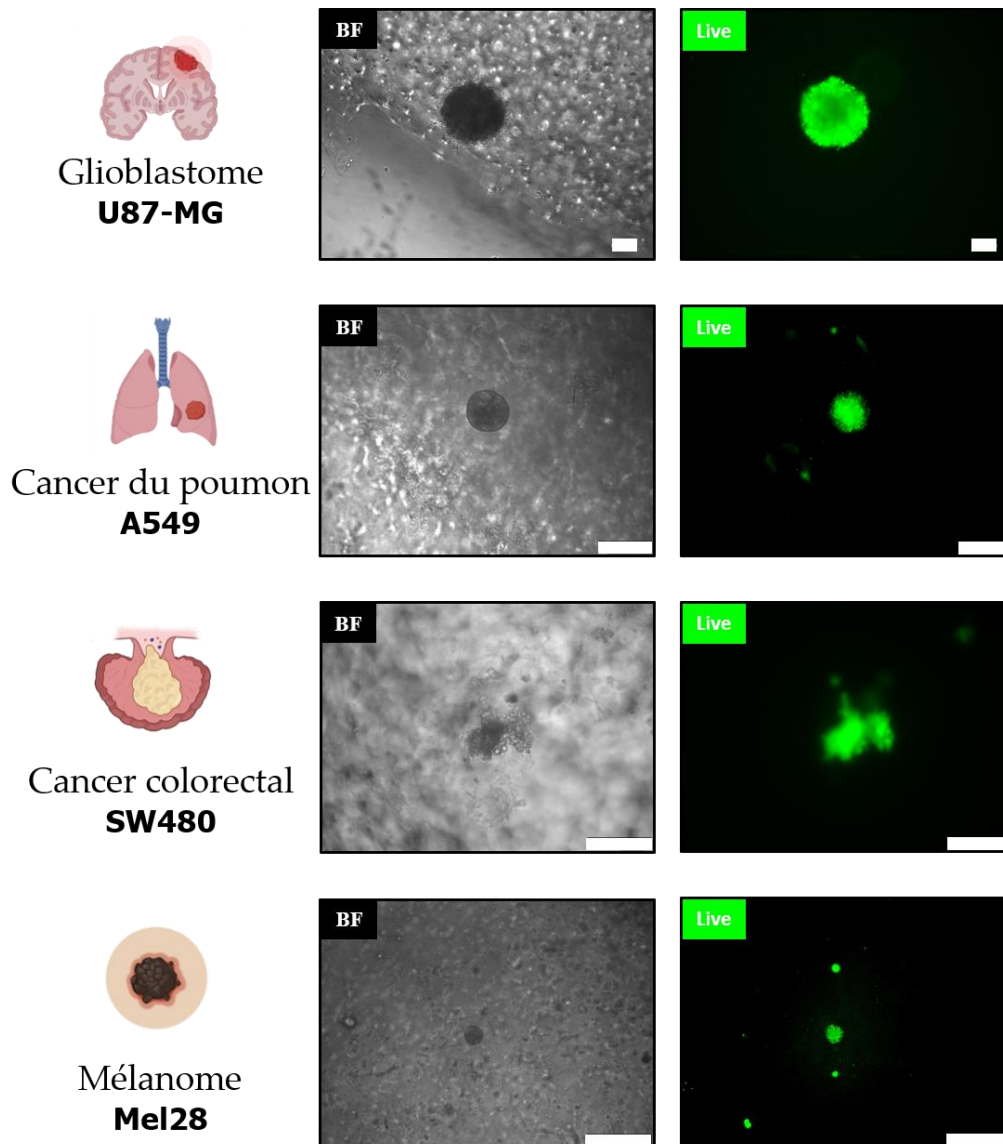


Figure P.1. Culture 3D lignées cancéreuses de diverses origines dans l'hydrogel BA 0,25 % w/v : imagerie effectuée après 35 jours de culture cellulaire. Imagerie optique en BF à gauche et fluorescente avec calcéine AM à droite. Echelle: 100 nm.

- Culture 3D de cellules de Glioblastome issues de patient

La culture primaire de cellules de patient atteint de GBM devient d'une importance majeure aujourd'hui dans le domaine de l'oncologie, afin d'optimiser les thérapies conventionnelles (chimio/radiothérapies) ou pour concevoir de nouvelles thérapies innovantes (nano-thérapies par exemple).^{592,593} La culture 2D n'est pas suffisante pour engendrer une réponse cellulaire similaire à celle observée chez les patients. De ce fait, beaucoup d'études ont recours aux xénogreffes dans des modèles animaux.⁵⁹⁴ Etant donné le coût et les problématiques éthiques associées, de nouveaux essais de médecine personnalisée sont faits sur des modèles 3D connus sous le terme de "patient derived tumors". Ils consistent à effectuer une culture 3D des cellules issues de patient, afin de mimer au plus proche possible sa progression tumorale.⁵⁹⁵ De tels modèles ont permis la conception de thérapies personnalisées avec un rendement plus élevé que les tests sur des lignées. Certes, en théorie ceci est le cas idéal, mais beaucoup d'obstacles accompagnent ces expériences (extraction, purification, culture primaire, échecs et mortalité cellulaire, etc.) notamment le choix du support 3D le plus convenable.⁵⁹⁶ Nous observons dans beaucoup d'études, une fonctionnalisation des molécules gélatrices par des protéines de la MEC (acide hyaluronique par exemple)⁵⁹⁷ afin de produire un micro-environnement optimal pour ce type de cellules.⁵⁹⁶

Cependant, nous nous sommes intéressés à tester le comportement de cellules issues de culture primaires de cellules de patient atteint de Glioblastome dans BA 0,25% w/v. Les cellules de la culture primaire de Glioblastome (lignée GBM3) ont été gracieusement fournies par Dr. Barbara Bessette de l'équipe CAPTuR de l'Université de Limoges, et ont été incorporées au sein du gel suivant le même protocole déjà décrit auparavant. La première observation remarquable a été le temps de culture long. (Figure P.2) Avec la lignée U87-MG, au bout de 35 jours nous observons un sphéroïde de grande taille et bien organisé. Alors avec les cellules de GBM patient, au moins deux mois ont été nécessaires pour observer une progression importante. En outre, l'organisation de ces cellules à J60 n'était pas en forme de sphère comme pour la lignée U87-MG. Une telle observation a déjà été faite⁵⁹⁸ avec des cellules issues de patient (Glioblastome) dans un hydrogel. Les pseudo tumeurs observées dans cette étude ont une morphologie proche de ce que nous observons dans la figure P.2. Cependant, les hydrogels utilisés dans ces types d'études sont d'une complexité importante (polyéthylène glycol + acide hyaluronique + réticulation aux rayons UV qui sont nocives aux cellules) ce qui rend la conception des plateformes d'études plus difficile. Dans notre preuve de concept, le point positif est que les cellules se sont bien développées en tumeur au sein de BA 0,25% w/v et elles

ont maintenu une forte viabilité même jusqu'à 60 jours de culture, prouvant ainsi les diverses applications dans le domaine de la médecine personnalisée pouvant être envisagées avec cette plateforme. Il serait important pour la suite, d'essayer de trier des CSCs à partir de la culture primaire et évaluer leur progression dans cet hydrogel. Pour se faire, une adaptation des conditions de tri par SdFFF est nécessaire en termes de débit et champs appliqués, rendement de purification, etc.

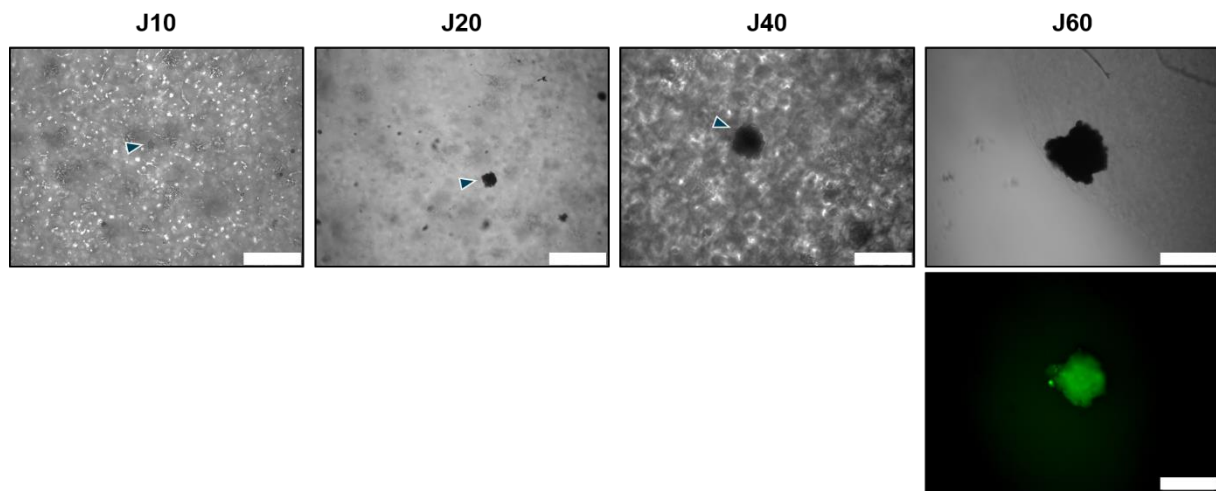


Figure P.2. Culture 3D dans BA 0,25% w/v de cellules de culture primaire issues de patient durant 60 jours de temps de culture supplémenté par un test de viabilité à J60. Imagerie optique en BF complémenté par imagerie fluorescente avec calcéine AM à J60. Echelle = 250µm

- Approche de coculture de U87-MG et cellules souches mésenchymateuses issues de patient

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM), qui peuvent également être définies comme des cellules stromales multipotentes, constituent une population hétérogène de cellules qui prolifèrent *in vitro* sous forme de cellules adhérentes, de morphologie semblable à celle des fibroblastes, et qui peuvent se différencier en cellules osseuses, cartilagineuses et graisseuses.⁵⁹⁹ Les CSM partagent des caractéristiques clés avec les CSCs dont l'auto-renouvellement et la multipotence.⁵⁹⁹ Elles possèdent un rôle primordial dans le maintien de l'intégrité tissulaire. Cependant, les applications basées sur des CSM dans la thérapie du cancer exploitent l'activité antitumorale putative et le tropisme inhérent des CSM vers les sites tumoraux.⁶⁰⁰

La question de savoir si la présence des CSM dans le micro-environnement tumoral peut avoir des effets suppressifs sur les tumeurs ou, au contraire, favorise leur croissance, n'est toujours pas résolue.⁶⁰¹ Plusieurs hypothèses ont été avancées pour expliquer les effets antitumoraux des CSM, notamment l'inhibition des voies de signalisation liées à la prolifération, telles que AKT,

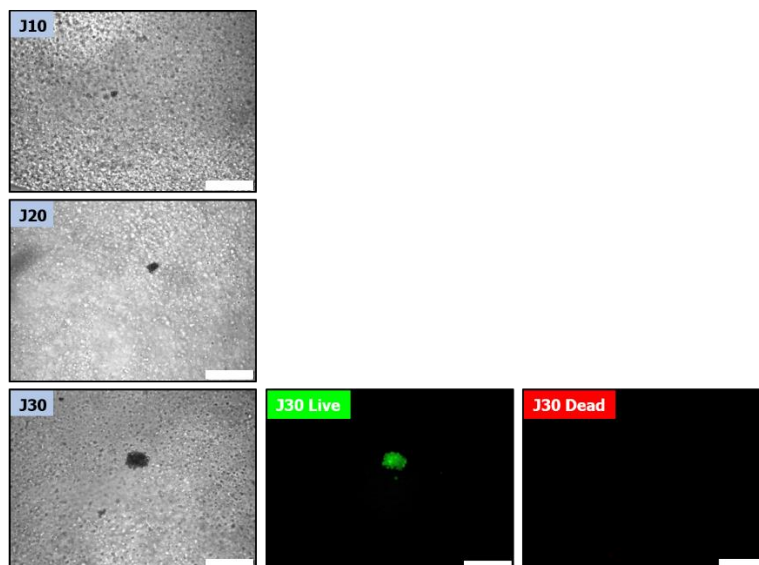
PI3K et Wnt, l'inhibition de la progression du cycle cellulaire, la régulation négative de XIAP (protéine inhibitrice de l'apoptose liée à l'X) et la suppression de l'angiogénèse.⁶⁰²

L'action dualiste des CSM, favorisant ou ciblant les tumeurs, dépend des facteurs sécrétés et des vésicules extracellulaires, ce qui entraîne un dialogue croisé complexe entre les CSM et les CSCs de GBM.⁶⁰³ Les études expérimentales utilisant les CSM dans le traitement du GBM ont donné lieu à de nombreuses controverses. Il a été démontré que les CSM natives exerçaient une activité antitumorale en contrôlant l'angiogénèse, en régulant le cycle cellulaire et en induisant l'apoptose. Elles ont également été utilisées comme facteurs de sensibilisation et comme vecteurs de divers composés anticancéreux.⁶⁰⁴ D'autre part, certaines expériences ont révélé des risques importants liés aux thérapies à base de CSM pour les GBM, tels que l'augmentation de la prolifération, de l'invasion et de l'agressivité des cellules tumorales.

Dans ce test, nous sommes intéressés d'une part à évaluer la possibilité de coculture de deux lignées au sein de BA 0,25% w/v, ouvrant la porte ainsi à diverses études ultérieures. D'autre part, nous souhaiterions évaluer le changement du comportement de U87-MG suite à leur communication avec les CSM.

Nous avons d'abord étudié le comportement des CSM fournis gracieusement par Dr. Amandine Magnaudeix du Centre Européen de la Céramique (IRCER - UMR CNRS 7315), cultivées seules dans BA 0,25% w/v (Figure P.3A). Au bout de 30 jours de culture, les CSM se sont organisés dans le volume du gel et elles ont maintenues une forte viabilité. Elles ont perdu leur morphologie fibroblaste-like pour devenir des cellules de morphologie arrondie représentative de la culture 3D. Ensuite, la coculture de CSM avec des CSCs de U87-MG dans BA 0,25% w/v, montre qu'aucune prolifération ni organisation n'était possible durant les 60 jours de culture. Par comparaison au développement classique des CSCs de U87-MG en 3D, et étant donné que la présence des CSM est la seule variable dans cette culture, nous spéculons par cette étude préliminaire, que la présence des CSM dans le micro-environnement a potentiellement engendré une inhibition de la progression tumorale. Ceci nécessite des études plus poussées pour le confirmer. Néanmoins, nous pouvons juste affirmer que les cellules sont restées viables sans aucune mortalité cellulaire, prouvant d'avantage la cytocompatibilité de l'hydrogel. D'une part, une discrimination par marquage entre les deux types de cellules en 3D permettrait de mieux comprendre les communications CSM/U87 en 3D, et d'autre part il serait important d'implémenter les CSM après la formation des sphéroïdes en 3D pour évaluer le gain ou la perte en agressivité suite à l'impact des CSM.

A. Culture 3D de CSM dans BA 0,25% w/v



B. Coculture U87-MG CSCs x CSM en 3D

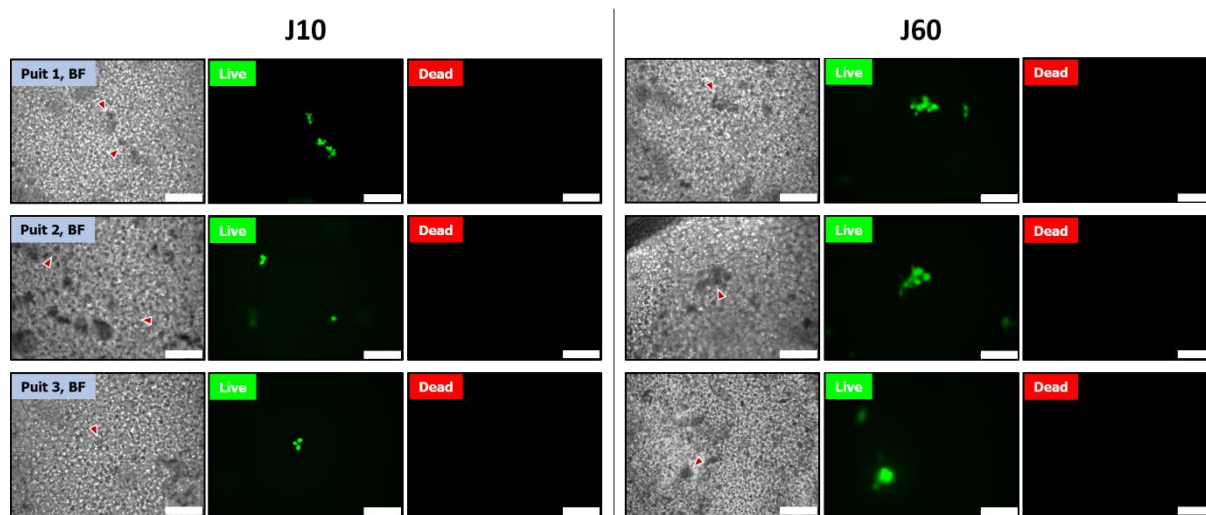


Figure P.3. Images par microscopie optique et fluorescente montrant (A) culture 3D de CSM issues de patient dans BA 0,25 w/v pendant 30 jours complétée par un test de viabilité live/dead à J30, échelle 100 nm, (C) Coculture dans BA 0,25% w/v de CSCs de U87-MG triées par SdFFF avec CSM issues de patient pendant 60 jours complétée par un test de viabilité (live/dead), échelle 250 nm.

- Etude d'impact de vésicules extracellulaires sur les sphéroïdes

L'un des moyens par lesquels la tumeur interagit avec le microenvironnement est la sécrétion de vésicules extracellulaires (EVs). Les EVs contiennent un assortiment de protéines, de lipides et d'acides nucléiques, représentant approximativement le cytosol de la cellule productrice.⁶⁰⁵

Ces EVs sont sécrétées dans l'espace extracellulaire et peuvent être transférées aux cellules adjacentes et parfois aux cellules distantes. Dans le cas du Glioblastome, il a été démontré que les EVs dérivées des tumeurs soutiennent la prolifération via plusieurs mécanismes (induction d'un environnement cérébral immunodéprimé, induction des changements transcriptomiques et phénotypiques favorables aux tumeurs dans les cellules de la niche tumorale, etc.).⁶⁰⁵⁻⁶⁰⁷ Les cellules de GBM utilisent également les EVs pour communiquer entre elles : des moteurs oncogènes peuvent être échangés, la voie du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFRvIII) étant la mieux décrite.^{607,608} En général, la prolifération et l'invasion sont renforcées par les EVs de GBM *in vitro* et *in vivo*, bien que les mécanismes exacts ne soient pas bien compris.

La protéine 27a associée à Ras (Rab27a) est largement décrite comme intervenant dans le trafic vésiculaire et notamment dans l'une des étapes clef de la sécrétion de vésicules extracellulaires particulières : les exosomes.^{609,610} Rab27a va accompagner les vésicules contenant ces exosomes jusqu'à la membrane plasmique, permettant ainsi leur libération dans l'espace extracellulaire. Il a été démontré que le knockdown de Rab27a (shRab27a) diminuait l'excrétion de petits EVs dans les lignées cancéreuses. Donc en présence de la protéine Rab27a, les EVs jouent potentiellement un rôle de transfert d'agressivité et résistance aux contraintes telles que l'hypoxie ou les traitements.

Au sein du laboratoire CAPTuR de l'Université de Limoges, une équipe dirigée par le Dr. Barbara Bessette et le Dr. Mireille Verdier, a ciblé la protéine Rab27a, de sorte à diminuer drastiquement son expression dans la lignée cellulaire de glioblastome U87-MG.⁶⁰⁸ L'intérêt de produire des lignées de U87-MG shRab27a est donc d'empêcher la sécrétion de ces vésicules extracellulaires, éléments majeurs de la communication des cellules entre-elles et avec leur micro-environnement par la transmission de matériel génétique ou de protéines permettant, par exemple, un transfert d'agressivité ou de résistance d'une cellule à une autre. Cependant, ils ont observé qu'après atténuation de l'expression de la protéine Rab27a, il existe toujours une sécrétion d'EVs ce qui est incompréhensible et inattendu. De ce fait, cette équipe s'est intéressée à comprendre le rôle de ces EVs sécrétées suite au knockdown de Rab27a.

Nous avons décidé de tester comme preuve de concept, l'impact de ces EVs sur des sphéroïdes en 3D. Cette approche permet d'examiner le potentiel effet de ces EVs. Nous avons ajouté à la culture 3D de CSCs de U87-MG dans BA 0,25% w/v, une suspension d'EVs issues de shRab27a à différents temps d'incubations (J15, J20 et J25) pour un temps d'exposition de 15 jours. (Figure P.4) L'ajout d'EVs est effectué chaque 48h durant les 15 jours. Donc le comportement cellulaire est observé à J30, J35 et J40 avec EVs.

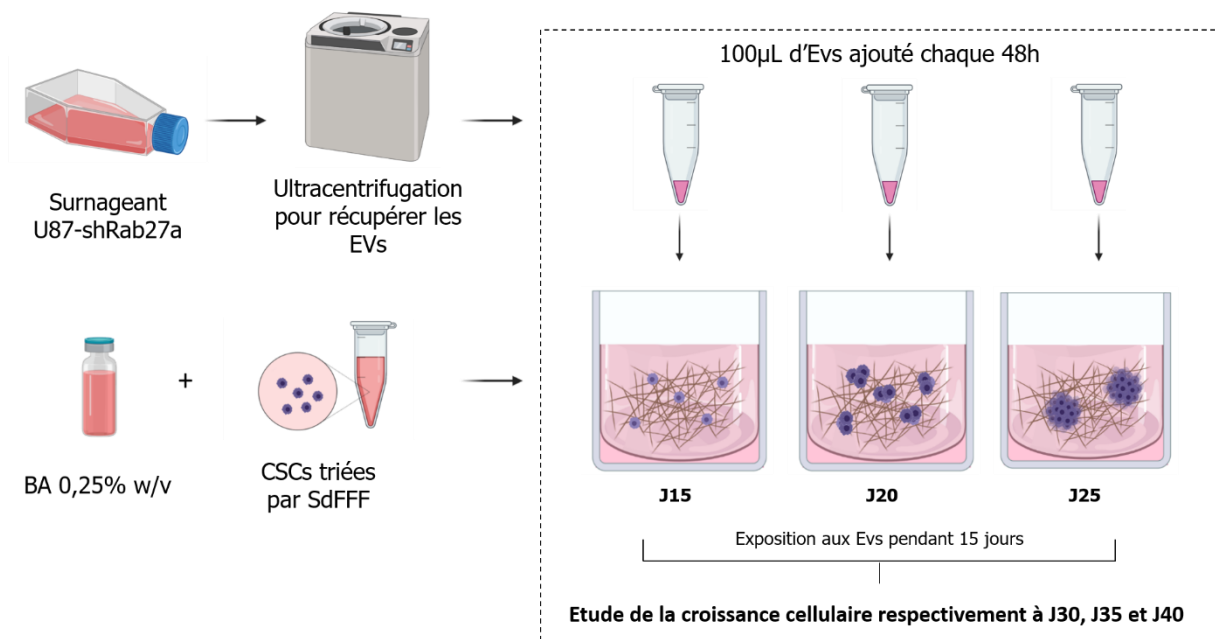


Figure P.4. Schématisation du protocole expérimental de l'étude de l'impact d'EVs de U87 shRab27a sur les sphéroïdes en 3D.

En effet, à J30 nous avons observé des cellules éparpillées dans le volume du gel, viables mais sans aucune organisation. (Figure P.5) A J35, l'agrégat de cellules à une taille beaucoup plus petite que celle du contrôle. Et enfin, à J40, nous observons une désagrégation de la couche périphérique du sphéroïde sans aucune mortalité. Nous avons sûrement observé un changement dans le comportement cellulaire suite à l'impact des EVs de shRab27a. Cela veut dire qu'un transfert d'informations a eu lieu grâce à ces EVs. Il est important de faire des tests supplémentaires et avoir un contrôle négatif pour le jour de fin d'exposition des EVs, afin de confirmer si le comportement observé peut-être corrélé à une perte d'agressivité tumorale dans les sphéroïdes de Glioblastome ou bien une potentielle induction de différenciation des cellules. Pour le moment, nous avons offert à cette équipe une plateforme intéressante de culture 3D, capable de mener leurs analyses à un niveau plus avancé que la culture 2D conventionnelle.

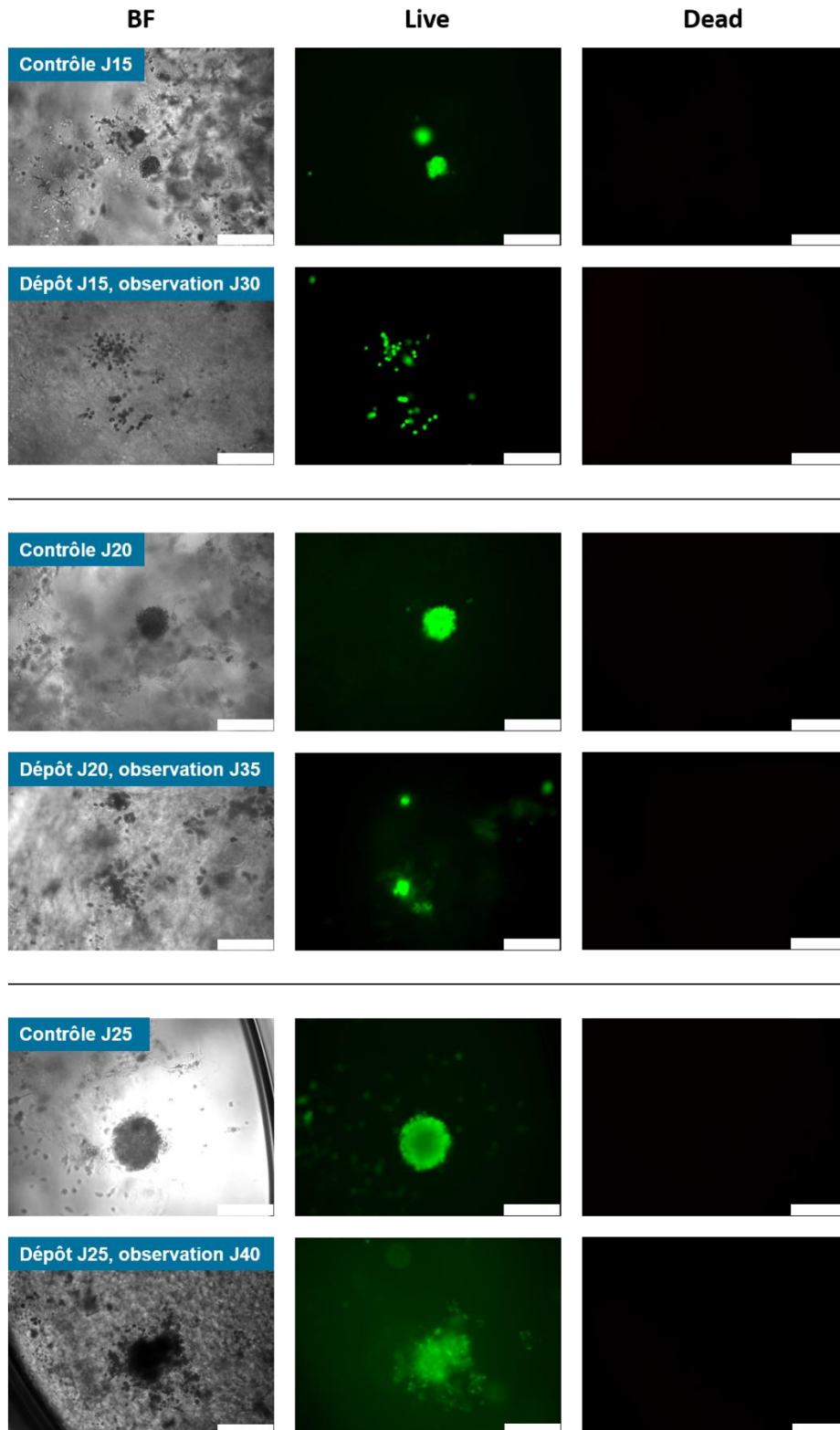


Figure P.5. Culture 3D de CSCs de U87-MG dans BA 0,25% w/v : Images prises par microscopie fluorescente (gauche : BF, centre : calcéine AM live et droite : homodimère d'éthidium dead) à J30, J35 et J40, 15 jours après exposition aux EVs de U87-MG sh Rab27a. Ajout des EVs effectué chaque 48h. Echelle = 250µm.

Le chemin menant à la conception d'un modèle de cancer en 3D, dont les propriétés intrinsèques des sphéroïdes telles que la taille et la morphologie ne présentent pas de différence significative, comprend deux éléments constitutifs. Grâce à un protocole maîtrisé de conception d'un hydrogel supramoléculaire, nous sommes capables de contrôler et d'adapter les propriétés physico-chimiques de cet hydrogel par un enjeu de concentration des molécules gélifiantes de faibles poids moléculaires. Ceci permet de moduler la viscoélasticité, la porosité et l'architecture fibrillaire pour faciliter l'implantation des cellules et leur croissance en 3D. Néanmoins, c'est grâce au tri cellulaire par SdFFF d'une population de cellules souches cancéreuses de Glioblastome, que nous avons pu obtenir une reproductibilité au niveau biologique. En effet, nous avons mis en œuvre les propriétés des CSCs, afin de garantir une croissance cellulaire répétable au sein du réseau de l'hydrogel. Par conséquent, cela a abouti à la formation de MCTS de tailles uniformes et de cinétique de croissance reproductible. Une telle plateforme permet d'ouvrir la porte à des applications de diverses sortes. Nous avons souligné en particulier, la possibilité d'utiliser ce système 3D comme un bioindicateur de la toxicité de nanoparticules émergentes. Cependant, les opportunités d'applications sont nombreuses et les voies sont multidisciplinaires.

Références

- (1) Duval, K.; Grover, H.; Han, L.-H.; Mou, Y.; Pegoraro, A. F.; Fredberg, J.; Chen, Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)* **2017**, *32* (4), 266–277. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>.
- (2) Godoy, P.; Hewitt, N. J.; Albrecht, U.; Andersen, M. E.; Ansari, N.; Bhattacharya, S.; Bode, J. G.; Bolleyn, J.; Borner, C.; Böttger, J.; Braeuning, A.; Budinsky, R. A.; Burkhardt, B.; Cameron, N. R.; Camussi, G.; Cho, C.-S.; Choi, Y.-J.; Craig Rowlands, J.; Dahmen, U.; Damm, G.; Dirsch, O.; Donato, M. T.; Dong, J.; Dooley, S.; Drasdo, D.; Eakins, R.; Ferreira, K. S.; Fonsato, V.; Fraczek, J.; Gebhardt, R.; Gibson, A.; Glanemann, M.; Goldring, C. E. P.; Gómez-Lechón, M. J.; Groothuis, G. M. M.; Gustavsson, L.; Guyot, C.; Hallifax, D.; Hammad, S.; Hayward, A.; Häussinger, D.; Hellerbrand, C.; Hewitt, P.; Hoehme, S.; Holzhütter, H.-G.; Houston, J. B.; Hrach, J.; Ito, K.; Jaeschke, H.; Keitel, V.; Kelm, J. M.; Kevin Park, B.; Kordes, C.; Kullak-Ublick, G. A.; LeCluyse, E. L.; Lu, P.; Luebke-Wheeler, J.; Lutz, A.; Maltman, D. J.; Matz-Soja, M.; McMullen, P.; Merfort, I.; Messner, S.; Meyer, C.; Mwinyi, J.; Naisbitt, D. J.; Nussler, A. K.; Olinga, P.; Pampaloni, F.; Pi, J.; Pluta, L.; Przyborski, S. A.; Ramachandran, A.; Rogiers, V.; Rowe, C.; Schelcher, C.; Schmich, K.; Schwarz, M.; Singh, B.; Stelzer, E. H. K.; Stieger, B.; Stöber, R.; Sugiyama, Y.; Tetta, C.; Thasler, W. E.; Vanhaecke, T.; Vinken, M.; Weiss, T. S.; Widera, A.; Woods, C. G.; Xu, J. J.; Yarborough, K. M.; Hengstler, J. G. Recent Advances in 2D and 3D in Vitro Systems Using Primary Hepatocytes, Alternative Hepatocyte Sources and Non-Parenchymal Liver Cells and Their Use in Investigating Mechanisms of Hepatotoxicity, Cell Signaling and ADME. *Arch. Toxicol.* **2013**, *87* (8), 1315–1530. <https://doi.org/10.1007/s00204-013-1078-5>.
- (3) Ravi, M.; Paramesh, V.; Kaviya, S. r.; Anuradha, E.; Solomon, F. D. P. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *Journal of Cellular Physiology* **2015**, *230* (1), 16–26. <https://doi.org/10.1002/jcp.24683>.
- (4) Ylostalo, J. H. 3D Stem Cell Culture. *Cells* **2020**, *9* (10), E2178. <https://doi.org/10.3390/cells9102178>.
- (5) Lee, G. Y.; Kenny, P. A.; Lee, E. H.; Bissell, M. J. Three-Dimensional Culture Models of Normal and Malignant Breast Epithelial Cells. *Nat Methods* **2007**, *4* (4), 359–365. <https://doi.org/10.1038/nmeth1015>.
- (6) Imamura, Y.; Mukohara, T.; Shimono, Y.; Funakoshi, Y.; Chayahara, N.; Toyoda, M.; Kiyota, N.; Takao, S.; Kono, S.; Nakatsura, T.; Minami, H. Comparison of 2D- and 3D-Culture Models as Drug-Testing Platforms in Breast Cancer. *Oncol. Rep.* **2015**, *33* (4), 1837–1843. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3767>.

- (7) Riedl, A.; Schlederer, M.; Pudelko, K.; Stadler, M.; Walter, S.; Unterleuthner, D.; Unger, C.; Kramer, N.; Hengstschläger, M.; Kenner, L.; Pfeiffer, D.; Krupitza, G.; Dolznig, H. Comparison of Cancer Cells in 2D vs 3D Culture Reveals Differences in AKT–MTOR–S6K Signaling and Drug Responses. *J Cell Sci* **2017**, *130* (1), 203–218. <https://doi.org/10.1242/jcs.188102>.
- (8) Kapałczyńska, M.; Kolenda, T.; Przybyła, W.; Zajączkowska, M.; Teresiak, A.; Filas, V.; Ibbs, M.; Bliźniak, R.; Łuczewski, Ł.; Lamperska, K. 2D and 3D Cell Cultures - a Comparison of Different Types of Cancer Cell Cultures. *Arch Med Sci* **2018**, *14* (4), 910–919. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.63743>.
- (9) Zips, D.; Thames, H. D.; Baumann, M. New Anticancer Agents: In Vitro and *in vivo* Evaluation. *In vivo* **2005**, *19* (1), 1–7.
- (10) Bert, B.; Dörendahl, A.; Leich, N.; Vietze, J.; Steinfath, M.; Chmielewska, J.; Hensel, A.; Grune, B.; Schönfelder, G. Rethinking 3R Strategies: Digging Deeper into AnimalTestInfo Promotes Transparency in *in vivo* Biomedical Research. *PLoS Biol* **2017**, *15* (12), e2003217. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003217>.
- (11) Hampshire, V. A.; Gilbert, S. H. Refinement, Reduction, and Replacement (3R) Strategies in Preclinical Testing of Medical Devices. *Toxicol Pathol* **2019**, *47* (3), 329–338. <https://doi.org/10.1177/0192623318797289>.
- (12) Jensen, C.; Teng, Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front. Mol. Biosci.* **2020**, *7*, 33. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00033>.
- (13) Zhou, P.; Xu, P.; Guan, J.; Zhang, C.; Chang, J.; Yang, F.; Xiao, H.; Sun, H.; Zhang, Z.; Wang, M.; Hu, J.; Mao, Y. Promoting 3D Neuronal Differentiation in Hydrogel for Spinal Cord Regeneration. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2020**, *194*, 111214. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111214>.
- (14) Bordoni, M.; Rey, F.; Fantini, V.; Pansarasa, O.; Di Giulio, A. M.; Carelli, S.; Cereda, C. From Neuronal Differentiation of iPSCs to 3D Neuro-Organoids: Modelling and Therapy of Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* **2018**, *19* (12), E3972. <https://doi.org/10.3390/ijms19123972>.
- (15) Gabriel, E.; Gopalakrishnan, J. Generation of iPSC-Derived Human Brain Organoids to Model Early Neurodevelopmental Disorders. *J Vis Exp* **2017**, No. 122. <https://doi.org/10.3791/55372>.
- (16) Stadhouders, R.; Filion, G. J.; Graf, T. Transcription Factors and 3D Genome Conformation in Cell-Fate Decisions. *Nature* **2019**, *569* (7756), 345–354. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1182-7>.

- (17) Denholtz, M.; Plath, K. Pluripotency in 3D: Genome Organization in Pluripotent Cells. *Curr Opin Cell Biol* **2012**, *24* (6), 793–801. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2012.11.001>.
- (18) van Schoonhoven, A.; Huylebroeck, D.; Hendriks, R. W.; Stadhouders, R. 3D Genome Organization during Lymphocyte Development and Activation. *Brief Funct Genomics* **2020**, *19* (2), 71–82. <https://doi.org/10.1093/bfgp/elz030>.
- (19) Chia, S. L.; Tay, C. Y.; Setyawati, M. I.; Leong, D. T. Biomimicry 3D Gastrointestinal Spheroid Platform for the Assessment of Toxicity and Inflammatory Effects of Zinc Oxide Nanoparticles. *Small* **2015**, *11* (6), 702–712. <https://doi.org/10.1002/sml.201401915>.
- (20) Friedrich, J.; Ebner, R.; Kunz-Schughart, L. A. Experimental Anti-Tumor Therapy in 3-D: Spheroids--Old Hat or New Challenge? *Int J Radiat Biol* **2007**, *83* (11–12), 849–871. <https://doi.org/10.1080/09553000701727531>.
- (21) Hamilton, G.; Rath, B. Applicability of Tumor Spheroids for in Vitro Chemosensitivity Assays. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2019**, *15* (1), 15–23. <https://doi.org/10.1080/17425255.2019.1554055>.
- (22) Weiswald, L.-B.; Bellet, D.; Dangles-Marie, V. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia* **2015**, *17* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.12.004>.
- (23) Han, K.; Pierce, S. E.; Li, A.; Spees, K.; Anderson, G. R.; Seoane, J. A.; Lo, Y.-H.; Dubreuil, M.; Olivas, M.; Kamber, R. A.; Wainberg, M.; Kostyrko, K.; Kelly, M. R.; Yousefi, M.; Simpkins, S. W.; Yao, D.; Lee, K.; Kuo, C. J.; Jackson, P. K.; Sweet-Cordero, A.; Kundaje, A.; Gentles, A. J.; Curtis, C.; Winslow, M. M.; Bassik, M. C. CRISPR Screens in Cancer Spheroids Identify 3D Growth-Specific Vulnerabilities. *Nature* **2020**, *580* (7801), 136–141. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2099-x>.
- (24) Dubiak-Szepietowska, M.; Karczmarczyk, A.; Jönsson-Niedziółka, M.; Winckler, T.; Feller, K.-H. Development of Complex-Shaped Liver Multicellular Spheroids as a Human-Based Model for Nanoparticle Toxicity Assessment in Vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2016**, *294*, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.01.016>.
- (25) Hirschhaeuser, F.; Menne, H.; Dittfeld, C.; West, J.; Mueller-Klieser, W.; Kunz-Schughart, L. A. Multicellular Tumor Spheroids: An Underestimated Tool Is Catching up Again. *J. Biotechnol.* **2010**, *148* (1), 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.01.012>.
- (26) Lu, H.; Stenzel, M. H. Multicellular Tumor Spheroids (MCTS) as a 3D In Vitro Evaluation Tool of Nanoparticles. *Small* **2018**, *14* (13), 1702858. <https://doi.org/10.1002/sml.201702858>.
- (27) Sabhachandani, P.; Motwani, V.; Cohen, N.; Sarkar, S.; Torchilin, V.; Konry, T. Generation and Functional Assessment of 3D Multicellular Spheroids in Droplet Based

- Microfluidics Platform. *Lab Chip* **2016**, *16* (3), 497–505. <https://doi.org/10.1039/c5lc01139f>.
- (28) Calpe, B.; Kovacs, W. J. High-Throughput Screening in Multicellular Spheroids for Target Discovery in the Tumor Microenvironment. *Expert Opin Drug Discov* **2020**, *15* (8), 955–967. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1756769>.
- (29) Froehlich, K.; Haeger, J.-D.; Heger, J.; Pastuschek, J.; Photini, S. M.; Yan, Y.; Lupp, A.; Pfarrer, C.; Mrowka, R.; Schleußner, E.; Markert, U. R.; Schmidt, A. Generation of Multicellular Breast Cancer Tumor Spheroids: Comparison of Different Protocols. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **2016**, *21* (3–4), 89–98. <https://doi.org/10.1007/s10911-016-9359-2>.
- (30) Liu, X.; Hummon, A. B. Quantitative Determination of Irinotecan and the Metabolite SN-38 by Nanoflow Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in Different Regions of Multicellular Tumor Spheroids. *J Am Soc Mass Spectrom* **2015**, *26* (4), 577–586. <https://doi.org/10.1007/s13361-014-1071-0>.
- (31) Lukowski, J. K.; Hummon, A. B. Quantitative Evaluation of Liposomal Doxorubicin and Its Metabolites in Spheroids. *Anal Bioanal Chem* **2019**, *411* (27), 7087–7094. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02084-7>.
- (32) Kucuktulu, E.; Yurekli, A. F.; Topbas, M.; Kece, C.; Guner, A.; Kucuktulu, U. Comparisons between the Dosimetric and Clinical Outcomes of Tomotherapy and 3D Conformal Radiotherapy in Gastric Cancer Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev* **2019**, *20* (2), 595–599. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.2.595>.
- (33) Keall, P. J.; Nguyen, D. T.; O'Brien, R.; Zhang, P.; Happersett, L.; Bertholet, J.; Poulsen, P. R. Review of Real-Time 3-Dimensional Image Guided Radiation Therapy on Standard-Equipped Cancer Radiation Therapy Systems: Are We at the Tipping Point for the Era of Real-Time Radiation Therapy? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2018**, *102* (4), 922–931. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2018.04.016>.
- (34) Aref, A. R.; Campisi, M.; Ivanova, E.; Portell, A.; Larios, D.; Piel, B. P.; Mathur, N.; Zhou, C.; Coakley, R. V.; Bartels, A.; Bowden, M.; Herbert, Z.; Hill, S.; Gilhooley, S.; Carter, J.; Cañadas, I.; Thai, T. C.; Kitajima, S.; Chiono, V.; Paweletz, C. P.; Barbie, D. A.; Kamm, R. D.; Jenkins, R. W. 3D Microfluidic Ex Vivo Culture of Organotypic Tumor Spheroids to Model Immune Checkpoint Blockade. *Lab Chip* **2018**, *18* (20), 3129–3143. <https://doi.org/10.1039/c8lc00322j>.
- (35) Sgouros, G.; Hobbs, R. F.; Atkins, F. B.; Van Nostrand, D.; Ladenson, P. W.; Wahl, R. L. Three-Dimensional Radiobiological Dosimetry (3D-RD) with ¹²⁴I PET for ¹³¹I Therapy

- of Thyroid Cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* **2011**, *38 Suppl 1*, S41-47. <https://doi.org/10.1007/s00259-011-1769-1>.
- (36) Jeong, K.; Yu, Y. J.; You, J. Y.; Rhee, W. J.; Kim, J. A. Exosome-Mediated MicroRNA-497 Delivery for Anti-Cancer Therapy in a Microfluidic 3D Lung Cancer Model. *Lab Chip* **2020**, *20* (3), 548–557. <https://doi.org/10.1039/c9lc00958b>.
- (37) Augustine, R.; Kalva, S. N.; Ahmad, R.; Zahid, A. A.; Hasan, S.; Nayeem, A.; McClements, L.; Hasan, A. 3D Bioprinted Cancer Models: Revolutionizing Personalized Cancer Therapy. *Transl Oncol* **2021**, *14* (4), 101015. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101015>.
- (38) Fan, H.; Demirci, U.; Chen, P. Emerging Organoid Models: Leaping Forward in Cancer Research. *J Hematol Oncol* **2019**, *12* (1), 142. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0832-4>.
- (39) Luo, Y.; Wei, X.; Wan, Y.; Lin, X.; Wang, Z.; Huang, P. 3D Printing of Hydrogel Scaffolds for Future Application in Photothermal Therapy of Breast Cancer and Tissue Repair. *Acta Biomater* **2019**, *92*, 37–47. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.039>.
- (40) Hadi, L. M.; Yaghini, E.; MacRobert, A. J.; Loizidou, M. Synergy between Photodynamic Therapy and Dactinomycin Chemotherapy in 2D and 3D Ovarian Cancer Cell Cultures. *Int J Mol Sci* **2020**, *21* (9), E3203. <https://doi.org/10.3390/ijms21093203>.
- (41) Van Zundert, I.; Fortuni, B.; Rocha, S. From 2D to 3D Cancer Cell Models-The Enigmas of Drug Delivery Research. *Nanomaterials (Basel)* **2020**, *10* (11), E2236. <https://doi.org/10.3390/nano10112236>.
- (42) Ravi, M.; Ramesh, A.; Pattabhi, A. Contributions of 3D Cell Cultures for Cancer Research. *J Cell Physiol* **2017**, *232* (10), 2679–2697. <https://doi.org/10.1002/jcp.25664>.
- (43) Sepantafar, M.; Maheronnaghsh, R.; Mohammadi, H.; Radmanesh, F.; Hasani-Sadrabadi, M. M.; Ebrahimi, M.; Baharvand, H. Engineered Hydrogels in Cancer Therapy and Diagnosis. *Trends Biotechnol* **2017**, *35* (11), 1074–1087. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.06.015>.
- (44) Fernandes, S.; Cassani, M.; Pagliari, S.; Filipensky, P.; Cavalieri, F.; Forte, G. Tumor in 3D: In Vitro Complex Cellular Models to Improve Nanodrugs Cancer Therapy. *Curr Med Chem* **2020**, *27* (42), 7234–7255. <https://doi.org/10.2174/0929867327666200625151134>.
- (45) Kim, J.; Jo, C.; Lim, W.-G.; Jung, S.; Lee, Y. M.; Lim, J.; Lee, H.; Lee, J.; Kim, W. J. Programmed Nanoparticle-Loaded Nanoparticles for Deep-Penetrating 3D Cancer Therapy. *Adv Mater* **2018**, e1707557. <https://doi.org/10.1002/adma.201707557>.

- (46) Shrestha, B.; Wang, L.; Zhang, H.; Hung, C. Y.; Tang, L. Gold Nanoparticles Mediated Drug-Gene Combinational Therapy for Breast Cancer Treatment. *Int J Nanomedicine* **2020**, *15*, 8109–8119. <https://doi.org/10.2147/IJN.S258625>.
- (47) Stocke, N. A.; Sethi, P.; Jyoti, A.; Chan, R.; Arnold, S. M.; Hilt, J. Z.; Upreti, M. Toxicity Evaluation of Magnetic Hyperthermia Induced by Remote Actuation of Magnetic Nanoparticles in 3D Micrometastatic Tumor Tissue Analogs for Triple Negative Breast Cancer. *Biomaterials* **2017**, *120*, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.12.019>.
- (48) Pellen-Mussi, P.; Tricot-Doleux, S.; Neaime, C.; Nerambourg, N.; Cabello-Hurtado, F.; Cordier, S.; Grasset, F.; Jeanne, S. Evaluation of Functional SiO₂ Nanoparticles Toxicity by a 3D Culture Model. *J Nanosci Nanotechnol* **2018**, *18* (5), 3148–3157. <https://doi.org/10.1166/jnn.2018.14619>.
- (49) Alghuwainem, A.; Alshareeda, A. T.; Alsowayan, B. Scaffold-Free 3-D Cell Sheet Technique Bridges the Gap between 2-D Cell Culture and Animal Models. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (19), 4926. <https://doi.org/10.3390/ijms20194926>.
- (50) Ayala-Caminero, R.; Pinzón-Herrera, L.; Martínez, C. A. R.; Almodovar, J. Polymeric Scaffolds for Three-Dimensional Culture of Nerve Cells: A Model of Peripheral Nerve Regeneration. *MRS Communications* **2017**, *7* (3), 391–415. <https://doi.org/10.1557/mrc.2017.90>.
- (51) El-Sherbiny, I. M.; Yacoub, M. H. Hydrogel Scaffolds for Tissue Engineering: Progress and Challenges. *Global Cardiology Science and Practice* **2013**, *2013* (3), 38. <https://doi.org/10.5339/gcsp.2013.38>.
- (52) Kołbuk, D.; Heljak, M.; Choińska, E.; Urbanek, O. Novel 3D Hybrid Nanofiber Scaffolds for Bone Regeneration. *Polymers (Basel)* **2020**, *12* (3), E544. <https://doi.org/10.3390/polym12030544>.
- (53) Antoni, D.; Burckel, H.; Josset, E.; Noel, G. Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough *in vivo*. *Int J Mol Sci* **2015**, *16* (3), 5517–5527. <https://doi.org/10.3390/ijms16035517>.
- (54) Chaicharoenaudomrung, N.; Kunhorn, P.; Noisa, P. Three-Dimensional Cell Culture Systems as an *in Vitro* Platform for Cancer and Stem Cell Modeling. *World J Stem Cells* **2019**, *11* (12), 1065–1083. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i12.1065>.
- (55) Edmondson, R.; Broglie, J. J.; Adcock, A. F.; Yang, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev Technol* **2014**, *12* (4), 207–218. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>.

- (56) Ma, R.; Mandell, J.; Lu, F.; Heim, T.; Schoedel, K.; Duensing, A.; Watters, R. J.; Weiss, K. R. Do Patient-Derived Spheroid Culture Models Have Relevance in Chondrosarcoma Research? *Clin Orthop Relat Res* **2021**, *479* (3), 477–490. <https://doi.org/10.1097/CORR.0000000000001317>.
- (57) Close, D. A.; Camarco, D. P.; Shan, F.; Kochanek, S. J.; Johnston, P. A. The Generation of Three-Dimensional Head and Neck Cancer Models for Drug Discovery in 384-Well Ultra-Low Attachment Microplates. *Methods Mol Biol* **2018**, *1683*, 355–369. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7357-6_20.
- (58) Du, X.; Li, W.; Du, G.; Cho, H.; Yu, M.; Fang, Q.; Lee, L. P.; Fang, J. Droplet Array-Based 3D Coculture System for High-Throughput Tumor Angiogenesis Assay. *Anal Chem* **2018**, *90* (5), 3253–3261. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04772>.
- (59) Nath, S.; Devi, G. R. Three-Dimensional Culture Systems in Cancer Research: Focus on Tumor Spheroid Model. *Pharmacol Ther* **2016**, *163*, 94–108. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.013>.
- (60) Zhang, L.; Yang, G.; Johnson, B. N.; Jia, X. Three-Dimensional (3D) Printed Scaffold and Material Selection for Bone Repair. *Acta Biomater* **2019**, *84*, 16–33. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.039>.
- (61) Luo, X.; Fong, E. L. S.; Zhu, C.; Lin, Q. X. X.; Xiong, M.; Li, A.; Li, T.; Benoukraf, T.; Yu, H.; Liu, S. Hydrogel-Based Colorectal Cancer Organoid Co-Culture Models. *Acta Biomater* **2021**, *132*, 461–472. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.12.037>.
- (62) Karageorgiou, V.; Kaplan, D. Porosity of 3D Biomaterial Scaffolds and Osteogenesis. *Biomaterials* **2005**, *26* (27), 5474–5491. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.002>.
- (63) Bassi, G.; Panseri, S.; Dozio, S. M.; Sandri, M.; Campodoni, E.; Dapporto, M.; Sprio, S.; Tampieri, A.; Montesi, M. Scaffold-Based 3D Cellular Models Mimicking the Heterogeneity of Osteosarcoma Stem Cell Niche. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 22294. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79448-y>.
- (64) Chaudhuri, O.; Cooper-White, J.; Janmey, P. A.; Mooney, D. J.; Shenoy, V. B. Effects of Extracellular Matrix Viscoelasticity on Cellular Behaviour. *Nature* **2020**, *584* (7822), 535–546. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2612-2>.
- (65) Elosegui-Artola, A. The Extracellular Matrix Viscoelasticity as a Regulator of Cell and Tissue Dynamics. *Curr Opin Cell Biol* **2021**, *72*, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2021.04.002>.

- (66) Huang, D.; Huang, Y.; Xiao, Y.; Yang, X.; Lin, H.; Feng, G.; Zhu, X.; Zhang, X. Viscoelasticity in Natural Tissues and Engineered Scaffolds for Tissue Reconstruction. *Acta Biomater* **2019**, *97*, 74–92. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.08.013>.
- (67) DiMaio, J. T. M.; Doran, T. M.; Ryan, D. M.; Raymond, D. M.; Nilsson, B. L. Modulating Supramolecular Peptide Hydrogel Viscoelasticity Using Biomolecular Recognition. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (11), 3591–3599. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00925>.
- (68) Cacopardo, L.; Guazzelli, N.; Nossa, R.; Mattei, G.; Ahluwalia, A. Engineering Hydrogel Viscoelasticity. *J Mech Behav Biomed Mater* **2019**, *89*, 162–167. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.09.031>.
- (69) Le, V.-M.; Lang, M.-D.; Shi, W.-B.; Liu, J.-W. A Collagen-Based Multicellular Tumor Spheroid Model for Evaluation of the Efficiency of Nanoparticle Drug Delivery. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* **2016**, *44* (2), 540–544. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.968820>.
- (70) James-Bhasin, M.; Siegel, P. M.; Nazhat, S. N. A Three-Dimensional Dense Collagen Hydrogel to Model Cancer Cell/Osteoblast Interactions. *J Funct Biomater* **2018**, *9* (4), E72. <https://doi.org/10.3390/jfb9040072>.
- (71) Nii, T.; Makino, K.; Tabata, Y. A Cancer Invasion Model Combined with Cancer-Associated Fibroblasts Aggregates Incorporating Gelatin Hydrogel Microspheres Containing a P53 Inhibitor. *Tissue Eng Part C Methods* **2019**, *25* (12), 711–720. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2019.0189>.
- (72) Narkhede, A. A.; Crenshaw, J. H.; Crossman, D. K.; Shevde, L. A.; Rao, S. S. An in Vitro Hyaluronic Acid Hydrogel Based Platform to Model Dormancy in Brain Metastatic Breast Cancer Cells. *Acta Biomater* **2020**, *107*, 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.02.039>.
- (73) Rezakhani, L.; Alizadeh, M.; Alizadeh, A. A Three Dimensional *in vivo* Model of Breast Cancer Using a Thermosensitive Chitosan-Based Hydrogel and 4 T1 Cell Line in Balb/c. *J Biomed Mater Res A* **2021**, *109* (7), 1275–1285. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37121>.
- (74) Zhang, C.; Yang, X.; Hu, W.; Han, X.; Fan, L.; Tao, S. Preparation and Characterization of Carboxymethyl Chitosan/Collagen Peptide/Oxidized Konjac Composite Hydrogel. *Int J Biol Macromol* **2020**, *149*, 31–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.01.127>.
- (75) Hughes, C. S.; Postovit, L. M.; Lajoie, G. A. Matrigel: A Complex Protein Mixture Required for Optimal Growth of Cell Culture. *PROTEOMICS* **2010**, *10* (9), 1886–1890. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900758>.

- (76) Benton, G.; Arnaoutova, I.; George, J.; Kleinman, H. K.; Koblinksi, J. Matrigel: From Discovery and ECM Mimicry to Assays and Models for Cancer Research. *Adv Drug Deliv Rev* **2014**, *79–80*, 3–18. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.06.005>.
- (77) El Hamoui, O.; Gaudin, K.; Battu, S.; Barthélémy, P.; Lespes, G.; Alies, B. Self-Assembly of Nucleoside-Derived Low-Molecular-Weight Gelators: A Thermodynamics and Kinetics Study on Different Length Scales. *Langmuir* **2021**, *37* (1), 297–310. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c02894>.
- (78) Du, X.; Zhou, J.; Shi, J.; Xu, B. Supramolecular Hydrogelators and Hydrogels: From Soft Matter to Molecular Biomaterials. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (24), 13165–13307. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00299>.
- (79) Latxague, L.; Dalila, M.-J.; Patwa, A.; Ziane, S.; Chassande, O.; Godeau, G.; Barthélémy, P. Glycoside Nucleoside Lipids (GNLs): An Intrusion into the Glycolipids' World? *Comptes Rendus Chimie* **2012**, *15* (1), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2011.08.010>.
- (80) Saydé, T.; El Hamoui, O.; Alies, B.; Gaudin, K.; Lespes, G.; Battu, S. Biomaterials for Three-Dimensional Cell Culture: From Applications in Oncology to Nanotechnology. *Nanomaterials (Basel)* **2021**, *11* (2), 481. <https://doi.org/10.3390/nano11020481>.
- (81) Latxague, L.; Ramin, M. A.; Appavoo, A.; Berto, P.; Maisani, M.; Ehret, C.; Chassande, O.; Barthélémy, P. Control of Stem-Cell Behavior by Fine Tuning the Supramolecular Assemblies of Low-Molecular-Weight Gelators. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (15), 4517–4521. <https://doi.org/10.1002/anie.201409134>.
- (82) Cesarz, Z.; Tamama, K. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int* **2016**, *2016*, 9176357. <https://doi.org/10.1155/2016/9176357>.
- (83) Mirabelli, P.; Coppola, L.; Salvatore, M. Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. *Cancers (Basel)* **2019**, *11* (8). <https://doi.org/10.3390/cancers11081098>.
- (84) Shetab-Boushehri, S.; Abdollahi, M. Current Concerns on the Validity of in Vitro Models That Use Transformed Neoplastic Cells in Pharmacology and Toxicology. *International Journal of Pharmacology* **2012**, *8*, 594–595. <https://doi.org/10.3923/ijp.2012.594.595>.
- (85) Liu, Z.; Zhu, L.; Thakkar, S.; Roberts, R.; Tong, W. Can Transcriptomic Profiles from Cancer Cell Lines Be Used for Toxicity Assessment? *Chem. Res. Toxicol.* **2020**, *33* (1), 271–280. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00288>.
- (86) Goodspeed, A.; Heiser, L. M.; Gray, J. W.; Costello, J. C. Tumor-Derived Cell Lines as Molecular Models of Cancer Pharmacogenomics. *Mol Cancer Res* **2016**, *14* (1), 3–13. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-15-0189>.

- (87) Menyhárt, O.; Harami-Papp, H.; Sukumar, S.; Schäfer, R.; Magnani, L.; de Barrios, O.; Györfy, B. Guidelines for the Selection of Functional Assays to Evaluate the Hallmarks of Cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2016**, *1866* (2), 300–319. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2016.10.002>.
- (88) Kristensen, B. W.; Priesterbach-Ackley, L. P.; Petersen, J. K.; Wesseling, P. Molecular Pathology of Tumors of the Central Nervous System. *Ann Oncol* **2019**, *30* (8), 1265–1278. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz164>.
- (89) Schiffer, D.; Annovazzi, L.; Casalone, C.; Corona, C.; Mellai, M. Glioblastoma: Microenvironment and Niche Concept. *Cancers* **2019**, *11* (1), 5. <https://doi.org/10.3390/cancers11010005>.
- (90) Brown, D. V.; Stylli, S. S.; Kaye, A. H.; Mantamadiotis, T. Multilayered Heterogeneity of Glioblastoma Stem Cells: Biological and Clinical Significance. *Adv Exp Med Biol* **2019**, *1139*, 1–21. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14366-4_1.
- (91) Prasad, S.; Ramachandran, S.; Gupta, N.; Kaushik, I.; Srivastava, S. K. Cancer Cells Stemness: A Doorstep to Targeted Therapy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **2020**, *1866* (4), 165424. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.02.019>.
- (92) Jin, X.; Jin, X.; Kim, H. Cancer Stem Cells and Differentiation Therapy. *Tumour Biol* **2017**, *39* (10), 1010428317729933. <https://doi.org/10.1177/1010428317729933>.
- (93) Vlashi, E.; Pajonk, F. Cancer Stem Cells, Cancer Cell Plasticity and Radiation Therapy. *Semin Cancer Biol* **2015**, *31*, 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2014.07.001>.
- (94) Jögi, A.; Vaapil, M.; Johansson, M.; Pählman, S. Cancer Cell Differentiation Heterogeneity and Aggressive Behavior in Solid Tumors. *Ups J Med Sci* **2012**, *117* (2), 217–224. <https://doi.org/10.3109/03009734.2012.659294>.
- (95) Reya, T.; Morrison, S. J.; Clarke, M. F.; Weissman, I. L. Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells. *Nature* **2001**, *414* (6859), 105–111. <https://doi.org/10.1038/35102167>.
- (96) Singh, S. K.; Clarke, I. D.; Terasaki, M.; Bonn, V. E.; Hawkins, C.; Squire, J.; Dirks, P. B. Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. *Cancer Res* **2003**, *63* (18), 5821–5828.
- (97) Najafi, M.; Farhood, B.; Mortezaee, K. Cancer Stem Cells (CSCs) in Cancer Progression and Therapy. *J Cell Physiol* **2019**, *234* (6), 8381–8395. <https://doi.org/10.1002/jcp.27740>.
- (98) Kuşoğlu, A.; Biray Avcı, Ç. Cancer Stem Cells: A Brief Review of the Current Status. *Gene* **2019**, *681*, 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.09.052>.

- (99) Guichet, P.-O.; Guelfi, S.; Ripoll, C.; Teigell, M.; Sabourin, J.-C.; Bauchet, L.; Rigau, V.; Rothhut, B.; Hugnot, J.-P. Asymmetric Distribution of GFAP in Glioma Multipotent Cells. *PLoS One* **2016**, *11* (3), e0151274. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151274>.
- (100) Batlle, E.; Clevers, H. Cancer Stem Cells Revisited. *Nature Medicine* **2017**, *23* (10), 1124–1134. <https://doi.org/10.1038/nm.4409>.
- (101) Singh, S. K.; Hawkins, C.; Clarke, I. D.; Squire, J. A.; Bayani, J.; Hide, T.; Henkelman, R. M.; Cusimano, M. D.; Dirks, P. B. Identification of Human Brain Tumour Initiating Cells. *Nature* **2004**, *432* (7015), 396–401. <https://doi.org/10.1038/nature03128>.
- (102) Walcher, L.; Kistenmacher, A.-K.; Suo, H.; Kitte, R.; Dluczek, S.; Strauß, A.; Blaudszun, A.-R.; Yevsa, T.; Fricke, S.; Kossatz-Boehlert, U. Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies. *Front Immunol* **2020**, *11*, 1280. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01280>.
- (103) Steinbichler, T. B.; Dudás, J.; Skvortsov, S.; Ganswindt, U.; Riechelmann, H.; Skvortsova, I.-I. Therapy Resistance Mediated by Cancer Stem Cells. *Semin Cancer Biol* **2018**, *53*, 156–167. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.11.006>.
- (104) Nassar, D.; Blanpain, C. Cancer Stem Cells: Basic Concepts and Therapeutic Implications. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2016**, *11* (1), 47–76. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044438>.
- (105) Barbato, L.; Bocchetti, M.; Di Biase, A.; Regad, T. Cancer Stem Cells and Targeting Strategies. *Cells* **2019**, *8* (8), E926. <https://doi.org/10.3390/cells8080926>.
- (106) Borst, P. Cancer Drug Pan-Resistance: Pumps, Cancer Stem Cells, Quiescence, Epithelial to Mesenchymal Transition, Blocked Cell Death Pathways, Persisters or What? *Open Biology* **2019**, *2* (5), 120066. <https://doi.org/10.1098/rsob.120066>.
- (107) Bao, S.; Wu, Q.; McLendon, R. E.; Hao, Y.; Shi, Q.; Hjelmeland, A. B.; Dewhirst, M. W.; Bigner, D. D.; Rich, J. N. Glioma Stem Cells Promote Radioresistance by Preferential Activation of the DNA Damage Response. *Nature* **2006**, *444* (7120), 756–760. <https://doi.org/10.1038/nature05236>.
- (108) Diehn, M.; Cho, R. W.; Lobo, N. A.; Kalisky, T.; Dorie, M. J.; Kulp, A. N.; Qian, D.; Lam, J. S.; Ailles, L. E.; Wong, M.; Joshua, B.; Kaplan, M. J.; Wapnir, I.; Dirbas, F. M.; Somlo, G.; Garberoglio, C.; Paz, B.; Shen, J.; Lau, S. K.; Quake, S. R.; Brown, J. M.; Weissman, I. L.; Clarke, M. F. Association of Reactive Oxygen Species Levels and Radioresistance in Cancer Stem Cells. *Nature* **2009**, *458* (7239), 780–783. <https://doi.org/10.1038/nature07733>.

- (109) Mélin, C.; Perraud, A.; Akil, H.; Jauberteau, M.-O.; Cardot, P.; Mathonnet, M.; Battu, S. Cancer Stem Cell Sorting from Colorectal Cancer Cell Lines by Sedimentation Field Flow Fractionation. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (3), 1549–1556. <https://doi.org/10.1021/ac202797z>.
- (110) Lacroix, A.; Deluche, E.; Zhang, L. Y.; Dalmay, C.; Mélin, C.; Leroy, J.; Babay, M.; Morand Du Puch, C.; Giraud, S.; Bessette, B.; Bégau, G.; Saada, S.; Lautrette, C.; Pothier, A.; Battu, S.; Lalloué, F. A New Label-Free Approach to Glioblastoma Cancer Stem Cell Sorting and Detection. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (14), 8948–8957. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b00913>.
- (111) Saydé, T.; Manczak, R.; Saada, S.; Bégau, G.; Bessette, B.; Lespes, G.; Le Coustumer, P.; Gaudin, K.; Dalmay, C.; Pothier, A.; Lalloué, F.; Battu, S. Characterization of Glioblastoma Cancer Stem Cells Sorted by Sedimentation Field-Flow Fractionation Using an Ultrahigh-Frequency Range Dielectrophoresis Biosensor. *Anal. Chem.* **2021**. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c02466>.
- (112) Cheray, M.; Bégau, G.; Deluche, E.; Nivet, A.; Battu, S.; Lalloué, F.; Verdier, M.; Bessette, B. Cancer Stem-Like Cells in Glioblastoma. In *Glioblastoma*; De Vleeschouwer, S., Ed.; Codon Publications: Brisbane (AU), 2017.
- (113) Duval, K.; Grover, H.; Han, L.-H.; Mou, Y.; Pegoraro, A. F.; Fredberg, J.; Chen, Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)* **2017**, *32* (4), 266–277. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>.
- (114) Ravi, M.; Paramesh, V.; Kaviya, S. R.; Anuradha, E.; Solomon, F. D. P. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *Journal of Cellular Physiology* **2015**, *230* (1), 16–26. <https://doi.org/10.1002/jcp.24683>.
- (115) Muthuswamy, S. K. 3D Culture Reveals a Signaling Network. *Breast Cancer Research* **2011**, *13* (1), 103. <https://doi.org/10.1186/bcr2800>.
- (116) Sittampalam, S.; Eglén, R.; Ferguson, S.; Maynes, J. T.; Olden, K.; Schrader, L.; Shelper, T.; Ferrer, M. Three-Dimensional Cell Culture Assays: Are They More Predictive of *In vivo* Efficacy than 2D Monolayer Cell-Based Assays. *Assay Drug Dev Technol* **2015**, *13* (5), 254–261. <https://doi.org/10.1089/adt.2015.29001.rtd>.
- (117) Edmondson, R.; Broglie, J. J.; Adcock, A. F.; Yang, L. Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. *Assay Drug Dev Technol* **2014**, *12* (4), 207–218. <https://doi.org/10.1089/adt.2014.573>.

- (118) Langhans, S. A. Three-Dimensional in Vitro Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front. Pharmacol.* **2018**, *0*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006>.
- (119) Cekanova, M.; Rathore, K. Animal Models and Therapeutic Molecular Targets of Cancer: Utility and Limitations. *Drug Des Devel Ther* **2014**, *8*, 1911–1921. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S49584>.
- (120) Voskoglou-Nomikos, T.; Pater, J. L.; Seymour, L. Clinical Predictive Value of the in Vitro Cell Line, Human Xenograft, and Mouse Allograft Preclinical Cancer Models. *Clin Cancer Res* **2003**, *9* (11), 4227–4239.
- (121) Knight, E.; Przyborski, S. Advances in 3D Cell Culture Technologies Enabling Tissue-like Structures to Be Created in Vitro. *J Anat* **2015**, *227* (6), 746–756. <https://doi.org/10.1111/joa.12257>.
- (122) Bielecka, Z. F.; Maliszewska-Olejniczak, K.; Safir, I. J.; Szczylik, C.; Czarnecka, A. M. Three-Dimensional Cell Culture Model Utilization in Cancer Stem Cell Research. *Biol Rev Camb Philos Soc* **2017**, *92* (3), 1505–1520. <https://doi.org/10.1111/brv.12293>.
- (123) Nguyen, H. T.-L.; Nguyen, S. T.; Pham, P. V. Concise Review: 3D Cell Culture Systems for Anticancer Drug Screening. *Biomedical Research and Therapy* **2016**, *3* (05), 625–632.
- (124) Till, U.; Gibot, L.; Vicendo, P.; Rols, M.-P.; Gaucher, M.; Violleau, F.; Mingotaud, A.-F. Crosslinked Polymeric Self-Assemblies as an Efficient Strategy for Photodynamic Therapy on a 3D Cell Culture. *RSC Adv.* **2016**, *6* (74), 69984–69998. <https://doi.org/10.1039/C6RA09013C>.
- (125) Mak, I. W.; Evaniew, N.; Ghert, M. Lost in Translation: Animal Models and Clinical Trials in Cancer Treatment. *Am J Transl Res* **2014**, *6* (2), 114–118.
- (126) Hoarau-Véchet, J.; Rafii, A.; Touboul, C.; Pasquier, J. Halfway between 2D and Animal Models: Are 3D Cultures the Ideal Tool to Study Cancer-Microenvironment Interactions? *Int J Mol Sci* **2018**, *19* (1), E181. <https://doi.org/10.3390/ijms19010181>.
- (127) Donaldson, K.; Borm, P. J.; Castranova, V.; Gulumian, M. The Limits of Testing Particle-Mediated Oxidative Stress in Vitro in Predicting Diverse Pathologies; Relevance for Testing of Nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology* **2009**, *6* (1), 13. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-6-13>.
- (128) Mapanao, A. K.; Voliani, V. Three-Dimensional Tumor Models: Promoting Breakthroughs in Nanotheranostics Translational Research. *Applied Materials Today* **2020**, *19*, 100552. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2019.100552>.

- (129) Antoni, D.; Burckel, H.; Josset, E.; Noel, G. Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough *in vivo*. *Int J Mol Sci* **2015**, *16* (3), 5517–5527. <https://doi.org/10.3390/ijms16035517>.
- (130) Yip, D.; Cho, C. H. A Multicellular 3D Heterospheroid Model of Liver Tumor and Stromal Cells in Collagen Gel for Anti-Cancer Drug Testing. *Biochem Biophys Res Commun* **2013**, *433* (3), 327–332. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.008>.
- (131) Soares, C. P.; Midlej, V.; Oliveira, M. E. W. de; Benchimol, M.; Costa, M. L.; Mermelstein, C. 2D and 3D-Organized Cardiac Cells Shows Differences in Cellular Morphology, Adhesion Junctions, Presence of Myofibrils and Protein Expression. *PLOS ONE* **2012**, *7* (5), e38147. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038147>.
- (132) Bokhari, M.; Carnachan, R. J.; Cameron, N. R.; Przyborski, S. A. Culture of HepG2 Liver Cells on Three Dimensional Polystyrene Scaffolds Enhances Cell Structure and Function during Toxicological Challenge. *J Anat* **2007**, *211* (4), 567–576. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2007.00778.x>.
- (133) Torisawa, Y.-S. Y.-S.; Shiku, H.; Yasukawa, T.; Nishizawa, M.; Matsue, T. Multi-Channel 3-D Cell Culture Device Integrated on a Silicon Chip for Anticancer Drug Sensitivity Test. *Biomaterials* **2005**, *26* (14), 2165–2172. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.05.028>.
- (134) Fang, Y.; Eglén, R. M. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. *SLAS Discov* **2017**, *22* (5), 456–472. <https://doi.org/10.1177/1087057117696795>.
- (135) Vinci, M.; Gowan, S.; Boxall, F.; Patterson, L.; Zimmermann, M.; Court, W.; Lomas, C.; Mendiola, M.; Hardisson, D.; Eccles, S. A. Advances in Establishment and Analysis of Three-Dimensional Tumor Spheroid-Based Functional Assays for Target Validation and Drug Evaluation. *BMC Biology* **2012**, *10* (1), 29. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-29>.
- (136) Hollister, S. J. Porous Scaffold Design for Tissue Engineering. *Nature Materials* **2005**, *4* (7), 518–524. <https://doi.org/10.1038/nmat1421>.
- (137) Martin, I.; Miot, S.; Barbero, A.; Jakob, M.; Wendt, D. Osteochondral Tissue Engineering. *J Biomech* **2007**, *40* (4), 750–765. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2006.03.008>.
- (138) Auxenfans, C.; Builles, N.; Andre, V.; Lequeux, C.; Fievet, A.; Rose, S.; Braye, F.-M.; Fradette, J.; Janin-Manificat, H.; Nataf, S.; Burillon, C.; Damour, O. [Porous matrix and

- primary-cell culture: a shared concept for skin and cornea tissue engineering]. *Pathol Biol (Paris)* **2009**, *57* (4), 290–298. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.04.014>.
- (139) Jiang, S.; Lyu, C.; Zhao, P.; Li, W.; Kong, W.; Huang, C.; Genin, G. M.; Du, Y. Cryoprotectant Enables Structural Control of Porous Scaffolds for Exploration of Cellular Mechano-Responsiveness in 3D. *Nat Commun* **2019**, *10* (1), 3491. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11397-1>.
- (140) Alghuwainem, A.; Alshareeda, A. T.; Alsowayan, B. Scaffold-Free 3-D Cell Sheet Technique Bridges the Gap between 2-D Cell Culture and Animal Models. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (19), 4926. <https://doi.org/10.3390/ijms20194926>.
- (141) Smith, I. O.; Liu, X. H.; Smith, L. A.; Ma, P. X. Nanostructured Polymer Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2009**, *1* (2), 226–236. <https://doi.org/10.1002/wnan.26>.
- (142) Ovsianikov, A.; Khademhosseini, A.; Mironov, V. The Synergy of Scaffold-Based and Scaffold-Free Tissue Engineering Strategies. *Trends Biotechnol* **2018**, *36* (4), 348–357. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.01.005>.
- (143) Youn, B. S.; Sen, A.; Behie, L. A.; Girgis-Gabardo, A.; Hassell, J. A. Scale-Up of Breast Cancer Stem Cell Aggregate Cultures to Suspension Bioreactors. *Biotechnology Progress* **2006**, *22* (3), 801–810. <https://doi.org/10.1021/bp050430z>.
- (144) Lancaster, M. A.; Knoblich, J. A. Organogenesis in a Dish: Modeling Development and Disease Using Organoid Technologies. *Science* **2014**, *345* (6194), 1247125. <https://doi.org/10.1126/science.1247125>.
- (145) Cramer, S. M.; Larson, T. S.; Lockett, M. R. Tissue Papers: Leveraging Paper-Based Microfluidics for the Next Generation of 3D Tissue Models. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (17), 10916–10926. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b02102>.
- (146) Luo, H.; Cha, R.; Li, J.; Hao, W.; Zhang, Y.; Zhou, F. Advances in Tissue Engineering of Nanocellulose-Based Scaffolds: A Review. *Carbohydr Polym* **2019**, *224*, 115144. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115144>.
- (147) Tandon, S.; Kandasubramanian, B.; Ibrahim, S. M. Silk-Based Composite Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2020**, *59* (40), 17593–17611. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c02195>.
- (148) Yahia, Lh.; Chirani, N.; Gritsch, L.; Motta, F. L.; SoumiaChirani; Fare, S. History and Applications of Hydrogels. *Journal of Biomedical Sciences* **2015**, *4* (2). <https://doi.org/10.4172/2254-609X.100013>.

- (149) Hunt, N. C.; Grover, L. M. Cell Encapsulation Using Biopolymer Gels for Regenerative Medicine. *Biotechnol Lett* **2010**, *32* (6), 733–742. <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0221-0>.
- (150) Hoffman, A. S. Hydrogels for Biomedical Applications. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2012**, *64*, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.010>.
- (151) Nelson, S. R.; Zhang, C.; Roche, S.; O’Neill, F.; Swan, N.; Luo, Y.; Larkin, A.; Crown, J.; Walsh, N. Modelling of Pancreatic Cancer Biology: Transcriptomic Signature for 3D PDX-Derived Organoids and Primary Cell Line Organoid Development. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 2778. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59368-7>.
- (152) Kalabis, J.; Wong, G. S.; Vega, M. E.; Natsuzaka, M.; Robertson, E. S.; Herlyn, M.; Nakagawa, H.; Rustgi, A. K. Isolation and Characterization of Mouse and Human Esophageal Epithelial Cells in 3D Organotypic Culture. *Nat Protoc* **2012**, *7* (2), 235–246. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.437>.
- (153) Nisbet, D. R.; Forsythe, J. S.; Shen, W.; Finkelstein, D. I.; Horne, M. K. Review Paper: A Review of the Cellular Response on Electrospun Nanofibers for Tissue Engineering. *J Biomater Appl* **2009**, *24* (1), 7–29. <https://doi.org/10.1177/0885328208099086>.
- (154) Kopecek, J. Polymer Chemistry: Swell Gels. *Nature* **2002**, *417* (6887), 388–389, 391. <https://doi.org/10.1038/417388a>.
- (155) Draper, E. R.; Adams, D. J. Low-Molecular-Weight Gels: The State of the Art. *Chem* **2017**, *3* (3), 390–410. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2017.07.012>.
- (156) Buxboim, A.; Ivanovska, I. L.; Discher, D. E. Matrix Elasticity, Cytoskeletal Forces and Physics of the Nucleus: How Deeply Do Cells “feel” Outside and In? *Journal of Cell Science* **2010**, *123* (3), 297–308. <https://doi.org/10.1242/jcs.041186>.
- (157) Zhu, J.; Marchant, R. E. Design Properties of Hydrogel Tissue-Engineering Scaffolds. *Expert Rev Med Devices* **2011**, *8* (5), 607–626. <https://doi.org/10.1586/erd.11.27>.
- (158) Osswald, A.; Hedrich, V.; Sommergruber, W. 3D-3 Tumor Models in Drug Discovery for Analysis of Immune Cell Infiltration. *Methods Mol Biol* **2019**, *1953*, 151–162. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9145-7_10.
- (159) Zou, L.; Luo, Y.; Chen, M.; Wang, G.; Ding, M.; Petersen, C. C.; Kang, R.; Dagnaes-Hansen, F.; Zeng, Y.; Lv, N.; Ma, Q.; Le, D. Q. S.; Besenbacher, F.; Bolund, L.; Jensen, T. G.; Kjems, J.; Pu, W. T.; Bünger, C. A Simple Method for Deriving Functional MSCs and Applied for Osteogenesis in 3D Scaffolds. *Sci Rep* **2013**, *3*, 2243. <https://doi.org/10.1038/srep02243>.

- (160) Gyles, D. A.; Castro, L. D.; Silva, J. O. C.; Ribeiro-Costa, R. M. A Review of the Designs and Prominent Biomedical Advances of Natural and Synthetic Hydrogel Formulations. *European Polymer Journal* **2017**, *88*, 373–392. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.01.027>.
- (161) Baharvand, H.; Hashemi, S. M.; Kazemi Ashtiani, S.; Farrokhi, A. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Hepatocytes in 2D and 3D Culture Systems in Vitro. *Int J Dev Biol* **2006**, *50* (7), 645–652. <https://doi.org/10.1387/ijdb.052072hb>.
- (162) Glowacki, J.; Mizuno, S. Collagen Scaffolds for Tissue Engineering. *Biopolymers* **2008**, *89* (5), 338–344. <https://doi.org/10.1002/bip.20871>.
- (163) Sakai, S.; Hirose, K.; Taguchi, K.; Ogushi, Y.; Kawakami, K. An Injectable, in Situ Enzymatically Gellable, Gelatin Derivative for Drug Delivery and Tissue Engineering. *Biomaterials* **2009**, *30* (20), 3371–3377. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.03.030>.
- (164) Awad, H. A.; Wickham, M. Q.; Leddy, H. A.; Gimble, J. M.; Guilak, F. Chondrogenic Differentiation of Adipose-Derived Adult Stem Cells in Agarose, Alginate, and Gelatin Scaffolds. *Biomaterials* **2004**, *25* (16), 3211–3222. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.045>.
- (165) Willerth, S. M.; Arendas, K. J.; Gottlieb, D. I.; Sakiyama-Elbert, S. E. Optimization of Fibrin Scaffolds for Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells into Neural Lineage Cells. *Biomaterials* **2006**, *27* (36), 5990–6003. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.07.036>.
- (166) Osathanon, T.; Linnes, M. L.; Rajachar, R. M.; Ratner, B. D.; Somerman, M. J.; Giachelli, C. M. Microporous Nanofibrous Fibrin-Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Biomaterials* **2008**, *29* (30), 4091–4099. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.06.030>.
- (167) Mauney, J. R.; Nguyen, T.; Gillen, K.; Kirker-Head, C.; Gimble, J. M.; Kaplan, D. L. Engineering Adipose-like Tissue in Vitro and *in vivo* Utilizing Human Bone Marrow and Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells with Silk Fibroin 3D Scaffolds. *Biomaterials* **2007**, *28* (35), 5280–5290. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.08.017>.
- (168) Wang, Y.; Kim, H.-J.; Vunjak-Novakovic, G.; Kaplan, D. L. Stem Cell-Based Tissue Engineering with Silk Biomaterials. *Biomaterials* **2006**, *27* (36), 6064–6082. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.07.008>.
- (169) Gerecht, S.; Burdick, J. A.; Ferreira, L. S.; Townsend, S. A.; Langer, R.; Vunjak-Novakovic, G. Hyaluronic Acid Hydrogel for Controlled Self-Renewal and

- Differentiation of Human Embryonic Stem Cells. *PNAS* **2007**, *104* (27), 11298–11303. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703723104>.
- (170) Chen, D.; Qu, Y.; Hua, X.; Zhang, L.; Liu, Z.; Pflugfelder, S. C.; Li, D.-Q. A Hyaluronan Hydrogel Scaffold-Based Xeno-Free Culture System for Ex Vivo Expansion of Human Corneal Epithelial Stem Cells. *Eye (Lond)* **2017**, *31* (6), 962–971. <https://doi.org/10.1038/eye.2017.8>.
- (171) Kim, I.-Y.; Seo, S.-J.; Moon, H.-S.; Yoo, M.-K.; Park, I.-Y.; Kim, B.-C.; Cho, C.-S. Chitosan and Its Derivatives for Tissue Engineering Applications. *Biotechnol Adv* **2008**, *26* (1), 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.07.009>.
- (172) Aisenbrey, E. A.; Murphy, W. L. Synthetic Alternatives to Matrigel. *Nat Rev Mater* **2020**, *5* (7), 539–551. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0199-8>.
- (173) Ko, K. R.; Tsai, M.-C.; Frampton, J. P. Fabrication of Thin-Layer Matrigel-Based Constructs for Three-Dimensional Cell Culture. *Biotechnol Prog* **2019**, *35* (1), e2733. <https://doi.org/10.1002/btpr.2733>.
- (174) Dai, Y.; Siemann, D. C-Src Is Required for Hypoxia-Induced Metastasis-Associated Functions in Prostate Cancer Cells. *Oncotargets Ther* **2019**, *12*, 3519–3529. <https://doi.org/10.2147/OTT.S201320>.
- (175) Bogacheva, M. S.; Khan, S.; Kanninen, L. K.; Yliperttula, M.; Leung, A. W.; Lou, Y.-R. Differences in Definitive Endoderm Induction Approaches Using Growth Factors and Small Molecules. *J Cell Physiol* **2018**, *233* (4), 3578–3589. <https://doi.org/10.1002/jcp.26214>.
- (176) Ribeiro, A. J. S.; Ang, Y.-S.; Fu, J.-D.; Rivas, R. N.; Mohamed, T. M. A.; Higgs, G. C.; Srivastava, D.; Pruitt, B. L. Contractility of Single Cardiomyocytes Differentiated from Pluripotent Stem Cells Depends on Physiological Shape and Substrate Stiffness. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2015**, *112* (41), 12705–12710. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508073112>.
- (177) Wimmer, R. A.; Leopoldi, A.; Aichinger, M.; Kerjaschki, D.; Penninger, J. M. Generation of Blood Vessel Organoids from Human Pluripotent Stem Cells. *Nat Protoc* **2019**, *14* (11), 3082–3100. <https://doi.org/10.1038/s41596-019-0213-z>.
- (178) Talbot, N. C.; Caperna, T. J. Proteome Array Identification of Bioactive Soluble Proteins/Peptides in Matrigel: Relevance to Stem Cell Responses. *Cytotechnology* **2015**, *67* (5), 873–883. <https://doi.org/10.1007/s10616-014-9727-y>.
- (179) Hughes, C. S.; Postovit, L. M.; Lajoie, G. A. Matrigel: A Complex Protein Mixture Required for Optimal Growth of Cell Culture. *Proteomics* **2010**, *10* (9), 1886–1890. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900758>.

- (180) Hansen, K. C.; Kiemele, L.; Maller, O.; O'Brien, J.; Shankar, A.; Fornetti, J.; Schedin, P. An In-Solution Ultrasonication-Assisted Digestion Method for Improved Extracellular Matrix Proteome Coverage. *Mol Cell Proteomics* **2009**, *8* (7), 1648–1657. <https://doi.org/10.1074/mcp.M900039-MCP200>.
- (181) Sionkowska, A. Current Research on the Blends of Natural and Synthetic Polymers as New Biomaterials: Review. *Progress in Polymer Science* **2011**, *36* (9), 1254–1276. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.05.003>.
- (182) Soofi, S. S.; Last, J. A.; Liliensiek, S. J.; Nealey, P. F.; Murphy, C. J. The Elastic Modulus of Matrigel as Determined by Atomic Force Microscopy. *J Struct Biol* **2009**, *167* (3), 216–219. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.05.005>.
- (183) Catoira, M. C.; Fusaro, L.; Di Francesco, D.; Ramella, M.; Boccafoschi, F. Overview of Natural Hydrogels for Regenerative Medicine Applications. *J Mater Sci: Mater Med* **2019**, *30* (10), 115. <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6318-7>.
- (184) Ruedinger, F.; Lavrentieva, A.; Blume, C.; Pepelanova, I.; Scheper, T. Hydrogels for 3D Mammalian Cell Culture: A Starting Guide for Laboratory Practice. *Appl Microbiol Biotechnol* **2015**, *99* (2), 623–636. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6253-y>.
- (185) Slaughter, B. V.; Khurshid, S. S.; Fisher, O. Z.; Khademhosseini, A.; Peppas, N. A. Hydrogels in Regenerative Medicine. *Advanced Materials* **2009**, *21* (32–33), 3307–3329. <https://doi.org/10.1002/adma.200802106>.
- (186) Zhao, D.; Jiang, W.; Wang, Y.; Wang, C.; Zhang, X.; Li, Q.; Han, D. Three-Dimensional-Printed Poly-L-Lactic Acid Scaffolds with Different Pore Sizes Influence Periosteal Distraction Osteogenesis of a Rabbit Skull. *Biomed Res Int* **2020**, *2020*, 7381391. <https://doi.org/10.1155/2020/7381391>.
- (187) Ossipov, D. A.; Brännvall, K.; Forsberg-Nilsson, K.; Hilborn, J. Formation of the First Injectable Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogel by Mixing of Functional PVA Precursors. *Journal of Applied Polymer Science* **2007**, *106* (1), 60–70. <https://doi.org/10.1002/app.26455>.
- (188) Tibbitt, M. W.; Anseth, K. S. Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics for 3D Cell Culture. *Biotechnology and Bioengineering* **2009**, *103* (4), 655–663. <https://doi.org/10.1002/bit.22361>.
- (189) Hayward, A. S.; Sano, N.; Przyborski, S. A.; Cameron, N. R. Acrylic-Acid-Functionalized PolyHIPE Scaffolds for Use in 3D Cell Culture. *Macromol Rapid Commun* **2013**, *34* (23–24), 1844–1849. <https://doi.org/10.1002/marc.201300709>.

- (190) Engler, A. J.; Sen, S.; Sweeney, H. L.; Discher, D. E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification. *Cell* **2006**, *126* (4), 677–689. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>.
- (191) Nguyen, K. T.; West, J. L. Photopolymerizable Hydrogels for Tissue Engineering Applications. *Biomaterials* **2002**, *23* (22), 4307–4314. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00175-8](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00175-8).
- (192) Latxague, L.; Ramin, M. A.; Appavoo, A.; Berto, P.; Maisani, M.; Ehret, C.; Chassande, O.; Barthélémy, P. Control of Stem-Cell Behavior by Fine Tuning the Supramolecular Assemblies of Low-Molecular-Weight Gelators. *Angewandte Chemie International Edition* **2015**, *54* (15), 4517–4521. <https://doi.org/10.1002/anie.201409134>.
- (193) Narayana, C.; Upadhyay, R. K.; Chaturvedi, R.; Sagar, R. A Versatile Carbohydrate Based Gelator for Oil Water Separation, Nanoparticle Synthesis and Dye Removal. *New J. Chem.* **2017**, *41* (6), 2261–2267. <https://doi.org/10.1039/C6NJ03520E>.
- (194) Rajkamal; Pathak, N. P.; Chatterjee, D.; Paul, A.; Yadav, S. Arabinose Based Gelators: Rheological Characterization of the Gels and Phase Selective Organogelation of Crude-Oil. *RSC Adv.* **2016**, *6* (95), 92225–92234. <https://doi.org/10.1039/C6RA21109G>.
- (195) Chalard, A.; Vaysse, L.; Joseph, P.; Malaquin, L.; Souleille, S.; Lonetti, B.; Sol, J.-C.; Loubinoux, I.; Fitremann, J. Simple Synthetic Molecular Hydrogels from Self-Assembling Alkylgalactonamides as Scaffold for 3D Neuronal Cell Growth. *ACS Applied Materials & Interfaces* **2018**, *10* (20), 17004–17017. <https://doi.org/10.1021/acsami.8b01365>.
- (196) Wang, W.; Wang, H.; Ren, C.; Wang, J.; Tan, M.; Shen, J.; Yang, Z.; Wang, P. G.; Wang, L. A Saccharide-Based Supramolecular Hydrogel for Cell Culture. *Carbohydr. Res.* **2011**, *346* (8), 1013–1017. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.03.031>.
- (197) Ryadnov, M. G. Peptide Alpha-Helices for Synthetic Nanostructures. *Biochem. Soc. Trans.* **2007**, *35* (Pt 3), 487–491. <https://doi.org/10.1042/BST0350487>.
- (198) Colombo, G.; Soto, P.; Gazit, E. Peptide Self-Assembly at the Nanoscale: A Challenging Target for Computational and Experimental Biotechnology. *Trends Biotechnol.* **2007**, *25* (5), 211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2007.03.004>.
- (199) Manandhar, A.; Kang, M.; Chakraborty, K.; K. Tang, P.; M. Loverde, S. Molecular Simulations of Peptide Amphiphiles. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2017**, *15* (38), 7993–8005. <https://doi.org/10.1039/C7OB01290J>.
- (200) Jayawarna, V.; Richardson, S. M.; Hirst, A. R.; Hodson, N. W.; Saiani, A.; Gough, J. E.; Ulijn, R. V. Introducing Chemical Functionality in Fmoc-Peptide Gels for Cell

- Culture. *Acta Biomater* **2009**, *5* (3), 934–943. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.01.006>.
- (201) Gao, J.; Tang, C.; Elsayy, M. A.; Smith, A. M.; Miller, A. F.; Saiani, A. Controlling Self-Assembling Peptide Hydrogel Properties through Network Topology. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (3), 826–834. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01693>.
- (202) Araki, K.; Yoshikawa, I. Nucleobase-Containing Gelators. *Top Curr Chem* **2005**, *256*, 133–165. <https://doi.org/10.1007/b107173>.
- (203) Skilling, K. J.; Ndungu, A.; Kellam, B.; Ashford, M.; Bradshaw, T. D.; Marlow, M. Gelation Properties of Self-Assembling N-Acyl Modified Cytidine Derivatives. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2* (47), 8412–8417. <https://doi.org/10.1039/C4TB01375A>.
- (204) Alies, B.; Ouelhazi, M. A.; Patwa, A.; Verget, J.; Navailles, L.; Desvergnès, V.; Barthélémy, P. Cytidine- and Guanosine-Based Nucleotide–Lipids. *Organic & Biomolecular Chemistry* **2018**, *16* (26), 4888–4894. <https://doi.org/10.1039/C8OB01023D>.
- (205) Campins, N.; Dieudonné, P.; W. Grinstaff, M.; Barthélémy, P. Nanostructured Assemblies from Nucleotide -Based Amphiphiles. *New Journal of Chemistry* **2007**, *31* (11), 1928–1934. <https://doi.org/10.1039/B704884J>.
- (206) Patel, S.; Volpe, A. B.; Awwad, S.; Schätzlein, A. G.; Haider, S.; Liu, B.; Uchegbu, I. F. A Self-Assembling Lipidic Peptide and Selective Partial V2 Receptor Agonist Inhibits Urine Production. *Scientific Reports* **2020**, *10*.
- (207) Zhang, S. Discovery and Design of Self-Assembling Peptides. *Interface Focus* **2017**, *7* (6), 20170028. <https://doi.org/10.1098/rsfs.2017.0028>.
- (208) Yang, Z.; Xu, H.; Zhao, X. Designer Self-Assembling Peptide Hydrogels to Engineer 3D Cell Microenvironments for Cell Constructs Formation and Precise Oncology Remodeling in Ovarian Cancer. *Adv Sci (Weinh)* **2020**, *7* (9), 1903718. <https://doi.org/10.1002/advs.201903718>.
- (209) Qiu, F.; Chen, Y.; Tang, C.; Zhao, X. Amphiphilic Peptides as Novel Nanomaterials: Design, Self-Assembly and Application. *Int J Nanomedicine* **2018**, *13*, 5003–5022. <https://doi.org/10.2147/IJN.S166403>.
- (210) Latxague, L.; Dalila, M.-J.; Patwa, A.; Ziane, S.; Chassande, O.; Godeau, G.; Barthélémy, P. Glycoside Nucleoside Lipids (GNLs): An Intrusion into the Glycolipids' World? *Comptes Rendus Chimie* **2012**, *15* (1), 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2011.08.010>.

- (211) NAGARAJAN, R. Self-Assembly of Bola Amphiphiles. *Chemical Engineering Communications* **1987**, 55 (1–6), 251–273. <https://doi.org/10.1080/00986448708911931>.
- (212) Ochi, R.; Kurotani, K.; Ikeda, M.; Kiyonaka, S.; Hamachi, I. Supramolecular Hydrogels Based on Bola-Amphiphilic Glycolipids Showing Color Change in Response to Glycosidases. *Chem. Commun.* **2013**, 49 (21), 2115–2117. <https://doi.org/10.1039/C2CC37908B>.
- (213) Ramakanth, I.; Patnaik, A. Novel Two-Component Gels of Cetylpyridinium Chloride and the Bola-Amphiphile 6-Amino Caproic Acid: Phase Evolution and Mechanism of Gel Formation. *J. Phys. Chem. B* **2012**, 116 (9), 2722–2729. <https://doi.org/10.1021/jp2096345>.
- (214) Nebot, V. J.; Armengol, J.; Smets, J.; Prieto, S. F.; Escuder, B.; Miravet, J. F. Molecular Hydrogels from Bolaform Amino Acid Derivatives: A Structure–Properties Study Based on the Thermodynamics of Gel Solubilization. *Chemistry – A European Journal* **2012**, 18 (13), 4063–4072. <https://doi.org/10.1002/chem.201103193>.
- (215) Latxague, L.; Gaubert, A.; Maleville, D.; Baillet, J.; Ramin, M.; Barthélémy, P. Carbamate-Based Bolaamphiphile as Low-Molecular-Weight Hydrogelators. *Gels* **2016**, 2 (4), 25. <https://doi.org/10.3390/gels2040025>.
- (216) Ramin, M. A.; Latxague, L.; Sindhu, K. R.; Chassande, O.; Barthélémy, P. Low Molecular Weight Hydrogels Derived from Urea Based-Bolaamphiphiles as New Injectable Biomaterials. *Biomaterials* **2017**, 145, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.08.034>.
- (217) Soft Matter Nanotechnology: From Structure to Function | Wiley <https://www.wiley.com/en-ba/Soft+Matter+Nanotechnology%3A+From+Structure+to+Function-p-9783527337224> (accessed 2021 -07 -31).
- (218) Jain, N.; Goldschmidt, V.; Oncul, S.; Arntz, Y.; Duportail, G.; Mély, Y.; Klymchenko, A. S. Lactose-Ornithine Bolaamphiphiles for Efficient Gene Delivery in Vitro. *Int J Pharm* **2012**, 423 (2), 392–400. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.12.026>.
- (219) Griffin, D. R.; Weaver, W. M.; Scumpia, P. O.; Di Carlo, D.; Segura, T. Accelerated Wound Healing by Injectable Microporous Gel Scaffolds Assembled from Annealed Building Blocks. *Nature Materials* **2015**, 14 (7), 737–744. <https://doi.org/10.1038/nmat4294>.
- (220) Ziane, S.; Schlaubitz, S.; Miraux, S.; Patwa, A.; Lalande, C.; Bilem, I.; Lepreux, S.; Rousseau, B.; Le Meins, J.-F.; Latxague, L.; Barthélémy, P.; Chassande, O. A

- Thermosensitive Low Molecular Weight Hydrogel as Scaffold for Tissue Engineering. *Eur Cell Mater* **2012**, *23*, 147–160; discussion 160. <https://doi.org/10.22203/ecm.v023a11>.
- (221) Mirabelli, P.; Coppola, L.; Salvatore, M. Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. *Cancers (Basel)* **2019**, *11* (8), E1098. <https://doi.org/10.3390/cancers11081098>.
- (222) Shetab-Boushehri, S.; Abdollahi, M. Current Concerns on the Validity of in Vitro Models That Use Transformed Neoplastic Cells in Pharmacology and Toxicology. *International Journal of Pharmacology* **2012**, *8*, 594–595. <https://doi.org/10.3923/ijp.2012.594.595>.
- (223) Liu, Z.; Zhu, L.; Thakkar, S.; Roberts, R.; Tong, W. Can Transcriptomic Profiles from Cancer Cell Lines Be Used for Toxicity Assessment? *Chem Res Toxicol* **2020**, *33* (1), 271–280. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.9b00288>.
- (224) Hirschhaeuser, F.; Menne, H.; Dittfeld, C.; West, J.; Mueller-Klieser, W.; Kunz-Schughart, L. A. Multicellular Tumor Spheroids: An Underestimated Tool Is Catching up Again. *J Biotechnol* **2010**, *148* (1), 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.01.012>.
- (225) Bonnans, C.; Chou, J.; Werb, Z. Remodelling the Extracellular Matrix in Development and Disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, *15* (12), 786–801. <https://doi.org/10.1038/nrm3904>.
- (226) Hamilton, G.; Rath, B. Applicability of Tumor Spheroids for in Vitro Chemosensitivity Assays. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2019**, *15* (1), 15–23. <https://doi.org/10.1080/17425255.2019.1554055>.
- (227) Ediriwickrema, A.; Saltzman, W. M. Nanotherapy for Cancer: Targeting and Multifunctionality in the Future of Cancer Therapies. *ACS Biomater Sci Eng* **2015**, *1* (2), 64–78. <https://doi.org/10.1021/ab500084g>.
- (228) Ng, T. S. C.; Garlin, M. A.; Weissleder, R.; Miller, M. A. Improving Nanotherapy Delivery and Action through Image-Guided Systems Pharmacology. *Theranostics* **2020**, *10* (3), 968–997. <https://doi.org/10.7150/thno.37215>.
- (229) Schwachöfer, J. H. Multicellular Tumor Spheroids in Radiotherapy Research (Review). *Anticancer Res* **1990**, *10* (4), 963–969.
- (230) Bahadar, H.; Maqbool, F.; Niaz, K.; Abdollahi, M. Toxicity of Nanoparticles and an Overview of Current Experimental Models. *Iran Biomed J* **2016**, *20* (1), 1–11. <https://doi.org/10.7508/ibj.2016.01.001>.

- (231) Fröhlich, E. Comparison of Conventional and Advanced *in Vitro* Models in the Toxicity Testing of Nanoparticles. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* **2018**, *46* (sup2), 1091–1107. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1479709>.
- (232) Peng, F.; Setyawati, M. I.; Tee, J. K.; Ding, X.; Wang, J.; Nga, M. E.; Ho, H. K.; Leong, D. T. Nanoparticles Promote *in vivo* Breast Cancer Cell Intravasation and Extravasation by Inducing Endothelial Leakiness. *Nat. Nanotechnol.* **2019**, *14* (3), 279–286. <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0356-z>.
- (233) von Maltzahn, G.; Park, J.-H.; Lin, K. Y.; Singh, N.; Schwöppe, C.; Mesters, R.; Berdel, W. E.; Ruoslahti, E.; Sailor, M. J.; Bhatia, S. N. Nanoparticles That Communicate *in vivo* to Amplify Tumour Targeting. *Nat Mater* **2011**, *10* (7), 545–552. <https://doi.org/10.1038/nmat3049>.
- (234) Chai, Q.; Jiao, Y.; Yu, X. Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them. *Gels* **2017**, *3* (1), 6. <https://doi.org/10.3390/gels3010006>.
- (235) Prince, E.; Kumacheva, E. Design and Applications of Man-Made Biomimetic Fibrillar Hydrogels. *Nat Rev Mater* **2019**, *4* (2), 99–115. <https://doi.org/10.1038/s41578-018-0077-9>.
- (236) Saleh, A.; Marhuenda, E.; Fabre, C.; Hassani, Z.; Weille, J. D.; Boukhaddaoui, H.; Guelfi, S.; Maldonado, I. L.; Hugnot, J.-P.; Duffau, H.; Bauchet, L.; Cornu, D.; Bakalara, N. A Novel 3D Nanofibre Scaffold Conserves the Plasticity of Glioblastoma Stem Cell Invasion by Regulating Galectin-3 and Integrin-B1 Expression. *Scientific Reports* **2019**, *9* (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51108-w>.
- (237) Li, Y.; Kumacheva, E. Hydrogel Microenvironments for Cancer Spheroid Growth and Drug Screening. *Science Advances* **2018**, *4* (4), eaas8998. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aas8998>.
- (238) Huang, B.-W.; Gao, J.-Q. Application of 3D Cultured Multicellular Spheroid Tumor Models in Tumor-Targeted Drug Delivery System Research. *J Control Release* **2018**, *270*, 246–259. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.12.005>.
- (239) Imamura, Y.; Mukohara, T.; Shimono, Y.; Funakoshi, Y.; Chayahara, N.; Toyoda, M.; Kiyota, N.; Takao, S.; Kono, S.; Nakatsura, T.; Minami, H. Comparison of 2D- and 3D-Culture Models as Drug-Testing Platforms in Breast Cancer. *Oncol Rep* **2015**, *33* (4), 1837–1843. <https://doi.org/10.3892/or.2015.3767>.

- (240) Fischbach, C.; Chen, R.; Matsumoto, T.; Schmelzle, T.; Brugge, J. S.; Polverini, P. J.; Mooney, D. J. Engineering Tumors with 3D Scaffolds. *Nat Methods* **2007**, *4* (10), 855–860. <https://doi.org/10.1038/nmeth1085>.
- (241) Chaicharoenaudomrung, N.; Kunhorm, P.; Noisa, P. Three-Dimensional Cell Culture Systems as an in Vitro Platform for Cancer and Stem Cell Modeling. *World J Stem Cells* **2019**, *11* (12), 1065–1083. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i12.1065>.
- (242) Balcão, V. M.; Barreira, S. V. P.; Nunes, T. M.; Chaud, M. V.; Tubino, M.; Vila, M. M. D. C. Carbohydrate Hydrogels with Stabilized Phage Particles for Bacterial Biosensing: Bacterium Diffusion Studies. *Appl Biochem Biotechnol* **2014**, *172* (3), 1194–1214. <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0579-2>.
- (243) Sandrin, D.; Wagner, D.; Sitta, C. E.; Thoma, R.; Felekyan, S.; Hermes, H. E.; Janiak, C.; Amadeu, N. de S.; Kühnemuth, R.; Löwen, H.; Egelhaaf, S. U.; Seidel, C. a. M. Diffusion of Macromolecules in a Polymer Hydrogel: From Microscopic to Macroscopic Scales. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2016**, *18* (18), 12860–12876. <https://doi.org/10.1039/C5CP07781H>.
- (244) Engberg, K.; Frank, C. W. Protein Diffusion in Photopolymerized Poly(Ethylene Glycol) Hydrogel Networks. *Biomed Mater* **2011**, *6* (5), 055006. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/6/5/055006>.
- (245) Zhou, Y.; Li, J.; Zhang, Y.; Dong, D.; Zhang, E.; Ji, F.; Qin, Z.; Yang, J.; Yao, F. Establishment of a Physical Model for Solute Diffusion in Hydrogel: Understanding the Diffusion of Proteins in Poly(Sulfobetaine Methacrylate) Hydrogel. *J Phys Chem B* **2017**, *121* (4), 800–814. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b10355>.
- (246) Golmohamadi, M.; Wilkinson, K. J. Diffusion of Ions in a Calcium Alginate Hydrogel-Structure Is the Primary Factor Controlling Diffusion. *Carbohydr Polym* **2013**, *94* (1), 82–87. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.046>.
- (247) Faucher, S.; Le Coustumer, P.; Lespes, G. Nanoanalytics: History, Concepts, and Specificities. *Environ Sci Pollut Res Int* **2019**, *26* (6), 5267–5281. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1646-6>.
- (248) 14:00-17:00. ISO/TS 80004-4:2011 <https://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/05/21/52195.html> (accessed 2021 -07 -31).
- (249) Bruinink, A.; Wang, J.; Wick, P. Effect of Particle Agglomeration in Nanotoxicology. *Arch Toxicol* **2015**, *89* (5), 659–675. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1460-6>.

- (250) Sharma, V. K. Aggregation and Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles in Aquatic Environment—A Review. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* **2009**, *44* (14), 1485–1495. <https://doi.org/10.1080/10934520903263231>.
- (251) Baalousha, M.; Yang, Y.; Vance, M. E.; Colman, B. P.; McNeal, S.; Xu, J.; Blaszcak, J.; Steele, M.; Bernhardt, E.; Hochella, M. F. Outdoor Urban Nanomaterials: The Emergence of a New, Integrated, and Critical Field of Study. *Science of The Total Environment* **2016**, *557–558*, 740–753. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.132>.
- (252) Shandilya, N.; Le Bihan, O.; Bressot, C.; Morgeneyer, M. Emission of Titanium Dioxide Nanoparticles from Building Materials to the Environment by Wear and Weather. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49* (4), 2163–2170. <https://doi.org/10.1021/es504710p>.
- (253) Babaizadeh, H.; Hassan, M. Life Cycle Assessment of Nano-Sized Titanium Dioxide Coating on Residential Windows. *Construction and Building Materials* **2013**, *40*, 314–321. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2012.09.083>.
- (254) Windler, L.; Lorenz, C.; von Goetz, N.; Hungerbühler, K.; Amberg, M.; Heuberger, M.; Nowack, B. Release of Titanium Dioxide from Textiles during Washing. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (15), 8181–8188. <https://doi.org/10.1021/es301633b>.
- (255) Osmond, M. J.; Mccall, M. J. Zinc Oxide Nanoparticles in Modern Sunscreens: An Analysis of Potential Exposure and Hazard. *Nanotoxicology* **2010**, *4* (1), 15–41. <https://doi.org/10.3109/17435390903502028>.
- (256) Corinaldesi, C.; Marcellini, F.; Nepote, E.; Damiani, E.; Danovaro, R. Impact of Inorganic UV Filters Contained in Sunscreen Products on Tropical Stony Corals (*Acropora* Spp.). *Science of The Total Environment* **2018**, *637–638*, 1279–1285. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.108>.
- (257) Sadik, O. A. Anthropogenic Nanoparticles in the Environment. *Environ. Sci.: Processes Impacts* **2012**, *15* (1), 19–20. <https://doi.org/10.1039/C2EM90063G>.
- (258) Harrison, R. M.; Rob MacKenzie, A.; Xu, H.; Alam, M. S.; Nikolova, I.; Zhong, J.; Singh, A.; Zeraati-Rezaei, S.; Stark, C.; Beddows, D. C. S.; Liang, Z.; Xu, R.; Cai, X. Diesel Exhaust Nanoparticles and Their Behaviour in the Atmosphere. *Proc Math Phys Eng Sci* **2018**, *474* (2220), 20180492. <https://doi.org/10.1098/rspa.2018.0492>.
- (259) Kim, J. S.; Kuk, E.; Yu, K. N.; Kim, J.-H.; Park, S. J.; Lee, H. J.; Kim, S. H.; Park, Y. K.; Park, Y. H.; Hwang, C.-Y.; Kim, Y.-K.; Lee, Y.-S.; Jeong, D. H.; Cho, M.-H. Antimicrobial Effects of Silver Nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2007**, *3* (1), 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>.

- (260) Becheri, A.; Dürr, M.; Lo Nostro, P.; Baglioni, P. Synthesis and Characterization of Zinc Oxide Nanoparticles: Application to Textiles as UV-Absorbers. *J Nanopart Res* **2008**, *10* (4), 679–689. <https://doi.org/10.1007/s11051-007-9318-3>.
- (261) Smijs, T. G.; Pavel, S. Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles in Sunscreens: Focus on Their Safety and Effectiveness. *Nanotechnol Sci Appl* **2011**, *4*, 95–112. <https://doi.org/10.2147/NSA.S19419>.
- (262) Egerton, T. a.; Christensen, P. a.; Kosa, S. a. m.; Onoka, B.; Harper, J. c.; Tinlin, J. r. Photoelectrocatalysis by Titanium Dioxide for Water Treatment. *International Journal of Environment and Pollution* **2006**, *27* (1–3), 2–19. <https://doi.org/10.1504/IJEP.2006.010450>.
- (263) Chertok, B.; Moffat, B. A.; David, A. E.; Yu, F.; Bergemann, C.; Ross, B. D.; Yang, V. C. Iron Oxide Nanoparticles as a Drug Delivery Vehicle for MRI Monitored Magnetic Targeting of Brain Tumors. *Biomaterials* **2008**, *29* (4), 487–496. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.08.050>.
- (264) Chen, J.; Poon, C.-S. Photocatalytic Activity of Titanium Dioxide Modified Concrete Materials – Influence of Utilizing Recycled Glass Culletts as Aggregates. *Journal of Environmental Management* **2009**, *90* (11), 3436–3442. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.05.029>.
- (265) Shen, S.; Burton, M.; Jobson, B.; Haselbach, L. Pervious Concrete with Titanium Dioxide as a Photocatalyst Compound for a Greener Urban Road Environment. *Construction and Building Materials* **2012**, *35*, 874–883. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2012.04.097>.
- (266) You, H.; Yang, S.; Ding, B.; Yang, H. Synthesis of Colloidal Metal and Metal Alloy Nanoparticles for Electrochemical Energy Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (7), 2880–2904. <https://doi.org/10.1039/C2CS35319A>.
- (267) Frey, N. A.; Peng, S.; Cheng, K.; Sun, S. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Functionalization, and Applications in Bioimaging and Magnetic Energy Storage. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38* (9), 2532–2542. <https://doi.org/10.1039/B815548H>.
- (268) Webb, J. A.; Bardhan, R. Emerging Advances in Nanomedicine with Engineered Gold Nanostructures. *Nanoscale* **2014**, *6* (5), 2502–2530. <https://doi.org/10.1039/C3NR05112A>.
- (269) Das, S.; Dowding, J. M.; Klump, K. E.; McGinnis, J. F.; Self, W.; Seal, S. Cerium Oxide Nanoparticles: Applications and Prospects in Nanomedicine. *Nanomedicine* **2013**, *8* (9), 1483–1508. <https://doi.org/10.2217/nnm.13.133>.

- (270) Guarino-Hotz, M.; Zhang, J. Z. Structural Control and Biomedical Applications of Plasmonic Hollow Gold Nanospheres: A Mini Review. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* **2021**, *13* (4), e1694. <https://doi.org/10.1002/wnan.1694>.
- (271) Magnetism for Drug Delivery, MRI and Hyperthermia Applications: A Review. *Biointerface Res Appl Chem* **2020**, *11* (2), 8654–8668. <https://doi.org/10.33263/BRIAC112.86548668>.
- (272) Cormode, D. P.; Naha, P. C.; Fayad, Z. A. Nanoparticle Contrast Agents for Computed Tomography: A Focus on Micelles. *Contrast Media Mol Imaging* **2014**, *9* (1), 37–52. <https://doi.org/10.1002/cmml.1551>.
- (273) Hochella, M. F.; Mogk, D. W.; Ranville, J.; Allen, I. C.; Luther, G. W.; Marr, L. C.; McGrail, B. P.; Murayama, M.; Qafoku, N. P.; Rosso, K. M.; Sahai, N.; Schroeder, P. A.; Vikesland, P.; Westerhoff, P.; Yang, Y. Natural, Incidental, and Engineered Nanomaterials and Their Impacts on the Earth System. *Science* **2019**, *363* (6434), eaau8299. <https://doi.org/10.1126/science.aau8299>.
- (274) Rahman, Q.; Lohani, M.; Dopp, E.; Pemsel, H.; Jonas, L.; Weiss, D. G.; Schiffmann, D. Evidence That Ultrafine Titanium Dioxide Induces Micronuclei and Apoptosis in Syrian Hamster Embryo Fibroblasts. *Environmental Health Perspectives* **2002**, *110* (8), 797–800. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110797>.
- (275) Yamamoto, A.; Honma, R.; Sumita, M.; Hanawa, T. Cytotoxicity Evaluation of Ceramic Particles of Different Sizes and Shapes. *Journal of Biomedical Materials Research* **2004**, *68A* (2), 244–256. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.20020>.
- (276) Pan, Y.; Neuss, S.; Leifert, A.; Fischler, M.; Wen, F.; Simon, U.; Schmid, G.; Brandau, W.; Jahnen-Dechent, W. Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small* **2007**, *3* (11), 1941–1949. <https://doi.org/10.1002/sml.200700378>.
- (277) Vevers, W. F.; Jha, A. N. Genotoxic and Cytotoxic Potential of Titanium Dioxide (TiO₂) Nanoparticles on Fish Cells in Vitro. *Ecotoxicology* **2008**, *17* (5), 410–420. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0226-9>.
- (278) AshaRani, P. V.; Low Kah Mun, G.; Hande, M. P.; Valiyaveetil, S. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. *ACS Nano* **2009**, *3* (2), 279–290. <https://doi.org/10.1021/nn800596w>.
- (279) Foldbjerg, R.; Dang, D. A.; Autrup, H. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in the Human Lung Cancer Cell Line, A549. *Arch. Toxicol.* **2011**, *85* (7), 743–750. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0545-5>.

- (280) Park, M. V. D. Z.; Neigh, A. M.; Vermeulen, J. P.; de la Fonteyne, L. J. J.; Verharen, H. W.; Briedé, J. J.; van Loveren, H.; de Jong, W. H. The Effect of Particle Size on the Cytotoxicity, Inflammation, Developmental Toxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles. *Biomaterials* **2011**, *32* (36), 9810–9817. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.085>.
- (281) Helmlinger, J.; Sengstock, C.; Groß-Heitfeld, C.; Mayer, C.; A. Schildhauer, T.; Köller, M.; Epple, M. Silver Nanoparticles with Different Size and Shape: Equal Cytotoxicity, but Different Antibacterial Effects. *RSC Advances* **2016**, *6* (22), 18490–18501. <https://doi.org/10.1039/C5RA27836H>.
- (282) Akhtar, M. J.; Ahamed, M.; Alhadlaq, H. A.; Alrokayan, S. A. MgO Nanoparticles Cytotoxicity Caused Primarily by GSH Depletion in Human Lung Epithelial Cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2018**, *50*, 283–290. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.07.016>.
- (283) Lovern, S. B.; Klaper, R. Daphnia Magna Mortality When Exposed to Titanium Dioxide and Fullerene (C60) Nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2006**, *25* (4), 1132–1137. <https://doi.org/10.1897/05-278R.1>.
- (284) Wang, J.; Zhou, G.; Chen, C.; Yu, H.; Wang, T.; Ma, Y.; Jia, G.; Gao, Y.; Li, B.; Sun, J. Acute Toxicity and Biodistribution of Different Sized Titanium Dioxide Particles in Mice after Oral Administration. *Toxicology Letters* **2007**, *168* (2), 176–185. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2006.12.001>.
- (285) Chen, T.-H.; Lin, C.-Y.; Tseng, M.-C. Behavioral Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles on Larval Zebrafish (*Danio Rerio*). *Marine Pollution Bulletin* **2011**, *63* (5), 303–308. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.04.017>.
- (286) Tiwari, D. K.; Jin, T.; Behari, J. Dose-Dependent in-Vivo Toxicity Assessment of Silver Nanoparticle in Wistar Rats. *Toxicology Mechanisms and Methods* **2011**, *21* (1), 13–24. <https://doi.org/10.3109/15376516.2010.529184>.
- (287) Mahmoudi, M.; Hofmann, H.; Rothen-Rutishauser, B.; Petri-Fink, A. Assessing the In Vitro and In vivo Toxicity of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Chem. Rev.* **2012**, *112* (4), 2323–2338. <https://doi.org/10.1021/cr2002596>.
- (288) Simpson, C. A.; Salleng, K. J.; Cliffel, D. E.; Feldheim, D. L. In vivo Toxicity, Biodistribution, and Clearance of Glutathione-Coated Gold Nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2013**, *9* (2), 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.06.002>.

- (289) Askri, D.; Ouni, S.; Galai, S.; Chovelon, B.; Arnaud, J.; Lehmann, S. G.; Sakly, M.; Sève, M.; Amara, S. Sub-Acute Intravenous Exposure to Fe₂O₃ Nanoparticles Does Not Alter Cognitive Performances and Catecholamine Levels, but Slightly Disrupts Plasma Iron Level and Brain Iron Content in Rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* **2018**, *50*, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.06.006>.
- (290) Hussain, S. M.; Hess, K. L.; Gearhart, J. M.; Geiss, K. T.; Schlager, J. J. In Vitro Toxicity of Nanoparticles in BRL 3A Rat Liver Cells. *Toxicol In Vitro* **2005**, *19* (7), 975–983. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2005.06.034>.
- (291) Teodoro, J. S.; Simões, A. M.; Duarte, F. V.; Rolo, A. P.; Murdoch, R. C.; Hussain, S. M.; Palmeira, C. M. Assessment of the Toxicity of Silver Nanoparticles in Vitro: A Mitochondrial Perspective. *Toxicol In Vitro* **2011**, *25* (3), 664–670. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.01.004>.
- (292) Avalos, A.; Haza, A. I.; Mateo, D.; Morales, P. Cytotoxicity and ROS Production of Manufactured Silver Nanoparticles of Different Sizes in Hepatoma and Leukemia Cells. *Journal of Applied Toxicology* **2014**, *34* (4), 413–423. <https://doi.org/10.1002/jat.2957>.
- (293) Kaba, S. I.; Egorova, E. M. In Vitro Studies of the Toxic Effects of Silver Nanoparticles on HeLa and U937 Cells. *Nanotechnol Sci Appl* **2015**, *8*, 19–29. <https://doi.org/10.2147/NSA.S78134>.
- (294) Reeves, J. F.; Davies, S. J.; Dodd, N. J. F.; Jha, A. N. Hydroxyl Radicals (OH) Are Associated with Titanium Dioxide (TiO₂) Nanoparticle-Induced Cytotoxicity and Oxidative DNA Damage in Fish Cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **2008**, *640* (1–2), 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2007.12.010>.
- (295) Osman, I. F.; Baumgartner, A.; Cemeli, E.; Fletcher, J. N.; Anderson, D. Genotoxicity and Cytotoxicity of Zinc Oxide and Titanium Dioxide in HEP-2 Cells. *Nanomedicine* **2010**, *5* (8), 1193–1203. <https://doi.org/10.2217/nnm.10.52>.
- (296) Thurn, K. T.; Arora, H.; Paunesku, T.; Wu, A.; Brown, E. M. B.; Doty, C.; Kremer, J.; Woloschak, G. Endocytosis of Titanium Dioxide Nanoparticles in Prostate Cancer PC-3M Cells. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* **2011**, *7* (2), 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.09.004>.
- (297) Chen, L.; Zhou, L.; Liu, Y.; Deng, S.; Wu, H.; Wang, G. Toxicological Effects of Nanometer Titanium Dioxide (Nano-TiO₂) on *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2012**, *84*, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.019>.

- (298) Srivastava, R.; Rahman, Q.; Kashyap, M.; Singh, A.; Jain, G.; Jahan, S.; Lohani, M.; Lantow, M.; Pant, A. Nano-Titanium Dioxide Induces Genotoxicity and Apoptosis in Human Lung Cancer Cell Line, A549. *Hum Exp Toxicol* **2013**, *32* (2), 153–166. <https://doi.org/10.1177/0960327112462725>.
- (299) El-Said, K. S.; Ali, E. M.; Kanehira, K.; Taniguchi, A. Molecular Mechanism of DNA Damage Induced by Titanium Dioxide Nanoparticles in Toll-like Receptor 3 or 4 Expressing Human Hepatocarcinoma Cell Lines. *J Nanobiotechnol* **2014**, *12* (1), 48. <https://doi.org/10.1186/s12951-014-0048-2>.
- (300) Wang, Y.; Cui, H.; Zhou, J.; Li, F.; Wang, J.; Chen, M.; Liu, Q. Cytotoxicity, DNA Damage, and Apoptosis Induced by Titanium Dioxide Nanoparticles in Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells. *Environ Sci Pollut Res* **2015**, *22* (7), 5519–5530. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3717-7>.
- (301) Biondi, M.; Guarnieri, D.; Yu, H.; Belli, V.; Netti, P. A. Sub-100 Nm Biodegradable Nanoparticles: *In Vitro* Release Features and Toxicity Testing in 2D and 3D Cell Cultures. *Nanotechnology* **2013**, *24* (4), 045101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/4/045101>.
- (302) Lopes, V. R.; Loitto, V.; Audinot, J.-N.; Bayat, N.; Gutleb, A. C.; Cristobal, S. Dose-Dependent Autophagic Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles in Human HaCaT Cells at Non-Cytotoxic Levels. *J Nanobiotechnology* **2016**, *14*, 22. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0174-0>.
- (303) Sun, Q.; Tan, D.; Ze, Y.; Sang, X.; Liu, X.; Gui, S.; Cheng, Z.; Cheng, J.; Hu, R.; Gao, G.; Liu, G.; Zhu, M.; Zhao, X.; Sheng, L.; Wang, L.; Tang, M.; Hong, F. Pulmotoxicological Effects Caused by Long-Term Titanium Dioxide Nanoparticles Exposure in Mice. *Journal of Hazardous Materials* **2012**, *235–236*, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.072>.
- (304) Zhao, L.; Zhu, Y.; Chen, Z.; Xu, H.; Zhou, J.; Tang, S.; Xu, Z.; Kong, F.; Li, X.; Zhang, Y.; Li, X.; Zhang, J.; Jia, G. Cardiopulmonary Effects Induced by Occupational Exposure to Titanium Dioxide Nanoparticles. *Nanotoxicology* **2018**, *12* (2), 169–184. <https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1425502>.
- (305) Qu, Y.; Lü, X. Aqueous Synthesis of Gold Nanoparticles and Their Cytotoxicity in Human Dermal Fibroblasts-Fetal. *Biomed Mater* **2009**, *4* (2), 025007. <https://doi.org/10.1088/1748-6041/4/2/025007>.
- (306) Connor, E. E.; Mwamuka, J.; Gole, A.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D. Gold Nanoparticles Are Taken up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity. *Small* **2005**, *1* (3), 325–327. <https://doi.org/10.1002/sml.200400093>.

- (307) Escudero Francos, M. A.; Cepas López, V.; González Menéndez, P.; Badía Laíño, R.; Díaz García, M. E.; Sainz Menéndez, R. M.; Mayo Barrallo, J. C.; Hevia Sánchez, D. Cellular Uptake and Tissue Biodistribution of Functionalized Gold Nanoparticles and Nanoclusters. *Journal of Biomedical Nanotechnology* **2017**. <https://doi.org/10.1166/jbn.2017.2344>.
- (308) Susewind, J.; Carvalho-Wodarz, C. de S.; Repnik, U.; Collnot, E.-M.; Schneider-Daum, N.; Griffiths, G. W.; Lehr, C.-M. A 3D Co-Culture of Three Human Cell Lines to Model the Inflamed Intestinal Mucosa for Safety Testing of Nanomaterials. *Nanotoxicology* **2016**, *10* (1), 53–62. <https://doi.org/10.3109/17435390.2015.1008065>.
- (309) Theumer, A.; Gräfe, C.; Bähring, F.; Bergemann, C.; Hochhaus, A.; Clement, J. H. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Exert Different Cytotoxic Effects on Cells Grown in Monolayer Cell Culture versus as Multicellular Spheroids. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2015**, *380*, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2014.10.039>.
- (310) Le, V.-M.; Lang, M.-D.; Shi, W.-B.; Liu, J.-W. A Collagen-Based Multicellular Tumor Spheroid Model for Evaluation of the Efficiency of Nanoparticle Drug Delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **2016**, *44* (2), 540–544. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.968820>.
- (311) Wu, Z.; Guan, R.; Tao, M.; Lyu, F.; Cao, G.; Liu, M.; Gao, J. Assessment of the Toxicity and Inflammatory Effects of Different-Sized Zinc Oxide Nanoparticles in 2D and 3D Cell Cultures. *RSC Adv.* **2017**, *7* (21), 12437–12445. <https://doi.org/10.1039/C6RA27334C>.
- (312) Wang, J.; Chen, Y.; Chen, B.; Ding, J.; Xia, G.; Gao, C.; Cheng, J.; Jin, N.; Zhou, Y.; Li, X.; Tang, M.; Wang, X. M. Pharmacokinetic parameters and tissue distribution of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles in mice <https://www.dovepress.com/pharmacokinetic-parameters-and-tissue-distribution-of-magnetic-fe3o4-n-peer-reviewed-article-IJN> (accessed 2020 -05 -12). <https://doi.org/10.2147/IJN.S13662>.
- (313) Coccini, T.; Caloni, F.; Ramírez Cando, L. J.; De Simone, U. Cytotoxicity and Proliferative Capacity Impairment Induced on Human Brain Cell Cultures after Short- and Long-Term Exposure to Magnetite Nanoparticles. *J Appl Toxicol* **2017**, *37* (3), 361–373. <https://doi.org/10.1002/jat.3367>.
- (314) Sambale, F.; Lavrentieva, A.; Stahl, F.; Blume, C.; Stiesch, M.; Kasper, C.; Bahnemann, D.; Scheper, T. Three Dimensional Spheroid Cell Culture for Nanoparticle Safety Testing. *Journal of Biotechnology* **2015**, *205*, 120–129. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.001>.

- (315) Yu, M.; Huang, S.; Yu, K. J.; Clyne, A. M. Dextran and Polymer Polyethylene Glycol (PEG) Coating Reduce Both 5 and 30 Nm Iron Oxide Nanoparticle Cytotoxicity in 2D and 3D Cell Culture. *International Journal of Molecular Sciences* **2012**, *13* (5), 5554–5570. <https://doi.org/10.3390/ijms13055554>.
- (316) Chia, S. L.; Tay, C. Y.; Setyawati, M. I.; Leong, D. T. Biomimicry 3D Gastrointestinal Spheroid Platform for the Assessment of Toxicity and Inflammatory Effects of Zinc Oxide Nanoparticles. *Small* **2015**, *11* (6), 702–712. <https://doi.org/10.1002/sml.201401915>.
- (317) De Simone, U.; Roccio, M.; Gribaldo, L.; Spinillo, A.; Caloni, F.; Coccini, T. Human 3D Cultures as Models for Evaluating Magnetic Nanoparticle CNS Cytotoxicity after Short- and Repeated Long-Term Exposure. *IJMS* **2018**, *19* (7), 1993. <https://doi.org/10.3390/ijms19071993>.
- (318) Lee, J.; Lilly, G. D.; Doty, R. C.; Podsiadlo, P.; Kotov, N. A. In Vitro Toxicity Testing of Nanoparticles in 3D Cell Culture. *Small* **2009**, NA-NA. <https://doi.org/10.1002/sml.200801788>.
- (319) Weiswald, L.-B.; Bellet, D.; Dangles-Marie, V. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. *Neoplasia* **2015**, *17* (1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.12.004>.
- (320) He, H.; Liu, C.; Liu, Y.; Liu, X.; Wu, Y.; Fan, J.; Zhao, L.; Cao, Y. Mathematical Modeling of the Heterogeneous Distributions of Nanomedicines in Solid Tumors. *Eur J Pharm Biopharm* **2019**, *142*, 153–164. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.06.005>.
- (321) Guimarães, C. F.; Gasperini, L.; Marques, A. P.; Reis, R. L. The Stiffness of Living Tissues and Its Implications for Tissue Engineering. *Nature Reviews Materials* **2020**, *5* (5), 351–370. <https://doi.org/10.1038/s41578-019-0169-1>.
- (322) Lu, H.; Stenzel, M. H. Multicellular Tumor Spheroids (MCTS) as a 3D In Vitro Evaluation Tool of Nanoparticles. *Small* **2018**, *14* (13), e1702858. <https://doi.org/10.1002/sml.201702858>.
- (323) Cao, Y.; Gong, Y.; Liu, L.; Zhou, Y.; Fang, X.; Zhang, C.; Li, Y.; Li, J. The Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) as an in Vitro Model to Assess the Toxicity of Nanoparticles to Endothelium: A Review. *J Appl Toxicol* **2017**, *37* (12), 1359–1369. <https://doi.org/10.1002/jat.3470>.
- (324) Sindhvani, S.; Syed, A. M.; Ngai, J.; Kingston, B. R.; Maiorino, L.; Rothschild, J.; MacMillan, P.; Zhang, Y.; Rajesh, N. U.; Hoang, T.; Wu, J. L. Y.; Wilhelm, S.; Zilman, A.; Gadde, S.; Sulaiman, A.; Ouyang, B.; Lin, Z.; Wang, L.; Egeblad, M.; Chan, W. C. W. The Entry of Nanoparticles into Solid Tumours. *Nat Mater* **2020**, *19* (5), 566–575. <https://doi.org/10.1038/s41563-019-0566-2>.

- (325) Gollwitzer, C.; Bartczak, D.; Goenaga-Infante, H.; Kestens, V.; Krumrey, M.; Minelli, C.; Pálmai, M.; Ramaye, Y.; Roebben, G.; Sikora, A.; Varga, Z. A Comparison of Techniques for Size Measurement of Nanoparticles in Cell Culture Medium. *Analytical Methods* **2016**, *8* (26), 5272–5282. <https://doi.org/10.1039/C6AY00419A>.
- (326) Chen, Z.; Xu, R.; Zhang, Y.; Gu, N. Effects of Proteins from Culture Medium on Surface Property of Silanes- Functionalized Magnetic Nanoparticles. *Nanoscale Res Lett* **2008**, *4* (3), 204. <https://doi.org/10.1007/s11671-008-9226-1>.
- (327) Kato, H.; Fujita, K.; Horie, M.; Suzuki, M.; Nakamura, A.; Endoh, S.; Yoshida, Y.; Iwahashi, H.; Takahashi, K.; Kinugasa, S. Dispersion Characteristics of Various Metal Oxide Secondary Nanoparticles in Culture Medium for in Vitro Toxicology Assessment. *Toxicology in Vitro* **2010**, *24* (3), 1009–1018. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2009.12.006>.
- (328) Dubiak-Szepietowska, M.; Karczmarczyk, A.; Jönsson-Niedziółka, M.; Winckler, T.; Feller, K.-H. Development of Complex-Shaped Liver Multicellular Spheroids as a Human-Based Model for Nanoparticle Toxicity Assessment in Vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* **2016**, *294*, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.01.016>.
- (329) Chauhan, S.; Manivasagam, G.; Kumar, P.; Ambasta, R. K. Cellular Toxicity of Mesoporous Silica Nanoparticle in SHSY5Y and BMMNCs Cell. *Pharm Nanotechnol* **2018**, *6* (4), 245–252. <https://doi.org/10.2174/2211738506666181031160108>.
- (330) Braun, K.; Stürzel, C. M.; Biskupek, J.; Kaiser, U.; Kirchhoff, F.; Lindén, M. Comparison of Different Cytotoxicity Assays for in Vitro Evaluation of Mesoporous Silica Nanoparticles. *Toxicol In Vitro* **2018**, *52*, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.06.019>.
- (331) Bonnier, F.; Keating, M. E.; Wróbel, T. P.; Majzner, K.; Baranska, M.; Garcia-Munoz, A.; Blanco, A.; Byrne, H. J. Cell Viability Assessment Using the Alamar Blue Assay: A Comparison of 2D and 3D Cell Culture Models. *Toxicology in Vitro* **2015**, *29* (1), 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.09.014>.
- (332) Eustaquio, T.; Leary, J. F. Single-Cell Nanotoxicity Assays of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Methods Mol Biol* **2012**, *926*, 69–85. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-002-1_5.
- (333) Sonmez, E.; Cacciatore, I.; Bakan, F.; Turkez, H.; Mohtar, Y.; Togar, B.; Stefano, A. Toxicity Assessment of Hydroxyapatite Nanoparticles in Rat Liver Cell Model in Vitro. *Hum Exp Toxicol* **2016**, *35* (10), 1073–1083. <https://doi.org/10.1177/0960327115619770>.
- (334) Mota, A.; Hemati-Dinarvand, M.; Akbar Taheraghdam, A.; Reza Nejabati, H.; Ahmadi, R.; Ghasemnejad, T.; Hasanpour, M.; Valilo, M. Association of Paraoxonse1 (PON1)

- Genotypes with the Activity of PON1 in Patients with Parkinson's Disease. *Acta Neurol Taiwan* **2019**, *28*(3), 66–74.
- (335) Lou, J.; Stowers, R.; Nam, S.; Xia, Y.; Chaudhuri, O. Stress Relaxing Hyaluronic Acid-Collagen Hydrogels Promote Cell Spreading, Fiber Remodeling, and Focal Adhesion Formation in 3D Cell Culture. *Biomaterials* **2018**, *154*, 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.004>.
- (336) Marhuenda, E.; Fabre, C.; Zhang, C.; Martin-Fernandez, M.; Iskratsch, T.; Saleh, A.; Bauchet, L.; Cambedouzou, J.; Hugnot, J.-P.; Duffau, H.; Dennis, J. W.; Cornu, D.; Bakalara, N. Glioma Stem Cells Invasive Phenotype at Optimal Stiffness Is Driven by MGAT5 Dependent Mechanosensing. *J Exp Clin Cancer Res* **2021**, *40* (1), 139. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01925-7>.
- (337) Barnes, J. M.; Przybyla, L.; Weaver, V. M. Tissue Mechanics Regulate Brain Development, Homeostasis and Disease. *Journal of Cell Science* **2017**, *130* (1), 71–82. <https://doi.org/10.1242/jcs.191742>.
- (338) Chaudhuri, O. Viscoelastic Hydrogels for 3D Cell Culture. *Biomater. Sci.* **2017**, *5* (8), 1480–1490. <https://doi.org/10.1039/C7BM00261K>.
- (339) Gong, Z.; Szczesny, S. E.; Caliarì, S. R.; Charrier, E. E.; Chaudhuri, O.; Cao, X.; Lin, Y.; Mauck, R. L.; Janmey, P. A.; Burdick, J. A.; Shenoy, V. B. Matching Material and Cellular Timescales Maximizes Cell Spreading on Viscoelastic Substrates. *PNAS* **2018**. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716620115>.
- (340) Cheng, S.; Clarke, E. C.; Bilston, L. E. Rheological Properties of the Tissues of the Central Nervous System: A Review. *Med Eng Phys* **2008**, *30* (10), 1318–1337. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2008.06.003>.
- (341) Aufderhorst-Roberts, A.; Hughes, M. D. G.; Hare, A.; Head, D. A.; Kapur, N.; Brockwell, D. J.; Dougan, L. Reaction Rate Governs the Viscoelasticity and Nanostructure of Folded Protein Hydrogels. *Biomacromolecules* **2020**, *21* (10), 4253–4260. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c01044>.
- (342) Musilová, L.; Mráček, A.; Kovalčík, A.; Smolka, P.; Minařík, A.; Humpolíček, P.; Vícha, R.; Ponížil, P. Hyaluronan Hydrogels Modified by Glycinated Kraft Lignin: Morphology, Swelling, Viscoelastic Properties and Biocompatibility. *Carbohydr Polym* **2018**, *181*, 394–403. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.048>.
- (343) Theocharis, A. D.; Manou, D.; Karamanos, N. K. The Extracellular Matrix as a Multitasking Player in Disease. *FEBS J* **2019**, *286* (15), 2830–2869. <https://doi.org/10.1111/febs.14818>.

- (344) Varol, M. Cell-Extracellular Matrix Adhesion Assay. *Methods Mol Biol* **2020**, *2109*, 209–217. https://doi.org/10.1007/7651_2019_246.
- (345) Berrier, A. L.; Yamada, K. M. Cell-Matrix Adhesion. *J Cell Physiol* **2007**, *213* (3), 565–573. <https://doi.org/10.1002/jcp.21237>.
- (346) Doyle, A. D.; Yamada, K. M. Mechanosensing via Cell-Matrix Adhesions in 3D Microenvironments. *Exp Cell Res* **2016**, *343* (1), 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.033>.
- (347) Park, J. A.; Lee, H.-R.; Park, S.-Y.; Jung, S. Self-Organization of Fibroblast-Laden 3D Collagen Microstructures from Inkjet-Printed Cell Patterns. *Adv Biosyst* **2020**, *4* (5), e1900280. <https://doi.org/10.1002/adbi.201900280>.
- (348) Ren, K.; Zhou, J.; Wu, H. Materials for Microfluidic Chip Fabrication. *Acc Chem Res* **2013**, *46* (11), 2396–2406. <https://doi.org/10.1021/ar300314s>.
- (349) McMurtrey, R. J. Analytic Models of Oxygen and Nutrient Diffusion, Metabolism Dynamics, and Architecture Optimization in Three-Dimensional Tissue Constructs with Applications and Insights in Cerebral Organoids. *Tissue Eng Part C Methods* **2016**, *22* (3), 221–249. <https://doi.org/10.1089/ten.TEC.2015.0375>.
- (350) Galgoczy, R.; Pastor, I.; Colom, A.; Giménez, A.; Mas, F.; Alcaraz, J. A Spectrophotometer-Based Diffusivity Assay Reveals That Diffusion Hindrance of Small Molecules in Extracellular Matrix Gels Used in 3D Cultures Is Dominated by Viscous Effects. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2014**, *120*, 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.05.017>.
- (351) Worthington, P.; Pochan, D. J.; Langhans, S. A. Peptide Hydrogels - Versatile Matrices for 3D Cell Culture in Cancer Medicine. *Front Oncol* **2015**, *5*, 92. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00092>.
- (352) Radvar, E.; Azevedo, H. S. Supramolecular Peptide/Polymer Hybrid Hydrogels for Biomedical Applications. *Macromol Biosci* **2019**, *19* (1), e1800221. <https://doi.org/10.1002/mabi.201800221>.
- (353) Gissot, A.; Camplo, M.; Grinstaff, M. W.; Barthélémy, P. Nucleoside, Nucleotide and Oligonucleotide Based Amphiphiles: A Successful Marriage of Nucleic Acids with Lipids. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6* (8), 1324. <https://doi.org/10.1039/b719280k>.
- (354) Braun, G. A.; Ary, B. E.; Dear, A. J.; Rohn, M. C. H.; Payson, A. M.; Lee, D. S. M.; Parry, R. C.; Friedman, C.; Knowles, T. P. J.; Linse, S.; Åkerfeldt, K. S. On the Mechanism of Self-Assembly by a Hydrogel-Forming Peptide. *Biomacromolecules* **2020**, *21* (12), 4781–4794. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00989>.

- (355) Stupp, S. I. On Supramolecular Self-Assembly: Interview with Samuel Stupp. *Adv Mater* **2020**, *32* (20), e1906741. <https://doi.org/10.1002/adma.201906741>.
- (356) Dou, X.; Mehwish, N.; Zhao, C.; Liu, J.; Xing, C.; Feng, C. Supramolecular Hydrogels with Tunable Chirality for Promising Biomedical Applications. *Acc Chem Res* **2020**, *53* (4), 852–862. <https://doi.org/10.1021/acs.accounts.0c00012>.
- (357) Matsumoto, K.; Shundo, A.; Ohno, M.; Saruhashi, K.; Miyachi, N.; Tsuruzoe, N.; Tanaka, K. Sol-Gel Transition Accelerated by the Co-Assembly of Two Components in Supramolecular Hydrogels. *Phys Chem Chem Phys* **2015**, *17* (40), 26724–26730. <https://doi.org/10.1039/c5cp04800a>.
- (358) Makam, P.; Gazit, E. Minimalistic Peptide Supramolecular Co-Assembly: Expanding the Conformational Space for Nanotechnology. *Chem Soc Rev* **2018**, *47* (10), 3406–3420. <https://doi.org/10.1039/c7cs00827a>.
- (359) Hoque, J.; Sangaj, N.; Varghese, S. Stimuli-Responsive Supramolecular Hydrogels and Their Applications in Regenerative Medicine. *Macromol Biosci* **2019**, *19* (1), e1800259. <https://doi.org/10.1002/mabi.201800259>.
- (360) Xian, S.; Webber, M. J. Temperature-Responsive Supramolecular Hydrogels. *J Mater Chem B* **2020**, *8* (40), 9197–9211. <https://doi.org/10.1039/d0tb01814g>.
- (361) Tsutsumi, N.; Ito, A.; Ishigamori, A.; Ikeda, M.; Izumi, M.; Ochi, R. Synthesis and Self-Assembly Properties of Bola-Amphiphilic Glycosylated Lipopeptide-Type Supramolecular Hydrogels Showing Colour Changes Along with Gel-Sol Transition. *Int J Mol Sci* **2021**, *22* (4), 1860. <https://doi.org/10.3390/ijms22041860>.
- (362) Webber, M. J.; Appel, E. A.; Meijer, E. W.; Langer, R. Supramolecular Biomaterials. *Nat Mater* **2016**, *15* (1), 13–26. <https://doi.org/10.1038/nmat4474>.
- (363) Estroff, L. A.; Hamilton, A. D. Water Gelation by Small Organic Molecules. *Chem Rev* **2004**, *104* (3), 1201–1218. <https://doi.org/10.1021/cr0302049>.
- (364) Wang, L.; Shi, X.; Wu, Y.; Zhang, J.; Zhu, Y.; Wang, J. A Multifunctional Supramolecular Hydrogel: Preparation, Properties and Molecular Assembly. *Soft Matter* **2018**, *14* (4), 566–573. <https://doi.org/10.1039/c7sm02358h>.
- (365) Bansode, N. D.; Sindhu, K. R.; Morel, C.; Rémy, M.; Verget, J.; Boiziau, C.; Barthélémy, P. A Disulfide Based Low Molecular Weight Gel for the Selective Sustained Release of Biomolecules. *Biomater Sci* **2020**, *8* (11), 3186–3192. <https://doi.org/10.1039/d0bm00508h>.
- (366) Wirsching, H.-G.; Galanis, E.; Weller, M. Glioblastoma. *Handb Clin Neurol* **2016**, *134*, 381–397. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802997-8.00023-2>.

- (367) Luo, Z.; Wang, B.; Liu, H.; Shi, L. TNF Inhibitor Pomalidomide Sensitizes Glioblastoma Cells to EGFR Inhibition. *Ann Clin Lab Sci* **2020**, *50* (4), 474–480.
- (368) Kim, G.; Ko, Y. T. Small Molecule Tyrosine Kinase Inhibitors in Glioblastoma. *Arch Pharm Res* **2020**, *43* (4), 385–394. <https://doi.org/10.1007/s12272-020-01232-3>.
- (369) Lim, M.; Xia, Y.; Bettegowda, C.; Weller, M. Current State of Immunotherapy for Glioblastoma. *Nat Rev Clin Oncol* **2018**, *15* (7), 422–442. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0003-5>.
- (370) DeCordova, S.; Shastri, A.; Tsolaki, A. G.; Yasmin, H.; Klein, L.; Singh, S. K.; Kishore, U. Molecular Heterogeneity and Immunosuppressive Microenvironment in Glioblastoma. *Frontiers in Immunology* **2020**, *11*, 1402. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01402>.
- (371) Shergalis, A.; Bankhead, A.; Luesakul, U.; Muangsin, N.; Neamati, N. Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma. *Pharmacol Rev* **2018**, *70* (3), 412–445. <https://doi.org/10.1124/pr.117.014944>.
- (372) Jung, E.; Osswald, M.; Ratliff, M.; Dogan, H.; Xie, R.; Weil, S.; Hoffmann, D. C.; Kurz, F. T.; Kessler, T.; Heiland, S.; von Deimling, A.; Sahm, F.; Wick, W.; Winkler, F. Tumor Cell Plasticity, Heterogeneity, and Resistance in Crucial Microenvironmental Niches in Glioma. *Nat Commun* **2021**, *12* (1), 1014. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21117-3>.
- (373) Persano, L.; Rampazzo, E.; Della Puppa, A.; Pistollato, F.; Basso, G. The Three-Layer Concentric Model of Glioblastoma: Cancer Stem Cells, Microenvironmental Regulation, and Therapeutic Implications. *ScientificWorldJournal* **2011**, *11*, 1829–1841. <https://doi.org/10.1100/2011/736480>.
- (374) Qazi, M. A.; Vora, P.; Venugopal, C.; Sidhu, S. S.; Moffat, J.; Swanton, C.; Singh, S. K. Intratumoral Heterogeneity: Pathways to Treatment Resistance and Relapse in Human Glioblastoma. *Ann Oncol* **2017**, *28* (7), 1448–1456. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdx169>.
- (375) Davis, M. E. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs* **2016**, *20* (5 Suppl), S2-8. <https://doi.org/10.1188/16.CJON.S1.2-8>.
- (376) Soubéran, A.; Tchoghandjian, A. Practical Review on Preclinical Human 3D Glioblastoma Models: Advances and Challenges for Clinical Translation. *Cancers (Basel)* **2020**, *12* (9), E2347. <https://doi.org/10.3390/cancers12092347>.
- (377) Mariappan, A.; Goranci-Buzhala, G.; Ricci-Vitiani, L.; Pallini, R.; Gopalakrishnan, J. Trends and Challenges in Modeling Glioma Using 3D Human Brain Organoids. *Cell Death Differ* **2021**, *28* (1), 15–23. <https://doi.org/10.1038/s41418-020-00679-7>.

- (378) Stanković, T.; Ranđelović, T.; Dragoj, M.; Stojković Burić, S.; Fernández, L.; Ochoa, I.; Pérez-García, V. M.; Pešić, M. In Vitro Biomimetic Models for Glioblastoma—a Promising Tool for Drug Response Studies. *Drug Resistance Updates* **2021**, *55*, 100753. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2021.100753>.
- (379) Kwak, B.; Lee, Y.; Lee, J.; Lee, S.; Lim, J. Mass Fabrication of Uniform Sized 3D Tumor Spheroid Using High-Throughput Microfluidic System. *J Control Release* **2018**, *275*, 201–207. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.02.029>.
- (380) Singh, M.; Close, D. A.; Mukundan, S.; Johnston, P. A.; Sant, S. Production of Uniform 3D Microtumors in Hydrogel Microwell Arrays for Measurement of Viability, Morphology, and Signaling Pathway Activation. *Assay Drug Dev Technol* **2015**, *13* (9), 570–583. <https://doi.org/10.1089/adt.2015.662>.
- (381) Sant, S.; Johnston, P. A. The Production of 3D Tumor Spheroids for Cancer Drug Discovery. *Drug Discov Today Technol* **2017**, *23*, 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2017.03.002>.
- (382) Sherman, H.; Rossi, A. E. A Novel Three-Dimensional Glioma Blood-Brain Barrier Model for High-Throughput Testing of Tumoricidal Capability. *Front Oncol* **2019**, *9*, 351. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00351>.
- (383) Chang, J. C. Cancer Stem Cells: Role in Tumor Growth, Recurrence, Metastasis, and Treatment Resistance. *Medicine (Baltimore)* **2016**, *95* (1 Suppl 1), S20–S25. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000004766>.
- (384) Dawood, S.; Austin, L.; Cristofanilli, M. Cancer Stem Cells: Implications for Cancer Therapy. *Oncology (Williston Park)* **2014**, *28* (12), 1101–1107, 1110.
- (385) Yu, Y.; Ramena, G.; Elble, R. C. The Role of Cancer Stem Cells in Relapse of Solid Tumors. *Front Biosci (Elite Ed)* **2012**, *4*, 1528–1541. <https://doi.org/10.2741/478>.
- (386) Thankamony, A. P.; Saxena, K.; Murali, R.; Jolly, M. K.; Nair, R. Cancer Stem Cell Plasticity – A Deadly Deal. *Front Mol Biosci* **2020**, *7*. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00079>.
- (387) Majc, B.; Sever, T.; Zarić, M.; Breznik, B.; Turk, B.; Lah, T. T. Epithelial-to-Mesenchymal Transition as the Driver of Changing Carcinoma and Glioblastoma Microenvironment. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **2020**, *1867* (10), 118782. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118782>.
- (388) Dey, M.; Ulasov, I. V.; Tyler, M. A.; Sonabend, A. M.; Lesniak, M. S. Cancer Stem Cells: The Final Frontier for Glioma Virotherapy. *Stem Cell Rev Rep* **2011**, *7* (1), 119–129. <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9132-7>.

- (389) Dirkse, A.; Golebiewska, A.; Buder, T.; Nazarov, P. V.; Muller, A.; Poovathingal, S.; Brons, N. H. C.; Leite, S.; Sauvageot, N.; Sarkisjan, D.; Seyfrid, M.; Fritah, S.; Stieber, D.; Michelucci, A.; Hertel, F.; Herold-Mende, C.; Azuaje, F.; Skupin, A.; Bjerkgvig, R.; Deutsch, A.; Voss-Böhme, A.; Niclou, S. P. Stem Cell-Associated Heterogeneity in Glioblastoma Results from Intrinsic Tumor Plasticity Shaped by the Microenvironment. *Nat Commun* **2019**, *10* (1), 1787. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09853-z>.
- (390) Bradshaw, A.; Wickremsekera, A.; Tan, S. T.; Peng, L.; Davis, P. F.; Itinteang, T. Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. *Front Surg* **2016**, *3*, 21. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2016.00021>.
- (391) Hitomi, M.; Deleyrolle, L. P.; Mulkearns-Hubert, E. E.; Jarrar, A.; Li, M.; Sinyuk, M.; Otvos, B.; Brunet, S.; Flavahan, W. A.; Hubert, C. G.; Goan, W.; Hale, J. S.; Alvarado, A. G.; Zhang, A.; Rohaus, M.; Oli, M.; Vedam-Mai, V.; Fortin, J. M.; Futch, H. S.; Griffith, B.; Wu, Q.; Xia, C.-H.; Gong, X.; Ahluwalia, M. S.; Rich, J. N.; Reynolds, B. A.; Lathia, J. D. Differential Connexin Function Enhances Self-Renewal in Glioblastoma. *Cell Rep* **2015**, *11* (7), 1031–1042. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.021>.
- (392) Lathia, J. D.; Mack, S. C.; Mulkearns-Hubert, E. E.; Valentim, C. L. L.; Rich, J. N. Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Genes Dev* **2015**, *29* (12), 1203–1217. <https://doi.org/10.1101/gad.261982.115>.
- (393) Brown, Y.; Hua, S.; Tanwar, P. S. Extracellular Matrix-Mediated Regulation of Cancer Stem Cells and Chemoresistance. *Int J Biochem Cell Biol* **2019**, *109*, 90–104. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.02.002>.
- (394) Ibrahim, S. F.; van den Engh, G. Flow Cytometry and Cell Sorting. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **2007**, *106*, 19–39. https://doi.org/10.1007/10_2007_073.
- (395) Iriondo, O.; Rábano, M.; Vivanco, M. D. M. FACS Sorting Mammary Stem Cells. *Methods Mol Biol* **2015**, *1293*, 63–72. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2519-3_3.
- (396) Tung, J. W.; Parks, D. R.; Moore, W. A.; Herzenberg, L. A.; Herzenberg, L. A. New Approaches to Fluorescence Compensation and Visualization of FACS Data. *Clin Immunol* **2004**, *110* (3), 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2003.11.016>.
- (397) Pacheco, A.; Blanco, A.; Bronet, F.; Cruz, M.; García-Fernández, J.; García-Velasco, J. A. Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS): A Useful Sperm-Selection Technique in Cases of High Levels of Sperm DNA Fragmentation. *J Clin Med* **2020**, *9* (12), E3976. <https://doi.org/10.3390/jcm9123976>.
- (398) Song, Y.; Yin, H.; Huang, W. E. Raman Activated Cell Sorting. *Curr Opin Chem Biol* **2016**, *33*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.04.002>.

- (399) Aghajani, M.; Mansoori, B.; Mohammadi, A.; Asadzadeh, Z.; Baradaran, B. New Emerging Roles of CD133 in Cancer Stem Cell: Signaling Pathway and MiRNA Regulation. *J Cell Physiol* **2019**, *234* (12), 21642–21661. <https://doi.org/10.1002/jcp.28824>.
- (400) Wang, L.; Zuo, X.; Xie, K.; Wei, D. The Role of CD44 and Cancer Stem Cells. *Methods Mol Biol* **2018**, *1692*, 31–42. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7401-6_3.
- (401) Shaikh, M. V.; Kala, M.; Nivsarkar, M. CD90 a Potential Cancer Stem Cell Marker and a Therapeutic Target. *Cancer Biomark* **2016**, *16* (3), 301–307. <https://doi.org/10.3233/CBM-160590>.
- (402) Shimokawa, M.; Ohta, Y.; Nishikori, S.; Matano, M.; Takano, A.; Fujii, M.; Date, S.; Sugimoto, S.; Kanai, T.; Sato, T. Visualization and Targeting of LGR5+ Human Colon Cancer Stem Cells. *Nature* **2017**, *545* (7653), 187–192. <https://doi.org/10.1038/nature22081>.
- (403) Krause, J.; von Felden, J.; Casar, C.; Fründt, T. W.; Galaski, J.; Schmidt, C.; Jung, C.; Ittrich, H.; Weidemann, S. A.; Krech, T.; Heumann, A.; Li, J.; Fischer, L.; Sauter, G.; Lohse, A. W.; Wege, H.; Schulze, K. Hepatocellular Carcinoma: Intratumoral EpCAM-Positive Cancer Stem Cell Heterogeneity Identifies High-Risk Tumor Subtype. *BMC Cancer* **2020**, *20* (1), 1130. <https://doi.org/10.1186/s12885-020-07580-z>.
- (404) Boumahdi, S.; Driessens, G.; Lapouge, G.; Rorive, S.; Nassar, D.; Le Mercier, M.; Delatte, B.; Caauwe, A.; Lenglez, S.; Nkusi, E.; Brohée, S.; Salmon, I.; Dubois, C.; del Marmol, V.; Fuks, F.; Beck, B.; Blanpain, C. SOX2 Controls Tumour Initiation and Cancer Stem-Cell Functions in Squamous-Cell Carcinoma. *Nature* **2014**, *511* (7508), 246–250. <https://doi.org/10.1038/nature13305>.
- (405) Zhu, F.; Qian, W.; Zhang, H.; Liang, Y.; Wu, M.; Zhang, Y.; Zhang, X.; Gao, Q.; Li, Y. SOX2 Is a Marker for Stem-like Tumor Cells in Bladder Cancer. *Stem Cell Reports* **2017**, *9* (2), 429–437. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.07.004>.
- (406) Mohiuddin, I. S.; Wei, S.-J.; Kang, M. H. Role of OCT4 in Cancer Stem-like Cells and Chemotherapy Resistance. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* **2020**, *1866* (4), 165432. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.03.005>.
- (407) Zeineddine, D.; Hammoud, A. A.; Mortada, M.; Boeuf, H. The Oct4 Protein: More than a Magic Stemness Marker. *Am J Stem Cells* **2014**, *3* (2), 74–82.
- (408) Buczek, M. E.; Reeder, S. P.; Regad, T. Identification and Isolation of Cancer Stem Cells Using NANOG-EGFP Reporter System. *Methods Mol Biol* **2018**, *1692*, 139–148. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7401-6_13.

- (409) Ren, H.; Du, P.; Ge, Z.; Jin, Y.; Ding, D.; Liu, X.; Zou, Q. TWIST1 and BMI1 in Cancer Metastasis and Chemoresistance. *J Cancer* **2016**, *7* (9), 1074–1080. <https://doi.org/10.7150/jca.14031>.
- (410) Toledo-Guzmán, M. E.; Hernández, M. I.; Gómez-Gallegos, Á. A.; Ortiz-Sánchez, E. ALDH as a Stem Cell Marker in Solid Tumors. *Curr Stem Cell Res Ther* **2019**, *14* (5), 375–388. <https://doi.org/10.2174/1574888X13666180810120012>.
- (411) Cheng, R.; Zhang, F.; Li, M.; Wo, X.; Su, Y.-W.; Wang, W. Influence of Fixation and Permeabilization on the Mass Density of Single Cells: A Surface Plasmon Resonance Imaging Study. *Frontiers in Chemistry* **2019**, *7*, 588. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00588>.
- (412) Fariha, M.-M. N.; Chua, K.-H.; Tan, G.-C.; Tan, A.-E.; Hayati, A.-R. Human Chorion-Derived Stem Cells: Changes in Stem Cell Properties during Serial Passage. *Cytotherapy* **2011**, *13* (5), 582–593. <https://doi.org/10.3109/14653249.2010.549121>.
- (413) Andrzejewska, A.; Jablonska, A.; Seta, M.; Dabrowska, S.; Walczak, P.; Janowski, M.; Lukomska, B. Labeling of Human Mesenchymal Stem Cells with Different Classes of Vital Stains: Robustness and Toxicity. *Stem Cell Research & Therapy* **2019**, *10* (1), 187. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1296-8>.
- (414) Wolkers, W. F.; Oldenhof, H.; Tang, F.; Han, J.; Bigalk, J.; Sieme, H. Factors Affecting the Membrane Permeability Barrier Function of Cells during Preservation Technologies. *Langmuir* **2019**, *35* (23), 7520–7528. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b02852>.
- (415) Yakisich, J. S.; Azad, N.; Kaushik, V.; Iyer, A. K. V. Cancer Cell Plasticity: Rapid Reversal of Chemosensitivity and Expression of Stemness Markers in Lung and Breast Cancer Tumorspheres. *J Cell Physiol* **2017**, *232* (9), 2280–2286. <https://doi.org/10.1002/jcp.25725>.
- (416) Mélin, C.; Lacroix, A.; Lalloué, F.; Pothier, A.; Zhang, L. Y.; Perraud, A.; Dalmay, C.; Lautrette, C.; Jauberteau, M.-O.; Cardot, P.; Mathonnet, M.; Battu, S. Improved Sedimentation Field-Flow Fractionation Separation Channel for Concentrated Cellular Elution. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1302*, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.067>.
- (417) Lautrette, C.; Cardot, P. J. P.; Vermot-Desroches, C.; Wijdenes, J.; Jauberteau, M. O.; Battu, S. Sedimentation Field Flow Fractionation Purification of Immature Neural Cells from a Human Tumor Neuroblastoma Cell Line. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2003**, *791* (1–2), 149–160. [https://doi.org/10.1016/s1570-0232\(03\)00229-0](https://doi.org/10.1016/s1570-0232(03)00229-0).

- (418) Bertrand, J.; Begaud-Grimaud, G.; Bessette, B.; Verdier, M.; Battu, S.; Jauberteau, M.-O. Cancer Stem Cells from Human Glioma Cell Line Are Resistant to Fas-Induced Apoptosis. *Int J Oncol* **2009**, *34* (3), 717–727. https://doi.org/10.3892/ijo_00000198.
- (419) Mélin, C.; Lacroix, A.; Lalloué, F.; Pothier, A.; Zhang, L. Y.; Perraud, A.; Dalmay, C.; Lautrette, C.; Jauberteau, M.-O.; Cardot, P.; Mathonnet, M.; Battu, S. Improved Sedimentation Field-Flow Fractionation Separation Channel for Concentrated Cellular Elution. *J Chromatogr A* **2013**, *1302*, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.067>.
- (420) Micallef, L.; Battu, S.; Pinon, A.; Cook-Moreau, J.; Cardot, P. J. P.; Delage, C.; Simon, A. Sedimentation Field-Flow Fractionation Separation of Proliferative and Differentiated Subpopulations during Ca²⁺-Induced Differentiation in HaCaT Cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2010**, *878* (15–16), 1051–1058. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.03.009>.
- (421) Borowicz, S.; Van Scoyk, M.; Avasarala, S.; Karuppusamy Rathinam, M. K.; Tauler, J.; Bikkavilli, R. K.; Winn, R. A. The Soft Agar Colony Formation Assay. *J Vis Exp* **2014**, No. 92. <https://doi.org/10.3791/51998>.
- (422) Im, C.-N.; Yun, H. H.; Yoo, H. J.; Park, M.-J.; Lee, J.-H. Enhancement of SOX-2 Expression and ROS Accumulation by Culture of A172 Glioblastoma Cells under Non-Adherent Culture Conditions. *Oncol Rep* **2015**, *34* (2), 920–928. <https://doi.org/10.3892/or.2015.4021>.
- (423) Ugawa, Y.; Yamamoto, T.; Kawamura, M.; Yamashiro, K.; Shimoe, M.; Tomikawa, K.; Hongo, S.; Maeda, H.; Takashiba, S. Rho-Kinase Regulates Extracellular Matrix-Mediated Osteogenic Differentiation of Periodontal Ligament Cells. *Cell Biol Int* **2017**, *41* (6), 651–658. <https://doi.org/10.1002/cbin.10769>.
- (424) Coltelli, M.-B.; Aliotta, L.; Vannozzi, A.; Morganti, P.; Panariello, L.; Danti, S.; Neri, S.; Fernandez-Avila, C.; Fusco, A.; Donnarumma, G.; Lazzeri, A. Properties and Skin Compatibility of Films Based on Poly(Lactic Acid) (PLA) Bionanocomposites Incorporating Chitin Nanofibrils (CN). *J Funct Biomater* **2020**, *11* (2), E21. <https://doi.org/10.3390/jfb11020021>.
- (425) Lee, D. Y.; Park, S. A.; Lee, S. J.; Kim, T. H.; Oh, S. H.; Lee, J. H.; Kwon, S. K. Segmental Tracheal Reconstruction by 3D-Printed Scaffold: Pivotal Role of Asymmetrically Porous Membrane. *Laryngoscope* **2016**, *126* (9), E304-309. <https://doi.org/10.1002/lary.25806>.

- (426) Chai, Q.; Jiao, Y.; Yu, X. Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them. *Gels* **2017**, *3* (1). <https://doi.org/10.3390/gels3010006>.
- (427) Li, Y.; Kumacheva, E. Hydrogel Microenvironments for Cancer Spheroid Growth and Drug Screening. *Sci Adv* **2018**, *4* (4), eaas8998. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aas8998>.
- (428) Glowacki, J.; Mizuno, S. Collagen Scaffolds for Tissue Engineering. *Biopolymers* **2008**, *89* (5), 338–344. <https://doi.org/10.1002/bip.20871>.
- (429) Kang, S.-W.; Bae, Y. H. Cryopreservable and Tumorigenic Three-Dimensional Tumor Culture in Porous Poly(Lactic-Co-Glycolic Acid) Microsphere. *Biomaterials* **2009**, *30* (25), 4227–4232. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.04.025>.
- (430) Draper, E. R.; Adams, D. J. Low-Molecular-Weight Gels: The State of the Art. *Chem* **2017**, *3* (3), 390–410. <https://doi.org/10.1016/j.chempr.2017.07.012>.
- (431) Narayana, C.; Upadhyay, R. K.; Chaturvedi, R.; Sagar, R. A Versatile Carbohydrate Based Gelator for Oil Water Separation, Nanoparticle Synthesis and Dye Removal. *New J. Chem.* **2017**, *41* (6), 2261–2267. <https://doi.org/10.1039/C6NJ03520E>.
- (432) Wang, W.; Wang, H.; Ren, C.; Wang, J.; Tan, M.; Shen, J.; Yang, Z.; Wang, P. G.; Wang, L. A Saccharide-Based Supramolecular Hydrogel for Cell Culture. *Carbohydrate Research* **2011**, *346* (8), 1013–1017. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.03.031>.
- (433) Skilling, K. J.; Ndungu, A.; Kellam, B.; Ashford, M.; Bradshaw, T. D.; Marlow, M. Gelation Properties of Self-Assembling N-Acyl Modified Cytidine Derivatives. *J Mater Chem B* **2014**, *2* (47), 8412–8417. <https://doi.org/10.1039/c4tb01375a>.
- (434) Ziane, S.; Schlaubitz, S.; Miraux, S.; Patwa, A.; Lalande, C.; Bilem, I.; Lepreux, S.; Rousseau, B.; Le Meins, J.-F.; Latxague, L.; Barthélémy, P.; Chassande, O. A Thermosensitive Low Molecular Weight Hydrogel as Scaffold for Tissue Engineering. *Eur Cell Mater* **2012**, *23*, 147–160; discussion 160. <https://doi.org/10.22203/ecm.v023a11>.
- (435) Jain, D.; Karajic, A.; Murawska, M.; Goudeau, B.; Bichon, S.; Gounel, S.; Mano, N.; Kuhn, A.; Barthélémy, P. Low-Molecular-Weight Hydrogels as New Supramolecular Materials for Bioelectrochemical Interfaces. *ACS Appl Mater Interfaces* **2017**, *9* (1), 1093–1098. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b12890>.
- (436) Cidonio, G.; Glinka, M.; Dawson, J. I.; Oreffo, R. O. C. The Cell in the Ink: Improving Biofabrication by Printing Stem Cells for Skeletal Regenerative Medicine. *Biomaterials* **2019**, *209*, 10–24. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.04.009>.

- (437) Saydé, T.; El Hamoui, O.; Alies, B.; Gaudin, K.; Lespes, G.; Battu, S. Biomaterials for Three-Dimensional Cell Culture: From Applications in Oncology to Nanotechnology. *Nanomaterials* **2021**, *11* (2), 481. <https://doi.org/10.3390/nano11020481>.
- (438) Smith, D. K. Self-Assembling Fibrillar Networks—Supramolecular Gels. In *Supramolecular Chemistry*; American Cancer Society, 2012. <https://doi.org/10.1002/9780470661345.smc142>.
- (439) Loos, M. de; Feringa, B. L.; Esch, J. H. van. Design and Application of Self-Assembled Low Molecular Weight Hydrogels. *European Journal of Organic Chemistry* **2005**, *2005* (17), 3615–3631. <https://doi.org/10.1002/ejoc.200400723>.
- (440) Steed, J. W. Supramolecular Gel Chemistry: Developments over the Last Decade. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (5), 1379–1383. <https://doi.org/10.1039/C0CC03293J>.
- (441) Maisani, M.; Ziane, S.; Ehret, C.; Levesque, L.; Siadous, R.; Le Meins, J.-F.; Chevallier, P.; Barthélémy, P.; De Oliveira, H.; Amédée, J.; Mantovani, D.; Chassande, O. A New Composite Hydrogel Combining the Biological Properties of Collagen with the Mechanical Properties of a Supramolecular Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2018**, *12* (3), e1489–e1500. <https://doi.org/10.1002/term.2569>.
- (442) Zuidema, J. M.; Rivet, C. J.; Gilbert, R. J.; Morrison, F. A. A Protocol for Rheological Characterization of Hydrogels for Tissue Engineering Strategies. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **2014**, *102* (5), 1063–1073. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33088>.
- (443) Kretlow, J. D.; Klouda, L.; Mikos, A. G. Injectable Matrices and Scaffolds for Drug Delivery in Tissue Engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2007**, *59* (4), 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.013>.
- (444) Li, Q.; Wang, X.; Lu, X.; Tian, H.; Jiang, H.; Lv, G.; Guo, D.; Wu, C.; Chen, B. The Incorporation of Daunorubicin in Cancer Cells through the Use of Titanium Dioxide Whiskers. *Biomaterials* **2009**, *30* (27), 4708–4715. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.05.015>.
- (445) Okesola, B. O.; Smith, D. K. Applying Low-Molecular Weight Supramolecular Gelators in an Environmental Setting – Self-Assembled Gels as Smart Materials for Pollutant Removal. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (15), 4226–4251. <https://doi.org/10.1039/C6CS00124F>.

- (446) Patwa, A.; Labille, J.; Bottero, J.-Y.; Thiéry, A.; Barthélémy, P. Decontamination of Nanoparticles from Aqueous Samples Using Supramolecular Gels. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (13), 2547–2550. <https://doi.org/10.1039/C4CC08888C>.
- (447) Geckil, H.; Xu, F.; Zhang, X.; Moon, S.; Demirci, U. Engineering Hydrogels as Extracellular Matrix Mimics. *Nanomedicine* **2010**, *5* (3), 469–484. <https://doi.org/10.2217/nnm.10.12>.
- (448) Gieni, R. S.; Hendzel, M. J. Mechanotransduction from the ECM to the Genome: Are the Pieces Now in Place? *J Cell Biochem* **2008**, *104* (6), 1964–1987. <https://doi.org/10.1002/jcb.21364>.
- (449) Chen, C. S.; Mrksich, M.; Huang, S.; Whitesides, G. M.; Ingber, D. E. Geometric Control of Cell Life and Death. *Science* **1997**, *276* (5317), 1425–1428. <https://doi.org/10.1126/science.276.5317.1425>.
- (450) Birgersdotter, A.; Sandberg, R.; Ernberg, I. Gene Expression Perturbation in Vitro--a Growing Case for Three-Dimensional (3D) Culture Systems. *Semin Cancer Biol* **2005**, *15* (5), 405–412. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2005.06.009>.
- (451) Wang, Y.; Yao, Y. Nanofiber Alignment Mediates the Pattern of Single Cell Migration. *Langmuir* **2020**, *36* (8), 2129–2135. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b03314>.
- (452) Draper, E. R.; Adams, D. J. Controlling the Assembly and Properties of Low-Molecular-Weight Hydrogelators. *Langmuir* **2019**, *35* (20), 6506–6521. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.9b00716>.
- (453) Zhao, X.; Zhang, S. Designer Self-Assembling Peptide Materials. *Macromol Biosci* **2007**, *7* (1), 13–22. <https://doi.org/10.1002/mabi.200600230>.
- (454) Nowak, A. P.; Breedveld, V.; Pakstis, L.; Ozbas, B.; Pine, D. J.; Pochan, D.; Deming, T. J. Rapidly Recovering Hydrogel Scaffolds from Self-Assembling Diblock Copolypeptide Amphiphiles. *Nature* **2002**, *417* (6887), 424. <https://doi.org/10.1038/417424a>.
- (455) Parisi, E.; Garcia, A. M.; Marson, D.; Posocco, P.; Marchesan, S. Supramolecular Tripeptide Hydrogel Assembly with 5-Fluorouracil. *Gels* **2019**, *5* (1), 5. <https://doi.org/10.3390/gels5010005>.
- (456) Peters, G. M.; Davis, J. T. Supramolecular Gels Made from Nucleobase, Nucleoside and Nucleotide Analogs. *Chem. Soc. Rev.* **2016**, *45* (11), 3188–3206. <https://doi.org/10.1039/C6CS00183A>.
- (457) Nuthanakanti, A.; G. Srivatsan, S. Hierarchical Self-Assembly of Switchable Nucleolipid Supramolecular Gels Based on Environmentally-Sensitive Fluorescent

- Nucleoside Analogs. *Nanoscale* **2016**, 8 (6), 3607–3619. <https://doi.org/10.1039/C5NR07490H>.
- (458) Godeau, G.; Brun, C.; Arnion, H.; Staedel, C.; Barthélémy, P. Glycosyl-Nucleoside Fluorinated Amphiphiles as Components of Nanostructured Hydrogels. *Tetrahedron Letters* **2010**, 51 (7), 1012–1015. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.12.042>.
- (459) El Hamoui, O.; Gaudin, K.; Battu, S.; Barthélémy, P.; Lespes, G.; Alies, B. Self-Assembly of Nucleoside-Derived Low-Molecular-Weight Gelators: A Thermodynamics and Kinetics Study on Different Length Scales. *Langmuir* **2021**, 37 (1), 297–310. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c02894>.
- (460) Sindhu, K. R.; Bansode, N.; Rémy, M.; Morel, C.; Bareille, R.; Hagedorn, M.; Hinz, B.; Barthélémy, P.; Chassande, O.; Boiziau, C. New Injectable Self-Assembled Hydrogels That Promote Angiogenesis through a Bioactive Degradation Product. *Acta Biomaterialia* **2020**, 115, 197–209. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.08.012>.
- (461) Zhu, D.; Trinh, P.; Li, J.; Grant, G. A.; Yang, F. Gradient Hydrogels for Screening Stiffness Effects on Patient-Derived Glioblastoma Xenograft Cellfates in 3D. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2021**, 109 (6), 1027–1035. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37093>.
- (462) Wang, C.; Tong, X.; Yang, F. Bioengineered 3D Brain Tumor Model To Elucidate the Effects of Matrix Stiffness on Glioblastoma Cell Behavior Using PEG-Based Hydrogels. *Mol. Pharmaceutics* **2014**, 11 (7), 2115–2125. <https://doi.org/10.1021/mp5000828>.
- (463) Wang, C.; Sinha, S.; Jiang, X.; Fitch, S.; Wilson, C.; Caretti, V.; Ponnuswami, A.; Monje, M.; Grant, G.; Yang, F. A Comparative Study of Brain Tumor Cells from Different Age and Anatomical Locations Using 3D Biomimetic Hydrogels. *Acta Biomaterialia* **2020**, 116, 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.09.007>.
- (464) Zhu, D.; Tong, X.; Trinh, P.; Yang, F. Mimicking Cartilage Tissue Zonal Organization by Engineering Tissue-Scale Gradient Hydrogels as 3D Cell Niche. *Tissue Engineering Part A* **2018**, 24 (1–2), 1–10. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0453>.
- (465) Discher, D. E.; Janmey, P.; Wang, Y.-L. Tissue Cells Feel and Respond to the Stiffness of Their Substrate. *Science* **2005**, 310 (5751), 1139–1143. <https://doi.org/10.1126/science.1116995>.
- (466) Legant, W. R.; Miller, J. S.; Blakely, B. L.; Cohen, D. M.; Genin, G. M.; Chen, C. S. Measurement of Mechanical Traction Exerted by Cells in Three-Dimensional Matrices. *Nature Methods* **2010**, 7 (12), 969–971. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1531>.

- (467) Vogel, V.; Sheetz, M. Local Force and Geometry Sensing Regulate Cell Functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2006**, *7* (4), 265–275. <https://doi.org/10.1038/nrm1890>.
- (468) Cameron, Andrew. R.; Frith, Jessica. E.; Cooper-White, Justin. J. The Influence of Substrate Creep on Mesenchymal Stem Cell Behaviour and Phenotype. *Biomaterials* **2011**, *32* (26), 5979–5993. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.003>.
- (469) Gong, Z.; Szczesny, S. E.; Caliarì, S. R.; Charrier, E. E.; Chaudhuri, O.; Cao, X.; Lin, Y.; Mauck, R. L.; Janmey, P. A.; Burdick, J. A.; Shenoy, V. B. Matching Material and Cellular Timescales Maximizes Cell Spreading on Viscoelastic Substrates. *PNAS* **2018**, *115* (12), E2686–E2695. <https://doi.org/10.1073/pnas.1716620115>.
- (470) Lou, J.; Stowers, R.; Nam, S.; Xia, Y.; Chaudhuri, O. Stress Relaxing Hyaluronic Acid-Collagen Hydrogels Promote Cell Spreading, Fiber Remodeling, and Focal Adhesion Formation in 3D Cell Culture. *Biomaterials* **2018**, *154*, 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.004>.
- (471) Nam, S.; Stowers, R.; Lou, J.; Xia, Y.; Chaudhuri, O. Varying PEG Density to Control Stress Relaxation in Alginate-PEG Hydrogels for 3D Cell Culture Studies. *Biomaterials* **2019**, *200*, 15–24. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.02.004>.
- (472) Chaudhuri, O.; Gu, L.; Darnell, M.; Klumpers, D.; Bencherif, S. A.; Weaver, J. C.; Huebsch, N.; Mooney, D. J. Substrate Stress Relaxation Regulates Cell Spreading. *Nat Commun* **2015**, *6*, 6364. <https://doi.org/10.1038/ncomms7365>.
- (473) Chaudhuri, O.; Gu, L.; Klumpers, D.; Darnell, M.; Bencherif, S. A.; Weaver, J. C.; Huebsch, N.; Lee, H.; Lippens, E.; Duda, G. N.; Mooney, D. J. Hydrogels with Tunable Stress Relaxation Regulate Stem Cell Fate and Activity. *Nat Mater* **2016**, *15* (3), 326–334. <https://doi.org/10.1038/nmat4489>.
- (474) Cheng, S.; Clarke, E. C.; Bilston, L. E. Rheological Properties of the Tissues of the Central Nervous System: A Review. *Med Eng Phys* **2008**, *30* (10), 1318–1337. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2008.06.003>.
- (475) Geerligs, M.; Peters, G. W. M.; Ackermans, P. A. J.; Oomens, C. W. J.; Baaijens, F. P. T. Linear Viscoelastic Behavior of Subcutaneous Adipose Tissue. *Biorheology* **2008**, *45* (6), 677–688.
- (476) Charrier, E. E.; Pogoda, K.; Wells, R. G.; Janmey, P. A. Control of Cell Morphology and Differentiation by Substrates with Independently Tunable Elasticity and Viscous Dissipation. *Nature Communications* **2018**, *9* (1), 449. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-02906-9>.

- (477) Jones, J. L.; Marques, C. M. Rigid Polymer Network Models. *Journal de Physique* **1990**, *51* (11), 1113–1127. <https://doi.org/10.1051/jphys:0199000510110111300>.
- (478) Guenet, J.-M. Structure versus Rheological Properties in Fibrillar Thermoreversible Gels from Polymers and Biopolymers. *Journal of Rheology* **2000**, *44* (4), 947. <https://doi.org/10.1122/1.551121>.
- (479) Wang, Z.; Hui, A.; Zhao, H.; Ye, X.; Zhang, C.; Wang, A.; Zhang, C. A Novel 3D-Bioprinted Porous Nano Attapulgite Scaffolds with Good Performance for Bone Regeneration. *Int J Nanomedicine* **2020**, *15*, 6945–6960. <https://doi.org/10.2147/IJN.S254094>.
- (480) Silva, E. J. N. L.; Carvalho, N. K. de; Ronconi, C. T.; De-Deus, G.; Zuolo, M. L.; Zaia, A. A. Cytotoxicity Profile of Endodontic Sealers Provided by 3D Cell Culture Experimental Model. *Braz Dent J* **2016**, *27* (6), 652–656. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201600792>.
- (481) Wang, J.; Zhao, L.; Zhang, A.; Huang, Y.; Tavakoli, J.; Tang, Y. Novel Bacterial Cellulose/Gelatin Hydrogels as 3D Scaffolds for Tumor Cell Culture. *Polymers* **2018**, *10* (6), 581. <https://doi.org/10.3390/polym10060581>.
- (482) Meyer, M.; Reimand, J.; Lan, X.; Head, R.; Zhu, X.; Kushida, M.; Bayani, J.; Pressey, J. C.; Lionel, A. C.; Clarke, I. D.; Cusimano, M.; Squire, J. A.; Scherer, S. W.; Bernstein, M.; Woodin, M. A.; Bader, G. D.; Dirks, P. B. Single Cell-Derived Clonal Analysis of Human Glioblastoma Links Functional and Genomic Heterogeneity. *PNAS* **2015**, *112* (3), 851–856.
- (483) Inda, M.-M.; Bonavia, R.; Seoane, J. Glioblastoma Multiforme: A Look Inside Its Heterogeneous Nature. *Cancers* **2014**, *6* (1), 226–239. <https://doi.org/10.3390/cancers6010226>.
- (484) Dirkse, A.; Golebiewska, A.; Buder, T.; Nazarov, P. V.; Muller, A.; Poovathingal, S.; Brons, N. H. C.; Leite, S.; Sauvageot, N.; Sarkisjan, D.; Seyfrid, M.; Fritah, S.; Stieber, D.; Michelucci, A.; Hertel, F.; Herold-Mende, C.; Azuaje, F.; Skupin, A.; Bjerkvig, R.; Deutsch, A.; Voss-Böhme, A.; Niclou, S. P. Stem Cell-Associated Heterogeneity in Glioblastoma Results from Intrinsic Tumor Plasticity Shaped by the Microenvironment. *Nat Commun* **2019**, *10* (1), 1787. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09853-z>.
- (485) Amran, E. N.; Sudik, S.; Omar, A. F.; Mail, M. H.; Seeni, A. Potential Colorimetric Detection of Cancer Cells Using Phenol Red. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2019**, *27*, 380–384. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.07.006>.

- (486) Korgel, B. A.; van Zanten, J. H.; Monbouquette, H. G. Vesicle Size Distributions Measured by Flow Field-Flow Fractionation Coupled with Multiangle Light Scattering. *Biophys J* **1998**, *74* (6), 3264–3272. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(98\)78033-6](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)78033-6).
- (487) Luo, M.; Li, J.-F.; Yang, Q.; Zhang, K.; Wang, Z.-W.; Zheng, S.; Zhou, J.-J. Stem Cell Quiescence and Its Clinical Relevance. *World J Stem Cells* **2020**, *12* (11), 1307–1326. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i11.1307>.
- (488) Matsui, W. H. Cancer Stem Cell Signaling Pathways. *Medicine (Baltimore)* **2016**, *95* (1 Suppl 1), S8–S19. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004765>.
- (489) Pan, Y.; Ma, S.; Cao, K.; Zhou, S.; Zhao, A.; Li, M.; Qian, F.; Zhu, C. Therapeutic Approaches Targeting Cancer Stem Cells. *J Cancer Res Ther* **2018**, *14* (7), 1469–1475. https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_976_17.
- (490) Clevers, H. The Cancer Stem Cell: Premises, Promises and Challenges. *Nat Med* **2011**, *17* (3), 313–319. <https://doi.org/10.1038/nm.2304>.
- (491) Liou, G.-Y. CD133 as a Regulator of Cancer Metastasis through the Cancer Stem Cells. *Int J Biochem Cell Biol* **2019**, *106*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.10.013>.
- (492) Rajendran, V.; Jain, M. V. In Vitro Tumorigenic Assay: Colony Forming Assay for Cancer Stem Cells. In *Cancer Stem Cells*; Papaccio, G., Desiderio, V., Eds.; Methods in Molecular Biology; Springer New York: New York, NY, 2018; Vol. 1692, pp 89–95. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7401-6_8.
- (493) Schmohl, J. U.; Vallera, D. A. CD133, Selectively Targeting the Root of Cancer. *Toxins (Basel)* **2016**, *8* (6). <https://doi.org/10.3390/toxins8060165>.
- (494) Beier, C. P.; Beier, D. CD133 Negative Cancer Stem Cells in Glioblastoma. *Front Biosci (Elite Ed)* **2011**, *3*, 701–710. <https://doi.org/10.2741/e280>.
- (495) Faye, P.-A.; Vedrenne, N.; De la Cruz-Morcillo, M. A.; Barrot, C.-C.; Richard, L.; Bourthoumieu, S.; Sturtz, F.; Funalot, B.; Lia, A.-S.; Battu, S. New Method for Sorting Endothelial and Neural Progenitors from Human Induced Pluripotent Stem Cells by Sedimentation Field Flow Fractionation. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (13), 6696–6702. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b00704>.
- (496) Guglielmi, L.; Battu, S.; Le Bert, M.; Faucher, J. L.; Cardot, P. J. P.; Denizot, Y. Mouse Embryonic Stem Cell Sorting for the Generation of Transgenic Mice by Sedimentation Field-Flow Fractionation. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (6), 1580–1585. <https://doi.org/10.1021/ac030218e>.

- (497) Naves, T.; Battu, S.; Jauberteau, M.-O.; Cardot, P. J. P.; Ratinaud, M.-H.; Verdier, M. Autophagic Subpopulation Sorting by Sedimentation Field-Flow Fractionation. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (20), 8748–8755. <https://doi.org/10.1021/ac302032v>.
- (498) Bocca, B.; Battistini, B.; Petrucci, F. Silver and Gold Nanoparticles Characterization by SP-ICP-MS and AF4-FFF-MALS-UV-ICP-MS in Human Samples Used for Biomonitoring. *Talanta* **2020**, *220*, 121404. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121404>.
- (499) Bousse, T.; Shore, D. A.; Goldsmith, C. S.; Hossain, M. J.; Jang, Y.; Davis, C. T.; Donis, R. O.; Stevens, J. Quantitation of Influenza Virus Using Field Flow Fractionation and Multi-Angle Light Scattering for Quantifying Influenza A Particles. *J Virol Methods* **2013**, *193* (2), 589–596. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.026>.
- (500) González-Espinosa, Y.; Sabagh, B.; Moldenhauer, E.; Clarke, P.; Goycoolea, F. M. Characterisation of Chitosan Molecular Weight Distribution by Multi-Detection Asymmetric Flow-Field Flow Fractionation (AF4) and SEC. *Int J Biol Macromol* **2019**, *136*, 911–919. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.122>.
- (501) Manczak, R.; Saada, S.; Provent, T.; Dalmay, C.; Bessette, B.; Bégau, G.; Battu, S.; Blondy, P.; Jauberteau, M.; Kaynak, C. B.; Kaynak, M.; Palego, C.; Lalloué, F.; Pothier, A. UHF-Dielectrophoresis Crossover Frequency as a New Marker for Discrimination of Glioblastoma Undifferentiated Cells. *IEEE Journal of Electromagnetics, RF and Microwaves in Medicine and Biology* **2019**, *3* (3), 191–198. <https://doi.org/10.1109/JERM.2019.2895539>.
- (502) Bégau-Grimaud, G.; Battu, S.; Leger, D.; Cardot, P. J. P. Mammalian Cell Sorting with Sedimentation Field-Flow Fractionation. In *Field-Flow Fractionation in Biopolymer Analysis*; Williams, S. K. R., Caldwell, K. D., Eds.; Springer: Vienna, 2012; pp 223–253. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0154-4_15.
- (503) Caldwell, K. D. Steric Field-Flow Fractionation and Steric Transition. In *Field-flow fractionation handbook*; ed., New York: John Wiley & Sons, Inc., 2000; pp 79–94.
- (504) Williams, P.; Hoyos, M.; Kurowski, P.; Salhi, D.; Moore, L.; Zborowski, M. Characterization of Nonspecific Crossover in Split-Flow Thin Channel Fractionation. *Analytical chemistry* **2008**, *80*, 7105–7115. <https://doi.org/10.1021/ac800841q>.
- (505) Chmelík, J. Different Elution Modes and Field Programming in Gravitational Field-Flow Fractionation: I. A Theoretical Approach. *Journal of Chromatography A* **1999**, *845* (1), 285–291. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00131-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00131-4).

- (506) Hussein, D.; Punjaruk, W.; Storer, L. C. D.; Shaw, L.; Ottoman, R.; Peet, A.; Miller, S.; Bandopadhyay, G.; Heath, R.; Kumari, R.; Bowman, K. J.; Braker, P.; Rahman, R.; Jones, G. D. D.; Watson, S.; Lowe, J.; Kerr, I. D.; Grundy, R. G.; Coyle, B. Pediatric Brain Tumor Cancer Stem Cells: Cell Cycle Dynamics, DNA Repair, and Etoposide Extrusion. *Neuro Oncol* **2011**, *13* (1), 70–83. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noq144>.
- (507) Pauklin, S.; Vallier, L. The Cell-Cycle State of Stem Cells Determines Cell Fate Propensity. *Cell* **2013**, *155* (1), 135–147. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.031>.
- (508) Wang, Z.; Zhou, L.; Xiong, Y.; Yu, S.; Li, H.; Fan, J.; Li, F.; Su, Z.; Song, J.; Sun, Q.; Liu, S.; Xia, Y.; Zhao, L.; Li, S.; Guo, F.; Huang, P.; Carson, D. A.; Lu, D. Salinomycin Exerts Anti-colorectal Cancer Activity by Targeting the B-catenin/T-cell Factor Complex. *Br J Pharmacol* **2019**, *176* (17), 3390–3406. <https://doi.org/10.1111/bph.14770>.
- (509) Ravi, M.; Paramesh, V.; Kaviya, S. R.; Anuradha, E.; Solomon, F. D. P. 3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications. *Journal of Cellular Physiology* **2015**, *230*. <https://doi.org/10.1002/jcp.24683>.
- (510) Pozzi, S.; Scomparin, A.; Israeli Dangoor, S.; Rodriguez Ajamil, D.; Ofek, P.; Neufeld, L.; Krivitsky, A.; Vaskovich-Koubi, D.; Kleiner, R.; Dey, P.; Koshrovski-Michael, S.; Reisman, N.; Satchi-Fainaro, R. Meet Me Halfway: Are in Vitro 3D Cancer Models on the Way to Replace *in vivo* Models for Nanomedicine Development? *Adv Drug Deliv Rev* **2021**, *175*, 113760. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.04.001>.
- (511) McMahon, K. M.; Volpato, M.; Chi, H. Y.; Musiwaro, P.; Poterlowicz, K.; Peng, Y.; Scally, A. J.; Patterson, L. H.; Phillips, R. M.; Sutton, C. W. Characterization of Changes in the Proteome in Different Regions of 3D Multicell Tumor Spheroids. *J Proteome Res* **2012**, *11* (5), 2863–2875. <https://doi.org/10.1021/pr2012472>.
- (512) Lukowski, J. K.; Hummon, A. B. Quantitative Evaluation of Liposomal Doxorubicin and Its Metabolites in Spheroids. *Anal Bioanal Chem* **2019**, *411* (27), 7087–7094. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02084-7>.
- (513) Ruiz-Garcia, H.; Alvarado-Estrada, K.; Schiapparelli, P.; Quinones-Hinojosa, A.; Trifiletti, D. M. Engineering Three-Dimensional Tumor Models to Study Glioma Cancer Stem Cells and Tumor Microenvironment. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **2020**, *14*, 298. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.558381>.
- (514) Mehta, G.; Hsiao, A. Y.; Ingram, M.; Luker, G. D.; Takayama, S. Opportunities and Challenges for Use of Tumor Spheroids as Models to Test Drug Delivery and Efficacy. *J Control Release* **2012**, *164* (2), 192–204. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.04.045>.

- (515) Zhang, C.; Yang, Z.; Dong, D.-L.; Jang, T.-S.; Knowles, J. C.; Kim, H.-W.; Jin, G.-Z.; Xuan, Y. 3D Culture Technologies of Cancer Stem Cells: Promising Ex Vivo Tumor Models. *J Tissue Eng* **2020**, *11*, 2041731420933407. <https://doi.org/10.1177/2041731420933407>.
- (516) Ramin, M. A.; Latxague, L.; Sindhu, K. R.; Chassande, O.; Barthélémy, P. Low Molecular Weight Hydrogels Derived from Urea Based-Bolaamphiphiles as New Injectable Biomaterials. *Biomaterials* **2017**, *145*, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.08.034>.
- (517) Buczek, M. E.; Reeder, S. P.; Regad, T. Identification and Isolation of Cancer Stem Cells Using NANOG-EGFP Reporter System. *Methods Mol Biol* **2018**, *1692*, 139–148. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7401-6_13.
- (518) Sancho, P.; Barneda, D.; Heeschen, C. Hallmarks of Cancer Stem Cell Metabolism. *Br J Cancer* **2016**, *114* (12), 1305–1312. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.152>.
- (519) Kimlin, L. C.; Casagrande, G.; Virador, V. M. In Vitro Three-Dimensional (3D) Models in Cancer Research: An Update. *Mol Carcinog* **2013**, *52* (3), 167–182. <https://doi.org/10.1002/mc.21844>.
- (520) Sharma, V. K. Aggregation and Toxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles in Aquatic Environment—A Review. *Journal of Environmental Science and Health, Part A* **2009**, *44* (14), 1485–1495. <https://doi.org/10.1080/10934520903263231>.
- (521) Lehner, R.; Weder, C.; Petri-Fink, A.; Rothen-Rutishauser, B. Emergence of Nanoplastic in the Environment and Possible Impact on Human Health. *Environ Sci Technol* **2019**, *53* (4), 1748–1765. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05512>.
- (522) Ermolin, M. S.; Fedotov, P. S.; Malik, N. A.; Karandashev, V. K. Nanoparticles of Volcanic Ash as a Carrier for Toxic Elements on the Global Scale. *Chemosphere* **2018**, *200*, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.02.089>.
- (523) Hossain, Z.; Yasmeen, F.; Komatsu, S. Nanoparticles: Synthesis, Morphophysiological Effects, and Proteomic Responses of Crop Plants. *Int J Mol Sci* **2020**, *21* (9), E3056. <https://doi.org/10.3390/ijms21093056>.
- (524) Santini, B.; Zaroni, I.; Marzi, R.; Cigni, C.; Bedoni, M.; Gramatica, F.; Palugan, L.; Corsi, F.; Granucci, F.; Colombo, M. Cream Formulation Impact on Topical Administration of Engineered Colloidal Nanoparticles. *PLoS One* **2015**, *10* (5), e0126366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126366>.

- (525) Ju, Z.; Sun, W. Drug Delivery Vectors Based on Filamentous Bacteriophages and Phage-Mimetic Nanoparticles. *Drug Deliv* **2017**, *24* (1), 1898–1908. <https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1410259>.
- (526) Kaczmarek, J. C.; Patel, A. K.; Kauffman, K. J.; Fenton, O. S.; Webber, M. J.; Heartlein, M. W.; DeRosa, F.; Anderson, D. G. Polymer-Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of mRNA to the Lungs. *Angew Chem Int Ed Engl* **2016**, *55* (44), 13808–13812. <https://doi.org/10.1002/anie.201608450>.
- (527) Avasthi, A.; Caro, C.; Pozo-Torres, E.; Leal, M. P.; García-Martín, M. L. Magnetic Nanoparticles as MRI Contrast Agents. *Top Curr Chem (Cham)* **2020**, *378* (3), 40. <https://doi.org/10.1007/s41061-020-00302-w>.
- (528) Smijs, T. G.; Pavel, S. Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles in Sunscreens: Focus on Their Safety and Effectiveness. *Nanotechnol Sci Appl* **2011**, *4*, 95–112. <https://doi.org/10.2147/NSA.S19419>.
- (529) Egerton, T.; Christensen, P.; Kosa, S. A. M.; Onoka, B.; Harper, J. C.; Tinlin, J. R. Photoelectrocatalysis by Titanium Dioxide for Water Treatment. *Int. J. of Environment and Pollution* **2006**, *27*, 2–19. <https://doi.org/10.1504/IJEP.2006.010450>.
- (530) Shen, S.; Burton, M.; Jobson, B.; Haselbach, L. Pervious Concrete with Titanium Dioxide as a Photocatalyst Compound for a Greener Urban Road Environment. *Constr. Bldg. Mat.* **2012**, *35*, 874–883. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2012.04.097>.
- (531) You, H.; Yang, S.; Ding, B.; Yang, H. Synthesis of Colloidal Metal and Metal Alloy Nanoparticles for Electrochemical Energy Applications. *Chem Soc Rev* **2013**, *42* (7), 2880–2904. <https://doi.org/10.1039/c2cs35319a>.
- (532) Rodriguez-Garraus, A.; Azqueta, A.; Vettorazzi, A.; López de Cerain, A. Genotoxicity of Silver Nanoparticles. *Nanomaterials (Basel)* **2020**, *10* (2), E251. <https://doi.org/10.3390/nano10020251>.
- (533) Ahmed, T.; Noman, M.; Shahid, M.; Niazi, M. B. K.; Hussain, S.; Manzoor, N.; Wang, X.; Li, B. Green Synthesis of Silver Nanoparticles Transformed Synthetic Textile Dye into Less Toxic Intermediate Molecules through LC-MS Analysis and Treated the Actual Wastewater. *Environ Res* **2020**, *191*, 110142. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110142>.
- (534) McGillicuddy, E.; Murray, I.; Kavanagh, S.; Morrison, L.; Fogarty, A.; Cormican, M.; Dockery, P.; Prendergast, M.; Rowan, N.; Morris, D. Silver Nanoparticles in the Environment: Sources, Detection and Ecotoxicology. *Sci Total Environ* **2017**, *575*, 231–246. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.041>.

- (535) Kokura, S.; Handa, O.; Takagi, T.; Ishikawa, T.; Naito, Y.; Yoshikawa, T. Silver Nanoparticles as a Safe Preservative for Use in Cosmetics. *Nanomedicine* **2010**, *6* (4), 570–574. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2009.12.002>.
- (536) Yang, Y.-F.; Wang, W.-M.; Chen, C.-Y.; Lu, T.-H.; Liao, C.-M. Assessing Human Exposure Risk and Lung Disease Burden Posed by Airborne Silver Nanoparticles Emitted by Consumer Spray Products. *Int J Nanomedicine* **2019**, *14*, 1687–1703. <https://doi.org/10.2147/IJN.S171510>.
- (537) Mittelman, A. M.; Lantagne, D. S.; Rayner, J.; Pennell, K. D. Silver Dissolution and Release from Ceramic Water Filters. *Environ Sci Technol* **2015**, *49* (14), 8515–8522. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01428>.
- (538) Gorka, D. E.; Osterberg, J. S.; Gwin, C. A.; Colman, B. P.; Meyer, J. N.; Bernhardt, E. S.; Gunsch, C. K.; DiGulio, R. T.; Liu, J. Reducing Environmental Toxicity of Silver Nanoparticles through Shape Control. *Environ Sci Technol* **2015**, *49* (16), 10093–10098. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01711>.
- (539) Benn, T. M.; Westerhoff, P. Nanoparticle Silver Released into Water from Commercially Available Sock Fabrics. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42* (11), 4133–4139. <https://doi.org/10.1021/es7032718>.
- (540) Miyayama, T.; Arai, Y.; Hirano, S. [Environmental exposure to silver and its health effects]. *Nihon Eiseigaku Zasshi* **2012**, *67* (3), 383–389. <https://doi.org/10.1265/jjh.67.383>.
- (541) Fraser, J. A.; Kemp, S.; Young, L.; Ross, M.; Prach, M.; Hutchison, G. R.; Malone, E. Silver Nanoparticles Promote the Emergence of Heterogeneous Human Neutrophil Sub-Populations. *Sci Rep* **2018**, *8* (1), 7506. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25854-2>.
- (542) Yu, S.; Yin, Y.; Liu, J. Silver Nanoparticles in the Environment. *Environ. Sci.: Processes Impacts* **2012**, *15* (1), 78–92. <https://doi.org/10.1039/C2EM30595J>.
- (543) Yin, L.; Cheng, Y.; Espinasse, B.; Colman, B. P.; Auffan, M.; Wiesner, M.; Rose, J.; Liu, J.; Bernhardt, E. S. More than the Ions: The Effects of Silver Nanoparticles on *Lolium Multiflorum*. *Environ Sci Technol* **2011**, *45* (6), 2360–2367. <https://doi.org/10.1021/es103995x>.
- (544) Navarro, E.; Piccapietra, F.; Wagner, B.; Marconi, F.; Kaegi, R.; Odzak, N.; Sigg, L.; Behra, R. Toxicity of Silver Nanoparticles to *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Environ Sci Technol* **2008**, *42* (23), 8959–8964. <https://doi.org/10.1021/es801785m>.

- (545) Zeng, Q.; Shao, D.; Ji, W.; Li, J.; Chen, L.; Song, J. The Nanotoxicity Investigation of Optical Nanoparticles to Cultured Cells in Vitro. *Toxicol Rep* **2014**, *1*, 137–144. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.05.009>.
- (546) El-Said, K. S.; Ali, E. M.; Kanehira, K.; Taniguchi, A. Molecular Mechanism of DNA Damage Induced by Titanium Dioxide Nanoparticles in Toll-like Receptor 3 or 4 Expressing Human Hepatocarcinoma Cell Lines. *J Nanobiotechnology* **2014**, *12*, 48. <https://doi.org/10.1186/s12951-014-0048-2>.
- (547) Lopes, V. R.; Loitto, V.; Audinot, J.-N.; Bayat, N.; Gutleb, A. C.; Cristobal, S. Dose-Dependent Autophagic Effect of Titanium Dioxide Nanoparticles in Human HaCaT Cells at Non-Cytotoxic Levels. *J Nanobiotechnology* **2016**, *14*, 22. <https://doi.org/10.1186/s12951-016-0174-0>.
- (548) Zhao, L.; Zhu, Y.; Chen, Z.; Xu, H.; Zhou, J.; Tang, S.; Xu, Z.; Kong, F.; Li, X.; Zhang, Y.; Li, X.; Zhang, J.; Jia, G. Cardiopulmonary Effects Induced by Occupational Exposure to Titanium Dioxide Nanoparticles. *Nanotoxicology* **2018**, *12* (2), 169–184. <https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1425502>.
- (549) Thurn, K. T.; Arora, H.; Paunesku, T.; Wu, A.; Brown, E. M. B.; Doty, C.; Kremer, J.; Woloschak, G. Endocytosis of Titanium Dioxide Nanoparticles in Prostate Cancer PC-3M Cells. *Nanomedicine* **2011**, *7* (2), 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2010.09.004>.
- (550) Chen, L.; Zhou, L.; Liu, Y.; Deng, S.; Wu, H.; Wang, G. Toxicological Effects of Nanometer Titanium Dioxide (Nano-TiO₂) on *Chlamydomonas Reinhardtii*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2012**, *84*, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2012.07.019>.
- (551) Connor, E. E.; Mwamuka, J.; Gole, A.; Murphy, C. J.; Wyatt, M. D. Gold Nanoparticles Are Taken up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity. *Small* **2005**, *1* (3), 325–327. <https://doi.org/10.1002/sml.200400093>.
- (552) Biondi, M.; Guarnieri, D.; Yu, H.; Belli, V.; Netti, P. A. Sub-100 Nm Biodegradable Nanoparticles: In Vitro Release Features and Toxicity Testing in 2D and 3D Cell Cultures. *Nanotechnology* **2013**, *24* (4), 045101. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/24/4/045101>.
- (553) Wang, Y.; Cui, H.; Zhou, J.; Li, F.; Wang, J.; Chen, M.; Liu, Q. Cytotoxicity, DNA Damage, and Apoptosis Induced by Titanium Dioxide Nanoparticles in Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 Cells. *Environ Sci Pollut Res Int* **2015**, *22* (7), 5519–5530. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3717-7>.
- (554) Srivastava, R. K.; Rahman, Q.; Kashyap, M. P.; Singh, A. K.; Jain, G.; Jahan, S.; Lohani, M.; Lantow, M.; Pant, A. B. Nano-Titanium Dioxide Induces Genotoxicity and Apoptosis

- in Human Lung Cancer Cell Line, A549. *Hum Exp Toxicol* **2013**, *32* (2), 153–166. <https://doi.org/10.1177/0960327112462725>.
- (555) 14:00-17:00. ISO/TS 80004-4:2011
<https://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/05/21/52195.html> (accessed 2020 -07 -02).
- (556) Juárez-Cisneros, G.; Gómez-Romero, M.; Reyes de la Cruz, H.; Campos-García, J.; Villegas, J. Multi-Walled Carbon Nanotubes Produced after Forest Fires Improve Germination and Development of *Eysenhardtia Polystachya*. *PeerJ* **2020**, *8*, e8634. <https://doi.org/10.7717/peerj.8634>.
- (557) Avalos, A.; Haza, A. I.; Mateo, D.; Morales, P. Cytotoxicity and ROS Production of Manufactured Silver Nanoparticles of Different Sizes in Hepatoma and Leukemia Cells. *J Appl Toxicol* **2014**, *34* (4), 413–423. <https://doi.org/10.1002/jat.2957>.
- (558) Grande, F.; Tucci, P. Titanium Dioxide Nanoparticles: A Risk for Human Health? *Mini Rev Med Chem* **2016**, *16* (9), 762–769. <https://doi.org/10.2174/1389557516666160321114341>.
- (559) Kumari, S.; Yadav, B. S.; Yadav, R. B. Synthesis and Modification Approaches for Starch Nanoparticles for Their Emerging Food Industrial Applications: A Review. *Food Res Int* **2020**, *128*, 108765. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108765>.
- (560) Luyts, K.; Napierska, D.; Nemery, B.; Hoet, P. H. M. How Physico-Chemical Characteristics of Nanoparticles Cause Their Toxicity: Complex and Unresolved Interrelations. *Environ Sci Process Impacts* **2013**, *15* (1), 23–38. <https://doi.org/10.1039/c2em30237c>.
- (561) Pareek, V.; Gupta, R.; Panwar, J. Do Physico-Chemical Properties of Silver Nanoparticles Decide Their Interaction with Biological Media and Bactericidal Action? A Review. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* **2018**, *90*, 739–749. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.04.093>.
- (562) Fubini, B.; Ghiazza, M.; Fenoglio, I. Physico-Chemical Features of Engineered Nanoparticles Relevant to Their Toxicity. *Nanotoxicology* **2010**, *4*, 347–363. <https://doi.org/10.3109/17435390.2010.509519>.
- (563) Rizeq, B. R.; Younes, N. N.; Rasool, K.; Nasrallah, G. K. Synthesis, Bioapplications, and Toxicity Evaluation of Chitosan-Based Nanoparticles. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (22), E5776. <https://doi.org/10.3390/ijms20225776>.

- (564) Hillegass, J. M.; Shukla, A.; Lathrop, S. A.; MacPherson, M. B.; Fukagawa, N. K.; Mossman, B. T. Assessing Nanotoxicity in Cells in Vitro. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol* **2010**, *2* (3), 219–231. <https://doi.org/10.1002/wnan.54>.
- (565) Handral, H. K.; Tong, H. J.; Islam, I.; Sriram, G.; Rosa, V.; Cao, T. Pluripotent Stem Cells: An in Vitro Model for Nanotoxicity Assessments. *J Appl Toxicol* **2016**, *36* (10), 1250–1258. <https://doi.org/10.1002/jat.3347>.
- (566) Li, Z.; He, J.; Li, B.; Zhang, J.; He, K.; Duan, X.; Huang, R.; Wu, Z.; Xiang, G. Titanium Dioxide Nanoparticles Induce Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptotic Cell Death in Liver Cancer Cells. *J Int Med Res* **2020**, *48* (4), 300060520903652. <https://doi.org/10.1177/0300060520903652>.
- (567) Katt, M. E.; Placone, A. L.; Wong, A. D.; Xu, Z. S.; Searson, P. C. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **2016**, *4*, 12. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2016.00012>.
- (568) Mirabelli, P.; Coppola, L.; Salvatore, M. Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. *Cancers (Basel)* **2019**, *11* (8), 1098. <https://doi.org/10.3390/cancers11081098>.
- (569) Luo, Y.; Wang, C.; Hossain, M.; Qiao, Y.; Ma, L.; An, J.; Su, M. Three-Dimensional Microtissue Assay for High-Throughput Cytotoxicity of Nanoparticles. *Anal Chem* **2012**, *84* (15), 6731–6738. <https://doi.org/10.1021/ac301191j>.
- (570) Perepelytsina, O. M.; Ugnivenko, A. P.; Dobrydnev, A. V.; Bakalinska, O. N.; Marynin, A. I.; Sydorenko, M. V. Influence of Carbon Nanotubes and Its Derivatives on Tumor Cells In Vitro and Biochemical Parameters, Cellular Blood Composition *In vivo*. *Nanoscale Res Lett* **2018**, *13* (1), 286. <https://doi.org/10.1186/s11671-018-2689-9>.
- (571) Helmlinger, J.; Sengstock, C.; Groß-Heitfeld, C.; Mayer, C.; Schildhauer, T. A.; Köller, M.; Epple, M. Silver Nanoparticles with Different Size and Shape: Equal Cytotoxicity, but Different Antibacterial Effects. *RSC Adv.* **2016**, *6* (22), 18490–18501. <https://doi.org/10.1039/C5RA27836H>.
- (572) Ridolfo, R.; Tavakoli, S.; Junnuthula, V.; Williams, D. S.; Urtti, A.; van Hest, J. C. M. Exploring the Impact of Morphology on the Properties of Biodegradable Nanoparticles and Their Diffusion in Complex Biological Medium. *Biomacromolecules* **2021**, *22* (1), 126–133. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00726>.
- (573) Oh, N.; Park, J.-H. Endocytosis and Exocytosis of Nanoparticles in Mammalian Cells. *Int J Nanomedicine* **2014**, *9 Suppl 1*, 51–63. <https://doi.org/10.2147/IJN.S26592>.

- (574) Combrisson, H. [Animal experiment, can we replace?]. *Transfus Clin Biol* **2017**, *24* (3), 93–95. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2017.06.005>.
- (575) Bielecka, Z. F.; Maliszewska-Olejniczak, K.; Safir, I. J.; Szczylik, C.; Czarnecka, A. M. Three-Dimensional Cell Culture Model Utilization in Cancer Stem Cell Research: 3D Cell Culture Models in CSCs Research. *Biol Rev* **2017**, *92* (3), 1505–1520. <https://doi.org/10.1111/brv.12293>.
- (576) Fennema, E.; Rivron, N.; Rouwkema, J.; van Blitterswijk, C.; de Boer, J. Spheroid Culture as a Tool for Creating 3D Complex Tissues. *Trends Biotechnol* **2013**, *31* (2), 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.12.003>.
- (577) Haycock, J. W. 3D Cell Culture: A Review of Current Approaches and Techniques. *Methods Mol Biol* **2011**, *695*, 1–15. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-984-0_1.
- (578) Orsolits, B.; Kovács, Z.; Kriston-Vizi, J.; Merkely, B.; Földes, G. New Modalities of 3D Pluripotent Stem Cell-Based Assays in Cardiovascular Toxicity. *Front Pharmacol* **2021**, *12*, 603016. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.603016>.
- (579) Sanches, P. L.; Geaquinto, L. R. de O.; Cruz, R.; Schuck, D. C.; Lorencini, M.; Granjeiro, J. M.; Ribeiro, A. R. L. Toxicity Evaluation of TiO₂ Nanoparticles on the 3D Skin Model: A Systematic Review. *Front Bioeng Biotechnol* **2020**, *8*, 575. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00575>.
- (580) Kijanska, M.; Kelm, J. In Vitro 3D Spheroids and Microtissues: ATP-Based Cell Viability and Toxicity Assays. In *Assay Guidance Manual*; Markossian, S., Grossman, A., Brimacombe, K., Arkin, M., Auld, D., Austin, C. P., Baell, J., Chung, T. D. Y., Coussens, N. P., Dahlin, J. L., Devanarayan, V., Foley, T. L., Glicksman, M., Hall, M. D., Haas, J. V., Hoare, S. R. J., Inglese, J., Iversen, P. W., Kales, S. C., Lal-Nag, M., Li, Z., McGee, J., McManus, O., Riss, T., Saradjian, P., Sittampalam, G. S., Tarselli, M., Trask, O. J., Wang, Y., Weidner, J. R., Wildey, M. J., Wilson, K., Xia, M., Xu, X., Eds.; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda (MD), 2004.
- (581) Ravi, M.; Ramesh, A.; Pattabhi, A. Contributions of 3D Cell Cultures for Cancer Research. *J Cell Physiol* **2017**, *232* (10), 2679–2697. <https://doi.org/10.1002/jcp.25664>.
- (582) Weeber, F.; Ooft, S. N.; Dijkstra, K. K.; Voest, E. E. Tumor Organoids as a Pre-Clinical Cancer Model for Drug Discovery. *Cell Chem Biol* **2017**, *24* (9), 1092–1100. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.06.012>.

- (583) Boucherit, N.; Gorvel, L.; Olive, D. 3D Tumor Models and Their Use for the Testing of Immunotherapies. *Front Immunol* **2020**, *11*, 603640. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.603640>.
- (584) Lei, K. F.; Ji, W.-W.; Goh, A.; Huang, C.-H.; Lee, M.-Y. Investigation of Uniform Sized Multicellular Spheroids Raised by Microwell Arrays after the Combined Treatment of Electric Field and Anti-Cancer Drug. *Biomed Microdevices* **2019**, *21* (4), 94. <https://doi.org/10.1007/s10544-019-0442-5>.
- (585) Martino, F.; Perestrelo, A. R.; Vinarský, V.; Pagliari, S.; Forte, G. Cellular Mechanotransduction: From Tension to Function. *Front Physiol* **2018**, *9*, 824. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00824>.
- (586) Humphrey, J. D.; Dufresne, E. R.; Schwartz, M. A. Mechanotransduction and Extracellular Matrix Homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, *15* (12), 802–812. <https://doi.org/10.1038/nrm3896>.
- (587) Pankova, D.; Jiang, Y.; Chatzifrangkeskou, M.; Vendrell, I.; Buzzelli, J.; Ryan, A.; Brown, C.; O'Neill, E. RASSF1A Controls Tissue Stiffness and Cancer Stem-like Cells in Lung Adenocarcinoma. *EMBO J* **2019**, *38* (13), e100532. <https://doi.org/10.15252/emboj.2018100532>.
- (588) Liu, C.; Pei, H.; Tan, F. Matrix Stiffness and Colorectal Cancer. *Onco Targets Ther* **2020**, *13*, 2747–2755. <https://doi.org/10.2147/OTT.S231010>.
- (589) Tang, X.; Kuhlenschmidt, T. B.; Li, Q.; Ali, S.; Lezmi, S.; Chen, H.; Pires-Alves, M.; Laegreid, W. W.; Saif, T. A.; Kuhlenschmidt, M. S. A Mechanically-Induced Colon Cancer Cell Population Shows Increased Metastatic Potential. *Molecular Cancer* **2014**, *13* (1), 131. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-131>.
- (590) Shah, M. K.; Leary, E. A.; Darling, E. M. Integration of Hyper-Compliant Microparticles into a 3D Melanoma Tumor Model. *J Biomech* **2019**, *82*, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2018.10.018>.
- (591) Hirata, E.; Girotti, M. R.; Viros, A.; Hooper, S.; Spencer-Dene, B.; Matsuda, M.; Larkin, J.; Marais, R.; Sahai, E. Intravital Imaging Reveals How BRAF Inhibition Generates Drug-Tolerant Microenvironments with High Integrin B1/FAK Signaling. *Cancer Cell* **2015**, *27* (4), 574–588. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.008>.
- (592) Xiao, W.; Zhang, R.; Sohrabi, A.; Ehsanipour, A.; Sun, S.; Liang, J.; Walthers, C. M.; Ta, L.; Nathanson, D. A.; Seidlits, S. K. Brain-Mimetic 3D Culture Platforms Allow Investigation of Cooperative Effects of Extracellular Matrix Features on Therapeutic

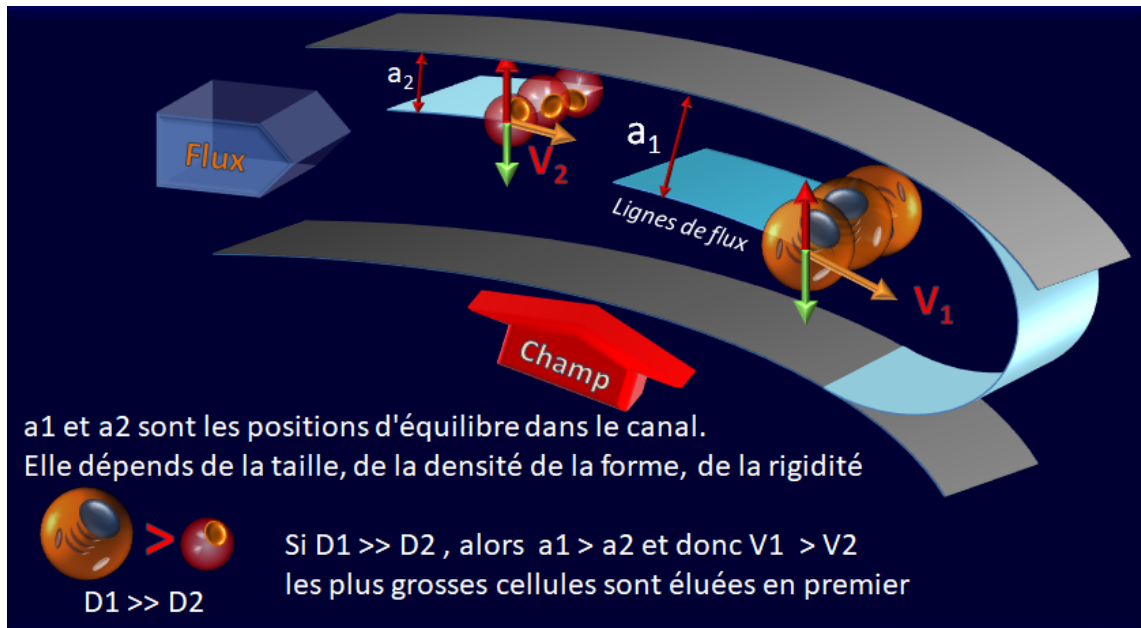
- Resistance in Glioblastoma. *Cancer Res* **2018**, 78 (5), 1358–1370. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-17-2429>.
- (593) Gilbert, A. N.; Shevin, R. S.; Anderson, J. C.; Langford, C. P.; Eustace, N.; Gillespie, G. Y.; Singh, R.; Willey, C. D. Generation of Microtumors Using 3D Human Biogel Culture System and Patient-Derived Glioblastoma Cells for Kinomic Profiling and Drug Response Testing. *J Vis Exp* **2016**, No. 112. <https://doi.org/10.3791/54026>.
- (594) da Hora, C. C.; Schweiger, M. W.; Wurdinger, T.; Tannous, B. A. Patient-Derived Glioma Models: From Patients to Dish to Animals. *Cells* **2019**, 8 (10), E1177. <https://doi.org/10.3390/cells8101177>.
- (595) Chen, J.-W. E.; Lumibao, J.; Leary, S.; Sarkaria, J. N.; Steelman, A. J.; Gaskins, H. R.; Harley, B. A. C. Crosstalk between Microglia and Patient-Derived Glioblastoma Cells Inhibit Invasion in a Three-Dimensional Gelatin Hydrogel Model. *J Neuroinflammation* **2020**, 17 (1), 346. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02026-6>.
- (596) Ledur, P. F.; Onzi, G. R.; Zong, H.; Lenz, G. Culture Conditions Defining Glioblastoma Cells Behavior: What Is the Impact for Novel Discoveries? *Oncotarget* **2017**, 8 (40), 69185–69197. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20193>.
- (597) Xiao, W.; Ehsanipour, A.; Sohrabi, A.; Seidlits, S. K. Hyaluronic-Acid Based Hydrogels for 3-Dimensional Culture of Patient-Derived Glioblastoma Cells. *J Vis Exp* **2018**, No. 138. <https://doi.org/10.3791/58176>.
- (598) Wang, C.; Sinha, S.; Jiang, X.; Murphy, L.; Fitch, S.; Wilson, C.; Grant, G.; Yang, F. Matrix Stiffness Modulates Patient-Derived Glioblastoma Cell Fates in Three-Dimensional Hydrogels. *Tissue Eng Part A* **2021**, 27 (5–6), 390–401. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2020.0110>.
- (599) Uccelli, A.; Moretta, L.; Pistoia, V. Mesenchymal Stem Cells in Health and Disease. *Nat Rev Immunol* **2008**, 8 (9), 726–736. <https://doi.org/10.1038/nri2395>.
- (600) Pacioni, S.; D’Alessandris, Q. G.; Giannetti, S.; Morgante, L.; Coccè, V.; Bonomi, A.; Buccarelli, M.; Pascucci, L.; Alessandri, G.; Pessina, A.; Ricci-Vitiani, L.; Falchetti, M. L.; Pallini, R. Human Mesenchymal Stromal Cells Inhibit Tumor Growth in Orthotopic Glioblastoma Xenografts. *Stem Cell Res Ther* **2017**, 8, 53. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0516-3>.
- (601) Nowak, B.; Rogujski, P.; Janowski, M.; Lukomska, B.; Andrzejewska, A. Mesenchymal Stem Cells in Glioblastoma Therapy and Progression: How One Cell Does It All. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **2021**, 1876 (1), 188582. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2021.188582>.

- (602) Bajetto, A.; Thellung, S.; Dellacasagrande, I.; Pagano, A.; Barbieri, F.; Florio, T. Cross Talk between Mesenchymal and Glioblastoma Stem Cells: Communication beyond Controversies. *STEM CELLS Translational Medicine* **2020**, *9* (11), 1310–1330. <https://doi.org/10.1002/sctm.20-0161>.
- (603) Breznik, B.; Motaln, H.; Vittori, M.; Rotter, A.; Turnšek, T. L. Mesenchymal Stem Cells Differentially Affect the Invasion of Distinct Glioblastoma Cell Lines. *Oncotarget* **2017**, *8* (15), 25482–25499. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16041>.
- (604) Tumangelova-Yuzeir, K.; Naydenov, E.; Ivanova-Todorova, E.; Krasimirova, E.; Vasilev, G.; Nachev, S.; Kyurkchiev, D. Mesenchymal Stem Cells Derived and Cultured from Glioblastoma Multiforme Increase Tregs, Downregulate Th17, and Induce the Tolerogenic Phenotype of Monocyte-Derived Cells. *Stem Cells International* **2019**, *2019*, e6904638. <https://doi.org/10.1155/2019/6904638>.
- (605) de Vrij, J.; Maas, S. L. N.; Kwappenberg, K. M. C.; Schnoor, R.; Kleijn, A.; Dekker, L.; Luiders, T. M.; de Witte, L. D.; Litjens, M.; van Strien, M. E.; Hol, E. M.; Kroonen, J.; Robe, P. A.; Lamfers, M. L.; Schilham, M. W.; Broekman, M. L. D. Glioblastoma-Derived Extracellular Vesicles Modify the Phenotype of Monocytic Cells. *International Journal of Cancer* **2015**, *137* (7), 1630–1642. <https://doi.org/10.1002/ijc.29521>.
- (606) Abels, E. R.; Breakefield, X. O. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol* **2016**, *36* (3), 301–312. <https://doi.org/10.1007/s10571-016-0366-z>.
- (607) Abels, E. R.; Broekman, M. L. D.; Breakefield, X. O.; Maas, S. L. N. Glioma EVs Contribute to Immune Privilege in the Brain. *Trends in Cancer* **2019**, *5* (7), 393–396. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2019.05.006>.
- (608) Pinet, S.; Bessette, B.; Vedrenne, N.; Lacroix, A.; Richard, L.; Jauberteau, M.-O.; Battu, S.; Lalloué, F. TrkB-Containing Exosomes Promote the Transfer of Glioblastoma Aggressiveness to YKL-40-Inactivated Glioblastoma Cells. *Oncotarget* **2016**, *7* (31), 50349–50364. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10387>.
- (609) Ostrowski, M.; Carmo, N. B.; Krumeich, S.; Fanget, I.; Raposo, G.; Savina, A.; Moita, C. F.; Schauer, K.; Hume, A. N.; Freitas, R. P.; Goud, B.; Benaroch, P.; Hacohen, N.; Fukuda, M.; Desnos, C.; Seabra, M. C.; Darchen, F.; Amigorena, S.; Moita, L. F.; Thery, C. Rab27a and Rab27b Control Different Steps of the Exosome Secretion Pathway. *Nat Cell Biol* **2010**, *12* (1), 19–30. <https://doi.org/10.1038/ncb2000>.
- (610) van Solinge, T. S.; Abels, E. R.; van de Haar, L. L.; Hanlon, K. S.; Maas, S. L. N.; Schnoor, R.; de Vrij, J.; Breakefield, X. O.; Broekman, M. L. D. Versatile Role of Rab27a

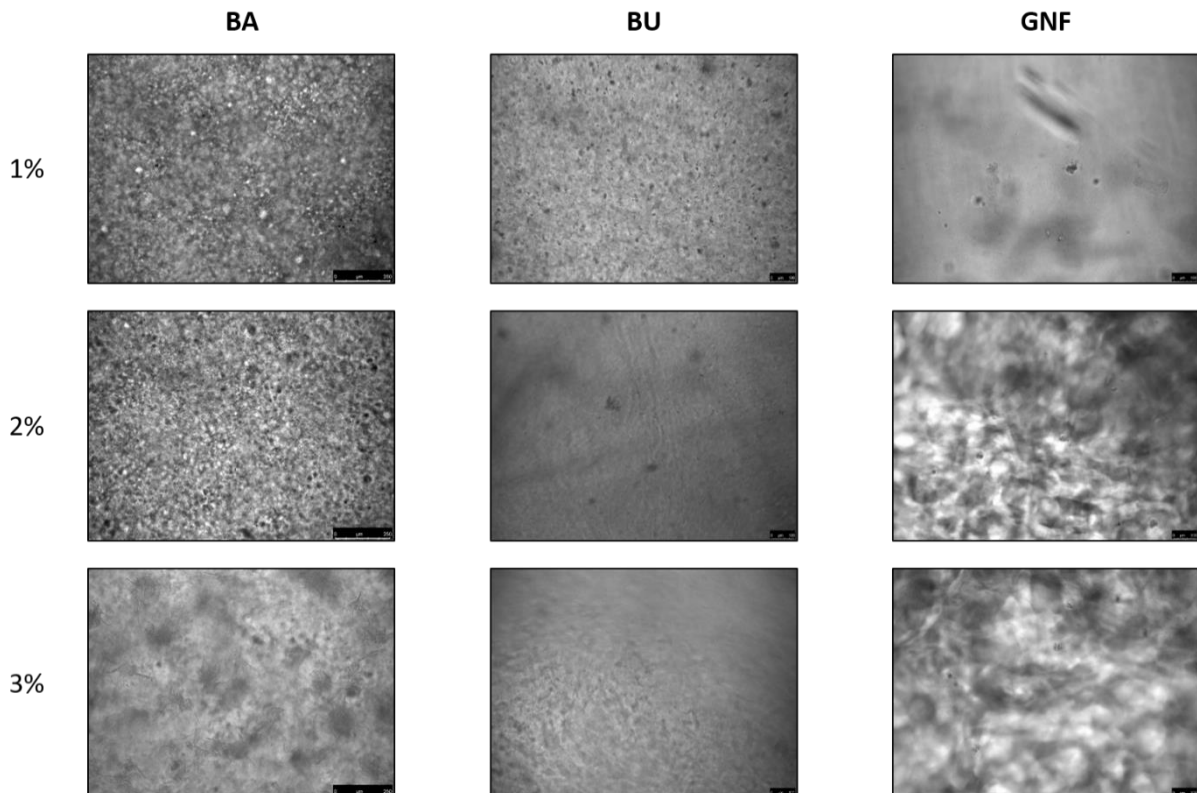
in Glioma: Effects on Release of Extracellular Vesicles, Cell Viability, and Tumor Progression. *Front Mol Biosci* **2020**, *7*, 554649. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.554649>.

Annexe

Annexe.1. Schématisation du mode inertiel de la séparation des cellules dans le canal de la SdFFF



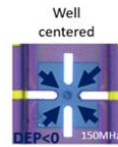
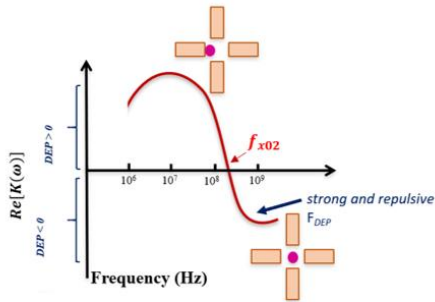
Annexe.2. Culture 3D à J35 de BA, BU et GNF aux concentrations de 1%, 2% et 3%



Annexe.3. Méthodologie de la mesure de la fréquence de transition des cellules par le détecteur UHF-DEP

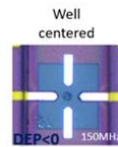
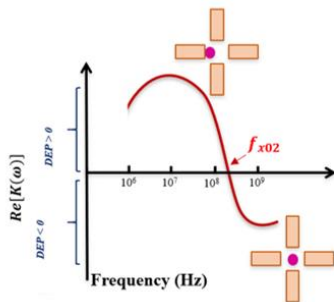
Methodology:

- 1) Cells are trapped in DEP<0



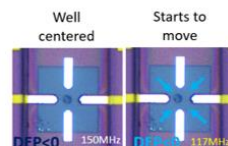
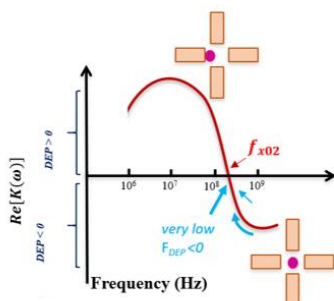
Methodology:

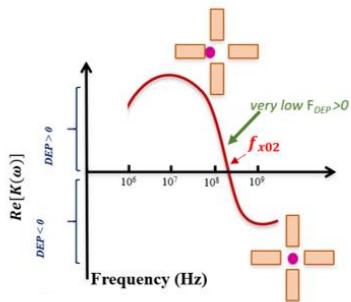
- 1) Cells are trapped in DEP<0
- 2) Flow is stopped



Methodology:

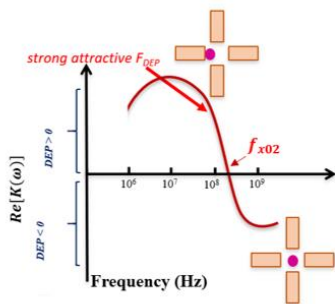
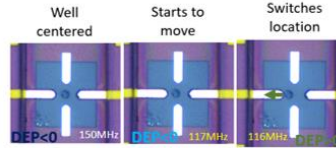
- 1) Cells are trapped in DEP<0
- 2) Flow is stopped
- 3) Frequency is tuned down per MHz till positive DEP is found





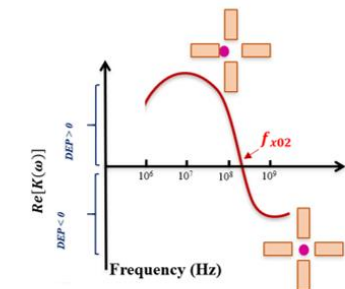
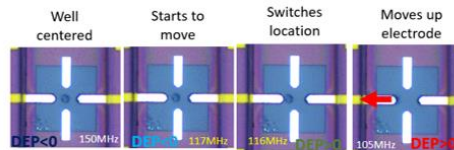
Methodology:

- 1) Cells are trapped in DEP<0
- 2) Flow is stopped
- 3) Frequency is tuned down per MHz till positive DEP is found



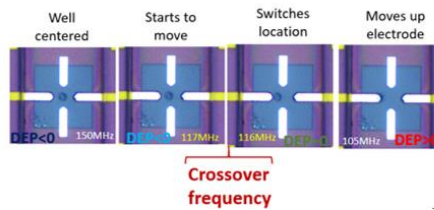
Methodology:

- 1) Cells are trapped in DEP<0
- 2) Flow is stopped
- 3) Frequency is tuned down per MHz till positive DEP is found



Methodology:

- 1) Cells are trapped in DEP<0
- 2) Flow is stopped
- 3) Frequency is tuned down per MHz till positive DEP is found



Résumé

Face à l'écart croissant observé entre la culture cellulaire conventionnelle en 2D et les essais cliniques, les chercheurs se sont résolus à utiliser des modèles animaux afin d'obtenir des résultats plus pertinents. Cependant, les modèles *in vivo* présentent de nombreuses controverses éthiques et sont coûteux et longs à mettre en œuvre. Par conséquent, la culture tridimensionnelle est apparue comme une solution intermédiaire, comprenant un réseau complexe dans lequel les cellules se développent d'une manière semblable à la physiologie. Dans ce projet de thèse, nous nous sommes concentrés sur la maîtrise d'une série d'études en vue de construire un système 3D reproductible basé sur des sphéroïdes tumoraux multicellulaires. Ces études impliquent, d'une part, la conception d'une nouvelle matrice 3D à base d'hydrogel supramoléculaire, avec des propriétés physico-chimiques définies et adaptées à la lignée cellulaire d'intérêt. Et d'autre part, la culture 3D inédite d'une population de cellules souches cancéreuses. Grâce à leurs caractéristiques intrinsèques uniques d'auto-renouvellement et de multipotence, les cellules souches cancéreuses permettent de générer des sphéroïdes reproductibles présentant des caractéristiques biologiques similaires à la tumeur d'origine. Compte tenu des faibles proportions de CSC en culture cellulaire, nous avons orienté cette recherche vers une lignée cellulaire de Glioblastome (U87-MG) qui est un cancer très hétérogène et qui présente un taux élevé de CSC par rapport aux autres lignées. Après un criblage de différents molécules gélifiantes de faible poids moléculaire, un hydrogel de glycosyl-nucléoside-bolaamphiphile a été choisi pour la culture 3D. La nature chimique et la concentration de cet hydrogel a été réajustée pour atteindre une viscoélasticité similaire à celle du microenvironnement cérébral, adaptée aux cellules de Glioblastome. Simultanément, les cellules souches cancéreuses ont été isolées de la population hétérogène à l'aide d'une méthode de fractionnement par couplage flux-force de sédimentation qui est bien adaptée et définie pour le tri des cellules de Glioblastome. Ensemble, ces deux éléments essentiels nous a permis de proposer un *modus operandi* maîtrisé qui permet d'établir une plateforme de sphéroïdes tumoraux reproductibles disponible pour une variété de tests (thérapeutiques, tumorigènes, de toxicité, etc.). L'émergence de nanoparticules dans l'environnement en raison de leur utilisation croissante constitue un problème majeur en santé publique. Notre plateforme 3D présente des propriétés potentiellement adaptées pour évaluer leur impact sur des systèmes vivants. Par conséquent, nous présentons dans ce projet une étude préliminaire de cette plateforme comme bioindicateur pour l'évaluation de la toxicité des nanoparticules d'argent manufacturées. Cette preuve de concept a été réalisée en suivant une méthodologie spécifique : 1) la conception et la caractérisation biologique du système 3D, 2) la caractérisation physico-chimique des nanoparticules d'argent, 3) l'évaluation de l'impact des nanoparticules sur la culture cellulaire 2D et 4) l'évaluation de l'impact sur la culture cellulaire 3D. L'écart entre les résultats obtenus en culture 2D et 3D souligne l'importance des modèles 3D dans les tests de toxicité.

Mots-clés: Culture 3D, Hydrogel supramoléculaire, Glioblastome, Cellules souches cancéreuses, Sphéroïdes tumoraux multicellulaires et Nano-toxicité.

Summary

With the increasing gap observed between conventional 2D cell culture and clinical assays, researchers resolved to animal models in order to obtain more relevant results. However, *in vivo* models present many ethical controversies, and they are cost and time consuming. Therefore, three-dimensional culture emerged as a middle ground, enclosing a complex network in which cells grow in a physiological-like manner. In this thesis project, we focus on mastering a series of studies in the light of building reproducible 3D system based on multicellular tumor spheroids. These studies involve, on one hand, the conception of a new supramolecular hydrogel-based 3D matrix, with defined physicochemical properties adapted to the cell line of interest. And on another hand, the unprecedented 3D culture of a population of cancer stem cells. Owing to their intrinsic unique characteristics of self-renewal and multipotency, cancer stem cells will allow the generation of reproducible spheroids with biological features similar to the tumor of origin. Considering the low proportions of CSCs in cell culture, we directed this research to a Glioblastoma cell line (U87-MG) which is a highly heterogeneous cancer and has a greater rate of CSCs compared to other lineages. Following a screening of different low molecular weight gelators, a glycosyl-nucleoside-bolaamphiphile hydrogel has been chosen for the 3D culture. The concentration of this hydrogel has been readjusted to achieve a viscoelasticity similar to the cerebral one, in order to accommodate Glioblastoma cells. Simultaneously, cancer stem cells are isolated from the heterogeneous population using sedimentation field-flow fractionation method that is well adapted and defined for Glioblastoma cell sorting. Taken together, these two essential building blocks consist of a mastered *modus operandi* that allows the establishment of a platform of reproducible tumor spheroids for a variety of assays (therapeutic, tumorigenic, toxicity etc.). For instance, the uncontrollable emergence of silver nanoparticles together with the lack of understanding of their impact on public health, require a platform to assess their potential hazardous effect on living systems. Therefore, we highlight in this study a preliminary use of this biological platform as a bioindicator for the assessment of the toxicity of manufactured silver nanoparticles. This proof of concept is conducted following a specific methodology: 1) the conception and biological characterization of the 3D system, 2) the physicochemical characterization of silver nanoparticles, 3) assessing the impact of the nanoparticles on 2D cell culture and 4) assessing the impact on 3D cell culture. The gap in the results between 2D and 3D culture, highlights furthermore the significance of 3D models in toxicity assays, but also in future therapeutic approaches.

Keywords: 3D culture, Supramolecular hydrogel, Glioblastoma, Cancer stem cells, Multicellular tumor spheroids and Nanotoxicity