

Influence des propriétés rhéologiques et des paramètres d'extrusion sur les structures créées par bio-impression 3D

par

Thierry LABONTÉ-DUPUIS

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

MONTRÉAL, LE 17 AOUT 2021

ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC



Thierry Labonté-Dupuis, 2021



Cette licence [Creative Commons](#) signifie qu'il est permis de diffuser, d'imprimer ou de sauvegarder sur un autre support une partie ou la totalité de cette œuvre à condition de mentionner l'auteur, que ces utilisations soient faites à des fins non commerciales et que le contenu de l'œuvre n'ait pas été modifié.

PRÉSENTATION DU JURY

CE MÉMOIRE A ÉTÉ ÉVALUÉ

PAR UN JURY COMPOSÉ DE :

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

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

Mme Nicole Demarquette, membre du jury
Département de génie mécanique à l'École de technologie supérieure

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

LE 30 JUILLET 2021

À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE

REMERCIEMENTS

La réalisation de ma maitrise a été un chemin long et semé d'embuches. Je tiens tout d'abord à remercier la Professeure Sophie Lerouge pour m'avoir donné une chance de rejoindre l'équipe du LBeV lors de mon 3^e stage du baccalauréat. Ce stage m'a permis d'apprendre ce que c'était que de travailler au sein d'une équipe de chercheurs passionnés. Je tiens donc à remercier chacun des étudiants du LBeV pour m'avoir appris à travailler dans un laboratoire et à faire de la recherche tout en gardant un équilibre de vie adéquat. Merci de m'avoir motivé à poursuivre mes études aux cycles supérieurs et à pousser ma curiosité encore plus loin.

Merci à Atma et à Maedeh pour m'avoir initié au travail de laboratoire et de recherche. Vous avez dû m'apprendre les bases de la chimie et comment être un étudiant chercheur efficace. Merci à Mélusine pour m'avoir guidé sur les chemins difficiles des études supérieures et pour m'avoir montré qu'il ne fallait jamais abandonner.

Merci à Tommy pour m'avoir supporté dans les moments difficiles de la maîtrise. Cette période se fait beaucoup mieux à deux et en riant que seul et pour ce support tout au long de ma maitrise, je te remercie. Merci aux étudiants du Lio pour votre complicité lors de ces deux années d'étude au CRCHUM et pour ces soirées où on pouvait enfin décompresser.

Je tiens encore à remercier Sophie Lerouge pour m'avoir donnée la chance de poursuivre mes études à la maitrise dans un domaine motivant au sein d'une bonne équipe. J'ai pu développer mes habiletés à gérer un projet sur près de deux ans dans un environnement me permettant de mettre mes capacités d'ingénieur mécanique à l'épreuve tout en développant mes habiletés de chercheur. Merci pour tout le support offert lors du confinement du printemps 2020. Ce support m'a permis de rester motivé et concentré sur ma maîtrise lors de cette période particulièrement difficile. Merci pour toutes ces rencontres individuelles et pour tous ces mots d'encouragement. Merci d'avoir exigé le meilleur de moi tout au long de mes études supérieures et merci de m'avoir permis d'apprendre autant en 2 ans.

Merci à tous les étudiants du LBeV pour avoir rendu ces deux années plus supportables et mêlés de rires. Vous avez été une équipe incroyable et je vous souhaite à tous le meilleure pour la suite.

Je tiens finalement à remercier ma famille et mes amis. Vous avez été présents avec moi tout au long de ces 2 années difficiles de hauts et de bas, dans des conditions moins qu'idéales. Sans vous, je ne serais pas où je suis aujourd'hui. Vous m'avez aidé à surpasser les plus gros obstacles, m'avez supporté lors de mes plus grands bas. C'est grâce à vous que je pourrai passer à la prochaine étape la tête haute.

Influence des propriétés rhéologiques et des paramètres d'extrusion sur les structures bio-imprimées

Thierry LABONTÉ-DUPUIS

RÉSUMÉ

La bio-impression 3D par extrusion est un domaine en pleine expansion, pour lequel il faut optimiser les matériaux servant de « bioencre », qui sont généralement des hydrogels. L'objectif de cette maîtrise est de proposer des méthodes rhéologiques permettant de comparer les hydrogels entre eux et de mieux prédire leur comportement lors de l'impression. Nous avons étudié 3 propriétés rhéologiques : la capacité de récupération (« recovery »), la contrainte d'écoulement et le caractère rhéofluidifiant. Ces propriétés ont été observées sur 3 formulations d'hydrogels à base de chitosane ainsi qu'une formulation à base d'alginate qui est déjà utilisée pour la bio-impression 3D et sert de contrôle positif.

Tout d'abord, l'effet des paramètres d'extrusion tels que le débit, la vitesse de déplacement de la buse, le diamètre d'extrusion et la hauteur d'extrusion sur la qualité des filaments extrudés ont été analysés sur une formulation. Tel qu'attendu, l'augmentation de la quantité de matière déposée par unité de distance (donc l'augmentation du débit ou la diminution de la vitesse de déplacement de la buse) augmente la largeur des filaments déposés. L'effet de la hauteur de déposition est moins évident, car ce paramètre doit être sélectionné en fonction des autres pour permettre l'extrusion de filaments minces, continus et uniformes.

Dans un deuxième temps, les données rhéologiques ont été mesurées et une étude de corrélation a été tentée avec les résultats d'impression, notamment la fidélité d'impression et la largeur des filaments. Contrairement à la littérature, le pourcentage de récupération n'est pas identifié comme étant un paramètre déterminant. Par contre, la viscosité pré-extrusion a une assez bonne corrélation inversement proportionnelle avec la largeur des filaments. L'hydrogel d'alginate-gélatine a donné les meilleurs résultats. Du côté des gels de chitosane, le manque de reproductibilité et la faible capacité à supporter plusieurs couches de gel pré-gélification affecte son potentiel.

Les résultats suggèrent que l'étude des propriétés rhéologiques peuvent aider à déterminer la capacité d'un gel à être utilisé pour la bio-impression par extrusion. Par contre, les tests doivent être modifiés pour permettre une meilleure analyse de gels thermosensibles tel que le chitosane et pour uniformiser les résultats.

Mots-clés : bio-impression 3D, extrusion, bioencre de chitosane, récupération, contrainte d'écoulement, fidélité d'impression

Impact of the rheological properties and the extrusion parameters on the printed structures

Thierry LABONTÉ-DUPUIS

ABSTRACT

Extrusion 3D bioprinting is a rapidly expanding field, for which it is necessary to optimize the materials serving as bio-ink, which are generally hydrogels. The objective of this master's degree is to propose rheological methods making it possible to compare hydrogels with each other and to better predict their behavior during printing. We have studied 3 rheological properties: the capacity of recovery, the yield stress and shear thinning. These properties were observed on 3 hydrogel formulations based on chitosan as well as one formulation based on alginate which is already used for 3D bioprinting and serves as a positive control.

First, the effect of extrusion parameters such as flow rate, nozzle movement speed, extrusion diameter and extrusion height on the quality of extruded filaments were analyzed on a formulation. As expected, increasing the amount of material deposited per unit of distance (thus increasing the flow rate or decreasing the speed of movement of the nozzle) increases the width of the deposited filaments. The effect of the deposition height is less obvious, as this parameter must be selected in relation to the others to allow the extrusion of thin, continuous and uniform filaments.

Second, the rheological data was measured and a correlation study was attempted with the print results, including print fidelity and filament width. Contrary to the literature, the percentage of recovery is not identified as being a determining parameter. On the other hand, the pre-extrusion viscosity has a fairly good inversely proportional correlation with the width of the filaments. Alginate gelatin hydrogel has given the best results. On the side of chitosan gels, the lack of reproducibility and the low capacity to withstand several layers of pre-gelled gel affects its potential.

The results suggest that studying the rheological properties can help determine the ability of a gel to be used for extrusion bioprinting. Although, the tests must be modified to allow a better analysis of thermosensitive gels such as chitosan and to standardize the results.

Keywords: 3D bio-printing, extrusion, chitosan bio-ink, recovery, yield stress, printing fidelity

TABLE DES MATIÈRES

	Page
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 LA BIO-IMPRESSION 3D ET ÉTAT DE L'ART	3
1.1 La bio-impression et applications médicales	3
1.1.1 Introduction à la bio-impression	3
1.1.2 Méthodes de bio-impression	4
1.1.3 Bio-impression par extrusion : principe et principaux attributs.....	7
1.2 Évaluation de l'extrusion (cahier des charges d'une bioencre idéale).....	14
1.2.1 Attributs d'une bioencre idéale	14
1.2.2 Spécifications techniques.....	15
1.3 Propriétés rhéologiques de la bioencre influençant la structure bio-imprimée.....	22
1.3.1 Configuration du rhéomètre	23
1.3.2 Viscosité et rhéofluidité :	24
1.3.3 Contrainte d'écoulement :.....	26
1.3.4 Récupération (« recovery ») :	28
1.3.5 Mécanisme de gélification :.....	30
1.4 Bioencres typiques en extrusion	31
1.5 Les hydrogels de chitosane	33
1.5.1 Le chitosane	33
1.5.2 Les bioencres de chitosane.....	34
1.6 Résumé du contexte et objectifs de l'étude.....	34
CHAPITRE 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES	37
2.1 Préparation des hydrogels	37
2.1.1 Solubilisation du chitosane	38
2.1.2 Solubilisation du chitosane/gélatine	38
2.1.3 Préparation des agents gélifiants.....	39
2.1.4 Préparation des hydrogels pour la bio-impression.....	39
2.1.5 Préparation des gels d'alginate-gélatine	40
2.2 Types de tests rhéologiques	41
2.2.1 Viscosité de la solution	42
2.2.2 Thermosensibilité.....	43
2.2.3 Rampe d'amplitude	43
2.2.4 Tests de récupération (« recovery »).....	44
2.3 Impression et caractérisation de la qualité d'impression	46
2.3.1 Appareillage.....	46
2.3.2 Architecture.....	48
2.3.3 Fidélité de forme	52
2.4 Propriétés mécaniques	53
2.5 Analyse des corrélations et statistiques.....	55

2.5.1	Lots de solubilisation	55
2.5.2	Moyenne et déviation standard	56
2.5.3	Corrélation de Pearson.....	56
CHAPITRE 3	RÉSULTATS.....	57
3.1	Caractérisation rhéologique des hydrogels pour la bio-impression par extrusion	57
3.1.1	Viscosité.....	57
3.1.2	Sensibilité à la température.....	58
3.1.3	Rampe d'amplitude.....	60
3.1.4	Essais de récupération (« recovery »)	64
3.1.5	Propriétés rhéofluidifiantes et calcul du taux de cisaillement durant l'extrusion	69
3.2	Effet des paramètres d'impression sur les dimensions des filaments extrudés	70
3.2.1	Impact du débit d'extrusion et de la vitesse de déplacement de la buse...	72
3.2.2	Impact du diamètre d'extrusion	74
3.2.3	Impact de la hauteur des couches.....	75
3.3	Résultats de bio-impression par extrusion	76
3.4	Dimension des filaments.....	76
3.5	Fidélité d'impression	77
3.6	Étude des corrélations entre propriétés rhéologiques et résultats d'impression (dimension de filaments et fidélité Pr).....	81
3.7	Régression entre propriétés rhéologiques et dimension des filaments	82
3.8	Corrélation propriétés rhéologiques et fidélité d'impression.....	87
3.9	Effet du processus de gélification sur la fidélité d'impression et les propriétés mécaniques des structures imprimées	91
3.10	Propriétés mécaniques des structures 3D imprimées	92
CHAPITRE 4	DISCUSSION, LIMITES ET PERSPECTIVES	95
4.1	Évaluation des propriétés rhéologiques déterminant la capacité d'impression par extrusion des gels	95
4.1.1	Rappel des hypothèses de récupération et contrainte à l'écoulement.....	95
4.1.2	Récupération et imprimabilité.....	96
4.1.3	Autres limites des tests de récupération :	97
4.2	Contrainte d'écoulement et imprimabilité	99
4.3	Méthode alternative de mesure de la récupération	99
4.4	Effet des paramètres d'impression sur la dimension des filaments extrudés d'un hydrogel	100
4.4.1	Paramètres influençant la largeur des filaments directement	100
4.4.2	Effet de la contrainte de cisaillement.....	103
4.5	Limites de l'étude	104
4.5.1	Variabilité des résultats.....	104
4.5.2	Choix de l'architecture.....	105
4.5.3	Mesure de la fidélité d'impression.....	106
4.5.4	Mesure de la fenêtre d'impression pour les gels.....	107
4.6	Perspectives.....	108

4.6.1	Méthode FRESH pour utiliser les propriétés du chitosane	108
	CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS.....	111
ANNEXE I	PROTOCOLE DE SOLUBILISATION CHITOSANE GÉLATINE	115
ANNEXE II	PRÉPARATION DES AGENTS GÉLIFIANTS.....	117
ANNEXE III	PRÉPARATION DES CARTOUCHES POUR EXTRUSION	119
ANNEXE IV	SOLUBILISATION ALGINATE GÉLATINE.....	121
ANNEXE V	MESURE DE VISCOSITÉ.....	123
ANNEXE VI	VISCOSITÉ DES GELS DE CHITOSANE.....	127
ANNEXE VII	COURBE DE RHÉOFLUIDITÉ	131
ANNEXE VIII	EFFET DES PARAMÈTRES D'EXTRUSION SUR LA LARGEUR ET LA QUALITÉ DES FILAMENTS	133
ANNEXE IX	LARGEUR À 5MM/S ET 7MM/S	143
	LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	145

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1.1 Résumé des types d'impression comprenant Tiré de Bishop et al. (2017)	5
Tableau 2.1 Noms et composition des différents hydrogels évalués. La concentration de chaque composante du gel est indiquée.	37
Tableau 2.2 Paramètres d'utilisation du rhéomètre en fonction du test	42
Tableau 2.3 Paramètres du test de récupération à température constante de 22°C	44
Tableau 2.4 Paramètres d'extrusions utilisés pour déterminer l'effet sur la largeur et la qualité des filaments extrudés du gel de CH3GEL3#1. La buse d'extrusion de 25G est utilisée pour extruder des filaments à un débit de 0,5, 1, 2 et 3 μ L/s d'une hauteur de 0,3mm à une vitesse de déplacement de 3, 5, 7, 9 et 11mm/s. La buse de 27G extrude des filaments aux mêmes paramètres, mais à une hauteur de 0,2 et de 0,3mm.....	49
Tableau 2.5 Évaluation de la qualité des lignes extrudées, 1 étant la note la plus basse et 3 étant la meilleure note	49
Tableau 2.6 Système d'évaluation de la qualité de déposition des filaments extrudés	50
Tableau 2.7 Évaluation de la fidélité de forme d'une structure en nid d'abeille	52
Tableau 3.1 Résultats de la contrainte de cisaillement lors de la rampe d'amplitude correspondant à la contrainte de cisaillement calculée. Le facteur «n» est calculé à partir de la pente ($n-1$) du graphique de la viscosité par rapport au taux de cisaillement (log-log). Le taux de cisaillement selon les paramètres d'extrusion est calculé selon l'équation de Dealy et Wissbrun (1990).....	69
Tableau 3.2 Largeur et qualité des filaments extrudés en fonction des paramètres d'impression. Exemple de données mesurées pour l'hydrogel CH3GEL3#1, imprimé avec aiguille conique 27G et une hauteur entre couches de 0,2 mm. Le score total pour la qualité du filament est évalué sur 6 en additionnant la note de continuité et d'uniformité. Un score cumulatif de 5 ou 6 (vert) indique que le filament est optimal; un score de 4 (jaune) indique que le filament peut convenir ou non	

	selon la situation; un score de 2 ou 3 indique que le filament n'est pas propice à l'impression.....	71
Tableau 3.3	Images de structures imprimées pour la mesure de la fidélité d'impression. Les gels sont extrudés avec une vitesse de déplacement de la buse de 5 mm/s; débit de 0,5 μ L/s; hauteur de 0,2mm; diamètre d'extrusion 0,2mm (27G). Des structures de 3 et 10 couches ont été imprimées. La fidélité d'impression est mesurée sur la structure non réticulée et ensuite sur la même structure réticulée. La distance entre deux lignes de l'échelle représente 1mm	79
Tableau 3.4	Résumé des propriétés rhéologiques des différentes gels testés. Les gels sont identifiés avec leur numéro de lot correspondant (#1)	81
Tableau 4.1	Hypothèse de l'impact de la variation des paramètres d'impression sur la largeur des filaments extrudés et sur la contrainte de cisaillement.....	100

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1.1	Représentation des méthodes de bio-impression Tirée de Loai (2019).....4
Figure 1.2	Présentation de la méthode FRESH. Processus d'extrusion d'une bioencre dans un bain de support Tirée de Noor et al. (2019).....7
Figure 1.3	Types de bio-impression par extrusion Tirée de Tao Jiang et al. (2019)....8
Figure 1.4	A) Bio-imprimante 3DDiscovery (RegenHu). B) Système d'extrusion par contrôle de volume, avec piston à vis sans fin Tirée du site wakoautomation (www.wakoautomation.com/products/3d-bioprinting-regenhu)9
Figure 1.5	Types de buse d'extrusion; A) conique et B) droite Tirée du site Nordson (https://www.nordson.com/en/divisions/efd/products/dispense-tips)10
Figure 1.6	Classification des filaments lors de l'extrusion. A : Le degré de gélification (sous gélifié, bien gélifié ou sur-gélifié) influence la forme du gel extrudé et la forme du gel déposé. B : La fidélité de forme est différente selon le gel utilisé et son degré de gélification Tirée de Ouyang et al. (2016)16
Figure 1.7	Test d'effondrement de filament Tirée de Habib et al. (2018).....17
Figure 1.8	Mesure du module de Young selon différentes méthodes : A) Module de Young tangent, B) Module de Young moyen et C) module de Young sécant Tirée de Davarpanah, Ván, et Vásárhelyi (2020).....20
Figure 1.9	A) Déphasage entre la mesure de la contrainte de cisaillement et la déformation appliquée (δ). B) Module de cisaillement complexe décomposé et module de conservation (G') et de perte (G'') Tirée de Anton-Paar (https://wiki.anton-paar.com/ca-en/basics-of-rheology/#rotational-tests-and-viscosity)23
Figure 1.10	Test de rhéofluidité. On observe que la viscosité des matériaux testés tend à diminuer à différents rythmes en augmentant le taux de cisaillement Tirée de Markstedt et al. (2015)25
Figure 1.11	Différentes méthodes pour déterminer la contrainte d'écoulement. A) Selon le modèle mathématique de Herschel-Bulkley (HB). B) Au

	croisement du module de conservation et de perte ($G' = G''$). C) Lorsque le module de conservation baisse de 10% par rapport à la région linéaire Tirée de Townsend, Beck, Gehrke, Berkland, et Detamore (2019)	26
Figure 1.12	Test de récupération effectué sur deux gels d'alginate (la figure présente la viscosité au cours du test, mais on peut également le faire avec le G' et G'') Tirée de Paxton et al. (2017).....	28
Figure 1.13	Gélification de CH2% développée au LBeV à 22°C (A) et à 37°C (B)	30
Figure 1.14	Structure chimique du chitosane	33
Figure 2.1	A) Méthode de gélification d'un gel de chitosane par contrôle de température ; B) Méthode de réticulation d'un gel d'alginate à l'aide de CaCl2	38
Figure 2.2	Méthodes de préparation des gels à base de chitosane pour la bio- impression	40
Figure 2.3	Rhéomètre MCR301(R) (Anton Paar). Les configuration CC10 (gauche) et PP25 (droite) y sont présentées Tirée de Anton-Paar (https://www.anton-paar.com/)	41
Figure 2.4	Exemple de gel de chitosane 3% démontrant une thermo- sensibilité à 37°C. Le gel est relativement stable à température ambiante, mais le module de conservation augmente en augmentant la température à 37°C (géométrie CC10, mode oscillatoire, fréquence 1Hz, amplitude)43	43
Figure 2.5	Exemple de courbe présentant la valeur de la viscosité moyenne lors de l'extrusion à différents taux de cisaillement pour un gel de CH3. La valeur de $n-1$ est de -0,627, donc $n=0,373$	45
Figure 2.6	Bio-imprimante 3DDiscovery (RegenHu) équipé de 4 systèmes d'impression : extrusion pneumatique, extrusion par contrôle de débit, extrusion de polymère fondu et par jet d'encre	47
Figure 2.7	Image utilisée pour la mesure de la largeur des filaments selon différentes paramètres d'extrusion. 3 lignes verticales sont extrudées pour chaque vitesse de déplacement de la buse. La buse se déplace à 3, 5, 7, 9 et 11 mm/s.....	48
Figure 2.8	Exemple de structure en nid d'abeille (10x10x2mm) produite par BioCAD pour le gel d'ALG3GEL7	51
Figure 2.9	Mach-1 (Biomomentum) en mode de compression non confiée	53

Figure 3.1	Sensibilité à la température des gels à base de chitosane. A) Module de conservation (G') et de perte (G'') du gel de chitosane 3%, B) du gel de chitosane 2% gélatine 2% et C) du gel de chitosane 3% Gélatine 3% en fonction de la température (la température est restée constante 10 minutes à 22°C, puis élevée à 37°C pour encore 10 min) (n=1) CC10, oscillation, 1Hz et amplitude 1%.....	59
Figure 3.2	Exemple de courbe typique d'une rampe d'amplitude d'un gel à base d'alginate. A) Évolution du module de conservation G' en fonction de la valeur de la déformation appliquée. Le point d'écoulement est identifié lorsque le G' baisse de 10% par rapport à la région linéaire; B) G' selon la contrainte de cisaillement correspondant à la déformation. La contrainte d'écoulement est identifiée au point d'écoulement. PP25, oscillation, 22°C, 1Hz et amplitude 1%.....	61
Figure 3.3	Exemple de courbe typique d'une rampe d'amplitude d'un gel à base de chitosane (CH3GEL3#2). A) La réponse du module de conservation en changeant la déformation. Le point d'écoulement est identifié lorsque le G' baisse de 10% par rapport à sa valeur maximale; B) G' selon la contrainte de cisaillement correspondant à la déformation. La contrainte d'écoulement est identifiée au point d'écoulement. PP25 oscillation, 22°C, 1Hz et amplitude 1%	62
Figure 3.4	Contrainte d'écoulement des gels. La ligne rouge indique la limite théorique selon laquelle un gel doit avoir une contrainte d'écoulement supérieure à 100Pa pour permettre une impression adéquate (n≥3, moyenne et DS).....	63
Figure 3.5	Module de conservation au point d'écoulement. Le module de conservation est mesuré lorsqu'il baisse de 10% par rapport à la valeur de la région linéaire ou de la valeur maximale lorsqu'il n'y a pas de région linéaire (n≥3, moyenne et DS).....	64
Figure 3.6	Tests de récupération des gels montrant l'évolution de la viscosité en fonction du taux de cisaillement durant l'extrusion. On distingue trois phases :). La stabilité du gel est tout d'abord observée pendant 10 minutes à 0,001 rad/s. Le cisaillement est ensuite appliqué pendant 1 minute à 10, 100, 500 et 1000 rad/s. La récupération du gel est mesurée à 0,001 rad/s pendant 10 minutes. Les pics post-extrusion (voir cercle rouge sur la figure B) sont considérés comme des artefacts par la compagnie Anton Paar. L'ensemble du test est effectué à température ambiante (n=3, moyenne). CC10, rotation, 22°C	66
Figure 3.7	Viscosité dynamique A) pré-extrusion et B) post-extrusion. Les valeurs de la viscosité sont mesurées lorsque le taux de cisaillement de la phase d'extrusion est de 500 rad/s. C) La récupération est le ratio	

entre la viscosité post-extrusion/pré-extrusionX100. (n=3, moyenne et SD)	68
Figure 3.8 Effet du débit d'extrusion sur la largeur du filament d'un gel de CH3GEL3 #1. La hauteur des couches est fixée à 0,2mm; diamètre d'extrusion de 0,2mm (27G). La vitesse de déplacement varie de 3 à 11 mm/s; le débit varie de 0,5 à 3 μ L/s. (n=6, moyenne et DS)	72
Figure 3.9 Effet de la vitesse de déplacement de la buse (3 à 11 mm/s), du diamètre d'extrusion (0,2 et 0,25mm) et du débit (0,5 à 3 μ L/s) sur la largeur de filaments extrudé du gel CH3GEL3 #1. La hauteur des couches est fixée à 0,3mm; le débit varie ainsi que la vitesse de déplacement (n≥3)	73
Figure 3.10 Exemple de mauvaise calibration des paramètres causant une extrusion du CH3GEL3#1 à l'intérieur des précédentes couches. A) Première couche de dépôt et B) 3 ^e couche de dépôt : débit 0,5 μ L/s; diamètre 0,2mm; vitesse de déplacement de la buse 5mm/s; hauteur 0,3mm	74
Figure 3.11 Effet de la hauteur des couches de gel sur un gel de CH3GEL3 #1. Le débit est de 1 ou 2 μ L/s; la hauteur de couches est de 0,2 ou 0,3 mm; le gauge de l'aiguille est de 27 (0,2mm). La vitesse de déplacement varie de 3 à 11 mm/s	75
Figure 3.12 Largeur des filaments à une vitesse de déplacement de la buse de 5mm/s, un débit de 0,5 μ L/s, une hauteur de 0,2mm et un diamètre interne de buse de 0,2mm	77
Figure 3.13 Architecture des structures. La zone utilisée pour calculer la fidélité d'impression est identifiée en rouge	78
Figure 3.14 Valeur du paramètre de fidélité d'impression Pr pour des structures de 3 et de 10 couches. Un Pr de 1 indique que l'aire de la structure pratique est identique à celle de la structure théorique. Pr <1 indique que l'aire de la structure réelle est plus petite que celle de la structure théorique, tandis que Pr>1 indique que l'aire de la structure réelle est plus grande que celle de la structure théorique (n=3, moyenne et DS)	80
Figure 3.15 Régression de la largeur des filaments aux mêmes paramètres d'extrusion avec la viscosité pré et post-extrusion et la récupération (A, B et C respectivement). La largeur des filaments est mesurée avec un débit de 0,5L/s, un diamètre d'extrusion de 0,2mm et une hauteur de 0,2mm. La vitesse de déplacement est de 5 mm/s	83

Figure 3.16	Lien entre la largeur des filaments aux propriétés au point d'écoulement. A) Influence de la contrainte d'écoulement sur la largeur à 5mm/s. B) Effet du module de conservation sur la largeur à 5mm/s	87
Figure 3.17	Corrélation de la viscosité pré-extrusion et post-extrusion sur la fidélité d'impression d'une structure de 3 A) et B) et 10 couches C) et D) respectivement (buse 27G, vitesse 5mm/s, débit 0,5 μ L/s et hauteur de 0,2mm)	88
Figure 3.18	Corrélation des propriétés rhéologiques au point d'écoulement sur la fidélité d'impression. A) Influence de la contrainte d'écoulement B) et du module de conservation sur la fidélité d'impression d'une structure de 3 couches et de 10 couches C) et D) respectivement. (buse 27G, vitesse 5mm/s, débit 0,5 μ L/s et hauteur de 0,2mm)	90
Figure 3.19	Ratio de la fidélité d'impression pré vs post-réticulation ainsi que la hauteur des structures imprimées. Le ratio est calculé en divisant le Pr post-réticulation par le Pr pré-réticulation. Un $Pr \geq 1$ signifie que le gel a gonflé et un $Pr \leq 1$ signifie que le gel s'est contracté ($n=3$, moyenne).....	91
Figure 3.20	Courbe contrainte-déformation en compression non confinée des structures de 10 couches à base de chitosane et d'alginate juste après impression («pré») et après gélification complète («post») ($n \geq 3$, moyenne).....	93
Figure 3.21	Module de Young sécant des gels. ($n \geq 3$ (exception CH2GEL2 $n = 2$), moyenne et DS).....	94
Figure 4.1	Contrainte de cisaillement d'un échantillon A) d'ALG3GEL7 selon différents taux de cisaillement lors de la phase d'extrusion du test de récupération. La phase d'extrusion entre 600 et 660 secondes présente une diminution de la contrainte de cisaillement en augmentant le taux de cisaillement. B) L'échantillon de CH2GEL2 présente un comportement permettant de calculer un «n» positif, la contrainte de cisaillement augmente en haussant le taux de cisaillement	98
Figure 4.2	Défaut de la mesure de la fidélité d'impression Pr. A) Une forme carrée théorique ayant une aire de 10mm ² peut avoir une fidélité d'impression parfaite (Pr=1) lorsque la forme imprimée est un cercle de 10mm ² . B) Un profil de surface de 0,1mm contrôle la variation de profil. Pour être acceptée, la forme imprimée ne doit pas dépasser le profil choisi	107

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

2D	Deux dimensions
3D	Trois dimensions
ALG	Alginate
BGP	Béta glycérophosphate
CaCl ₂	Chlorure de calcium
CC	Cylindre-concentrique
CH	Chitosane
CHUM	Centre Hospitalier de l'Université de Montréal
CMC	Carboxymethyl cellulose
CP	Cône-plaque
CRCHUM	Centre de Recherche du CHUM
DDA	Dégré de désacétylation
FRESH	Bio-impression dans un bain de support (Freeform Reversible Embedding of Suspended Hydrogels)
GEL	Gélatine
HA	Acide hyaluronique
HCl	Acide hydrochlorique (Hydrochloric acid)
LBeV	Laboratoire de Biomatériaux Endovasculaires
LVE	Viscoélasticité linéaire (Linear viscoelastic)
MEC	Matrice extracellulaire
Mw	Poids moléculaire
PHA	Hydrogel d'acide hyaluronique fonctionnalisé à la pentanone (pentanone-functionalized hyaluronic acid hydrogel)

PP	Plaque-parallèle
Pr	Fidélité de forme
SHC	Bicarbonate de sodium (Sodium Hydrogen Carbonate)
SLA	Stéréolithographie
UV	Ultraviolet

LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS DE MESURE

G'	Module de cisaillement (Pa)
G'	Module de conservation (Pa)
G''	Module de perte (Pa)
G^*	Module complexe de cisaillement (Pa)
gf	Grammes forces
Hz	Hertz
K	Coefficients de rhéofluidité
kPa	Kilo pascale
M	Molaire
Min	Minute
mm	Millimètre
mPa	Millipascal
N	Newton
Pa	Pascale
Pa^*s	Pascale secondes
Q	Débit ($\mu\text{L}/\text{s}$)
R	Rayon (mm)
μm	micro mètre
$^\circ\text{C}$	Degré Celsius
η	Viscosité (Pa^*s)
$\dot{\gamma}$	Taux de cisaillement (rad/s)
τ	Contrainte de cisaillement (Pa)
$\dot{\gamma}$	Taux de cisaillement (s^{-1})
γ	Déformation de cisaillement (m/m)
$\dot{\gamma}_w$	Taux de cisaillement à la paroi (rad/s)

INTRODUCTION

La survie de l'être humain a toujours été dépendante de notre capacité à corriger les défauts affectant le système humain. La médecine moderne permet de sauver bien des vies et de régler plusieurs problèmes affectant la qualité de la vie des humains. Par contre, lorsqu'un organe vital vient à faillir, la médecine atteint rapidement ses limites et doit procéder à un remplacement de l'organe défaillant à l'aide d'une transplantation. Pour certaines maladies, lorsque la médecine régénératrice atteint ses limites, le remplacement du tissu ou du système défectueux n'est tout simplement pas possible et le patient doit supporter un inconfort pour le reste de sa vie (arthrite). Dans le cas où l'organe peut être remplacé, on doit attendre de trouver un donneur compatible et cela peut prendre des mois d'attente, voire des années.

Pour combler ce besoin, le génie tissulaire, qui a vu le jour autour des années 1990, consiste à développer des substituts tissulaires permettant la régénération ou l'amélioration des capacités d'un système dans le corps humain (Langer & Vacanti, 1993). Parmi les approches d'ingénierie tissulaire, la bio-impression 3D est une solution particulièrement prometteuse car elle permet de créer *in vitro* des tissus, ou organes complexes, faits sur mesure pour le patient. Cette technologie est toute récente mais connaît un essor fulgurant depuis quelques années. Mais on manque encore de matériaux optimaux combinant les propriétés requises pour obtenir des structures complexes précises, solides et avec une excellente viabilité cellulaire.

L'objectif de ce mémoire de maîtrise est d'explorer les paramètres rhéologiques permettant de déterminer le potentiel d'hydrogels candidats à bio-impression. Avoir une meilleure connaissance sur les propriétés rhéologiques nécessaires pour la bio-impression 3D par extrusion aide à uniformiser la recherche et à développer de meilleurs matériaux plus rapidement en diminuant le nombre de tests préliminaires à réaliser.

Cette recherche vise à déterminer l'influence des propriétés rhéologiques sur le comportement du gel lors de la bio-impression 3D par extrusion. En évaluant les propriétés telles que la contrainte d'écoulement, la viscosité lors du test de récupération (« recovery ») et le

comportement rhéofluidifiant, on mesure l'effet sur la largeur des filaments extrudés ainsi que la fidélité d'impression (ou fidélité de forme) sur une structure de plusieurs couches. Il est donc possible de vérifier la validité de limites théoriques proposées par certains chercheurs. Cette recherche permet également de déterminer l'influence des paramètres d'extrusion sur les résultats de l'impression. Les paramètres d'impression doivent être choisis pour permettre l'extrusion de filaments uniformes, continus et minces pour tous les gels testés dans cette étude.

Le premier chapitre de ce mémoire est consacré à la revue de littérature sur la bio-impression 3D. Les méthodes de bio-impression 3D classiques y sont introduites et l'accent est mis sur le type d'impression utilisé dans cette étude : l'extrusion. Les paramètres d'extrusion, les propriétés rhéologiques et mécaniques sont ensuite présentées pour identifier les paramètres importants lors de l'extrusion. Par la suite, les matériaux typiques utilisés lors de l'impression par extrusion sont présentés en mettant un accent sur les gels à base de chitosane, car ils seront principalement utilisés lors de cette étude. La méthodologie suivie pour évaluer l'extrusion des gels est présentée au chapitre 2. Le chapitre 3 présente les résultats des expériences. Ces résultats sont ensuite discutés au chapitre 4.

CHAPITRE 1

LA BIO-IMPRESSION 3D ET ÉTAT DE L'ART

1.1 La bio-impression et applications médicales

1.1.1 Introduction à la bio-impression

La bio-impression est définie comme étant « l'utilisation du procédé de transfert de matière pour la structuration et l'assemblage de matériaux / molécules biologiquement pertinentes, cellules, tissus et biomatériaux biodégradables avec une organisation précise pour accomplir une ou plusieurs fonctions biologiques » (Mironov, Reis and Derby, 2006) (tiré de Brent, 2019). C'est un domaine de fabrication additive qui combine génie tissulaire et médecine régénérative (Gillispie et al., 2020).

Les bio-imprimantes ont été créées suite à la popularisation de l'impression 3D conventionnelle au début des années 2000 (Prendergast, Solorzano, & Cabrera, 2017). Pouvoir fabriquer une structure sur mesure avec une grande précision, dans un temps raisonnable et avec plusieurs matériaux rendent l'impression 3D très intéressante. Le domaine médical a adapté cette méthode pour créer la bio-impression 3D, qui ajoute des cellules dans la structure imprimée, permettant ainsi de créer des structures «vivantes». En 2007 la compagnie Organovo (Solana Beach, CA) a commercialisé une des premières bio-imprimantes par extrusion. Depuis, plusieurs autres compagnies à travers le monde travaillent à améliorer les méthodes de bio-impression.

Les matériaux utilisés en bio-impression 3D sont généralement des hydrogels, ayant une grande concentration en eau, pouvant encapsuler des cellules et leur donner une structure tout en favorisant leur croissance. Ces gels contenant des cellules sont alors appelés des bioencres. A terme, les cellules encapsulées sécrètent leur propre matrice extracellulaire et créent le tissu désiré.

Un des intérêts principaux de la bio-impression est sa capacité à reproduire une structure complexe spécifique à un tissu ou organe, et de géométrie spécifique à un patient en particulier (Gillispie et al., 2020). L'objectif à long terme est le remplacement d'organes défectueux. Mais la création de systèmes tissulaires complexes vivants est encore dans ses premiers balbutiements et la bio-impression est principalement utilisée aujourd'hui pour la création de modèles 3D et organoïdes pour tester des médicaments ou étudier des mécanismes biologiques. Par exemple, des morceaux de foie ont été générés pour tester la toxicité de certains médicaments. Dans le cas du traitement du cancer, il est maintenant possible de créer des modèles 3D imitant avec une grande précision l'environnement tumoral dans le corps humain et donc de simuler une réaction corporelle plus fidèle à la réalité qu'un modèle 2D ((Brent, 2019; Gleadall, Visscher, Yang, Thomas, & Segal, 2018; Gopinathan & Noh, 2018), etc.)

Dans la prochaine section, les différentes méthodes de bio-impression 3D seront présentées, puis la bio-impression par extrusion sera détaillée davantage puisqu'elle fait l'objet de ce travail de maîtrise.

1.1.2 Méthodes de bio-impression

Différentes méthodes de bio-impression ont été développées pour permettre l'utilisation d'une plus grande sélection de bioencres aux différentes propriétés (Figure 1.1).

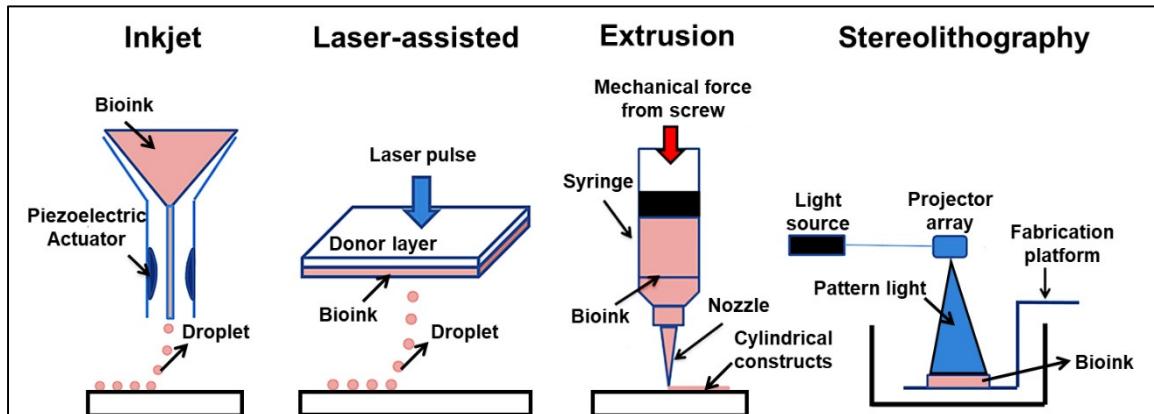


Figure 1.1 Représentation des méthodes de bio-impression
Tirée de Loai (2019)

On distingue la bio-impression par extrusion, par jet d'encre, par laser, par stéréolithographie (Arslan-Yildiz et al.). Chacune de ces méthodes présente ses avantages et ses inconvénients, résumés dans le Tableau 1.1. Il peut d'ailleurs être intéressant de les combiner pour former des structures complexes qui représentent mieux celles trouvées dans le corps humain.

Tableau 1.1 Résumé des types d'impression comprenant
Tiré de Bishop et al. (2017)

Bioprinting method	Inkjet 3D bioprinting	Microextrusion 3D bioprinting	Laser-assisted 3D bioprinting (LAD)	Stereolithography (SLA)
Description	Thermal, piezoelectric, or electromagnetic forces expel successive drops of bioink onto a substrate	Mechanical or pneumatic forces dispense bioink through a nozzle	Bioink and cells are suspended on the bottom of a ribbon and when vaporized by a laser pulse, are propelled to a receiving substrate	Use digital light to cure bioink in a layer by layer fashion
Advantages	High speed, availability, low cost	Ability to use high viscosity bioink and print high cell density	High degree of precision and resolution, ability to use high viscosity bioink and print high cell density	High degree of fabrication accuracy, and low printing time
Disadvantages	Lack of precision in droplet placement and size, need for low viscosity bioink	Distortion of cell structure	Time consuming, high cost	Use of high intensity UV light, lengthy post-processing, lack of compatible materials
Effect on cells	>85% cell viability ¹	As low as 40% viability ¹	>95% cell viability ¹	>90% cell viability ²
Cost	Low	Medium	High	Medium

A. Extrusion ;

La bio-impression par extrusion est la méthode la plus commune pour créer des structures 3D. Elle consiste à appliquer une pression sur un gel contenant des cellules pour le forcer à passer par une buse pour contrôler sa dimension. Cette méthode convient aux bioencres ayant une viscosité élevée ($30 - 6 \times 10^7$ mPa*s) et limite donc le choix des bioencres disponibles (Kyle, Jessop, Al-Sabah, & Whitaker, 2017). Cette méthode peut exercer un stress important sur les cellules dans le gel et donc diminuer la viabilité cellulaire. Il est donc important de bien contrôler les paramètres affectant l'extrusion.

B. Jet d'encre ;

Cette méthode de bio-impression consiste à faire passer une bioencre à travers un système thermal, piézoélectrique ou électromagnétique pour isoler une goutte de bioencre à la fois. En

ajustant la grosseur des gouttes et la distance entre elles, il est possible de contrôler la dimension des lignes imprimées et la position exacte des gouttes contenant des cellules dans une structure complexe. Cette méthode est souvent combinée avec l'extrusion pour créer des structures contenant différentes cellules dans des endroits stratégiques de la structure.

C. Transfert assisté par laser ;

La bio-impression par laser est une méthode utilisant un laser qui propulse des gouttes de gel sur le substrat pour créer une structure 3D. Cette méthode demande un temps d'impression et un coût élevé. Contrairement à la méthode par extrusion, il est très difficile de fabriquer une bio-imprimante par laser maison.

D. Stéréolithographie (Arslan-Yildiz et al.) ;

La SLA utilise une source de lumière telle que les rayons UV pour initier le processus de réticulations dans un bain de gel et donc de durcir les endroits désirés pour créer une structure complexe. Cette méthode permet une grande précision d'impression, mais le processus est long, les rayons UV peuvent diminuer la survie cellulaire et les bioencres sont limités, car elles doivent être photosensibles.

E. FRESH (« Freeform Reversible Embedding of Suspended Hydrogels »);

La méthode FRESH consiste à extruder une bioencre dans un gel qui sert de support temporaire. Cette méthode est donc une sous-méthode de la bio-impression par extrusion classique (Figure 1.2). Le matériel de support, généralement un bain de microbilles en gélatine, permet à la bioencre de garder sa forme lorsqu'elle se dépose et évite qu'elle se déforme en extrudant plusieurs couches. Une fois la structure complétée, on peut retirer le support en chauffant tout simplement les billes de gélatine, et ainsi garder la partie extrudée.

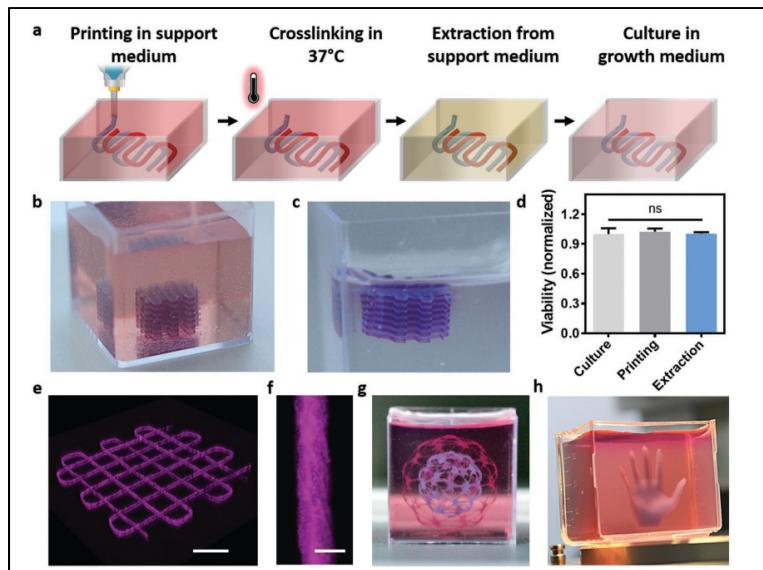


Figure 1.2 Présentation de la méthode FRESH. Processus d’extrusion d’une bioencre dans un bain de support
Tirée de Noor et al. (2019)

Dans le cadre de cette maîtrise, on s’intéresse exclusivement à la bio-impression par extrusion, qui est décrite plus en détail dans la section suivante.

1.1.3 Bio-impression par extrusion : principe et principaux attributs

1.1.3.1 Principe de la bio-impression par extrusion

Tel que mentionné plus haut, la bio-impression 3D par extrusion est la plus courante des techniques de bio-impression 3D (Tao Jiang, Munguia-Lopez, Flores-Torres, Kort-Mascort, & Kinsella, 2019). L’extrusion peut se faire par pression pneumatique, mécanique à l’aide d’un piston ou mécanique par vis-sans-fin (Figure 1.3) (Tao Jiang et al., 2019).

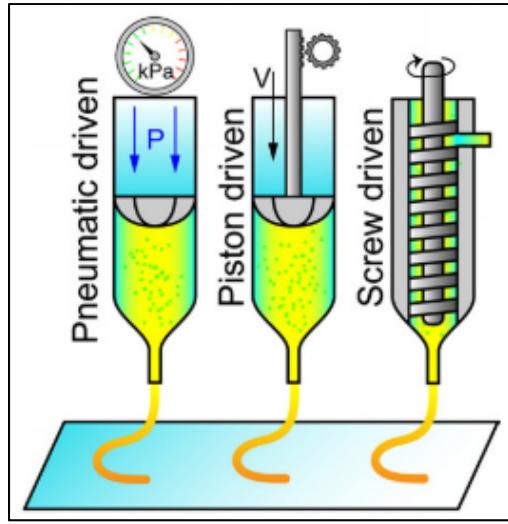


Figure 1.3 Types de bio-impression par extrusion
Tirée de Tao Jiang et al. (2019)

L’extrusion par contrôle de pression pneumatique permet d’appliquer une pression constante sur le gel (ou encre) qu’on cherche à extruder à l’aide d’un système pneumatique simple. L’air exerce une pression sur un piston qui, à son tour, distribue la pression également sur la surface du gel à extruder. Plus on augmente la pression de l’air, plus le gel sera extrudé rapidement. Cette méthode permet une extrusion rapide et est peu coûteuse. Par contre, lorsque la bioencre a des propriétés variant au cours du temps, comme c’est le cas de l’hydrogel thermosensible que nous utiliserons dans le cadre de cette maîtrise, il devient plus risqué d’utiliser cette méthode. Étant donné que le gel se solidifie au cours du temps, il sera plus facile de l’extruder au temps zéro que vers la fin de l’impression. La pression appliquée étant constante tout au long de l’impression, le volume extrudé diminue dans le temps, ce qui affecte la qualité et la répétabilité de l’impression. Pour régler cette problématique, on utilise l’extrusion par contrôle de volume. Cette méthode d’extrusion utilise un système mécanique pour générer le processus d’extrusion. Il est possible d’utiliser un système de fin-sans-fin ou un piston mécanique à contrôle de vitesse. À l’aide de cette méthode, la force appliquée par le moteur électrique s’adapte en fonction de la vitesse du volume extrudé désiré. On s’assure donc d’extruder la même quantité de matière tout au long de l’impression.

Il existe de nombreuses bio-imprimantes 3D utilisant ce principe. On peut notamment citer les appareils BioAssemblyBot (Advanced Solutions), RX1 (Aspect Biosystems), Bio X (Cellink). Au LBeV (Laboratoire de Biomatériaux Endovasculaires), notre équipe est équipée d'un 3DDiscovery de la compagnie RegenHu (Suisse) (Figure 1.4 A).

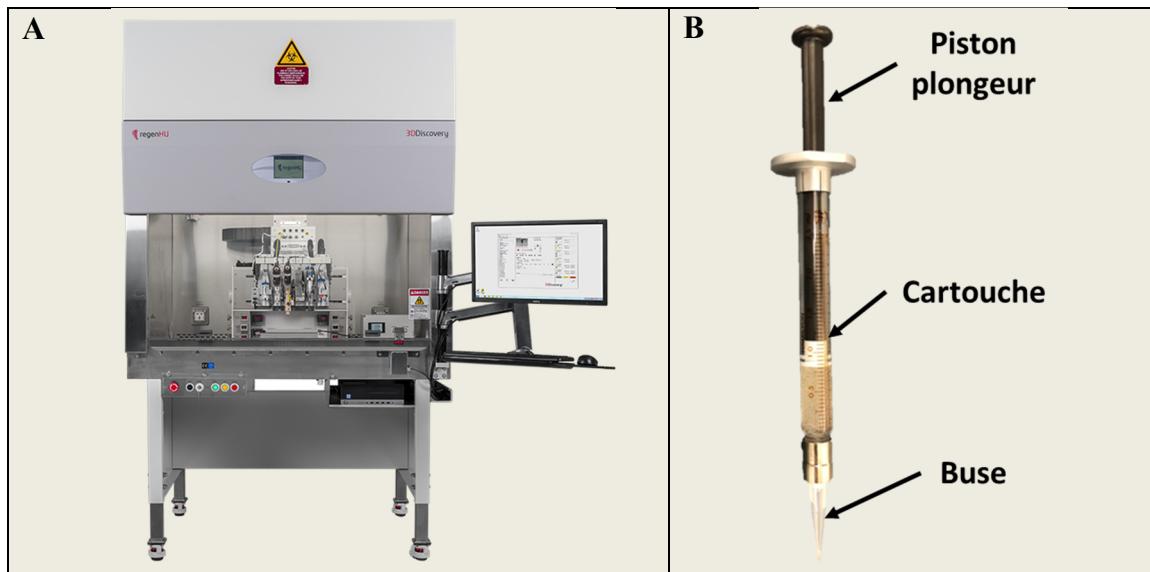


Figure 1.4 A) Bio-imprimante 3DDiscovery (RegenHu). B) Système d'extrusion par contrôle de volume, avec piston à vis sans fin

Tirée du site wakoautomation (www.wakoautomation.com/products/3d-bioprinting-regenhu)

Composantes d'un système de bio-impression par extrusion à contrôle de débit:

La bio-impression par extrusion à contrôle de débit nécessite d'utiliser certaines composantes propres à cette méthode et d'autres plus générales. Les composantes de la bio-imprimante par extrusion à contrôle de débit 3DDiscovery de RegenHu sont expliquées plus en détails ci-dessous (Figure 1.4 B).

Cartouche : cette composante sert à contenir la bioencre. La cartouche est à la température ambiante au repos. Par contre, il est possible de contrôler cette température à l'aide d'une circulation de fluide. Cette capacité permet de modifier les propriétés de la bioencre utilisée au besoin.

Piston plongeur : cette composante permet l'extrusion de la bioencre. À l'aide d'un moteur électrique et d'une vis-sans-fin, on contrôle la vitesse de déplacement du piston et donc le débit d'extrusion. Cette composante limite la viscosité maximale de la bioencre à extruder et le débit maximal d'extrusion.

Buse : cette composante est critique lors du procédé d'extrusion pour contrôler la dimension des lignes et l'effet de la contrainte appliquée sur les cellules. La dimension du diamètre d'extrusion se contrôle en utilisant des numéros de gauge normalisés. La buse est à température ambiante, mais peut également être chauffée pour permettre un meilleur contrôle des propriétés de la bioencre au moment de l'extrusion. La buse la plus utilisée est de forme conique (Figure 1.5) (Daly, Critchley, Rencsok, & Kelly, 2016). Les études précédentes ont en effet déterminé que ce type de buse diminue la contrainte de cisaillement appliquée sur le gel et augmente par conséquent le taux de survie cellulaire (Gillispie et al., 2020) et (Cidonio, Glinka, Dawson, & Oreffo, 2019).

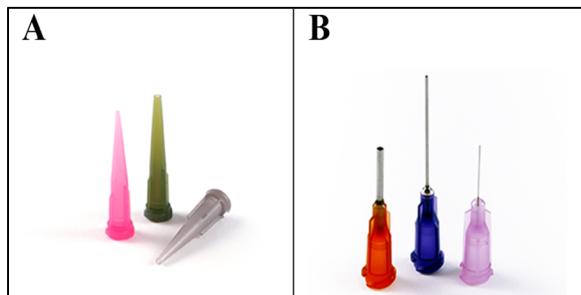


Figure 1.5 Types de buse d'extrusion;
 A) conique et B) droite
 Tirée du site Nordson
 ([https://www.nordson.com/en/divisions/efd
 /products/dispense-tips](https://www.nordson.com/en/divisions/efd/products/dispense-tips))

Plusieurs paramètres de la bio-imprimante tels que le débit, affectant la vitesse de déplacement du piston plongeur, seront décrits dans la section suivante.

1.1.3.2 Paramètres du procédé influençant la structure bio-imprimée

La bio-impression par extrusion se contrôle à l'aide de plusieurs paramètres ajustables sur la bio-imprimante. La modification de ces paramètres a un effet sur les contraintes ressenties par le gel lors de l'extrusion et sur la façon dont le gel s'extrude. Ces paramètres sont donc détaillés ci-dessous :

Vitesse de déplacement : la vitesse de déplacement en x et y de la buse est choisie manuellement. La vitesse choisie impacte directement le temps nécessaire pour réaliser la bio-impression, mais aussi la largeur de lignes extrudées si l'on garde les autres paramètres constants (débit et diamètre de la buse). En augmentant la vitesse de déplacement, le temps d'impression diminue et la largeur des lignes extrudées diminue, car on diminue la quantité de matière déposée par unité de longueur. Cependant, chaque imprimante a une vitesse de déplacement maximum. De plus, la vitesse de déplacement est limitée par la nécessité d'avoir des lignes continues et une déposition de matière précise. Or en augmentant la vitesse de déplacement, la taille des filaments extrudés diminue jusqu'à en arriver à se briser et à créer des discontinuités.

Débit / pression : le contrôle du débit se fait directement sur le programme de l'imprimante, on peut donc choisir le volume de matière extrudée par seconde. Ce paramètre influence plusieurs facteurs lors de l'extrusion. En effet, augmenter le débit : augmente le stress appliqué sur le gel et donc sur les cellules ; augmente la largeur des lignes extrudées ; augmente la hauteur des couches de gel. Il est donc important de changer ce paramètre en fonction du gel utilisé et des dimensions de lignes désirées. On cherche généralement à diminuer le débit pour diminuer la taille des lignes et donc augmenter la précision d'impression tout en diminuant la contrainte ressentie par les cellules. Par contre un débit trop faible crée des discontinuités dans l'extrusion.

Diamètre : le diamètre de la buse d'extrusion influence directement la dimension des lignes extrudées et le stress appliqué sur le gel. En diminuant le diamètre, on diminue la largeur et l'épaisseur des lignes extrudées. En changeant le diamètre, il faut également adapter le débit et la hauteur des couches pour optimiser l'extrusion et diminuer la dimension des lignes et le stress appliqué sur le gel. On cherche à diminuer le diamètre d'extrusion pour diminuer la dimension des lignes extrudées, mais une valeur trop petite peut créer un stress important dans le gel et des discontinuités dans l'extrusion des lignes.

Hauteur : la hauteur entre chaque couche (en z) se contrôle via le programme de création du code G qui guide la fabrication de la structure. C'est ce paramètre qui détermine le nombre de couches pour réaliser la structure désirée. Une hauteur faible compresse le gel extrudé et le force à s'étendre. Une hauteur trop élevée peut empêcher la cohésion de la structure. On doit donc choisir une hauteur optimale à la déposition de matière adéquate.

Outre ces paramètres d'impression, les propriétés de la bioencre sont déterminantes pour une bio-impression réussie. Elles influencent sa résolution, sa reproductibilité, les propriétés mécanique de la structure imprimée au cours du temps, ainsi que la survie et le comportement général des cellules contenues dans la structure. Pour évaluer le résultat de la bio-impression 3D, le terme « printability » (qui pourrait se traduire par imprimabilité) est utilisé. Dans la prochaine section, on définit ce qui est considéré comme étant une impression réussie.

1.1.3.3 « Printability » ou comment évaluer une structure bio-imprimée

Jusqu'à il y a quelques années, l'imprimabilité (« printability ») était définie comme la capacité d'un papier à bien accueillir l'encre. Pour avoir une bonne imprimabilité, il doit être capable d'accepter l'encre et la garder (Gillispie et al., 2020). Cette définition doit donc être mise à jour.

Plusieurs équipes utilisent maintenant le terme « printability » (imprimabilité) pour englober l'ensemble des attributs importants d'une bioencre et pour identifier la capacité d'un gel à servir de bioencre. Cette nouvelle utilisation du terme n'est pas proprement définie et est libre à interprétation. En effet, chaque équipe de recherche utilise sa propre définition. Voici quelques-unes des définitions proposées :

- “The ability of a material, when subjected to a certain set of *printing conditions*, to be printed in a way which results in *printing outcomes* which are desirable for a given application.” (Gillispie et al., 2020)
- “The properties that facilitate handling and deposition by the bioprinter.” (Atala, 2014)
- “The relationship between bioinks and substrates that results in printing an accurate, high-quality pattern.” (Kyle et al., 2017)

Une bioencre peut donc correspondre ou non à la définition de « printability » dépendant de la définition choisie. En général, on qualifie d'imprimable une bioencre permettant une bonne fidélité de forme, des propriétés mécaniques appropriées à la situation et une intégration avec les cellules favorable à leur survie. Le degré avec lequel ces conditions sont respectées est à juger selon chaque chercheur. Il est donc important de prendre en considération l'objectif principal de la structure imprimée et également la méthode d'impression.

Certains groupes de recherche vont déterminer qu'une bioencre est imprimable seulement sur le fait qu'elle garde sa forme après l'extrusion d'une couche de matière. Il se peut pourtant que cette encre ne supporte pas plusieurs couches successives de matière et ne permette donc pas de créer une structure 3D complexe. Aussi, certaines équipes de recherche n'analysent pas l'aspect biologique de la bioencre pour déterminer l'imprimabilité d'une bioencre ((Gillispie et al., 2020) & (Gopinathan & Noh, 2018)). Pourtant, un hydrogel ne permettant pas une bonne survie et une prolifération cellulaire ne se qualifie pas comme véritable bioencre. L'aspect mécanique est aussi souvent oublié lorsqu'on parle d'imprimabilité. Les propriétés mécaniques de la structure imprimée sont tout aussi importantes que la survie cellulaire ou la forme des filaments, car on doit obtenir les propriétés mécaniques nécessaires à la cohésion et à la manipulation de la structure, puis à la différenciation cellulaire et à l'incorporation de la

structure dans le corps humain. Le terme imprimabilité doit donc être redéfini pour uniformiser les différentes études et prendre en compte tous les aspects nécessaires pour déterminer la validité d'une bioencre.

C'est pourquoi nous jugeons utile, ci-dessous, de redéfinir les attributs d'une bioencre idéale, ainsi que les spécifications techniques qui peuvent y être associées pour éventuellement avoir une définition du terme « printability » qui regroupe mieux les besoins réels.

1.2 Évaluation de l'extrusion (cahier des charges d'une bioencre idéale)

1.2.1 Attributs d'une bioencre idéale

Les attributs d'une bioencre pour la bio-impression par extrusion sont nombreux. Ils se regroupent en trois grandes catégories.

Principaux attributs d'une bioencre :

- A. Créer la structure 3D désirée avec fidélité de forme et reproductibilité ;
- B. La structure imprimée doit être cohésive et manipulable, pour la culture 3D et ultimement son utilisation en modèle 3D in vitro ou chez le patient ;
- C. Elle doit être biocompatible (formée de biomatériaux reconnus comme non toxiques) ;
- D. Elle doit permettre une bonne survie, croissance et différentiation des cellules, durant le procédé d'impression mais aussi après, lors de la maturation de la structure imprimée. L'extrusion générant des contraintes de cisaillement sur la bioencre et donc sur les cellules (Emmermacher et al., 2020), il peut donc y avoir un lien entre l'extrudabilité et cet attribut dit 'biologique' ;
- E. Dans la plupart des cas, la bioencre doit être biorésorbable, afin de laisser la place à la matrice extracellulaire (MEC) synthétisée par les cellules encapsulées. La structure doit alors se dégrader à un rythme semblable à la fabrication de la MEC.

Contraintes :

- A. Le matériau doit être extrudable;
- B. Le matériau doit être stérilisable avant d'y ajouter les cellules.

1.2.2 Spécifications techniques

Afin de comparer différents matériaux, il est essentiel de déterminer des spécifications techniques correspondant aux attributs ci-dessus. Dans le cadre de cette maîtrise, nous nous concentrerons sur les attributs concernant les aspects physiques et mécaniques, soit la fidélité de forme, la résolution et la reproductibilité ainsi que les propriétés mécaniques. Dans cette section, nous présenterons différents types de tests et spécifications techniques pouvant servir à caractériser ces attributs, d'après la revue de littérature.

1.2.2.1 Attributs physiques :

Plusieurs méthodes ont été proposées pour évaluer la capacité de bioencre à former des structures fidèles et reproductibles. On peut analyser les dimensions et la forme de filaments extrudés, à la sortie de la buse, ou lors de la déposition sur le substrat et sur les différentes couches subséquentes. Le filament extrudé a un comportement différent lorsqu'il sort de la buse et lorsqu'il entre en contact avec le substrat. La réaction avec le substrat diffère de celle des couches subséquentes, car l'énergie de surface est différente et donc la forme que prendra le gel au contact également (Habib, Sathish, Mallik, & Khoda, 2018), (Ribeiro et al., 2017) et (Schwab et al., 2020). Ces différences s'observent en mesurant les dimensions du filament (épaisseur et largeur) et sa forme générale (continuité et uniformité). Il est également possible d'évaluer la capacité d'un gel à maintenir sa forme pour créer des porosités latérales. Ces différents comportements observables et mesurables sont décrits ci-dessous.

A. Fidélité de forme ;

Afin de déterminer si le gel crée des structures produisant les formes voulues et de manière reproductible, la forme des filaments suite à l'extrusion peut être étudiée. Plus précisément, on peut évaluer les dimensions, la continuité et l'homogénéité des filaments lors de l'extrusion,

ou une fois déposé sur le substrat ainsi que la fidélité de forme, c'est-à-dire la capacité d'une bioencre à garder sa forme après déposition ((Ouyang, Yao, Zhao, & Sun, 2016), (Habib et al., 2018), etc.) (Figure 1.6).

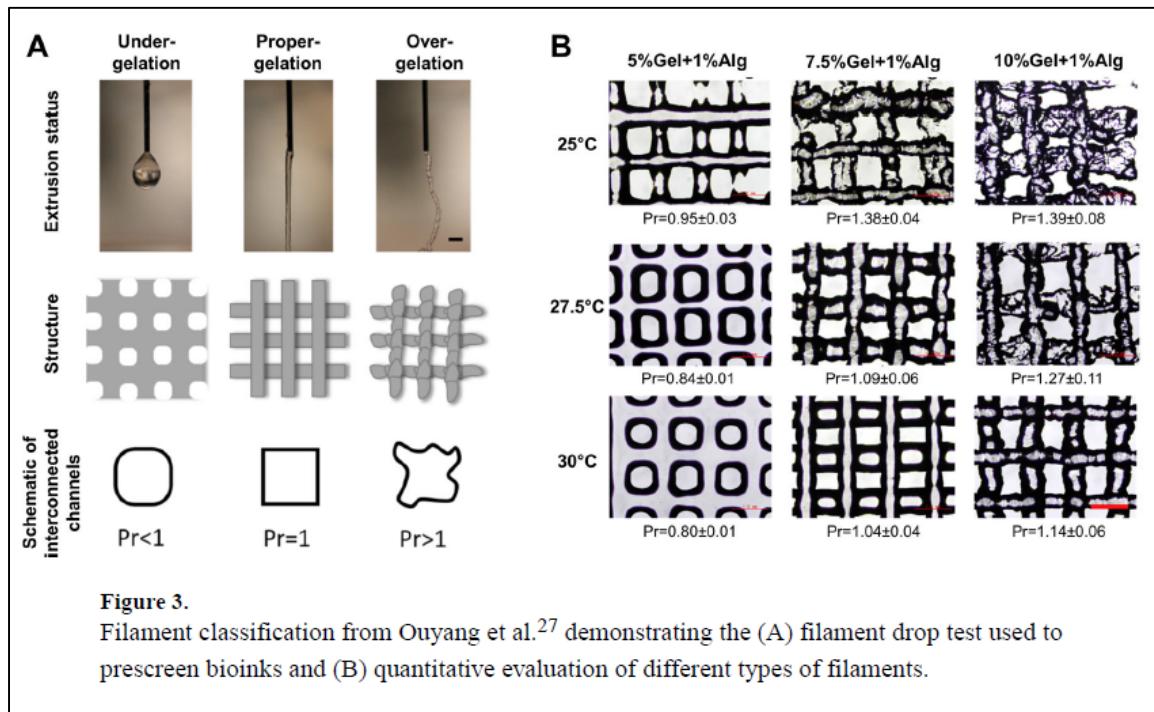


Figure 1.6 Classification des filaments lors de l'extrusion. A : Le degré de gélification (sous gélifié, bien gélifié ou sur-gélifié) influence la forme du gel extrudé et la forme du gel déposé. B : La fidélité de forme est différente selon le gel utilisé et son degré de gélification

Tirée de Ouyang et al. (2016)

On peut ainsi comparer l'aire théorique et l'aire pratique de la porosité de façon semi-quantitative (Kiyotake, Douglas, Thomas, Nimmo, & Detamore, 2019) alors qu'elle peut être mesurée comme c'est le cas pour cette étude et d'autres (Ouyang et al., 2016) (Habib et al., 2018). Pour quantifier ces données, on utilise le ratio Pr (aire pratique/ aire théorique) (Ouyang et al., 2016). Une bioencre ayant une fidélité de forme faible peut être extrudée, mais le gel tend à s'étendre suite à la déposition, ce qui limite la structure en terme de hauteur atteignable et crée des filaments larges. Ainsi, il est possible d'évaluer la déposition des filaments en mesurant le ratio d'aire des porosités. Un ratio Pr de 1 vient indiquer que l'aire du carré

imprimé est identique à l'aire théorique. Un ratio $0,9 < \text{Pr} < 1,1$ viendrait indiquer une uniformité acceptable. Un ratio $\text{Pr} < 0,9$ indique un gel qui tend à s'étaler à la suite de la déposition, alors qu'un ratio $\text{Pr} > 1,1$ indique une porosité plus grande que prévu (Ouyang et al., 2016).

B. Effondrement du filament ;

Lorsque la structure imprimée doit posséder des pores latéraux, les filaments extrudés doivent résister à la gravité et pouvoir s'étendre entre deux points de contacts. La capacité de la bioencre à créer des structures poreuses est essentielle car la présence de pores crée une meilleure oxygénation et un meilleur apport de nutriments pour les cellules dans la structure. L'équipe de Habit et al. (2018) a proposé d'analyser l'effondrement des filaments le long d'une structure rectiligne dont les espacements varient (Figure 1.7). Il est donc possible d'analyser la capacité d'un gel à créer des porosités latérales.

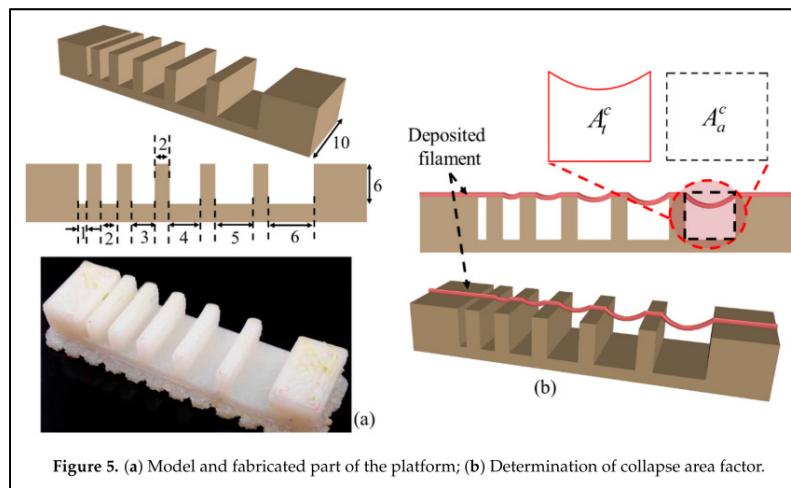


Figure 5. (a) Model and fabricated part of the platform; (b) Determination of collapse area factor.

Figure 1.7 Test d'effondrement de filament
Tirée de Habib et al. (2018)

C. Résolution d'impression ;

Le dictionnaire LAROUSSE définit la résolution comme étant le « Le plus petit incrément de distance qui peut être mesuré et atteint par un système de commande automatique. »

En impression 3D, la résolution fait référence à la plus petite dimension atteignable par les paramètres d'extrusion (Ersamo, Witherel, & Spiller, 2016), (Gillispie et al., 2020) et (Habib

et al., 2018). La résolution est influencée par plusieurs paramètres d'impression (débit, vitesse, diamètre, hauteur, etc.) et par les propriétés du gel lui-même. La non-uniformité du filament déposé vient influencer la résolution, car le filament peut être plus gros à certains endroits. La fidélité de forme vient aussi influencer la résolution, car un filament qui résiste à la force de la gravité et qui garde sa forme post-extrusion a moins tendance à s'étaler et donc à augmenter de largeur.

1.2.2.2 Attributs mécaniques :

Il existe plusieurs méthodes et spécifications techniques pour caractériser les propriétés mécaniques de structures bio-imprimées en 3D. Leur choix dépend de l'application de la structure 3D et des propriétés clés de la structure à imiter. Par exemple, on peut s'intéresser aux propriétés en tension, en cisaillement ou en compression pour connaître le comportement de la structure suite à l'implantation (Maciulaitis et al., 2016). Dans le cadre de ce projet, on s'intéresse surtout aux structures servant à mimer des tissus mous tels que du cartilage. L'accent sera donc mis sur les tests en compression, comme on peut le voir dans la section suivante.

La cohésion et la capacité à être manipulée :

Avant tout, pour déterminer si un gel est propice à la bio-impression, il doit former des structures cohésives et manipulables. Idéalement cette capacité à être manipulé serait immédiate après l'extrusion mais elle peut aussi être obtenue seulement après un processus de réticulation, de gélification ou autre procédé post-extrusion. Pour l'évaluer, on peut observer la capacité du gel à être retiré du substrat d'impression et à conserver l'intégrité de sa structure. La donnée obtenue peut être binaire (oui/non) ou un score semi-quantitatif (grade 1 à 4 par exemple).

Comportement en compression non confinée :

Plusieurs paramètres servant à décrire les propriétés en compression de structures 3D ont été proposées dans la littérature, soit le module de compression, le module de Young équivalent,

le module d'agrégat (« aggregate modulus »), le coefficient de Poisson (Maciulaitis et al., 2016).

Les tests de compression peuvent être confinés ou non confinée mais ces derniers sont les plus utilisés pour étudier l'effet du matériau, de l'architecture, de la porosité et de la dimension des filaments ((Ersamo et al., 2016) et (Mouser et al., 2016)). Pour les structures poreuses soumises en compression, on crée généralement une architecture en nid d'abeille, qui permet de supporter des charges plus grandes que l'architecture rectiligne (Gleadall et al., 2018). En effet, la surface de contact en compression est plus grande pour l'architecture en nid d'abeille que pour une architecture rectiligne pour le même pourcentage de porosité. La structure rectiligne n'offre un point de contact qu'aux croisements des lignes verticales et horizontales, alors que la structure en nid d'abeille offre un contact sur la surface totale.

La difficulté inhérente à la caractérisation mécanique des structures imprimées est que le résultat dépend du type de structure mais aussi de l'épaisseur des filaments (aire de contact réelle), qui est influencé par la nature de la bioencre. Il est donc difficile de caractériser les propriétés du matériau indépendamment de sa résolution.

Le test de compression permet d'obtenir une courbe de contrainte (Compaan, Song, & Huang) selon la déformation (%). Les bioencres ayant généralement un comportement viscoélastique, la vitesse de déformation est importante puisqu'elle influence le module de Young. De plus, le module de Young tangent équivalant, sécant ou moyen (illustrés à la Figure 1.8) doit être utilisé puisque le comportement en compression de ces matériaux est en général non linéaire.

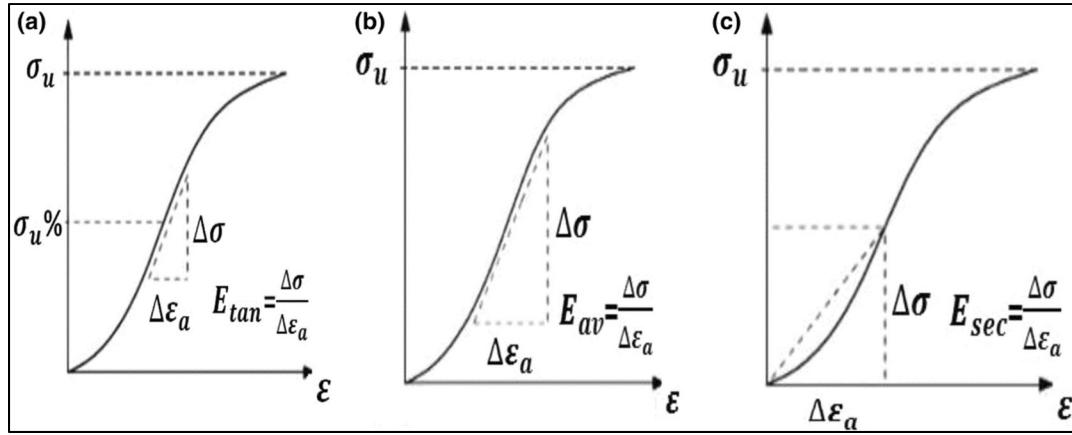


Figure 1.8 Mesure du module de Young selon différentes méthodes : A) Module de Young tangent, B) Module de Young moyen et C) module de Young sécant
Tirée de Davarpanah, Ván, et Vásárhelyi (2020)

Lors d'un test de compression non confiné, il est également possible de mesurer la contrainte maximale pouvant être supportée par la structure (Tan, Parisi, Di Silvio, Dini, & Forte, 2017) ou l'aire sous la courbe contrainte-déformation, ce qui nous donne respectivement la contrainte ultime et la ténacité. Ainsi, pour caractériser une structure en hydrogel imprimée, Liu, Li, Xu, Zheng, et Cao (2018) ont effectué des tests de compression non-confinée pour déterminer la force de compression à une déformation de 90%, la ténacité et le module de compression (partie linéaire élastique de la courbe contrainte-déformation).

D'autres équipes, comme celle de Habib et al. (2018), ont choisi de mesurer le module de Young du matériau imprimé lui-même, à l'aide de nano-indentation, ce qui varie légèrement de la mesure du module de Young équivalent sur une structure poreuse.

1.2.2.3 Attributs cellulaires :

L'aspect cellulaire d'une bioencre est essentiel et souvent négligé. Le gel doit protéger les cellules lors du processus d'impression tout en leur donnant un bon environnement pour que les cellules puissent proliférer (Matai, Kaur, Seyedsalehi, McClinton, & Laurencin, 2020). Dans ce mémoire, nous n'aborderons que l'aspect « mécanique », soit la protection des cellules lors de l'impression.

Lors de l'extrusion, une pression est appliquée à la bioencre et aux cellules qu'elle contient. La pression doit être suffisamment élevée pour procéder à l'écoulement de la bioencre, ce qui crée une contrainte de cisaillement importante sur le gel et sur les cellules dû au frottement du gel contre les parois (Gillispie et al., 2020). Plus la pression appliquée sur le gel est grande, plus la contrainte de cisaillement augmente, ce qui affecte directement le taux de mortalité des cellules ((Schwab et al., 2020); (Gillispie et al., 2020); (Webb & Doyle, 2017)).

Afin d'évaluer le taux de cisaillement appliquée sur la bioencre lors de l'extrusion, le modèle mathématique de la loi de puissance dans la région linéaire de la courbe du taux de cisaillement-viscosité est utilisé (Équation (1.1) (Paxton et al., 2017)).

$$\eta = K * \dot{\gamma}^{n-1} \quad (1.1)$$

Où η (Pa*s) est la viscosité, K et n sont des coefficients de rhéofluidité et $\dot{\gamma}$ (rad/s) est le taux de cisaillement.

En étant rhéofluidifiante, une bioencre peut diminuer la contrainte appliquée aux cellules, car le taux de cisaillement diminue, ce qui permet d'augmenter les chances de survie des cellules lors du processus d'extrusion ((Paxton et al., 2017) (Gillispie et al., 2020), (Schwab et al., 2020), etc).

On peut donc voir ici l'importance des propriétés rhéologiques des bioencres sur leur performance. De plus, il est intéressant d'étudier si la rhéologie permet de prévoir les spécifications physiques et mécaniques détaillées plus haut. La section suivante présente les propriétés clés d'une bioencre en rhéologie d'après la littérature.

1.3 Propriétés rhéologiques de la bioencre influençant la structure bio-imprimée

La rhéologie est la science qui permet de mesurer l'écoulement de la matière ainsi que sa déformation lorsque soumis à une contrainte. Les propriétés rhéologiques permettent de déterminer le comportement d'un matériau non linéaire.

Les tests de rhéologies permettent de mesurer ; une contrainte de cisaillement (τ (Pa)), un taux de cisaillement ($\dot{\gamma}$ (s^{-1})), une déformation de cisaillement (γ (m/m)), la viscosité (η (Pa*s)) ou le module de cisaillement (G(Pa)). Ces termes servent à décrire le comportement rhéologique d'un matériau.

Pour procéder à la mesure de différentes propriétés rhéologiques, les tests sont réalisés et **rotation** ou en **oscillation**. Les tests en **rotation** permettent de mesurer le taux de cisaillement (rad/s), la contrainte de cisaillement (Pa) et la viscosité dynamique (Pa*s). Il est par contre difficile d'évaluer le comportement viscoélastique d'un gel. Pour ce faire, on utilise un test d'**oscillation**, en contrôlant l'amplitude de déformation (%) et la fréquence (Hz), il est possible de mesurer le module de cisaillement (Pa). Le test d'oscillation suit le modèle d'une courbe sinusoïdale. Afin d'obtenir une mesure exacte lors d'un test d'oscillation, la fréquence et l'amplitude doivent être sélectionnées afin de rester dans la zone linéaire viscoélastique (« linear viscoelastic region » (LVE) du matériel testé. Ces valeurs ont été choisies afin de s'assurer que les paramètres de stimulation tels que la fréquence et l'amplitude n'aient pas d'effets sur les propriétés rhéologiques du gel et donc sur la validité des résultats. La Figure 1.9 présente le déphasage (δ) entre la réponse du gel et la courbe de contrôle permettant de décomposer le module complexe de cisaillement (G^*) en module de conservation (G') et en module de perte (G'').

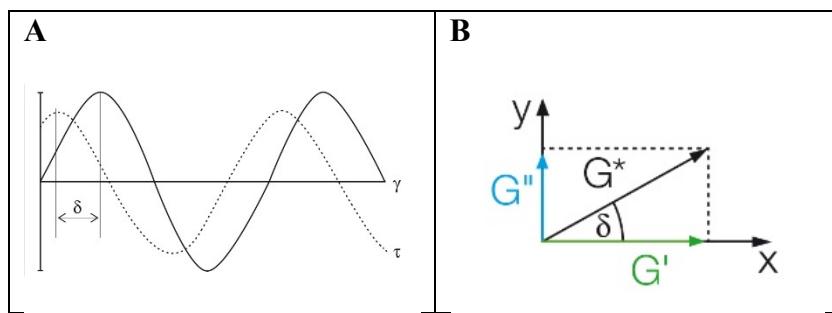


Figure 1.9 A) Déphasage entre la mesure de la contrainte de cisaillement et la déformation appliquée (δ). B) Module de cisaillement complexe décomposé et module de conservation (G') et de perte (G'')

Tirée de Anton-Paar (<https://wiki.anton-paar.com/ca-en/basics-of-rheology/#rotational-tests-and-viscosity>)

Le module de conservation représente le comportement solide ou élastique du gel et le module de perte, le comportement visqueux ou liquide. Lorsque le $G' > G''$, le gel se comporte majoritairement comme un solide, alors que lorsque le $G' < G''$, le gel se comporte majoritairement comme un liquide (Ouyang et al., 2016).

1.3.1 Configuration du rhéomètre

Afin de mesurer les propriétés rhéologiques des bioencres, un rhéomètre est utilisé. Plusieurs configurations peuvent être utilisées, soit cylindre-concentrique, cône plaque, plaque-parallèle, etc. Ces différentes configurations permettent de tester des gels ayant différentes propriétés rhéologiques.

A. Cylindre-concentrique (CC) :

Cette configuration permet de tester des gels ayant une viscosité faible entre 6×10^{-5} et 4×10^8 Pa*s (Anton Paar spécialiste de produit Dhriti Khandal). Les gels de chitosane développés par le laboratoire LBeV ont une viscosité comprise dans cette étendue (Rahimnejad, Labonté-Dupuis, Demarquette, & Lerouge, 2020). La quantité de matière déposée dans une configuration CC est plus élevée que dans les autres, ce qui diminue l'effet de l'évaporation sur les propriétés mesurées du gel.

B. Cône-plaque (CP) ;

La configuration cône-plaque permet d'appliquer un cisaillement constant sur le gel testé. Elle permet d'utiliser une faible quantité de matière pour réaliser le test, mais les particules du gel ne doivent pas être plus grandes que 10µm.

C. Plaque-parallèle (PP) ;

Cette configuration permet de tester des échantillons sous forme de gel solide ou très visqueux. Par exemple, une plaque parallèle de 50mm peut convenir à des échantillons ayant une viscosité entre 3×10^{-6} et 2×10^7 Pa*s. Un système PP permet d'appliquer un cisaillement moyen sur l'échantillon. La valeur de la contrainte de cisaillement pouvant être mesurée est moins précise que celle donnée par CP, mais elle permet de mesurer une moyenne sur un gel ayant des particules plus grandes que 10µm. Les systèmes de PP et de CP sont tous deux limités en fonction du taux de cisaillement appliqué par les propriétés de l'échantillon testé. Par exemple, si un gel n'est pas assez cohésif, il sera expulsé du système à un taux de cisaillement critique, rendant la mesure de propriétés rhéologiques à un taux de cisaillement supérieur impossible (Paxton et al., 2017). La configuration est utilisée par l'équipe ayant développé le gel d'ALG3GEL7 utilisé comme contrôle dans cette étude est PP25 (T. Jiang et al., 2017).

1.3.2 Viscosité et rhéofluidité :

La viscosité mesure le frottement interne des molécules et particules dans le gel et donc la capacité d'un gel à résister à l'écoulement lorsque soumis à une contrainte (Schwab et al., 2020). Tel que discuté plus haut, il est important que la bioencrure utilisée soit rhéofluidifiante, car cette propriété permet de protéger les cellules vivantes présentes dans le gel et elle permet au gel d'être extrudé plus facilement (Schwab et al., 2020). Un matériau est dit rhéofluidifiant lorsque la viscosité du matériau diminue lorsqu'on augmente la contrainte appliquée (Habib et al., 2018). Ce phénomène s'explique par le fait que la contrainte de cisaillement appliquée est suffisamment grande pour venir briser les liens physiques entre les chaînes, ce qui leur permet de passer d'un état courbé à lisse et de mieux glisser entre-elles et donc de diminuer la viscosité

(Q. Liu et al., 2018). En étant moins visqueux, le gel crée moins de résistance et passe plus facilement dans la buse pour être extrudé (Tao Jiang et al., 2019).

La baisse de viscosité lors de l'augmentation du taux de cisaillement contribue à protéger les cellules lors du processus d'extrusion (Gillispie et al., 2020). En diminuant la viscosité du gel lors de l'extrusion, la force nécessaire pour extruder le gel diminue également, car le gel offre moins de résistance à l'écoulement (Schwab et al., 2020). Cette baisse de résistance à l'écoulement crée une diminution de la contrainte de cisaillement appliquée à la frontière du gel et de la buse d'extrusion. En diminuant la contrainte de cisaillement appliquée sur le gel, on diminue la contrainte appliquée sur les cellules présentes dans le gel, ce qui augmente leur chance de survie au processus d'extrusion (Schwab et al., 2020), (Gillispie et al., 2020), (Webb & Doyle, 2017).

Pour vérifier qu'un gel est rhéofluidifiant, on utilise un rhéomètre et on mesure la viscosité du gel selon le taux de cisaillement appliqué (Figure 1.10). Certains gels ont une capacité rhéofluidifiante plus importante que d'autres, ce qui protège plus ou moins bien les cellules.

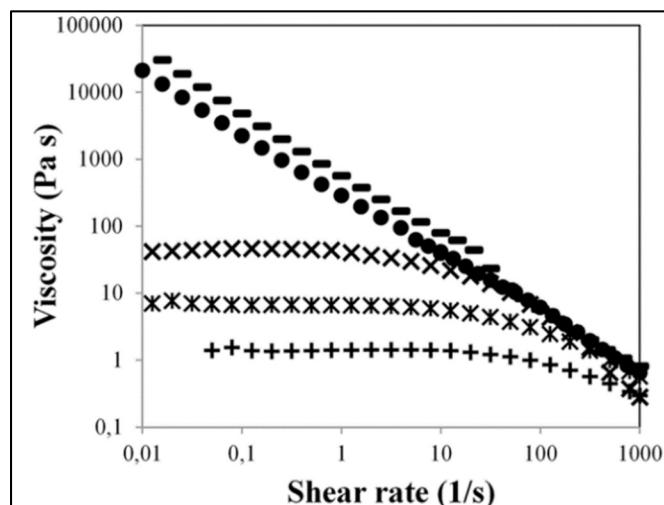


Figure 1.10 Test de rhéofluidité. On observe que la viscosité des matériaux testés tend à diminuer à différents rythmes en augmentant le taux de cisaillement
Tirée de Markstedt et al. (2015)

1.3.3 Contrainte d'écoulement :

Plusieurs équipes utilisent la contrainte d'écoulement comme une caractéristique déterminant l'imprimabilité d'une bioencre ainsi que pour sa capacité à résister à la déformation due à la gravité ((Emmermacher et al., 2020), (Tao Jiang et al., 2019), (Gillispie et al., 2020), (Kiyotake et al., 2019), (Mouser et al., 2016), etc.). La contrainte d'écoulement vise à déterminer à partir de quelle contrainte de cisaillement le gel commence à s'écouler (Figure 1.11).

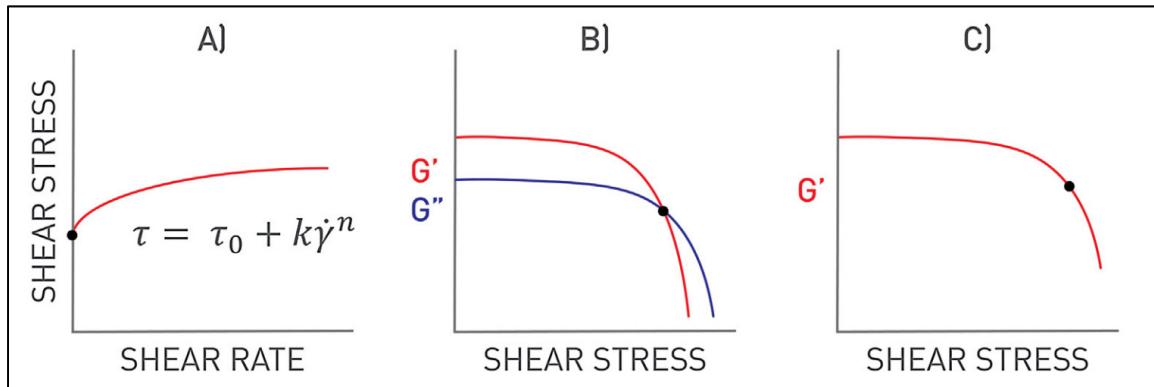


Figure 1.11 Différentes méthodes pour déterminer la contrainte d'écoulement. A) Selon le modèle mathématique de Herschel-Bulkley (HB). B) Au croisement du module de conservation et de perte ($G' = G''$). C) Lorsque le module de conservation baisse de 10% par rapport à la région linéaire
Tirée de Townsend, Beck, Gehrke, Berkland, et Detamore (2019)

Il existe plusieurs types de tests rhéologiques pour déterminer la contrainte d'écoulement d'un gel : balayage de taux de cisaillement; rampe d'amplitude; rampe de contrainte de cisaillement (Tao Jiang et al., 2019) et autres :

- A. Le balayage de taux de cisaillement consiste à augmenter le taux de cisaillement en mesurant la contrainte de cisaillement (Figure 1.11 A). La contrainte d'écoulement est considérée lorsque la courbe présente une asymptote au taux de cisaillement le plus bas ;

- B. Une méthode très utilisée consiste à déterminer la contrainte d'écoulement à l'aide d'une rampe d'amplitude. Ce test consiste à mesurer le module de conservation (G') du gel en fonction de la contrainte de cisaillement appliquée. Ce test peut être réalisé en contrôlant la contrainte de cisaillement (Pa) ou bien la déformation de cisaillement (%). Comme il est difficile de contrôler avec précision la contrainte de cisaillement (car cette valeur dépend de la viscosité du gel et le rhéomètre doit donc adapter la stimulation en permanence), nous avons choisi le mode de contrôle de la déformation de cisaillement. Ainsi, on contrôle directement le mouvement de la machine peu importe la viscosité du gel ;
- C. La 3^e méthode consiste à mesurer la viscosité lors d'un test en rotation en contrôlant la contrainte de cisaillement appliquée. La contrainte d'écoulement est déterminée lorsque la viscosité est à son maximum.

Une contrainte d'écoulement élevée indique qu'une pression élevée est nécessaire pour initier l'extrusion et on viendrait donc créer une grande contrainte sur les cellules présentes dans le gel. Une contrainte d'écoulement basse ou nulle viendrait indiquer que le gel coule naturellement et ne nécessite aucune force externe pour s'écouler à travers l'aiguille d'extrusion (Townsend et al., 2019).

La contrainte d'écoulement peut être mesurée à différents endroits lors du test de rampe d'amplitude. En effet, certaines équipes considèrent la contrainte d'écoulement : lorsque le rhéomètre donne une valeur hors limite (Figure 1.11 A) (Mouser et al., 2016), à l'intersection entre le module de conservation et le module de perte (Figure 1.11 B) suite à l'écoulement (Kiyotake et al., 2019), lorsque la valeur du G' a diminué de 10% par rapport au plateau (Figure 1.11 C) (Townsend et al., 2019).

1.3.4 Récupération (« recovery ») :

Le test de récupération permet d'évaluer le comportement de recouvrement du gel suite à l'application d'une contrainte élevée (Tao Jiang et al., 2019), ainsi que le caractère thixotropique du gel (variation des propriétés d'écoulement en fonction du temps. Un test de recouvrement permet de comprendre comment se comporte le gel aux moments critiques du processus d'extrusion, notamment lors de l'extrusion et juste après l'extrusion. La Figure 1.12 présente un exemple de test de recouvrement.

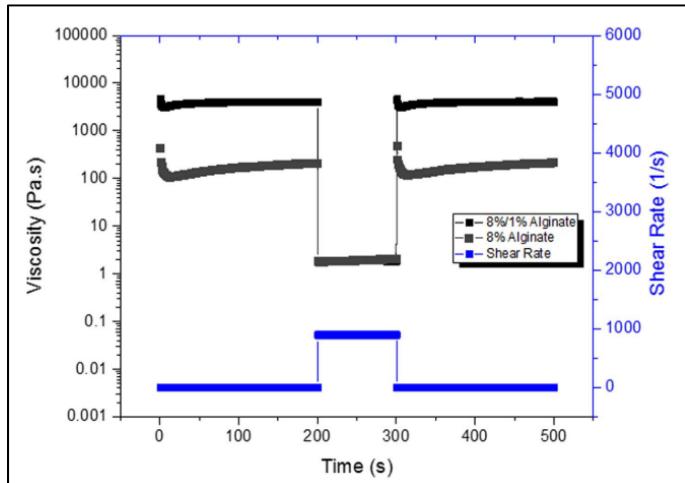


Figure 1.12 Test de récupération effectué sur deux gels d'alginate (la figure présente la viscosité au cours du test, mais on peut également le faire avec le G' et G'')

Tirée de Paxton et al. (2017)

La première phase vient simuler l'état de repos, où la bioencre est dans la cartouche avant d'être extrudée. On utilise un taux de cisaillement très faible pour pouvoir mesurer les propriétés sans altérer la bioencre. La deuxième phase vient simuler l'extrusion en appliquant un taux de cisaillement au gel (1000 s^{-1} à la Figure 1.12) (Paxton et al., 2017). Pour évaluer un plus grand éventail de taux de cisaillement et donc l'effet de paramètres d'extrusion différents, des taux de cisaillement entre 100 et 1000 s^{-1} peuvent être testés ((Tao Jiang et al., 2019) et (Rahimnejad et al., 2020)). On observe l'effet du cisaillement sur le module de conservation

G' de l'hydrogel. Ceci permet encore une fois d'observer le comportement rhéofluidifiant du gel si G' diminue.

La troisième phase est la phase de récupération, lorsque l'on arrête le cisaillement (en gardant un taux de cisaillement minimal pour mesurer la viscosité), ce qui caractérise les propriétés du gel immédiatement après avoir été extrudé. Si le gel ne récupère pas un module G' assez élevé pour supporter d'autres couches de gel, les couches s'étaleront sous le poids des couches subséquentes et il sera impossible de créer une structure 3D complexe de bonne fidélité et ayant des propriétés mécaniques suffisantes.

Le test de récupération permet donc de caractériser à la fois les propriétés pré-extrusion, le caractère rhéofluidifiant du gel ainsi que sa capacité à récupérer rapidement et complètement ses propriétés après l'extrusion. Il n'y a cependant pas de consensus quant au pourcentage de récupération nécessaire pour juger qu'une bioencrure est propice à l'extrusion.

Une récupération d'au moins 85% du G' en 15 secondes est recommandée par l'équipe de Kiyotake travaillant sur ces gels d'alginate (Kiyotake et al., 2019). Ce pourcentage démontre que le gel n'est pas excessivement abîmé par le processus d'extrusion et le temps est important pour s'assurer que le gel récupère avant d'extruder une nouvelle couche de gel sur la précédente. Le pourcentage de récupération est un bon critère pour un gel ayant une viscosité stable pré et post-extrusion. Cependant, lorsque l'écart entre la valeur pré-extrusion et post-extrusion est importante, la valeur de la viscosité peut elle-même être un bon indicateur. L'équipe de Paxton se penche davantage sur le temps pour atteindre une récupération (Paxton et al., 2017). Par contre, tous les gels n'atteignent pas nécessairement une récupération de 100%.

Dans le cas de gels à base d'alginate, le processus de gélification dépend d'une solution de réticulation (CaCl_2), on veut donc avoir une récupération du G' post-extrusion assez rapide pour pouvoir compléter la réticulation de la structure et maximiser la fidélité de forme post-extrusion. Dans le cas du chitosane, le gel et l'agent de gélification sont mélangés au début du processus et la réticulation est dépendante de la température. Il est donc primordial d'évaluer le phénomène de thixotropie du gel pour minimiser les effets de l'extrusion sur les propriétés mécaniques du gel et permettre d'extruder un filament suffisamment solide pour supporter une structure 3D complexe.

1.3.5 Mécanisme de gélification :

Dans le cas des hydrogels de chitosane qui nous intéressent ici, leur gélification physique a lieu sous l'effet de la température et leurs propriétés évoluent au cours du temps. Il est donc important d'évaluer cette évolution et de déterminer notamment le temps de gélification. Le test oscillatoire dit de « time sweep » consiste à suivre l'évolution du module de conservation (G') et du module de perte (G'') au cours du temps.

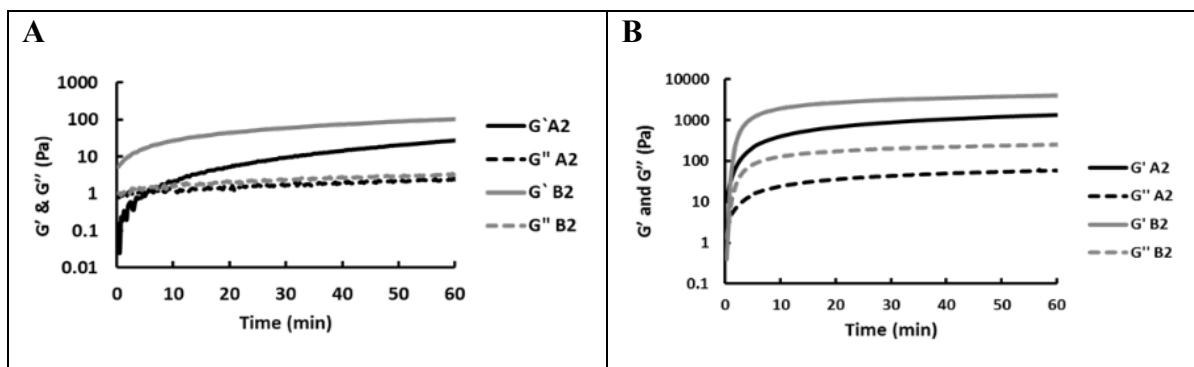


Figure 1.13 Gélification de CH2% développée au LBeV à 22°C (A) et à 37°C (B)

Tiré de Rahimnejad et al. (2020)

Selon l'approche de Winter et Chambon, le temps de gélification est déterminé au croisement des courbes G' et G'' . Lorsque G' dépasse G'' , on considère que le matériel testé se comporte principalement comme un solide et donc qu'il est gélifié (Winter & Chambon, 1986). Un temps de gélification court permet au gel de se solidifier avant de venir imprimer une deuxième

couche. Un temps trop court pourrait mener à un manque de cohésion entre les différentes couches extrudées. Ce type de test rhéologique ne permet donc pas de savoir si les propriétés mécaniques de la première couche seront suffisantes pour supporter plusieurs couches, mais elle vient indiquer si les différentes couches imprimées pourront être réticulées entre elles. De plus, elle permet d'évaluer l'impact de la température du substrat ou de la buse d'extrusion sur la vitesse de gélification.

1.4 Bioencres typiques en extrusion

Comme nous l'avons vu plus haut, une bioencre est un hydrogel permettant d'encapsuler des cellules et former des structures 3D par bio-impression. Plusieurs biomatériaux, souvent des biopolymères, sont actuellement utilisés comme base pour former des bioencres: le plus connu est l'alginate, mais on peut aussi citer l'agarose, le collagène, l'acide hyaluronique (HA) ou le chitosane qui nous intéresse ici (Gopinathan & Noh, 2018). Chaque matériau a ses avantages et ses inconvénients mais il n'existe pour le moment pas de bioencre idéale qui remplisse les besoins en bio-impression 3D. L'un des principaux défis consiste à obtenir à la fois de bonnes propriétés mécaniques, une bonne résolution, une biodégradation contrôlée et une bonne adhésion et prolifération cellulaire, bref à remplir l'ensemble des attributs du cahier des charges que nous avons définis plus haut.

L'**alginate** est un polymère naturel provenant d'algues brunes connu pour sa grande capacité à se lier avec l'eau et permettre aux molécules de bien diffuser à l'intérieur du gel (Gopinathan & Noh, 2018). Son gros avantage est sa capacité à réticuler rapidement en ajoutant des ions de calcium. Par contre, l'alginate pur est difficile à imprimer en plusieurs couches, car sans l'ajoute de l'agent gélifiant, il reste mou et tend à s'écraser sous le poids de plusieurs couches de matières. De plus il n'est pas vraiment biodégradable (Cidonio et al., 2019). Plusieurs polymères peuvent être combinés avec l'alginate, notamment l'agarose (Daly et al., 2016) ou la gélatine. L'utilisation de l'alginate, les différents mélanges et méthodes d'impression utilisées sont bien résumés dans l'article de revue de Liu, Chen et al. (2018). Les bioencres

commercialisées par la compagnie CellInk (Boston, USA) sont pour la plupart à base d'alginate.

La **gélatine** est une protéine obtenue par dénaturation du collagène. Elle est grandement utilisée pour sa très grande biocompatibilité, ses motifs d'adhésion cellulaire, sa capacité hydrophile, sa dégradation rapide etc. (F. Liu et al., 2018). La gélatine est souvent mélangée avec d'autres polymères naturels pour augmenter ses propriétés mécaniques et son intégrité structurelle. La gélatine est liquide à 37°C et ne peut donc pas être utilisée comme bioencre seule. La publication de Liu, Chen et al. (2018) fait une grande description de l'utilisation possible de la gélatine et des différents composés utilisés par certaines équipes de recherche. Il peut donc être intéressant d'utiliser la gélatine pour améliorer les propriétés mécaniques et biologiques du chitosane.

Le **collagène**, protéine structurelle de base des mammifères, est souvent utilisé seul ou combiné à d'autres polymères étant donné sa très grande biocompatibilité. Il peut être réticulé en contrôlant le pH ou la température. Par contre, pour certaines formulations, à 37°C, le temps de gélification est long (30 min) et il devient difficile d'imprimer le collagène seul. Pour pallier à ce défaut, certaines équipes de recherche viennent ajouter de l'alginate de sodium pour ensuite ajouter des chondrocytes (Yang et al. 2017).

L'**agarose** est connue pour ses bonnes propriétés mécaniques et sa biocompatibilité suite à la gélification. Par contre, sa capacité à permettre aux cellules de proliférer est très limitée (Gopinathan & Noh, 2018). Pour remédier à ces problèmes, certaines équipes, dont celle de Kreimendahl et al. (2017), Compaan et al. (2019) Yang et al. (2017) ont commencé à utiliser des mélanges d'agarose et de collagène ou de fibrinogène.

Le **chitosane** est également un biomatériau dont le potentiel pour la bio-impression est élevé, seul ou combiné avec de l'alginate et/ou de la gélatine (F. Liu et al., 2018). Comme il est le

biomatériaux d'intérêt dans cette étude, il est décrit plus en détail ci-dessous. Les hydrogels de chitosane sont utilisés depuis quelques années en bio-impression. On peut d'ailleurs citer les travaux de (Roehm & Madihally, 2017) (Yan et al., 2005) pour la préparation de bioencre de chitosane et de gélatine et ceux de (Q. Liu et al., 2018) pour la préparation de chitosane et d'alginate.

1.5 Les hydrogels de chitosane

1.5.1 Le chitosane

Le chitosane est polysaccharide linéaire naturel produit à l'aide du processus de désacétylation d'un polymère de chitine retrouvé dans l'exosquelette de crevettes ou autres crustacés (Croisier & Jérôme, 2013) (Figure 1.14)

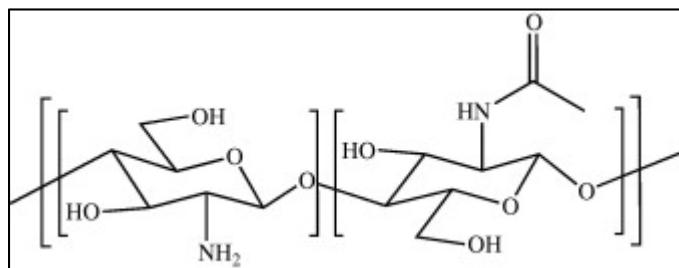


Figure 1.14 Structure chimique du chitosane

Tirée de Croisier et Jérôme (2013)

On le caractérise notamment par son degré de désacétylation (DDA), indiquant le pourcentage des groupements D-glucosamine (Glc) dans la chaîne du polymère, composée à la fois de groupements Glc et de groupements N-acétyl-D-glucosamine (Glc-N-Ac) acétylés (Croisier & Jérôme, 2013). La masse moléculaire moyenne (M_w) du chitosane (longueur moyenne de ses chaînes) peut également fortement varier et se situe généralement entre 300 et 1000 kDa (Croisier & Jérôme, 2013).

1.5.2 Les bioencres de chitosane

En combinant une solution de chitosane à certaines bases faibles, une solution ayant un pH près de 7 peut être créée qui va gélifier lorsque la température augmente. Ces hydrogels sont dits thermosensibles (Chenite, Buschmann, Wang, Chaput, & Kandani, 2001). Des études précédentes ont démontré qu'en utilisant un agent gélifiant à base de bêta-glycérophosphate (BGP) et de carbonate d'hydrogène de sodium (SHC), le gel de chitosane formé a de bonnes propriétés mécaniques et une vitesse de gélification qui le rendent propice à la bio-impression par extrusion (Rahimnejad et al., 2020). La gélification du chitosane se fait à l'aide de la création de liens physiques (pont d'hydrogène et force de Van der Waals) entre les chaînes de polymère. Une étude précédente a démontré qu'un utilisant un agent gélifiant ayant une concentration de 0,113M de SHC et 0,15M de BGP avec 3% de chitosane ou 0,075M de SHC et 0,1M de BGP avec 2% de chitosane, on obtient un hydrogel extrudable (Rahimnejad et al., 2020). Ce gel est également rhéofluidifiant, car les chaînes de polymères se réorientent lors de l'application d'une contrainte, ce qui diminue la viscosité du gel. Cette baisse de viscosité lorsqu'une contrainte est appliquée au gel diminue la contrainte appliquée aux cellules à l'intérieur du gel et augmente donc leurs chances de survie.

Ces hydrogels n'ont cependant encore jamais servi comme bioencre et leur potentiel reste à évaluer et leur optimisation est nécessaire.

1.6 Résumé du contexte et objectifs de l'étude

L'expansion de la bio-impression se heurte encore au manque de bioencre idéale combinant les propriétés biologiques, mécaniques et d'imprimabilité idéales. Pour développer et optimiser de telles bioencres, il est essentiel de développer des méthodes d'évaluation simples et rapides. Plusieurs tests ont été proposés pour évaluer l'une ou l'autre des propriétés d'une potentielle bioencre pour le procédé d'extrusion en bio-impression 3D. Par contre, ces tests sont généralement complexes à effectuer et il y a un manque d'uniformité et de consensus entre les différentes équipes de recherche (Gillispie et al., 2020) (Kiyotake et al., 2019). L'hypothèse principale de ce projet, basée sur certains travaux de la littérature (Townsend et al., 2019) (Tao

Jiang et al., 2019), est qu'il est possible de déterminer le potentiel d'une bioencre à être extrudée à partir de tests rhéologiques.

L'objectif principal de ce mémoire de maîtrise est de déterminer la bio-imprimabilité par extrusion de gels de chitosane thermosensibles à partir de tests rhéologiques. Ce projet se subdivise en trois sous-objectifs :

- A. Analyser les propriétés rhéologiques de différentes formulations d'hydrogels ainsi que leur capacité d'impression par extrusion en vue d'établir des liens des gels entre les deux. Les tests rhéologiques importants pour déterminer la capacité d'une bioencre à être extrudée doivent permettre de mesurer : la rhéofuidité, la récupération et la contrainte d'écoulement;
- B. Étudier la qualité d'impression des différentes formulations d'hydrogels. Les paramètres d'impression pouvant avoir une forte influence sur la qualité d'impression, leur impact sera évalué sur une seule composition de gel (chitosane3%-gélatine3%) thermosensible développé au LBeV;
- C. Étudier les corrélations entre les propriétés rhéologiques et les résultats d'impression (largeur et qualité des filaments extrudés, fidélité d'impression), afin d'évaluer si des méthodes rhéologiques simples permettraient de prédire le potentiel d'hydrogels pour la bio-impression 3D.

CHAPITRE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Préparation des hydrogels

Trois types d'hydrogels ont été étudiés dans le cadre de cette maîtrise. Des hydrogels de chitosane (CH), chitosane-gélatine (CH_GEL) et d'alginate-gélatine (ALG_GEL) comme contrôle positif. Le Tableau 2.1 résume les principales formulations testées. Différentes concentrations de gels ont été comparées pour observer l'effet des propriétés rhéologiques sur l'imprimabilité des gels. Le gel d'alginate-gélatine est utilisé comme contrôle étant donné qu'il s'agit d'un gel non thermosensible et dont la capacité à être imprimé tout en permettant une bonne survie cellulaire a déjà été démontrée (Tao Jiang et al., 2019).

Tableau 2.1 Noms et composition des différents hydrogels évalués. La concentration de chaque composante du gel est indiquée.

Nom du gel	Concentration initiale %(m/v)			Concentration initiale HCl (M)	Concentration finale %(m/v)			Concentration finale (M)	
	CH	GEL	ALG		CH	GEL	ALG	BGP	SHC
CH3	5	-	-	0.15	3	-	-	0.15	0.113
CH2GEL2	3.33	3.33	-	0.1	2	2	-	0.1	0.075
CH3GEL3	5	5	-	0.15	3	3	-	0.15	0.113
ALG3GEL7	-	7	3	-	-	7	3	-	-

Les hydrogels thermosensibles à base de chitosane sont préparés en mélangeant une solution de chitosane acide et un agent gélifiant basique, ce qui forme une solution qui gélifie lorsqu'on augmente la température à 37°C (Figure 2.1 A). Le gel physique est formé grâce à la création de ponts d'hydrogène entre les chaînes de polymères. Les hydrogels d'alginate quant à eux sont des hydrogels non thermosensibles qui sont réticulés de façon ionique en ajoutant des ions de calcium au gel (Figure 2.1 B).

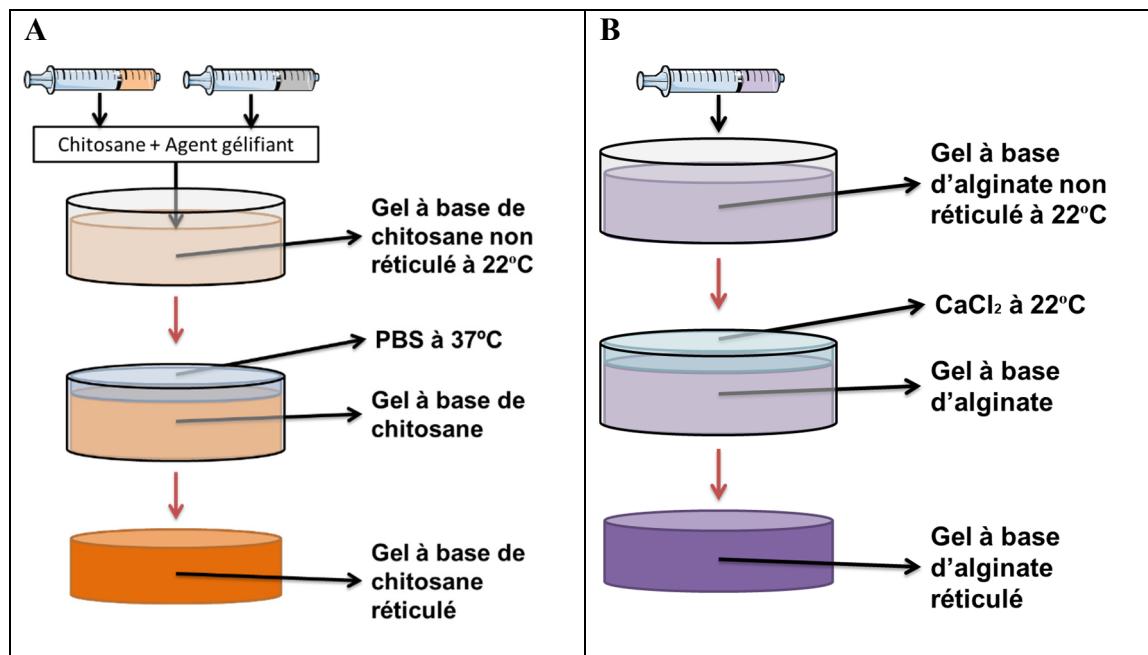


Figure 2.1 A) Méthode de gélification d'un gel de chitosane par contrôle de température ;
B) Méthode de réticulation d'un gel d'alginate à l'aide de CaCl_2

2.1.1 Solubilisation du chitosane

Le chitosane (Primex, Islande, ChitoClear-43020, Batch TM4713, 2017, DDA 89%, Mw : 255400 g/mol) sous forme de poudre est solubilisé dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl) de concentration de 0.15M à une concentration initiale de 5% (m/v). Le chitosane est mélangé pendant 4h à l'aide d'une turbine à 700rpm à température ambiante. Pour permettre une meilleure solubilisation des poudres, un volume de 50mL de chitosane est solubilisé dans un bêcher de 150mL pour minimiser l'espace entre le rotor et les parois du bêcher. La solution obtenue est disposée dans des contenants de 10mL qui sont envoyés à l'autoclave pour être stérilisés (20 minutes à 121°C). Finalement, les contenants sont stockés à 4°C pour éviter une dégradation précoce.

2.1.2 Solubilisation du chitosane/gélatine

La gélatine de type A dérivée de peau de porc (Sigma-Aldrich, USA, G1890-110G) sous forme de poudre est solubilisée (concentration de 2 ou 3% m/v) dans une solution d'acide

chlorhydrique (Tableau 2.1). La gélatine est mélangée pendant 1h à 37°C à l'aide d'un mélangeur magnétique. La solution est ensuite transférée dans un bain à 37°C, le chitosane (concentration de 2 ou 3% m/v) est ajouté à la solution et mélangé pendant 3h à l'aide d'une turbine à 350rpm. La solution est ensuite stérilisée et entreposée tout comme celle de chitosane 3% (ANNEXE I pour protocole complet).

2.1.3 Préparation des agents gélifiants

Les gels de chitosane peuvent être formés avec différents agents gélifiants. Pour cette étude, les agents gélifiants sont composés de bicarbonate de sodium (NaHCO_3 ou SHC) et de β -glycérophosphate (BGP). Les solutions de SHC et BGP sont préparées en solubilisant les sels dans de l'eau milli-Q selon les concentrations indiquées dans le Tableau 2.1. Les concentrations dépendent de la concentration finale de chitosane visée. Le protocole complet est ajouté en ANNEXE II.

2.1.4 Préparation des hydrogels pour la bio-impression

Les hydrogels de chitosane se préparent en mélangeant la solution de chitosane avec son agent gélifiant correspondant avec un ratio volumique de 3:2 (Figure 2.2). Le mélange doit se faire de façon à minimiser la quantité de bulles introduites par le mélange et obtenir une solution homogène au moment où la buse d'extrusion est connectée. Le gel est préparé de la même façon pour les tests rhéologiques, hormis le remplissage de la cartouche d'extrusion. La méthode a été légèrement adaptée pour chaque gel. Les détails sont donnés dans le protocole en ANNEXE III.

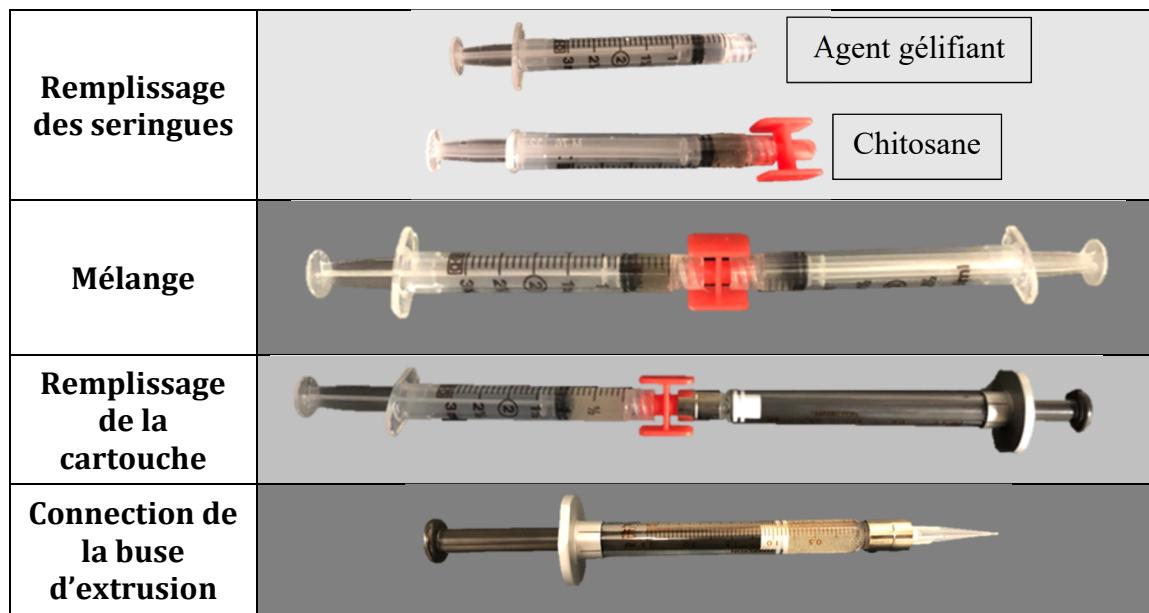


Figure 2.2 Méthodes de préparation des gels à base de chitosane pour la bio-impression

2.1.5 Préparation des gels d’alginat-gélatine

De la poudre de sodium d’alginat (Sigma-Aldrich, USA, W201502 lot#MKBZ4415V) et de gélatine de type B dérivé de peau bovine (Sigma-Aldrich, USA, G-9391) sont dissous dans de l’eau milli-Q à 60°C à l’aide d’un mélangeur magnétique pendant 1 heure. La solution est mélangée à température ambiante pendant 2 heures afin d’obtenir une concentration finale d’alginat de 3% (m/v) et de gélatine de 7% (m/v) (T. Jiang et al., 2017). La solution est ensuite versée dans des contenants de 10mL et maintenue dans un environnement à 4°C (ANNEXE IV pour protocole complet).

La solution d’alginat-gélatine est transférée directement dans la cartouche d’extrusion à l’aide d’un lueur-lock. Une fois la solution d’alginat-gélatine extrudée, elle est réticulée par immersion dans une solution de 100mM de CaCl₂ dissout dans de l’eau Milli-Q (Figure 2.1 B).

2.2 Types de tests rhéologiques

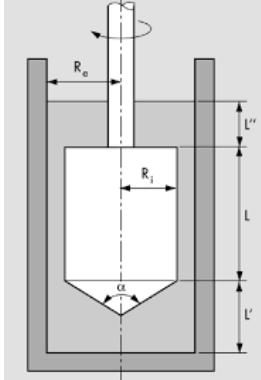
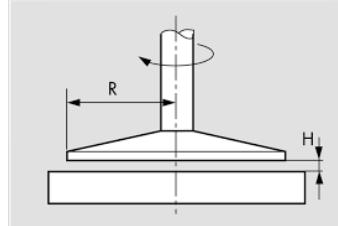
Les tests de rhéologie ont été effectués à l'aide d'un rhéomètre MCR301® (Anton Paar) (Figure 2.3).



Figure 2.3 Rhéomètre MCR301(R) (Anton Paar). Les configurations CC10 (gauche) et PP25 (droite) y sont présentées
Tirée de Anton-Paar (<https://www.anton-paar.com/>)

Plusieurs géométries ont été utilisées en fonction du type de test, soit le cylindre-concentrique de 10mm de diamètres (CC10) et plaque-plaque ayant 25mm de diamètre (PP25). Le Tableau 2.2 présente les différentes configurations utilisées et les méthodes de mesure selon le type de test pour mesurer les propriétés rhéologiques des gels. Ce choix a été justifié dans la revue de littérature.

Tableau 2.2 Paramètres d'utilisation du rhéomètre en fonction du test

Test	Configuration	Température (°C)	Méthode de mesure
Viscosité		22	Rotation
Thermo sensibilité		22-37	Oscillation
Récupération	 CC10	22	Rotation
Rampe d'amplitude (variation de l'amplitude de la déformation)	 PP25	22	Oscillation

*Pour les gels d'alginate-gélatine, la température est maintenue à 25°C au lieu de 22°C.

Les sections suivantes décrivent les différents tests rhéologiques utilisés et leurs objectifs respectifs.

2.2.1 Viscosité de la solution

Afin d'évaluer la reproductibilité des différents lots de solubilisation de chitosane (avant l'ajout d'agent gélifiant), un test mesurant la viscosité en fonction du taux de cisaillement est effectué. La viscosité est mesurée en fonction du taux de cisaillement contrôlé de manière logarithmique pour mesurer 25 points entre 0,01 et 100 rad/s (protocole complet en ANNEXE V).

2.2.2 Thermosensibilité

Pour évaluer la thermosensibilité des différents gels de chitosane et de gélatine, l'évolution du module de conservation (G') et de perte (G'') est mesuré lorsque l'on passe d'une température de 22°C à 37°C (Figure 2.4). Le gel (1.5 mL) est injecté juste après le mélange des deux solutions (chitosane et agent gélifiant).

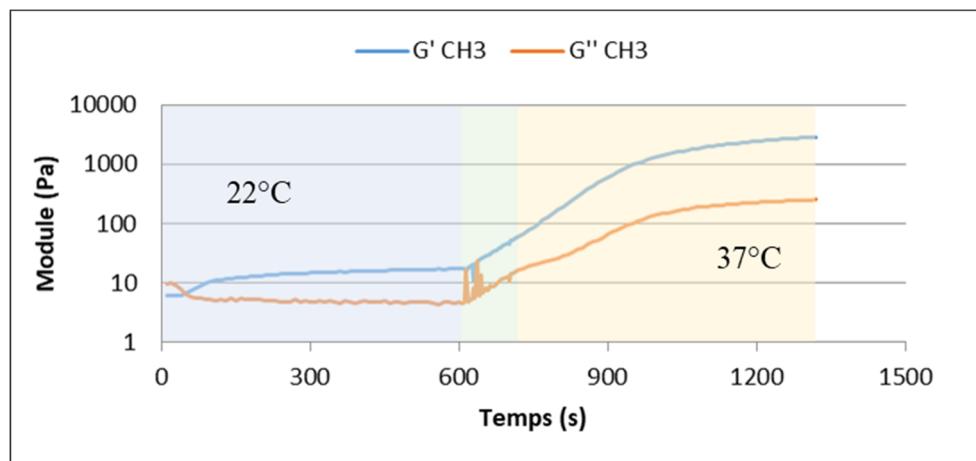


Figure 2.4 Exemple de gel de chitosane 3% démontrant une thermosensibilité à 37°C. Le gel est relativement stable à température ambiante, mais le module de conservation augmente en augmentant la température à 37°C (géométrie CC10, mode oscillatoire, fréquence 1Hz, amplitude) 1%)

Afin de respecter la LVR des gels à base de chitosane et d'ALG3GEL7, (T. Jiang et al., 2017) la fréquence est fixée à 1 Hz et l'amplitude à 1%. On maintient la température à 22°C pendant 10 minutes pour simuler la période de pré-extrusion à température ambiante, puis on change la température à 37°C en 2 minutes pour finalement la maintenir pendant 10 minutes pour observer l'effet du changement de la température sur les propriétés du gel et caractériser son comportement thermosensible.

2.2.3 Rampe d'amplitude

Le test de rampe d'amplitude a été utilisé pour déterminer plusieurs paramètres (déformation, module de conservation et contrainte à l'écoulement). La contrainte

d'écoulement est considérée comme étant critique pour déterminer la capacité d'un gel à avoir une bonne fidélité d'impression.

La rampe d'amplitude a été effectuée avec une fréquence de 1 Hz, une distance de 1mm et une amplitude de 0.01 à 500% en effectuant 100 mesures de manière logarithmique.

Ce test permet de mesurer la déformation (%), le module de conservation (Pa) et le module de perte (Pa), le taux de cisaillement (rad/s) et la contrainte de cisaillement (Pa). En suivant la variation du module de conservation G' selon la déformation de cisaillement, on observe une diminution de G' à partir d'une certaine contrainte. Cette contrainte (contrainte d'écoulement) (Townsend et al., 2019) est déterminée lorsque la valeur du module de conservation diminue de 10%.

2.2.4 Tests de récupération (« recovery »)

Des tests de récupération (recovery), décrits à la section 1.3.4, ont été effectués afin d'obtenir la viscosité du gel à différents moments lors du processus d'extrusion ainsi que le pourcentage de récupération de la viscosité post-extrusion. Ces résultats permettent donc de comparer la récupération de nos gels avec la littérature et la limite théorique de 85% proposée par (Kiyotake et al., 2019). Les tests ont été conçus pour simuler trois étapes : la pré-extrusion, l'extrusion et la post-extrusion. Le taux de cisaillement lors de l'extrusion a été varié selon les essais pour simuler différentes conditions d'extrusion (Tableau 2.3).

Tableau 2.3 Paramètres du test de récupération à température constante de 22°C

	Pré-extrusion	Extrusion	Post-extrusion
Durée (min)	10	1	10
Taux de cisaillement (rad/s)	0.001	10, 100, 500, 1000	0.001

En mesurant la valeur de la viscosité dynamique pré-extrusion et post-extrusion, on mesure le pourcentage de récupération de la viscosité. La période de pré-extrusion à très faible cisaillement (0.001) a une durée de 10 minutes, car on simule le temps de préparer la machine avant de lancer le programme de la bio-imprimante et d'extruder le gel. La période

d'extrusion est d'une minute (bien que la durée de l'extrusion sur la bio-imprimante soit certainement plus courte en pratique), car on veut mesurer suffisamment de points pour calculer une valeur moyenne et observer si la valeur se maintient lors d'un taux de cisaillement élevé. Finalement, la période de post-extrusion est d'une durée de 10 minutes pour permettre d'observer si le gel continue de récupérer sur une longue période de temps après le haut taux de cisaillement. Dans le cadre de cette maîtrise, nous avons choisi de ne pas étudier l'effet de la température, car on ne prend pas en compte l'effet des propriétés rhéologiques sur le processus de gélification post-extrusion.

Lors du test de récupération, la viscosité est mesurée selon différents taux de cisaillements. En analysant la courbe de viscosité en fonction du taux de cisaillement (Figure 2.5), on obtient la pente de la courbe exponentielle ($n-1$) (Équation (1.1)).

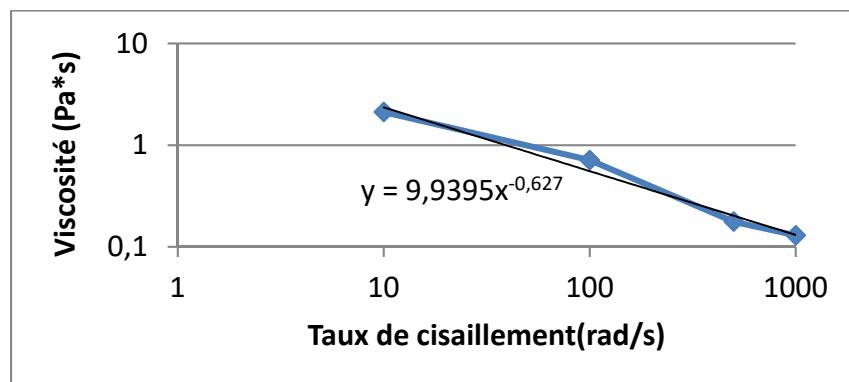


Figure 2.5 Exemple de courbe présentant la valeur de la viscosité moyenne lors de l'extrusion à différents taux de cisaillement pour un gel de CH3. La valeur de $n-1$ est de -0,627, donc $n=0,373$

La variable « n » indique l'intensité du comportement rhéofluidifiant du gel testé. La valeur « n » se situe entre 0 et l'infini positif. Une valeur de $n=1$ indique que le gel est newtonien et donc qu'une augmentation du taux de cisaillement n'influence pas la viscosité. Un $n<1$ indique que le gel est rhéofluidifiant alors qu'un $n>1$ indique qu'il est rhéodurcissant (Dealy & Wissbrun, 1990). Cette valeur (n) est utilisée pour calculer le taux de cisaillement selon les paramètres d'extrusion (Équation (2.1)) (Dealy & Wissbrun, 1990)).

$$\dot{\gamma}_w = \frac{4Q}{\pi R^3} \frac{3n+1}{4n} \quad (2.1)$$

Ou $\dot{\gamma}_w$ (rad/s) est le taux de cisaillement à la paroi, Q ($\mu\text{L/s}$) est le débit; R (mm) est le rayon intérieur de la buse d'extrusion; et $(n-1)$ est la pente du graphique de la viscosité par rapport au taux de cisaillement dans un graphique log-log.

2.3 Impression et caractérisation de la qualité d'impression

Afin de corrélérer les propriétés rhéologiques aux résultats de l'impression, on s'intéresse dans cette section à la largeur des filaments extrudés et à la fidélité d'impression sur des structures imprimées de plusieurs couches.

2.3.1 Appareillage

La machine utilisée pour effectuer la bio-impression par extrusion est la 3D Discovery de RegenHu (Suisse) (Figure 2.6). Les tests d'impression sont effectués par extrusion avec contrôle du débit, tel qu'expliqué dans la revue de littérature.



Figure 2.6 Bio-imprimante 3DDiscovery (RegenHu) équipé de 4 systèmes d'impression : extrusion pneumatique, extrusion par contrôle de débit, extrusion de polymère fondu et par jet d'encre

Afin d'obtenir une structure 3D, un fichier STL est importé dans le logiciel BioCAM. La hauteur entre les couches, la largeur théorique des filaments, la porosité et l'architecture de la structure désirée sont choisis par l'utilisateur du logiciel. Le modèle 3D créé par BioCAM peut ensuite être transféré sur BioCAD pour être modifié. Le logiciel BioCAD permet de créer des filaments individuels et de contrôler les paramètres d'impression sur chaque couche de déposition de matière individuellement si nécessaire. La structure finale est convertie en code G pour être lue par la bio-imprimante. Le débit est sélectionné sur l'interface de l'imprimante et la buse d'extrusion est choisie manuellement.

L'extrusion est effectuée sur une plaque de verre qui est ensuite photographiée à l'aide d'un microscope ou placée à l'intérieur d'un incubateur pour procéder à la gélification.

2.3.2 Architecture

Plusieurs structures ont été imprimées pour évaluer l'influence des paramètres d'impression (objectif 2) et analyser la largeur et la qualité des filaments extrudés et la fidélité d'impression des différentes bioencres (objectif 3).

2.3.2.1 Filaments extrudés

Dans un premier temps, nous avons évalué l'influence des paramètres d'impression sur la largeur et l'uniformité de filaments extrudés.

Les filaments extrudés sont en forme de serpentin pour être en mesure de varier la vitesse de déplacement de la buse lors de la même extrusion et donc de prendre ce paramètre en compte. Trois lignes de 10mm sont donc extrudées aux mêmes paramètres pour mesurer la largeur, la continuité et l'uniformité des filaments (Figure 2.7). La géométrie choisie permet d'analyser l'effet de l'extrusion sur des filaments linéaires simples.

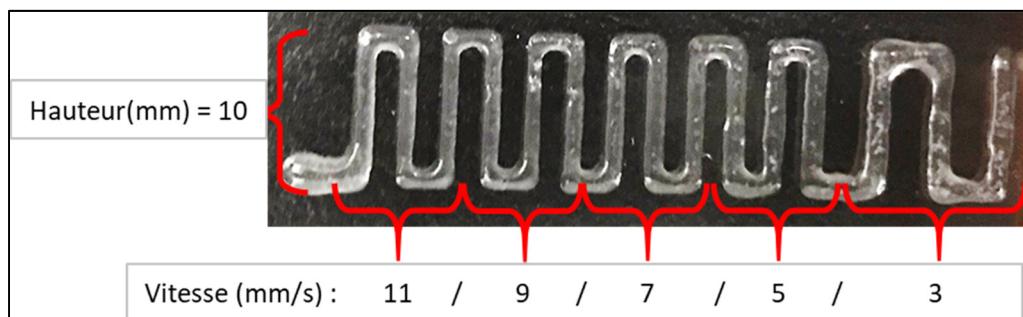


Figure 2.7 Image utilisée pour la mesure de la largeur des filaments selon différentes paramètres d'extrusion. 3 lignes verticales sont extrudées pour chaque vitesse de déplacement de la buse. La buse se déplace à 3, 5, 7, 9 et 11 mm/s

En changeant le débit d'extrusion, la hauteur de couches ou la dimension ou la vitesse de déplacement de la buse d'extrusion selon les paramètres indiqués au Tableau 2.4, la largeur et la qualité des filaments extrudés est mesurée.

Tableau 2.4 Paramètres d'extrusions utilisés pour déterminer l'effet sur la largeur et la qualité des filaments extrudés du gel de CH3GEL3#1. La buse d'extrusion de 25G est utilisée pour extruder des filaments à un débit de 0,5, 1, 2 et 3 μ L/s d'une hauteur de 0,3mm à une vitesse de déplacement de 3, 5, 7, 9 et 11mm/s.

La buse de 27G extrude des filaments aux mêmes paramètres, mais à une hauteur de 0,2 et de 0,3mm

Diamètre d'extrusion	Épaisseur de couche (mm)	Débit (μ L/s)	Vitesse de déplacement (mm/s)
25G (0,25mm) ou 27G (0,20mm)	0,2	0,5	3
			À
			11
		À	
	0,3	3	Idem
		0,5	Idem
		À	
		3	Idem

Les filaments sont mesurés après l'extrusion de 3 couches de matière pour diminuer l'effet de la première couche extrudée sur une vitre et pour observer l'effet de la déposition de plusieurs couches de matières ((Habib et al., 2018), (Ribeiro et al., 2017) et (Schwab et al., 2020)). On obtient donc des dimensions de lignes plus représentatives du reste de la structure à imprimer qu'en mesurant la dimension d'un filament déposé directement sur la vitre. Pour mesurer la dimension moyenne des filaments, on mesure l'aire du filament sur une section de 5 mm de long. On évalue ensuite la continuité et l'uniformité des lignes visuellement sur une échelle de 1 à 3. Chaque gel est donc évalué sur 6 en additionnant la note obtenue pour la continuité à celle de l'uniformité (Tableau 2.5 pour plus de détails.)

Tableau 2.5 Évaluation de la qualité des lignes extrudées, 1 étant la note la plus basse et 3 étant la meilleure note

Note	1	2	3
Continuité	+ 3 discontinuités	1 ou 2 discontinuités	Aucune discontinuité
Uniformité	Forme non-uniforme et courbée	Courbée et uniforme	Droite et uniforme

Un gel obtenant une note cumulative inférieure à 4 n'est pas considéré comme étant extrudable aux paramètres choisis. Une note cumulative de 4 est considérée comme étant des paramètres d'extrusion limites, pouvant convenir ou non selon le cas. Une note cumulative plus grande que 4 est considérée comme étant adéquate et tend à démontrer la capacité d'un gel à être extrudé selon les paramètres choisis (Tableau 2.6).

Tableau 2.6 Système d'évaluation de la qualité de déposition des filaments extrudés

Continuité Uniformité \	+ 3 discontinuités	1 ou 2 discontinuités	Aucune discontinuité
Forme non uniforme et courbée	2	3	4
Courbée et uniforme	3	4	5
Droite et uniforme	4	5	6

A. Par la suite, nous avons déterminé les paramètres d'extrusion optimaux pour l'ensemble des gels candidats, ce qui permet d'imprimer des structures pour tous les gels aux mêmes paramètres d'extrusion.

Lorsque l'effet général des paramètres est identifié sur le gel de CH3GEL3#1, on est en mesure de déterminer les paramètres d'impression permettant de créer une structure en nid d'abeille pour chaque gel. Pour ce faire, chaque gel a été testé avec une buse ayant un gauge de 27 (0,2mm de diamètre), une hauteur de couche de 0,2mm, un débit de 0,5 et de 1 μ L/s à une vitesse de déplacement de 3 à 11 mm/s. Les paramètres permettant d'extruder le filament de plus petite dimension tout en ayant une bonne qualité pour tous les gels seront sélectionnés pour effectuer les tests de fidélité de forme.

2.3.2.2 Structure en nid d'abeille

En choisissant les mêmes paramètres d'impression permettant l'extrusion des filaments minces, continus et uniformes pour tous les gels (débit de $0.5\mu\text{L}/\text{s}$; vitesse de déplacement 5 mm/s; buse d'extrusion 27G; hauteur de 0,2mm), on est en mesure de créer des structures en nid d'abeille pour chaque gel, tout en diminuant la quantité de paramètres à prendre en compte.

B. Par la suite, nous avons demandé au programme de créer une architecture de type hexagonale (nid d'abeille) dans un prisme de $10 \times 10 \times 2\text{mm}$ ayant une porosité entre 30 et 40% selon le gel (Figure 2.8).

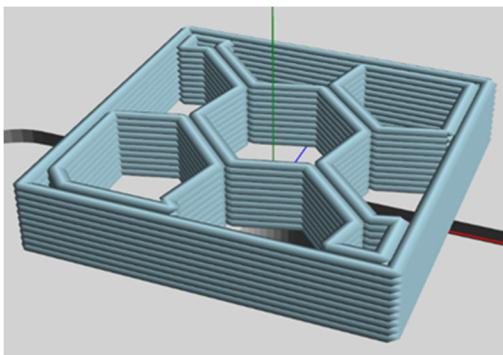


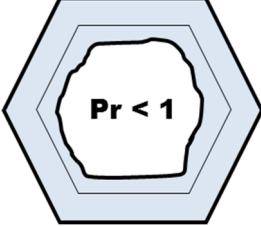
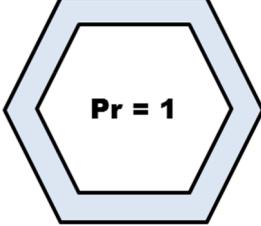
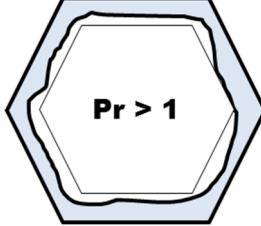
Figure 2.8 Exemple de structure en nid d'abeille ($10 \times 10 \times 2\text{mm}$) produite par BioCAD pour le gel d'ALG3GEL7

Étant donnée la largeur différente des filaments extrudés pour chaque gel, l'architecture finale de la structure varie malheureusement en fonction du gel. La porosité de chaque structure est sélectionnée manuellement pour éviter de créer des porosités trop grandes, ce qui crée des vides importants et minimise l'importance de la fidélité de forme (les défauts deviennent minimes par rapport à l'aire de la porosité), ou trop petites, ce qui augmente les risques d'obstructions. Ces structures ont été utilisées pour évaluer la fidélité de forme et la rigidité en compression.

2.3.3 Fidélité de forme

Afin d'évaluer l'effet des propriétés rhéologiques sur l'imprimabilité d'un gel, la fidélité d'impression a été utilisée. Dans cette étude, on l'évalue en comparant l'aire d'un hexagone théorique (aire de la porosité obtenue à l'aide du logiciel BioCAD) à l'aire d'un hexagone réelle (aire de la porosité imprimée) (Tableau 2.7). On choisit d'observer la fidélité d'impression avec l'hexagone, car il s'agit de l'architecture interne choisie pour faciliter l'impression.

Tableau 2.7 Évaluation de la fidélité de forme d'une structure en nid d'abeille

Note	<1	1	>1
	Aire réelle < Aire théorique	Aire réelle =	Aire réelle > Aire théorique
Fidélité de forme			

Dans cette étude, la fidélité de forme des différents gels à différents moments dans le cycle de production d'une structure est mesurée. La fidélité de forme d'une structure ayant 3 couches de matériel pour obtenir une référence de base avec les mesures des dimensions des filaments extrudés est d'abord mesurée. Ensuite, la fidélité de forme d'une structure ayant 10 couches de matières est mesurée pour observer la capacité du gel à supporter plusieurs couches et son effet sur la fidélité de forme. On est donc en mesure de calculer le ratio de Pr 3 couches : Pr 10 couches. Cette mesure permet d'analyser l'effet des propriétés rhéologiques sur la fidélité de forme des gels selon le nombre de couches. Finalement, on mesure la fidélité de forme sur les structures des 3 et de 10 couches une fois complètement gélifiées. Cette mesure permet de tenir en compte le changement de forme des gels lors du processus de gélification. La fidélité de forme se mesure en faisant le ratio de la forme réelle : forme théorique (Tableau 2.7 pour plus de détails).

2.4 Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques des structures imprimées ont été caractérisées en **compression non confinée** pour comparer les différentes bioencres et étudier les corrélations entre propriétés rhéologiques des bioencres.

La Figure 2.9 présente l'appareil MACH-1 (Biomomentum, Laval, Canada) utilisé pour réaliser des essais de compression non-confinée sur les structures bio-imprimées de 10 couches, à l'aide d'une cellule de charge de 100N ayant une résolution de 5mN (MA296) et une plaque de compression de 25mm de diamètre.

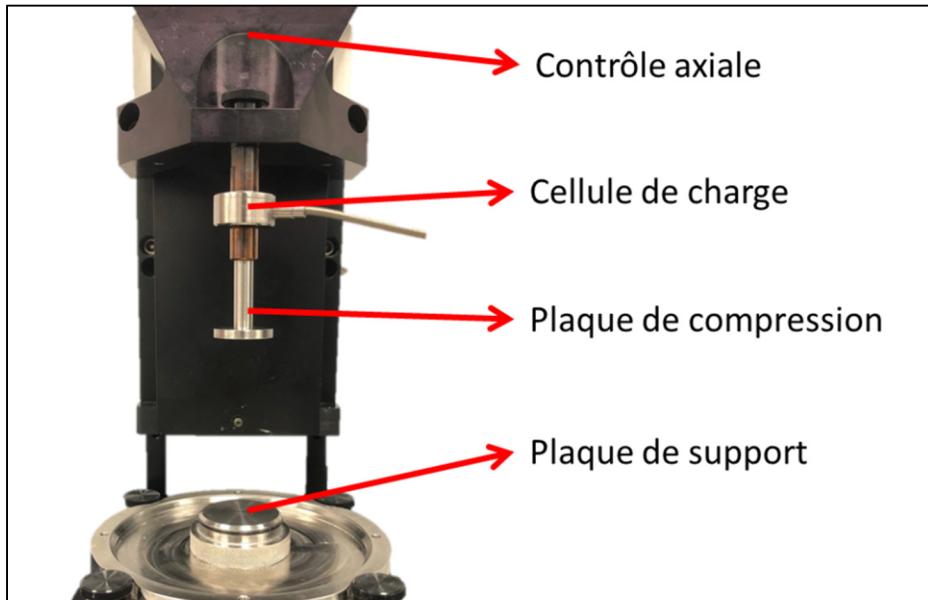


Figure 2.9 Mach-1 (Biomomentum) en mode de compression non confinée

La compression se fait à une vitesse de 100% de la hauteur de l'échantillon par minute. On s'assure ainsi d'avoir une vitesse de compression proportionnelle à la hauteur de l'échantillon, contrairement à une vitesse de déplacement fixe lorsque les échantillons ont des hauteurs différentes. La compression est effectuée jusqu'à une déformation de 80% de la hauteur pour s'approcher du point de rupture des gels. La surface de contact (aire réelle) a été déterminée en analysant une image prise au microscope de la structure imprimée.

Pour les gels d'ALG3GEL7 et de CH3GEL3, les essais de compression ont été faits sur des structures juste après impression puis une fois le processus de gélification terminé (incubation à 37°C pour les hydrogels de chitosane et réticulation ionique par CaCl₂ pour le gel d'alginate), pour étudier l'effet du processus de gélification. Pour les autres gels, les tests ont été faits suite à la gélification.

Compression pré-gélification :

Pour mesurer la hauteur de l'échantillon, la surface de contact de la plaque de compression est déplacée à une vitesse de 0,25mm/s, jusqu'à ce qu'on observe visuellement que le gel touche à la surface (contact uniforme sur la largeur totale de l'échantillon ou 2 points de contact). Cette mesure est prise manuellement, car la cellule de charge ne permet pas de détecter le contact sur la structure non gélifiée, elle est donc dépendante de l'utilisateur. Une mesure automatique viendrait écraser le gel non gélifié, car les propriétés mécaniques sont trop faibles pour la résolution de l'appareil. On effectue ensuite le cycle de compression selon la hauteur de l'échantillon.

Compression post-gélification :

Suite à l'impression et à la prise de la hauteur pré-gélification, les gels à base de chitosane sont placés dans un bain de PBS dans un incubateur à 37°C pendant 24 heures. Les gels d'alginate sont placés dans un bain de CaCl₂ 100mM à température ambiante pendant 24 heures. Cette durée n'est pas réaliste pour un gel contenant des cellules, car le CaCl₂ est toxique pour les cellules lors d'une longue exposition. Par contre, en gardant ce bain, on s'assure de la gélification complète de la structure. Pour mesurer la hauteur de structures gélifiées, on applique une force de 2 gf (0.02N) sur le gel pour égaliser la surface et on considère la hauteur à cette limite. On effectue ensuite le test de compression selon la hauteur de l'échantillon.

2.5 Analyse des corrélations et statistiques

La variabilité des résultats dans le cadre de cette maîtrise peut provenir de plusieurs facteurs, dont le manque de répétabilité entre les lots de solubilisation de chitosane et de chitosane/gélatine. Étant donné qu'on ne peut solubiliser que 50 mL d'un gel à la fois et que les tests nécessitent une grande quantité de gel pour obtenir un $n=9$, il faudra prévoir plus d'un lot de solubilisation pour avoir la quantité de gel désirée. Il faut donc d'abord s'assurer que la différence entre les lots n'est pas significative pour permettre l'uniformité des résultats.

Afin d'évaluer la répétabilité et la reproductibilité des résultats, un test student (t-test) est effectué pour comparer les résultats entre deux groupes. Une valeur $p \leq 0,05$ indique que la différence est significative et donc que les résultats des deux groupes sont différents. La moyenne et l'écart-type des résultats sont utilisés pour tirer des conclusions sur la validité des résultats. Lorsque la quantité de résultat est assez élevée ($n=9$), il est possible d'utiliser la valeur-p pour déterminer si les résultats sont significativement différents d'un gel à l'autre. Lorsque la quantité de résultats permettant de calculer la moyenne et l'écart-type est trop faible, la valeur-p perd de son utilité.

Pour s'assurer de la répétabilité des tests, chacun est répété 3 fois sur trois lots de solubilisation du même gel ($n=9$ et $N=3$). La moyenne ainsi que l'écart-type sont calculés sur l'échantillon de 9 lorsque la répétabilité entre lots est acceptable. Chaque test est réalisé 3 fois par lot de solubilisation pour valider la répétabilité du test et la reproductibilité des résultats entre chaque lot de solubilisation.

2.5.1 Lots de solubilisation

Chaque lot de gel doit être utilisé pour effectuer chacun des tests de rhéologie et d'impression. De cette manière, on s'assure que si la répétabilité entre lots de solubilisation n'est pas adéquate, on puisse tout de même obtenir des données sur chaque test en fonction du lot. En effectuant 3 lots de solubilisation pour chaque gel, on s'assure d'obtenir une

tendance représentant adéquatement chaque gel testé. Dans le cas où un lot de solubilisation est significativement différent des deux autres, un quatrième lot de solubilisation sera nécessaire.

2.5.2 Moyenne et déviation standard

Les graphiques présentant les résultats des tests sont des moyennes faites sur l'ensemble des échantillons du même gel lorsque la reproductibilité entre lots est acceptée. Les résultats présentés sont sous forme de moyennes \pm écart-type.

2.5.3 Corrélation de Pearson

La corrélation de Pearson (R) permet d'évaluer la codépendance de deux variables ainsi que l'écart-type entre les valeurs et la courbe de tendance. Ce type de corrélation permet donc de savoir si l'augmentation d'une variable crée une augmentation ou une diminution d'une autre variable. Afin de déterminer s'il y a une corrélation entre les propriétés rhéologiques et les résultats de l'impression, tel que la largeur des filaments et la fidélité d'impression, on utilise un graphique montrant une propriété rhéologique en fonction d'un résultat d'impression. La courbe de tendance représentant le mieux le type de corrélation est obtenue en choisissant le modèle ayant le meilleur coefficient de détermination (R^2), on obtient donc un courbe d'une tendance linéaire, en puissance, logarithmique ou exponentielle. Dans le cas où l'augmentation d'un paramètre coïncide avec l'augmentation d'un autre paramètre, on parle de corrélation proportionnelle. Un coefficient de détermination de 1 indique que la courbe de tendance définit parfaitement la distribution des points. Ce coefficient de détermination permet donc d'évaluer l'importance de la corrélation et donc sa capacité à prédire un comportement général.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Caractérisation rhéologique des hydrogels pour la bio-impression par extrusion

Le premier objectif de ce travail consistait à étudier les propriétés rhéologiques de différents hydrogels de chitosane afin d'analyser, par la suite, de possibles corrélations avec la qualité de bio-impression (largeur et fidélité d'impression).

Les sections suivantes présentent les résultats obtenus pour les hydrogels de chitosane, chitosane-gélatine et alginate-gélatine, à l'aide de tests de récupération et de rampe d'amplitude. Cependant les premiers tests ont consisté à vérifier la reproductibilité des formulations, leur stabilité à température de la pièce et leur sensibilité à la température. Tout d'abord, la viscosité des solutions de chitosane suite à la solubilisation est mesurée.

3.1.1 Viscosité

Les mesures de la viscosité en fonction du taux de cisaillement pour les différentes solutions à base de chitosane (sans agent gélifiant) ont permis d'analyser la répétabilité du processus de solubilisation. Les résultats présentés en ANNEXE VII montrent que le processus de solubilisation, pour les gels à base de chitosane (tant pour le CH3 que CH3GEL3) ne montrent pas une bonne répétabilité entre les lots de solubilisation. L'écart-type de la viscosité de trois échantillons de la solution de CH3GEL3 selon le taux de cisaillement varie de 140 à 22%. La méthode de solubilisation devra donc être améliorée à l'avenir pour permettre d'augmenter la quantité de données et donc d'obtenir des analyses statistiques acceptables. Dans le cadre de cette maîtrise, on a choisi de considérer séparément les différents lots de solubilisation lorsqu'on compare les propriétés rhéologiques et les résultats d'impression. Par exemple, le CH3GEL3#2 est le deuxième

lot de solubilisation de Chitosane 3% Gélatine 3%. Une seule solubilisation de CH2GEL2 est effectuée pour diminuer la taille de l'échantillonnage. Les gels de chitosane et de chitosane-gélatine seront donc considérés en fonction de leur lot de solubilisation.

3.1.2 Sensibilité à la température

L'attractif principal des gels de chitosane est leur sensibilité à la température. La Figure 3.1 présente l'évolution des modules de conservation G' et de perte G'' des gels CH3%, CH2GEL2 et CH3GEL3, en fonction du temps et lors du changement de température de 22° C (représentant les conditions dans la cartouche avant impression) à 37° C (représentant les conditions post-extrusion lors de la gélification). La première partie de la courbe montre donc la stabilité du gel à température ambiante et l'évolution de G' montre la capacité du gel à gélifier en augmentant la température. Selon la théorie de Winter et Chambon, on considère que le matériau se comporte comme une solution pour $G'' > G'$ et comme un gel (solide) lorsque $G' > G''$ (Winter & Chambon, 1986).

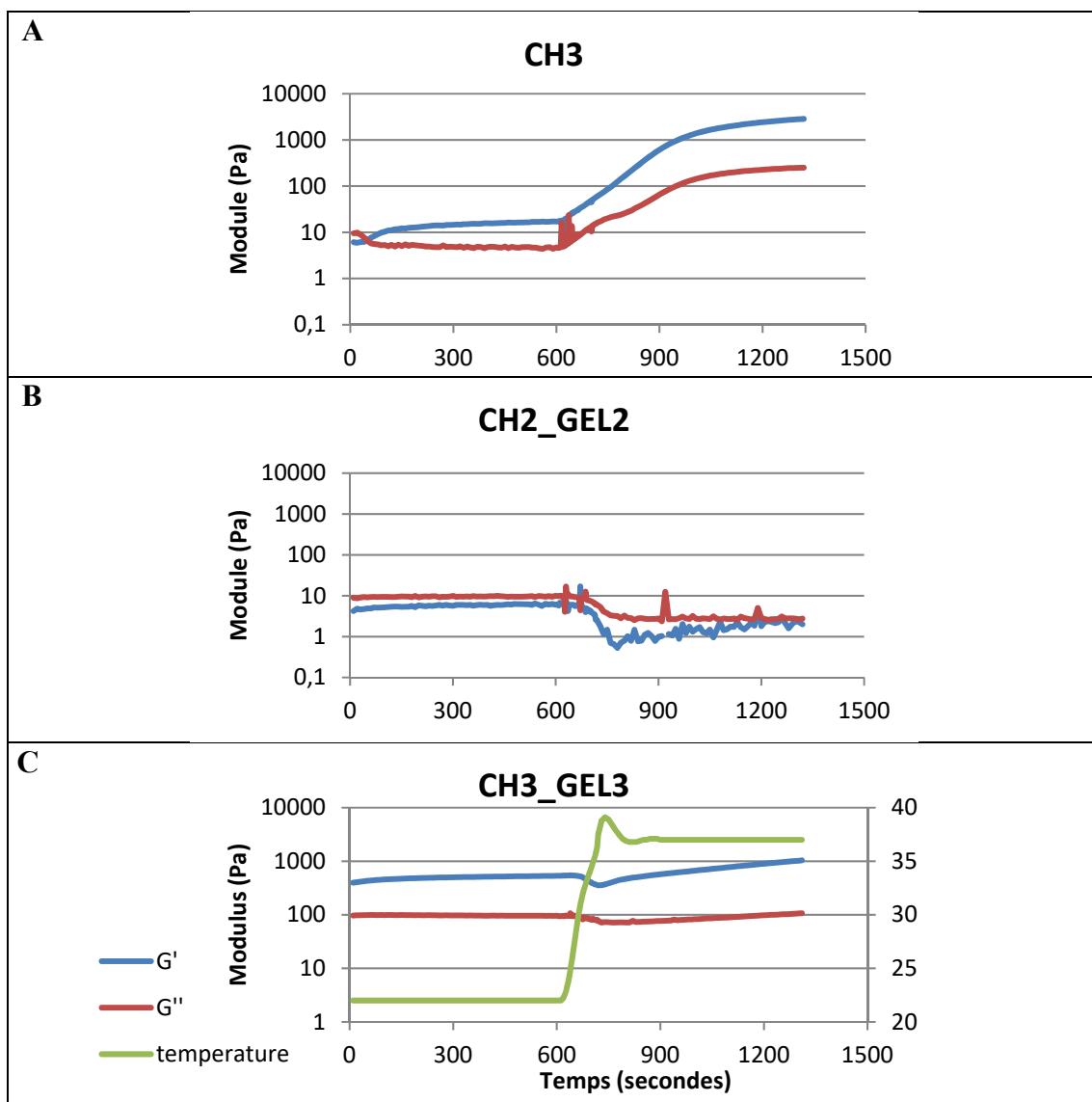


Figure 3.1 Sensibilité à la température des gels à base de chitosane. A) Module de conservation (G') et de perte (G'') du gel de chitosane 3%, B) du gel de chitosane 2% gélatine 2% et C) du gel de chitosane 3% Gélatine 3% en fonction de la température (la température est restée constante 10 minutes à 22°C, puis élevée à 37°C pour encore 10 min) (n=1) CC10, oscillation, 1Hz et amplitude 1%

On peut noter de fortes différences entre les courbes des 3 matériaux. Le CH2GEL2 n'est toujours pas qualifié de gel après 10 minutes à 37°C. Le CH3% a un comportement assez proche du CH2% utilisé généralement par l'équipe du LBEV (voir section 1.3.5), soit un module G' faible relativement stable à température ambiante, qui augmente rapidement lorsque la température est haussée à 37°C démontrant le caractère thermosensible du gel, bien que de façon plus prononcée que le CH2% (Rahimnejad et al., 2020). Le gel atteint

le point de gélification ($G' > G''$) en moins de 5 min, même à température ambiante. Les gels de chitosane-gélatine sont plus stables à température ambiante que ceux de CH3. On s'attend donc à avoir une meilleure reproductibilité d'impression, car le gel varie moins avant d'être imprimé. Les gels de chitosane 3% gélatine 3% et chitosane 2% gélatine 2%, subissent une légère baisse du module de conservation suivie d'une augmentation lente lors du passage de 22 à 37°C. Ceci était attendu, car la gélatine se liquéfie à 37°C. On en conclut que les gels de CH3GEL3 et de CH2GEL2 sont plus adaptés à l'impression à température ambiante, alors que le CH3 aurait avantage à être imprimé dans un environnement à 37°C pour profiter pleinement de sa capacité à solidifier sous l'effet de la température.

Bien que ces courbes montrent une petite variation du module de conservation dans le temps à température ambiante, nous avons choisi de ne pas considérer le temps dans le reste de cette maîtrise pour simplifier les tests et l'analyse des résultats. Ceci est l'une des limites de ce travail.

3.1.3 Rampe d'amplitude

La Figure 3.2 A présente une courbe typique du gel d'ALG3GEL7 soumis à un essai de rampe d'amplitude avec contrôle de la déformation. Ce gel se comporte d'une manière standard avec un plateau et une chute soudaine lorsqu'on augmentant la déformation au-dessus d'un certain seuil. On considère que la déformation à l'écoulement correspond au point où la valeur du G' diminue de 10% par rapport à la valeur moyenne de la région linéaire. On détermine ensuite la contrainte de cisaillement correspondant à la valeur de la déformation à l'écoulement (Figure 3.2 B). On obtient ainsi la contrainte d'écoulement.

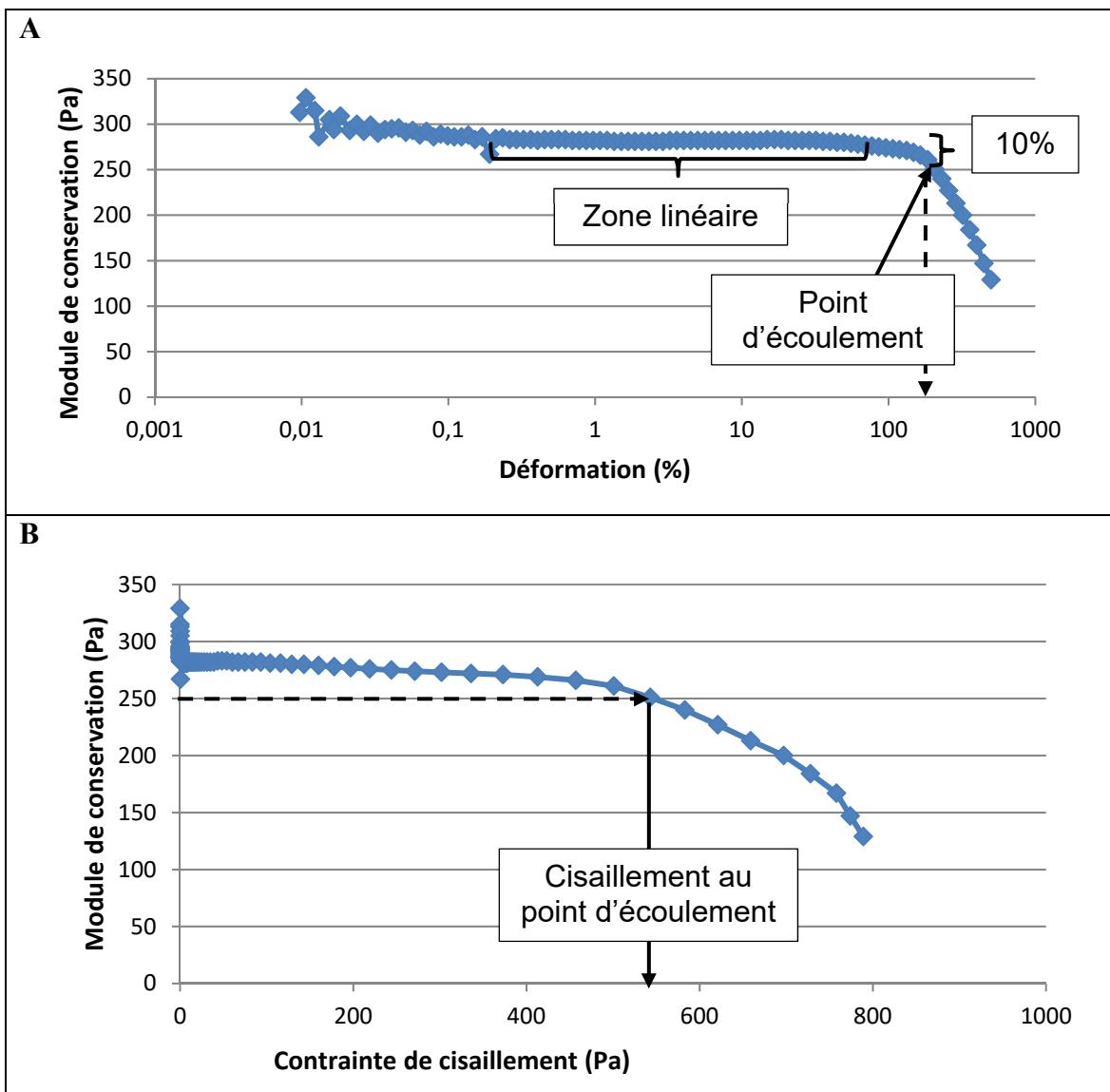


Figure 3.2 Exemple de courbe typique d'une rampe d'amplitude d'un gel à base d'alginate. A) Évolution du module de conservation G' en fonction de la valeur de la déformation appliquée. Le point d'écoulement est identifié lorsque le G' baisse de 10% par rapport à la région linéaire; B) G' selon la contrainte de cisaillement correspondant à la déformation. La contrainte d'écoulement est identifiée au point d'écoulement. PP25, oscillation, 22°C, 1Hz et amplitude 1%

La Figure 3.3 présente une courbe typique obtenue pour un gel à base de chitosane. Contrairement à l'alginate, la valeur de G' n'est pas stable et tend à augmenter jusqu'à sa baisse soudaine (Figure 3.3 A). Cette courbe peut s'expliquer par le fait que le gel n'est pas tout à fait stable à température ambiante, mais aussi parce que les conditions du test se situent hors de la zone viscoélastique linéaire, l'amplitude du test aurait pu être diminué

pour éviter ce comportement. Dans le futur, il serait intéressant d'étudier le comportement du gel lorsque l'on réduit encore davantage l'amplitude. Pour obtenir la déformation au point «d'écoulement», on a utilisé la valeur de G' lorsqu'il diminue de 10% par rapport à la valeur maximale. On détermine ensuite la contrainte de cisaillement à la déformation au point d'écoulement (contrainte d'écoulement).

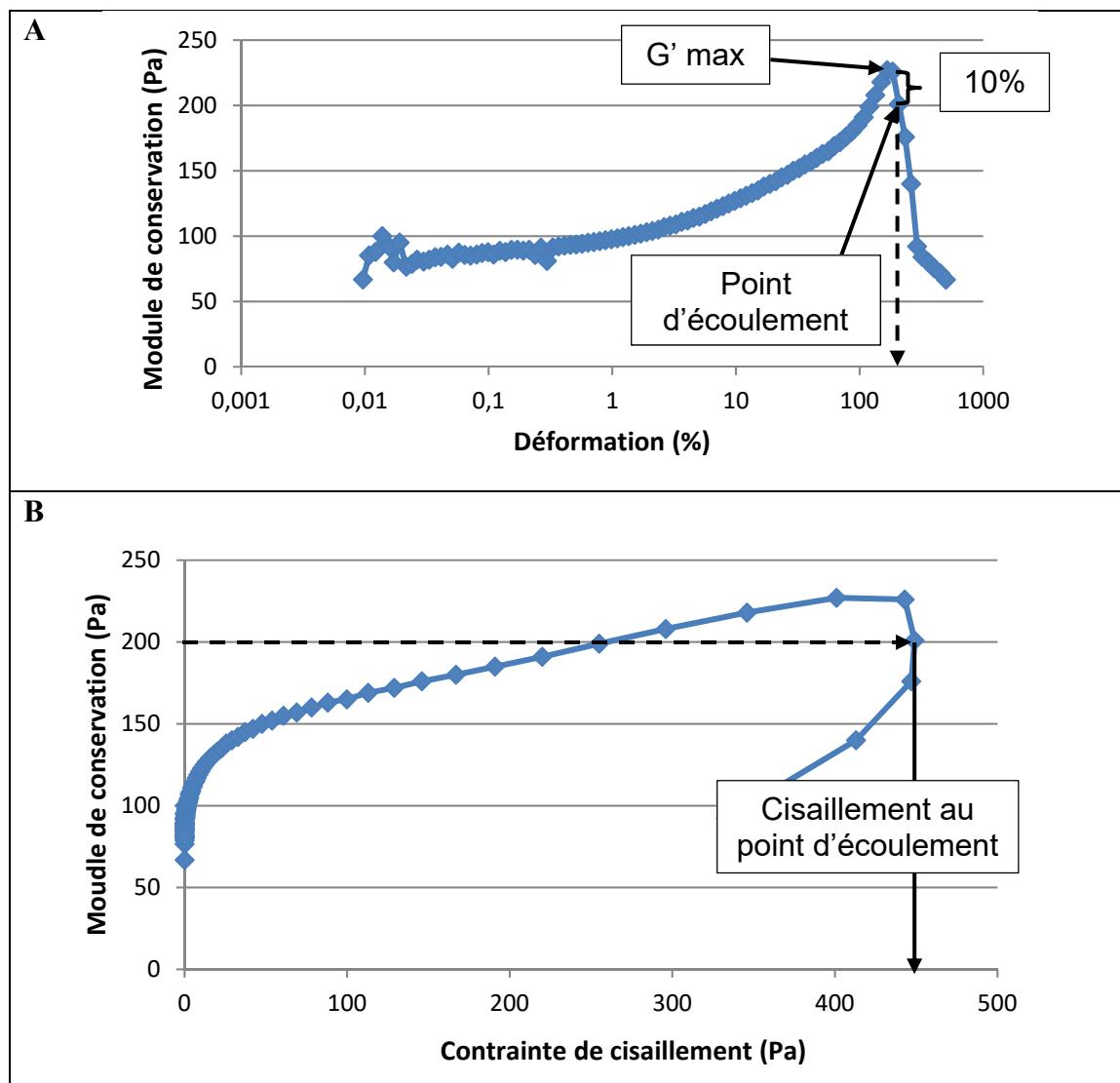


Figure 3.3 Exemple de courbe typique d'une rampe d'amplitude d'un gel à base de chitosane (CH3GEL3#2). A) La réponse du module de conservation en changeant la déformation. Le point d'écoulement est identifié lorsque le G' baisse de 10% par rapport à sa valeur maximale; B) G' selon la contrainte de cisaillement correspondant à la déformation. La contrainte d'écoulement est identifiée au point d'écoulement. PP25 oscillation, 22°C, 1Hz et amplitude 1%

La Figure 3.4 présente les valeurs de contrainte d'écoulement pour tous les gels testés.

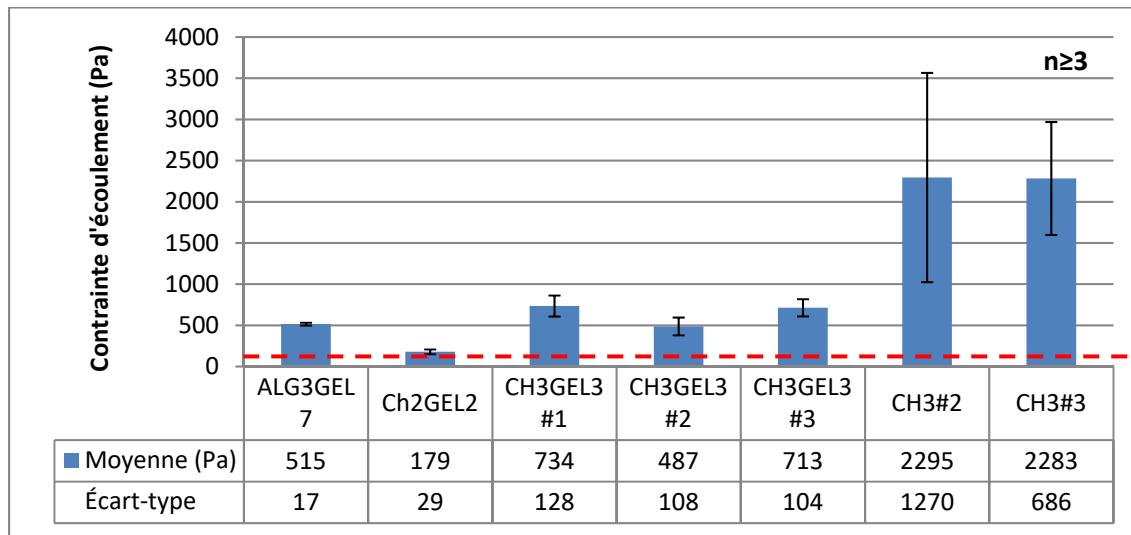


Figure 3.4 Contrainte d'écoulement des gels. La ligne rouge indique la limite théorique selon laquelle un gel doit avoir une contrainte d'écoulement supérieure à 100Pa pour permettre une impression adéquate ($n \geq 3$, moyenne et DS)

On observe une grande différence entre les formulations : CH2GEL2 présente les valeurs les plus faibles, CH3% les plus élevées, tandis que ALG3GEL7 et CH3GEL3 ont des valeurs intermédiaires assez proches. L'écart type plus élevé pour le CH3% (entre 600 et 1300 Pa selon les lots) et CH3GEL3 (104-128 Pa) par rapport au ALG3GEL7 (17 Pa) met en évidence la moins grande reproductibilité des gels de chitosane. L'écart-type élevé du CH3% pourrait cependant aussi être dû au manque de stabilité à température ambiante (évolution des propriétés au cours du temps, même à 22°C) observé lors du test de sensibilité à la température.

Townsend mentionne qu'une bioencre doit avoir une contrainte de cisaillement supérieure à 100 Pa pour permettre au gel de résister à l'écoulement naturel dû à la gravité et au poids du gel (Townsend et al., 2019). Le gel de CH2GEL2 a une contrainte d'écoulement de 178 Pa, ce qui en fait la contrainte d'écoulement la plus faible. Les gels contenant de la gélatine ont une contrainte d'écoulement entre 480 et 700 Pa, alors que les gels contenant seulement du chitosane ont une contrainte d'écoulement autour de 2300 Pa.

La Figure 3.5 présente la valeur du module de conservation au point d'écoulement. Cette valeur indique la grandeur de la réponse élastique lors de l'extrusion, c'est-à-dire l'intensité du comportement solide du gel (Ribeiro et al., 2017) (Schwab et al., 2020).

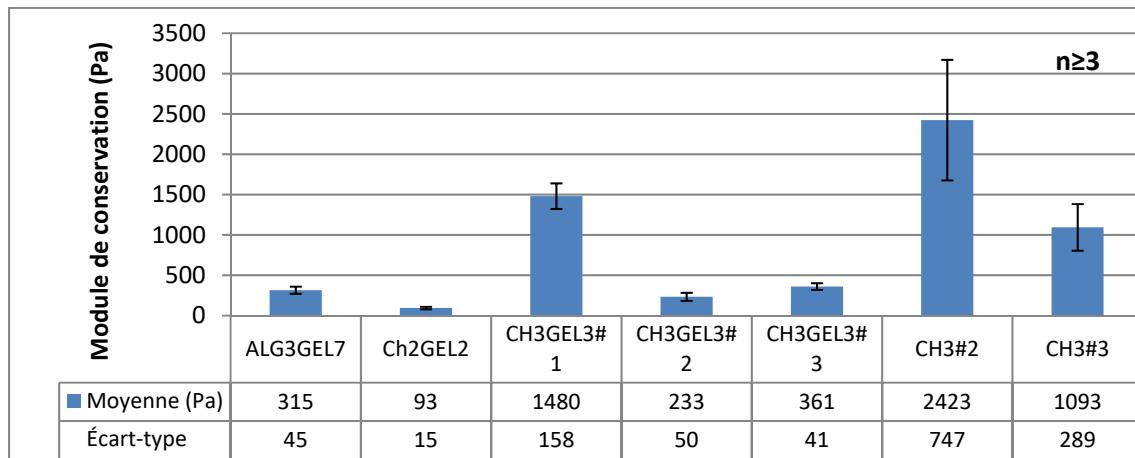


Figure 3.5 Module de conservation au point d'écoulement. Le module de conservation est mesuré lorsqu'il baisse de 10% par rapport à la valeur de la région linéaire ou de la valeur maximale lorsqu'il n'y a pas de région linéaire ($n \geq 3$, moyenne et DS)

La tendance est similaire à celle de la contrainte d'écoulement. Le CH2GEL2 a la valeur la moins élevée, tandis que le CH3 a les valeurs les plus élevées. On observe cependant ici que le lot de CH3GEL3#1 a un module de conservation nettement supérieure à celle des autres lots. Le nombre d'échantillons est trop faible pour une analyse statistique mais la différence est très nette. Elle peut être reliée aux résultats de viscosité très supérieure observée pour ce lot par rapport aux autres (ANNEXE VI) et à des différences de comportement rhéologique comme on le verra dans les prochaines sections.

3.1.4 Essais de récupération (« recovery »)

La Figure 3.6 présente les courbes moyennes de la viscosité dynamique des gels durant les essais de récupération. Durant ce test, le gel est tout d'abord soumis à un cisaillement très faible durant 10 min (0.001 rad/s) pour mimer le gel stable à l'intérieur de la cartouche d'imprimante, suivi d'une minute à différents taux de cisaillements (10, 100, 500 et 1000

rad/s), puis de nouveau à des conditions quasi-statiques (0.001 rad/s) pour observer la récupération des propriétés après cisaillement.

La première partie des courbes (pré-extrusion) des gels montre une augmentation de la viscosité pendant les 10 premières minutes. Celle-ci est reproductible, comme on peut le voir, par la superposition de ces courbes (toutes à 0.001 rad/s). Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette augmentation de la viscosité, soit i) une gélification lente à température ambiante ; ii) l'évaporation progressive de l'eau contenue dans le gel ou iii) changement de température. Afin d'éviter les changements de comportement dus à l'évaporation, une fine couche d'huile pourrait être ajoutée entre le gel et l'air lors du test. La deuxième phase de récupération (extrusion) à haut taux de cisaillement permet d'observer le comportement de rhéofluidité des gels. En effet, tel qu'attendu, la viscosité diminue drastiquement et ce, d'autant plus que le cisaillement est important. Lors de l'arrêt du cisaillement (phase de récupération), on observe que la viscosité des gels est généralement moins élevée que sa valeur juste avant la phase d'extrusion, surtout lorsque le cisaillement a été important. La viscosité tend cependant ensuite à augmenter (phase de récupération), ce qui montre la capacité des gels à se réparer.

Pour obtenir des données quantitatives à corréler avec la qualité d'extrusion, plusieurs valeurs ont été déterminées à partir de ces courbes : viscosité pré-cisaillement, viscosité lors du cisaillement, viscosité post-cisaillement et le pourcentage de récupération. On a utilisé pour cela les courbes obtenues au taux de cisaillement de 500 rad/s, qui correspond aux conditions d'extrusion réelles (entre 500 et 1000 rad/s selon l'équation de Dealy (section 2.2.4)).

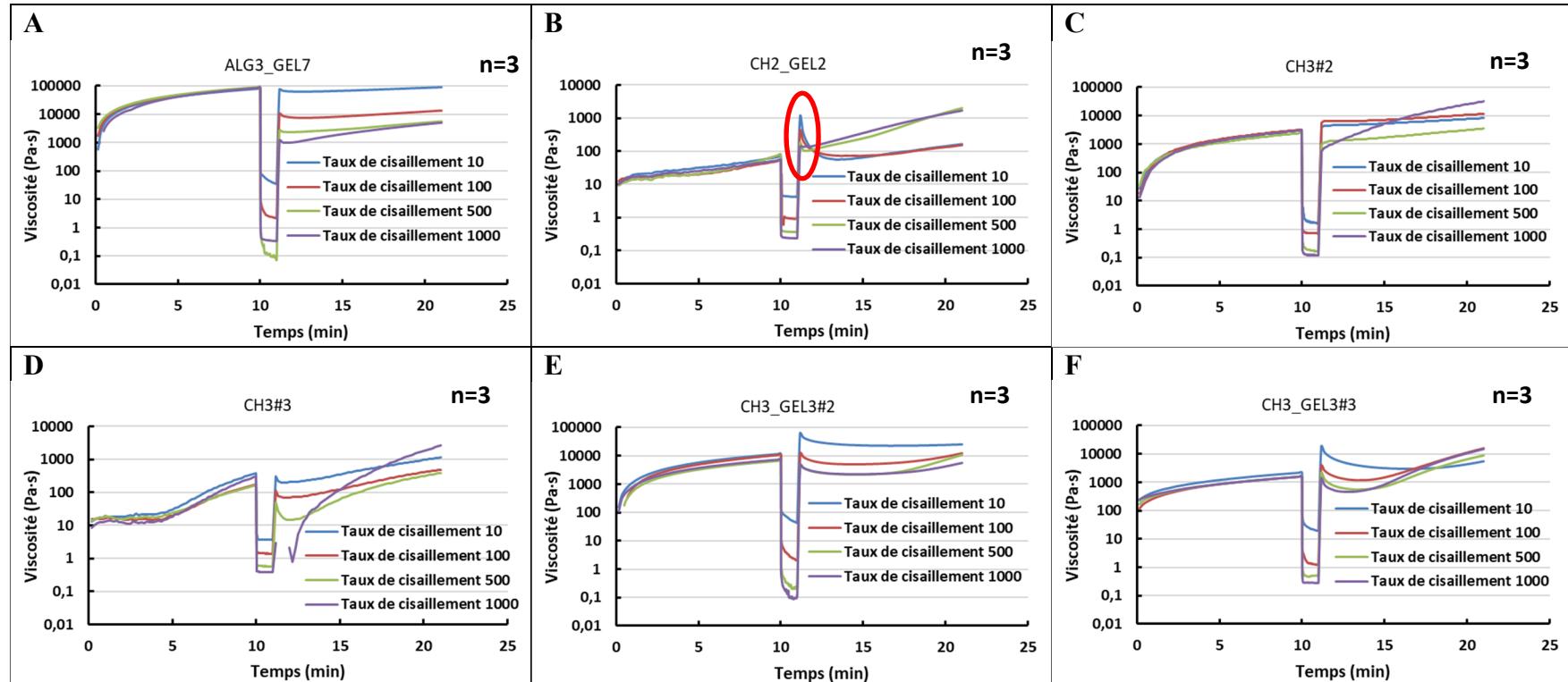


Figure 3.6 Tests de récupération des gels montrant l'évolution de la viscosité en fonction du taux de cisaillement durant l'extrusion. On distingue trois phases :). La stabilité du gel est tout d'abord observée pendant 10 minutes à 0,001 rad/s. Le cisaillement est ensuite appliqué pendant 1 minute à 10, 100, 500 et 1000 rad/s. La récupération du gel est mesurée à 0,001 rad/s pendant 10 minutes. Les pics post-extrusion (voir cercle rouge sur la figure B) sont considérés comme des artefacts par la compagnie Anton Paar. L'ensemble du test est effectué à température ambiante (n=3, moyenne). CC10, rotation, 22°C

Dans le cas où la valeur post-cisaillement présente un pic immédiat qui diminue ensuite rapidement (Figure 3.6 B), les premières mesures ont été ignorées, car d'après la compagnie Anton Paar, il s'agit d'artefact et cela ne représente pas le comportement réel du gel

La Figure 3.7 présente les résultats de viscosité dynamique à différents moments du test de récupération, soit la valeur pré-extrusion (immédiatement avant le début de l'extrusion) (Figure 3.7 A) et la valeur post-extrusion (moyenne sur les 5 points (5 secondes) suivant la phase d'extrusion) (Figure 3.7 B). En calculant le ratio la viscosité dynamique post-extrusion sur pré-extrusion, on obtient le pourcentage de récupération de la viscosité (Figure 3.7 C).

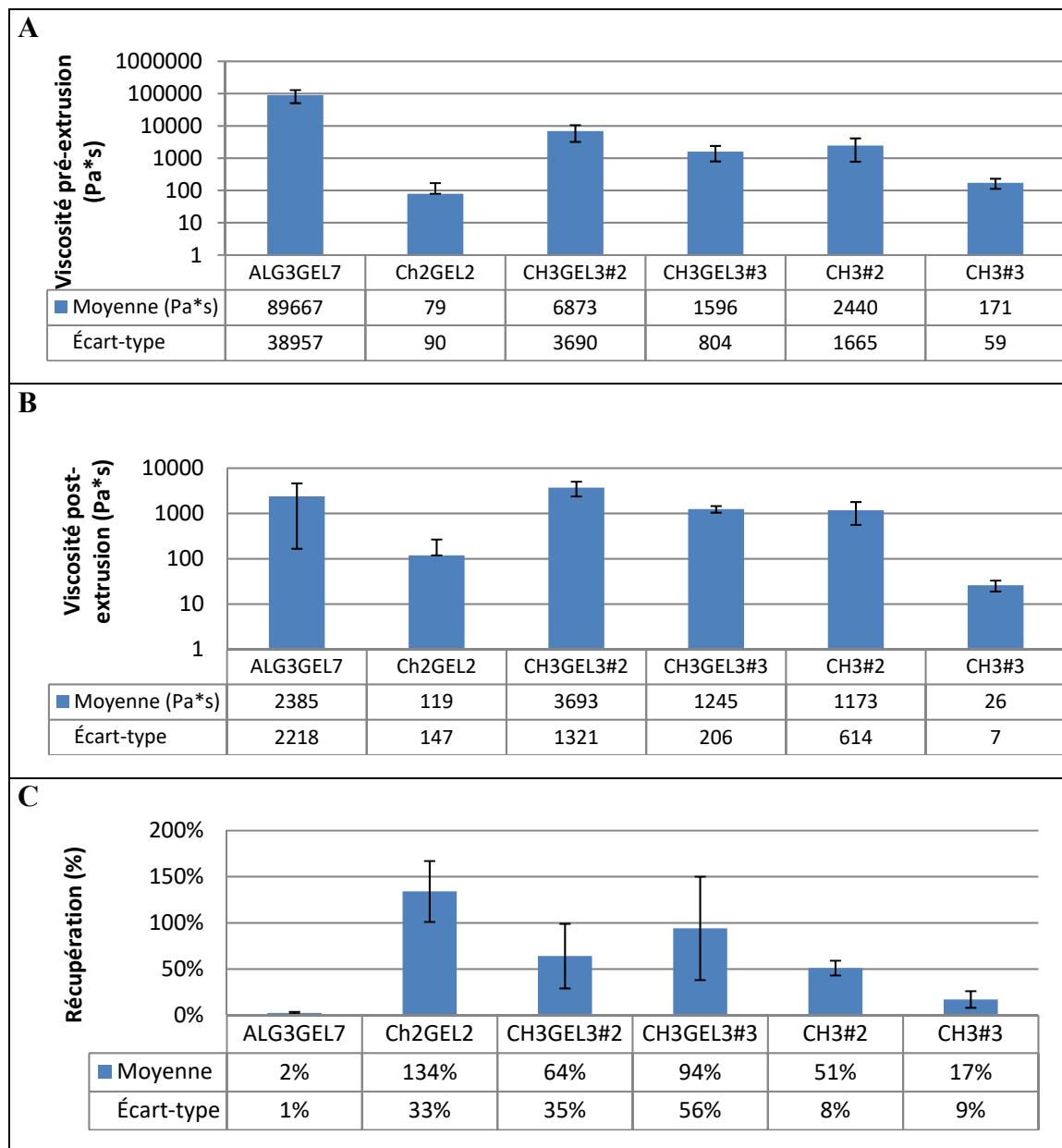


Figure 3.7 Viscosité dynamique A) pré-extrusion et B) post-extrusion. Les valeurs de la viscosité sont mesurées lorsque le taux de cisaillement de la phase d'extrusion est de 500 rad/s. C) La récupération est le ratio entre la viscosité post-extrusion/pré-extrusionX100. (n=3, moyenne et SD)

Le gel d'ALG3GEL3 a une récupération de seulement 2%. Le CH2GEL2 a la meilleure récupération post-extrusion (134%), les gels de CH3 et CH3Gel3 ayant des valeurs intermédiaires avec de forts écart types. La viscosité post-extrusion du CH2GEL2 (119Pa*s) et du CH3#3 (26 Pa*s) sont nettement sous celle des autres gels (entre 1200 et

3700 Pa*s) et l'ALG3GEL7 (2385 Pa*s) se situe dans la moyenne. On obtient donc des tendances différentes en observant seulement le pourcentage de récupération ou la viscosité pré/post-extrusion. La corrélation de ces résultats avec les résultats d'impression pourra montrer quel paramètre est le plus prédicteur de la qualité d'impression, et notamment si la limite théorique de 85% de récupération proposée par (Kiyotake et al., 2019) peut s'appliquer pour tout type de gel. Le test de récupération permet également de mesurer les propriétés rhéofluidifiantes des gels. La prochaine section présente ces résultats.

3.1.5 Propriétés rhéofluidifiantes et calcul du taux de cisaillement durant l'extrusion

La capacité rhéofluidifiante des gels est très importante pour leur permettre de protéger les cellules lors du procédé d'extrusion ((Tao Jiang et al., 2019), (Gillispie et al., 2020) et (Townsend et al., 2019)). Pour l'évaluer, nous avons reporté les valeurs de viscosité des gels lors des tests de recouvrement aux différents taux de cisaillement, tel que décrit à la figure 19. Les courbes sont présentées en ANNEXE VII. A partir de la valeur de la pente ($n-1$), le taux de cisaillement maximal à la paroi de la buse lors de l'extrusion du gel a été calculé à l'aide de l'équation de Dealy (section 2.2.4). Les données sont reportées au Tableau 3.1.

Tableau 3.1 Résultats de la contrainte de cisaillement lors de la rampe d'amplitude correspondant à la contrainte de cisaillement calculée. Le facteur « n » est calculé à partir de la pente ($n-1$) du graphique de la viscosité par rapport au taux de cisaillement (log-log). Le taux de cisaillement selon les paramètres d'extrusion est calculé selon l'équation de Dealy et Wissbrun (1990)

Gels	ALG3 GEL7	CH2 GEL2	CH3 GEL3 #1	CH3 GEL3 #2	CH3 GEL3 #3	CH3#2	CH3#3
n	-0,204	0,359	-0,155	-0,312	0,032	0,372	0,509
Taux de cisaillement (rad/s)	NA	921	NA	NA	NA	905	790

La valeur de n selon les courbes de tendances varie grandement selon les gels testés. Les valeurs de n entre 0,3 et 0,5 semblent logiques et permettent de calculer les valeurs de taux de cisaillement, contrainte de cisaillement et viscosité à l'extrusion. Par contre, pour certains gels, une valeur de n nulle ou négative est obtenue. Cette valeur manque de sens théorique puisqu'un n négatif signifierait qu'augmenter le taux de cisaillement diminue la contrainte de cisaillement. Ces données ne peuvent donc pas être utilisées pour calculer le taux de cisaillement lors de l'extrusion. Ces mesures aberrantes indiquent que la méthodologie du test n'est pas adaptée à ces gels ayant une viscosité élevée. Ceci sera expliqué dans la section discussion.

3.2 Effet des paramètres d'impression sur les dimensions des filaments extrudés

Avant de corrélérer les propriétés rhéologiques des encres et la qualité de l'impression, nous avons évalué l'effet de chacun des paramètres d'extrusion sur la qualité des filaments extrudés, car ils peuvent aussi influencer la qualité et la faisabilité de l'impression. Le Tableau 3.2 présente la qualité des filaments extrudés du gel CH3GEL3#1, exprimée sous forme de largeur et de score de 1 à 3 pour la continuité et pour l'uniformité (n=6 pour chaque condition) en fonction du débit d'extrusion (0,5, 1 et 2 $\mu\text{L/s}$), de la vitesse de déplacement de la buse (3,5, 7, 9 et 11 mm/s), de la grandeur du diamètre d'extrusion (0,2 et 0,25mm) et de la hauteur des couches de matière (0,2 et 0,3mm). Le gel CH3GEL3#1 a été choisi, car il est stable à température ambiante (donc indépendant du temps). Tous les autres gels ont été testés sur un éventail de paramètres moins larges par la suite pour déterminer les meilleurs paramètres d'extrusion. Les tableaux complets regroupant tous les paramètres testés pour chaque gel se trouvent en ANNEXE VIII.

Tableau 3.2 Largeur et qualité des filaments extrudés en fonction des paramètres d'impression. Exemple de données mesurées pour l'hydrogel CH3GEL3#1, imprimé avec aiguille conique 27G et une hauteur entre couches de 0,2 mm. Le score total pour la qualité du filament est évalué sur 6 en additionnant la note de continuité et d'uniformité. Un score cumulatif de 5 ou 6 (vert) indique que le filament est optimal; un score de 4 (jaune) indique que le filament peut convenir ou non selon la situation; un score de 2 ou 3 indique que le filament n'est pas propice à l'impression

Bioink : CH3GEL3#1						
Buse : 27G conical						
Hauteur 0,2 mm						
Débit	Vitesse	Continuité	Uniformité	Score	Moyenne	Déviation
[mm^3/J]	[mm/sec]	/3	/3	/6	largeur	standard
0,5	3	3	2	5	0,56	0,05
	5	3	2	5	0,50	0,04
	7	3	2	5	0,50	0,11
	9	2	3	5	0,44	0,12
	11	2	3	5	0,38	0,05
1	3	3	1	4	0,81	0,05
	5	3	2	5	0,70	0,06
	7	3	2	5	0,64	0,12
	9	3	2	5	0,62	0,11
	11	3	3	6	0,40	0,07
2	3	3	1	4	1,14	0,08
	5	3	1	4	0,99	0,04
	7	3	2	4	0,84	0,08
	9	3	2	5	0,77	0,03
	11	3	2	5	0,65	0,08

Dans le cas de cette étude, on cherche à obtenir des filaments de petite dimension et ayant une bonne continuité et uniformité pour permettre de créer une structure de plusieurs couches. Tel que discuté dans les sections précédentes, il est préférable d'avoir un filament mince pour permettre un bon échange d'oxygène et de nutriments avec les cellules et le milieu et pour créer des structures ayant une bonne précision. Les sections suivantes présentent le résumé des résultats et donc l'effet de chacun des paramètres d'impression sur la qualité et la dimension des filaments extrudés.

3.2.1 Impact du débit d'extrusion et de la vitesse de déplacement de la buse

La Figure 3.8 présente l'effet du débit d'extrusion sur la largeur des lignes extrudées pour le CH3GEL3#1 selon les différentes vitesses de déplacement de la buse. Malgré un écart-type non négligeable, on observe une tendance linéaire à la hausse de la largeur des lignes en augmentant le **débit d'extrusion**. Ceci est valable pour les 5 vitesses de déplacement de la buse.

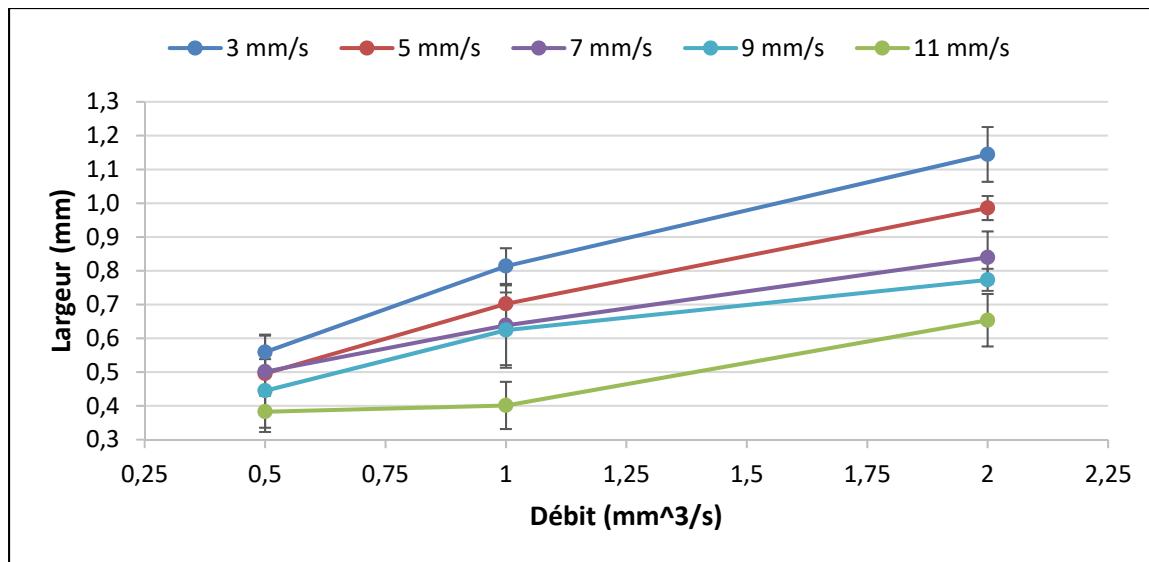


Figure 3.8 Effet du débit d'extrusion sur la largeur du filament d'un gel de CH3GEL3 #1.
La hauteur des couches est fixée à 0,2mm; diamètre d'extrusion de 0,2mm (27G). La vitesse de déplacement varie de 3 à 11 mm/s; le débit varie de 0,5 à 3 µL/s. (n=6, moyenne et DS)

La Figure 3.9 montre clairement l'effet inversement proportionnel de l'augmentation de la **vitesse de déplacement** de la buse sur la largeur des filaments extrudés. Ceci s'explique par le fait que ce paramètre affecte la quantité de matière déposée par unité de distance. En augmentant la vitesse de déplacement, la quantité de matière déposée par distance est réduite, diminuant ainsi la largeur et la hauteur des filaments déposés. Cette tendance est la même pour une hauteur de 0,2mm et un diamètre d'extrusion de 0,2mm (résultats en ANNEXE IX). Les filaments ayant obtenu une cote de qualité inférieure à 4 ne sont pas présentés (débit de 0,5µL/s avec un diamètre d'extrusion de 27G ou de 25G avec une

vitesse de déplacement > 5mm/s), car ils sont considérés comme étant non propices à l'extrusion (section 2.3.2.1).

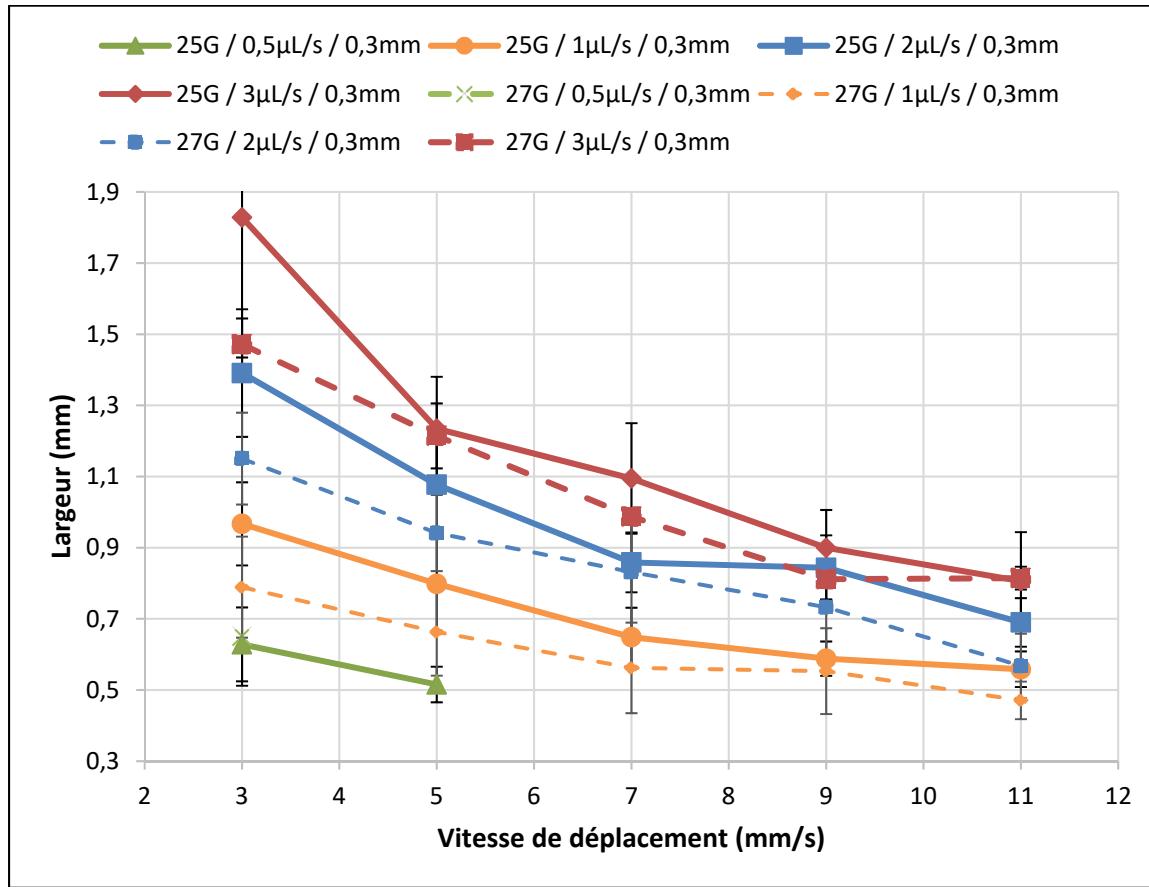


Figure 3.9 Effet de la vitesse de déplacement de la buse (3 à 11 mm/s), du diamètre d'extrusion (0,2 et 0,25mm) et du débit (0,5 à 3 µL/s) sur la largeur de filaments extrudé du gel CH3GEL3 #1. La hauteur des couches est fixée à 0,3mm; le débit varie ainsi que la vitesse de déplacement ($n \geq 3$)

On observe donc que la largeur des filaments augmente avec le débit et lorsque la vitesse de déplacement diminue. Ces résultats étaient prévisibles étant donné l'augmentation de la quantité de matière extrudée par unité de distance. Le gel peut donc se comporter de deux façons : s'accumuler en hauteur ou s'étendre sur la largeur. L'augmentation de la largeur indique que le gel a une forte tendance à s'étendre. Par contre, les paramètres d'impression influencent également la hauteur de la couche imprimée, comme le montre la Figure 3.10.

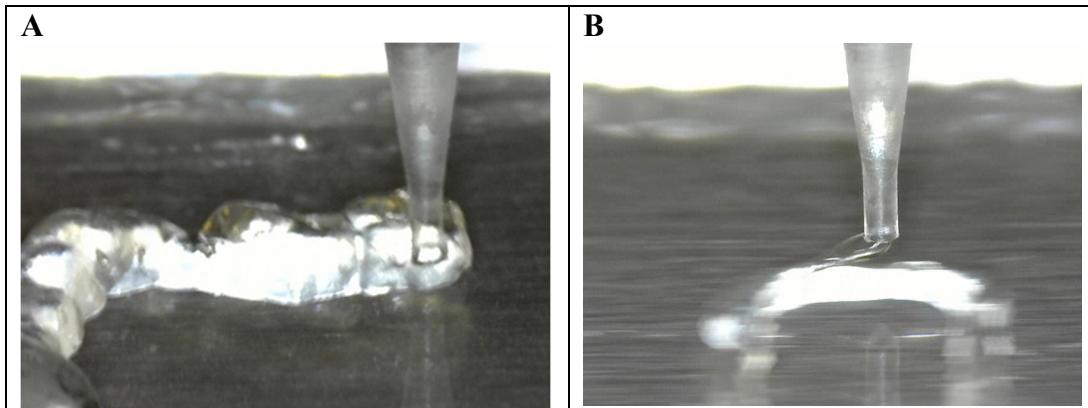


Figure 3.10 Exemple de mauvaise calibration des paramètres causant une extrusion du CH3GEL3#1 à l'intérieur des précédentes couches. A) Première couche de déposition et B) 3^e couche de déposition : débit 0,5µL/s; diamètre 0,2mm; vitesse de déplacement de la buse 5mm/s; hauteur 0,3mm

La Figure 3.10 A montre un cas où la buse d'extrusion se retrouve à l'intérieur de la 2^e couche d'extrusion lors de l'extrusion de la 3^e couche de matière. Une trop grande quantité de matière déposée par unité de distance est la cause de ce phénomène. La Figure 3.10 B montre le cas inverse où la buse d'extrusion est éloignée de la 2^e couche d'extrusion, créant des discontinuités d'extrusion.

3.2.2 Impact du diamètre d'extrusion

La Figure 3.9 présente également l'impact de la taille de la buse d'extrusion sur la largeur du filament extrudé. En passant d'une buse de gauge 25 ($\phi = 0.25\text{mm}$; ligne pleine) à une de gauge 27 ($\phi = 0.20\text{mm}$; ligne brisée), on voit que la largeur du filament tend à diminuer pour toutes les conditions. La différence est plus marquée pour des vitesses de déplacement faibles (3 à 7mm/s).

Par contre, il ne faut pas oublier que la diminution du diamètre d'extrusion augmente également la contrainte de cisaillement exercée sur le gel, ce qui peut affecter la forme de filaments extrudés. Une contrainte trop élevée peut créer le phénomène de « melt-fracture » lorsque la contrainte crée une déformation et un manque d'uniformité du filament extrudé.

3.2.3 Impact de la hauteur des couches

Le nombre de couches et la hauteur entre 2 couches imprimées est également un paramètre critique pour les structures 3D. Un nombre élevé de couches augmente le temps d'impression et donc le temps durant lequel le gel doit supporter le poids de la structure. Par contre, un nombre élevé de couches augmente la qualité de la structure imprimée. Par contre, en ne faisant varier que ce paramètre, il est difficile d'obtenir une tendance claire sur la largeur des filaments extrudés (Figure 3.11). Une mauvaise combinaison de la hauteur avec le débit ou la vitesse de déplacement mène à une sur-déposition de matière et des lignes irrégulières ou à un manque de précision et des discontinuités causés par une trop grande hauteur.

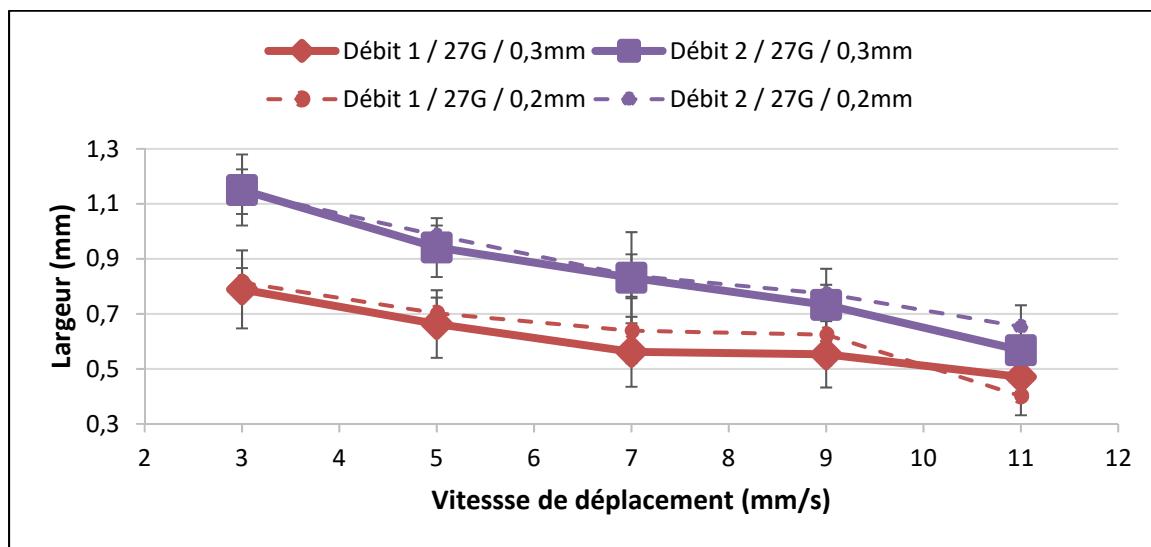


Figure 3.11 Effet de la hauteur des couches de gel sur un gel de CH3GEL3 #1. Le débit est de 1 ou 2 $\mu\text{L/s}$; la hauteur de couches est de 0,2 ou 0,3 mm; le gauge de l'aiguille est de 27 (0,2mm). La vitesse de déplacement varie de 3 à 11 mm/s

Il est donc essentiel d'adapter ce paramètre selon le comportement du gel. Un gel ayant tendance à maintenir sa forme post-extrusion a de meilleures chances d'avoir une hauteur de couche proche de la dimension du diamètre d'extrusion. Par contre, un gel ayant tendance à s'aplatir post-extrusion devra avoir une hauteur d'impression plus petite pour compenser cet affaissement. Il est donc important de prendre en compte les propriétés rhéologiques du gel pour le choix de l'architecture de la structure à imprimer.

3.3 Résultats de bio-impression par extrusion

L'imprimabilité des différents gels a été caractérisée via la largeur (diamètre) des filaments extrudés et la fidélité d'impression des structures en nid d'abeille, tel que présenté dans la section Méthodologie. Tous les gels ont été imprimés aux mêmes paramètres d'extrusion pour simplifier l'analyse et diminuer le nombre de paramètres à prendre en compte. Nous sommes conscients que ceci a généré un biais en favorisant certains gels ayant des filaments plus minces et de meilleure qualité à ces paramètres, mais c'est pourquoi on s'assure que tous les filaments ont une qualité de filaments supérieure à 4 aux conditions d'extrusion (section 2.3.2.1). Ces paramètres permettent l'extrusion de filaments ayant la plus petite largeur atteignable tout en étant continus et en ayant une uniformité acceptable. Les paramètres sélectionnés ont donc une hauteur d'extrusion de 0,2mm avec une buse d'extrusion d'un diamètre interne de 0,2mm, le débit est de 0,5 μ L/s et la vitesse de déplacement de la buse est de 5mm/s.

Les prochaines sections présentent les résultats pour les différents gels et les corrélations entre les propriétés rhéologiques des gels et la largeur de filaments et la fidélité d'impression.

3.4 Dimension des filaments

La Figure 3.12 présente la largeur des filaments aux paramètres d'extrusion choisis. Les corrélations entre les propriétés rhéologiques des gels et ces valeurs sont évaluées dans les prochaines sections.

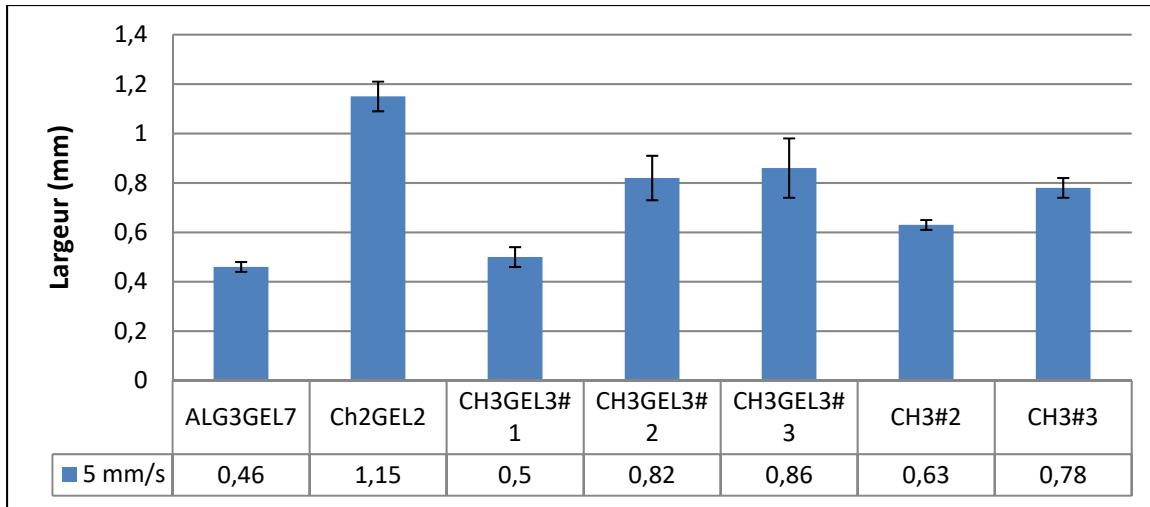


Figure 3.12 Largeur des filaments à une vitesse de déplacement de la buse de 5mm/s, un débit de 0,5 μ L/s, une hauteur de 0,2mm et un diamètre interne de buse de 0,2mm

On observe que bien que les paramètres d’extrusion soient les mêmes pour tous les gels, leur largeur varie entre 0,46 et 1,15mm. Les propriétés rhéologiques affectent donc grandement la dimension des filaments extrudés.

3.5 Fidélité d’impression

Tel que décrit dans le chapitre de méthodologie (section 2.3.3), la fidélité d’impression a été caractérisée à l’aide du paramètre Pr (ratio aire théorique/aire réelle) mesuré sur des structures en nid d’abeille. Étant donné la largeur très variable des filaments, la structure de type hexagonale créée par le programme BIOCAM est cependant différente d’un hydrogel à l’autre pour obtenir une porosité similaire (Figure 3.13), ce qui pose possiblement un biais lors de l’analyse.

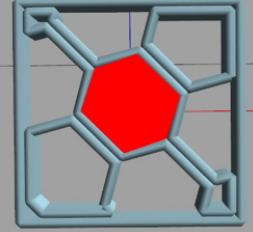
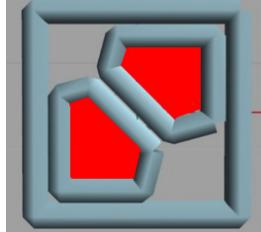
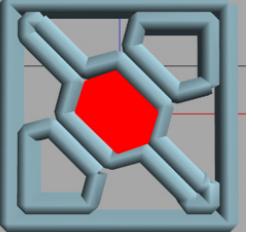
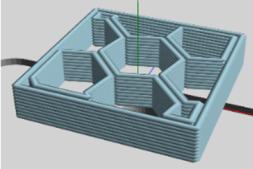
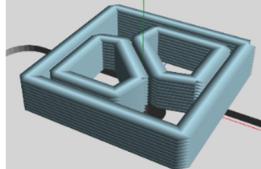
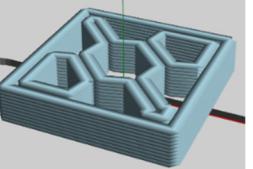
Gels	ALG3GEL7	CH2GEL2	CH3 GEL3#2	CH3 GEL3#3	CH3 #3
Structure 10x10mm					
Vue isométrique					

Figure 3.13 Architecture des structures. La zone utilisée pour calculer la fidélité d'impression est identifiée en rouge

La structure pour le gel de CH2GEL2 est différente des autres, car les filaments sont trop larges pour permettre de créer un hexagone complet au centre de la structure sans risquer de le boucher. La fidélité d'impression est donc calculée en utilisant l'aire théorique et réelle des trous (voir 2.3.3). L'architecture des gels de CH3GEL3 et de CH3 sont identiques, car la largeur des filaments ne varie pas de façon importante.

La fidélité d'impression (Pr), ratio entre l'aire théorique/aire pratique, a été mesurée sur des structures de 3 et de 10 couches, suite à l'impression et après réticulation complète (bain de $CaCl_2$ pour l'alginate, 24h d'incubation à $37^\circ C$ pour les gels de chitosane). Des images caractéristiques sont présentées dans le Tableau 3.3. On observe une différence de géométrie selon le nombre de couches, avec une perte nette de la fidélité de reproduction de la structure théorique à 10 couches. Des différences sont également observables pré et post-géification, ce qui montre l'effet du poids des couches de matières et du processus de géification sur la résistance des gels sur la structure.

Tableau 3.3 Images de structures imprimées pour la mesure de la fidélité d'impression. Les gels sont extrudés avec une vitesse de déplacement de la buse de 5 mm/s; débit de $0,5\mu\text{L}/\text{s}$; hauteur de 0,2mm; diamètre d'extrusion 0,2mm (27G). Des structures de 3 et 10 couches ont été imprimées. La fidélité d'impression est mesurée sur la structure non réticulée et ensuite sur la même structure réticulée. La distance entre deux lignes de l'échelle représente 1mm

	Gels	ALG3GEL7	CH2GEL2	CH3GEL3#2	CH3GEL3#3	CH3#3
Structure non-gélifiée	3 couches					
	10 couches					
Structure gélifiée	3 couches					
	10 couches					

La Figure 3.14 présente les valeurs de Pr pour les structures fabriquées en 3 et 10 couches avec les différents gels, calculée à partir des photos des structures non gélifiées. On rappelle qu'une valeur de Pr proche de 1 est optimale.

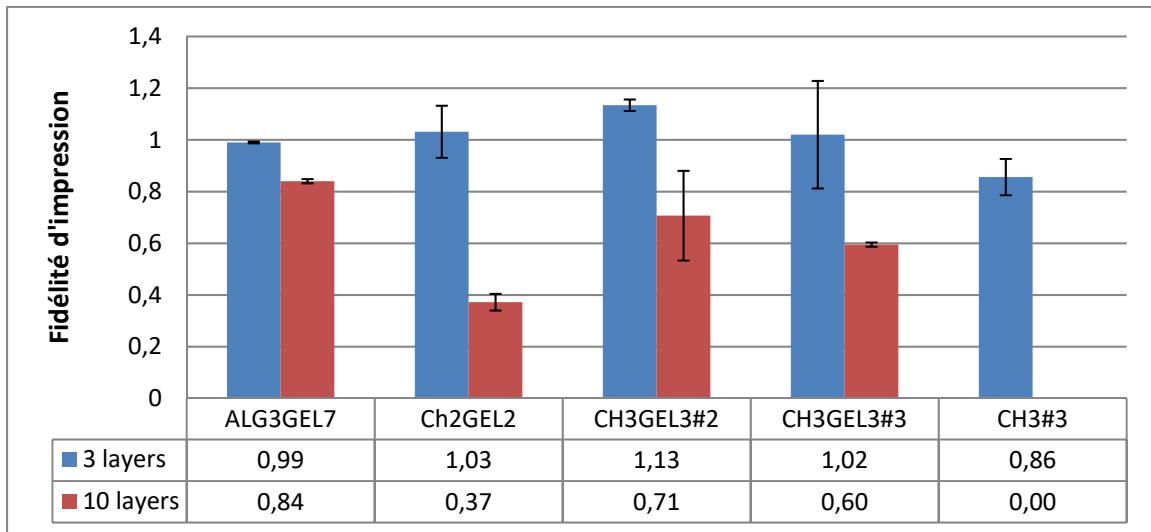


Figure 3.14 Valeur du paramètre de fidélité d'impression Pr pour des structures de 3 et de 10 couches. Un Pr de 1 indique que l'aire de la structure pratique est identique à celle de la structure théorique. Pr <1 indique que l'aire de la structure réelle est plus petite que celle de la structure théorique, tandis que Pr>1 indique que l'aire de la structure réelle est plus grande que celle de la structure théorique (n=3, moyenne et DS)

Le CH3GEL#1 n'a pas été analysé, car il ne restait pas une assez grande quantité de gel. Le CH3#2 n'est pas présenté, car une instabilité trop importante à température ambiante crée des discontinuités et des blocages dans la buse d'extrusion et rend donc l'impression d'une structure complète impossible. Le CH3#3 de 10 couches a une fidélité d'impression de 0, car le gel s'agglomère dans les coins de la structure et l'hexagone du centre n'est complet que sur 3 à 5 couches de matière. Le gel d'ALG3GEL7 semble offrir la meilleure fidélité d'impression, car il a un Pr de 0,99 pour 3 couches et de 0,84 pour 10 couches, avec un faible écart type. C'est le gel qui est le moins affecté par le nombre de couches de gel. Les gels à base de chitosane donnent d'assez bons résultats à 3 couches (Pr entre 0,86 et 1,13) mais les valeurs de Pr sont beaucoup plus faibles pour les structures à 10 couches (Pr entre 0 et 0,37).

3.6 Étude des corrélations entre propriétés rhéologiques et résultats d'impression (dimension de filaments et fidélité Pr)

Le Tableau 3.4 résume les résultats rhéologiques utilisés pour étudier les possibles corrélations avec les résultats de l'impression (largeur des filaments et Pr).

Tableau 3.4 Résumé des propriétés rhéologiques des différentes gels testés. Les gels sont identifiés avec leur numéro de lot correspondant (#1)

		ALG3GEL7	Ch2 GEL2	CH3 GEL3#1	CH3 GEL3#2	CH3 GEL3#3	CH3#2	CH3#3
Contrainte d'écoulement	Pa	515 ±17	<u>179</u> ±29	734 ±128	487 ±108	713 ±104	<u>2295</u> ±1270	<u>2282</u> ±686
Module de conservation	Pa	315 ±45	<u>93</u> ±15	1480 ±158	233 ±50	361 ±41	<u>2423</u> ±747	<u>1093</u> ±289
Viscosité pré-extrusion	Pa*s	<u>89 667</u> ±38957	<u>79</u> ±90	Na	6 873 ±3690	1 596 ±804	2 440 ±1665	<u>171</u> ±59
Viscosité post-extrusion	Pa*s	<u>2385</u> ±2218	<u>11</u> <u>9±147</u>	Na	<u>3693</u> ±1321	1245 ±206	1173 ±614	<u>26</u> ±7
Récupération	%	<u>2</u> ±1	<u>134</u> ±33	Na	64 ±35	94 ±56	51 ±8	<u>17</u> ±9

Les prochaines sections présentent l'étude de l'influence de la contrainte d'écoulement, du module de conservation à l'écoulement et de la viscosité pré et post-extrusion sur la largeur des filaments extrudés et sur la fidélité d'impression.

3.7 Régression entre propriétés rhéologiques et dimension des filaments

La

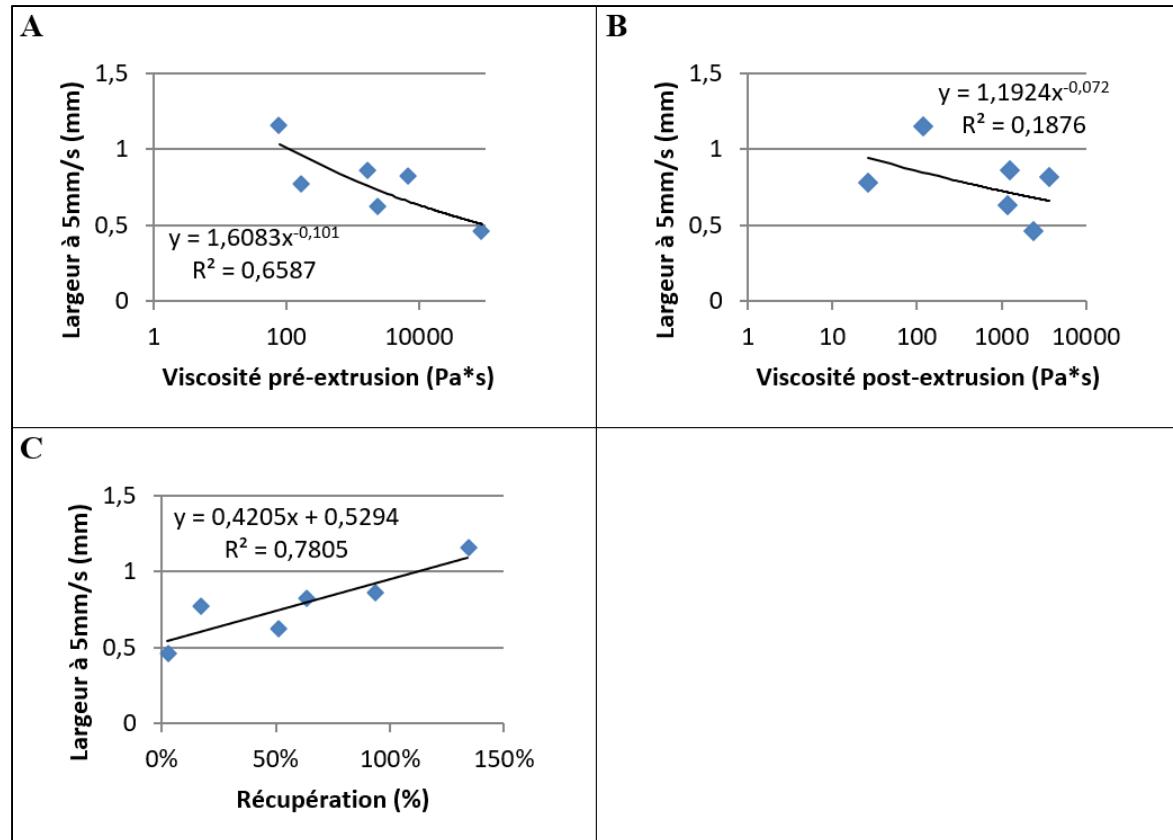


Figure 3.15 présente les courbes reliant la valeur de la viscosité pré (A) et post-extrusion (B) ainsi que le pourcentage de recouvrement (C) avec la largeur des lignes extrudées. Chaque point correspondant à un gel différent. Les résultats pour deux vitesses de déplacement de la buse (5 et 7 mm/s) sont présentés pour montrer que la tendance était très similaire (résultats montrés en Annexe X).

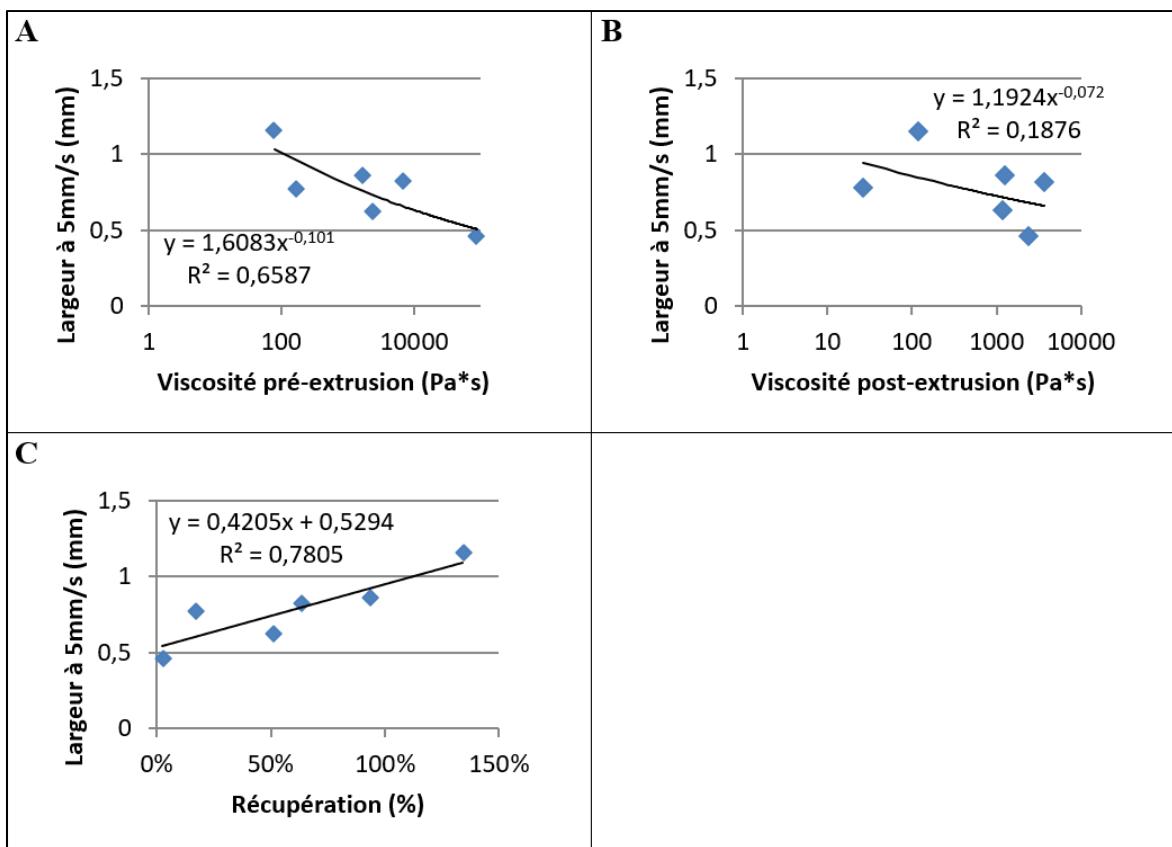


Figure 3.15 Régression de la largeur des filaments aux mêmes paramètres d'extrusion avec la viscosité pré et post-extrusion et la récupération (A, B et C respectivement). La largeur des filaments est mesurée avec un débit de 0,5L/s, un diamètre d'extrusion de 0,2mm et une hauteur de 0,2mm. La vitesse de déplacement est de 5 mm/s

On observe immédiatement qu'il n'y a pas de régression linéaire entre les paramètres. Les résultats suggèrent cependant que le diamètre des filaments tend à réduire lorsque la **viscosité du gel** augmente (pré-extrusion)

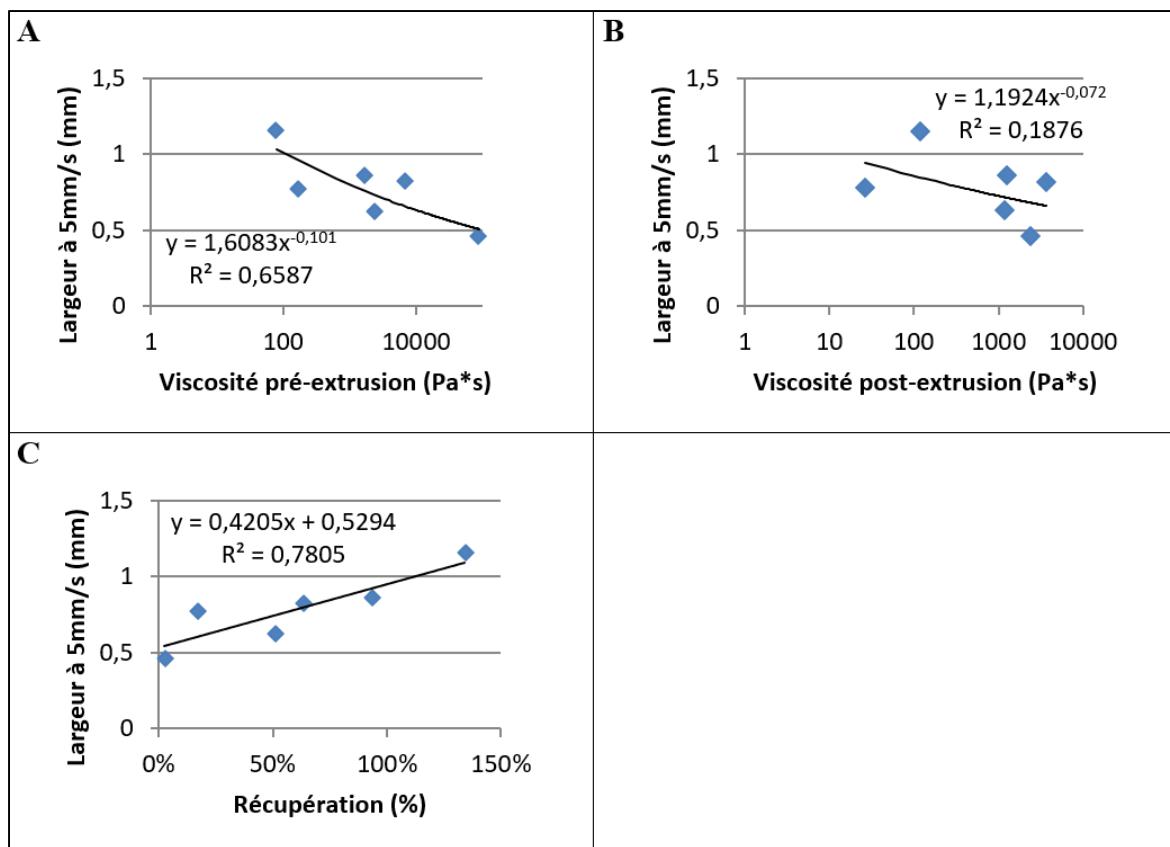


Figure 3.15 A). La courbe de tendance (régression) est de type puissance (coefficient de détermination $R^2=0,69$). Il faut de plus tempérer ce résultat en rappelant que cette courbe de tendance est fortement liée à un point particulier correspondant à ALGGEL qui présente le meilleur diamètre et la plus haute viscosité pré-extrusion.

La

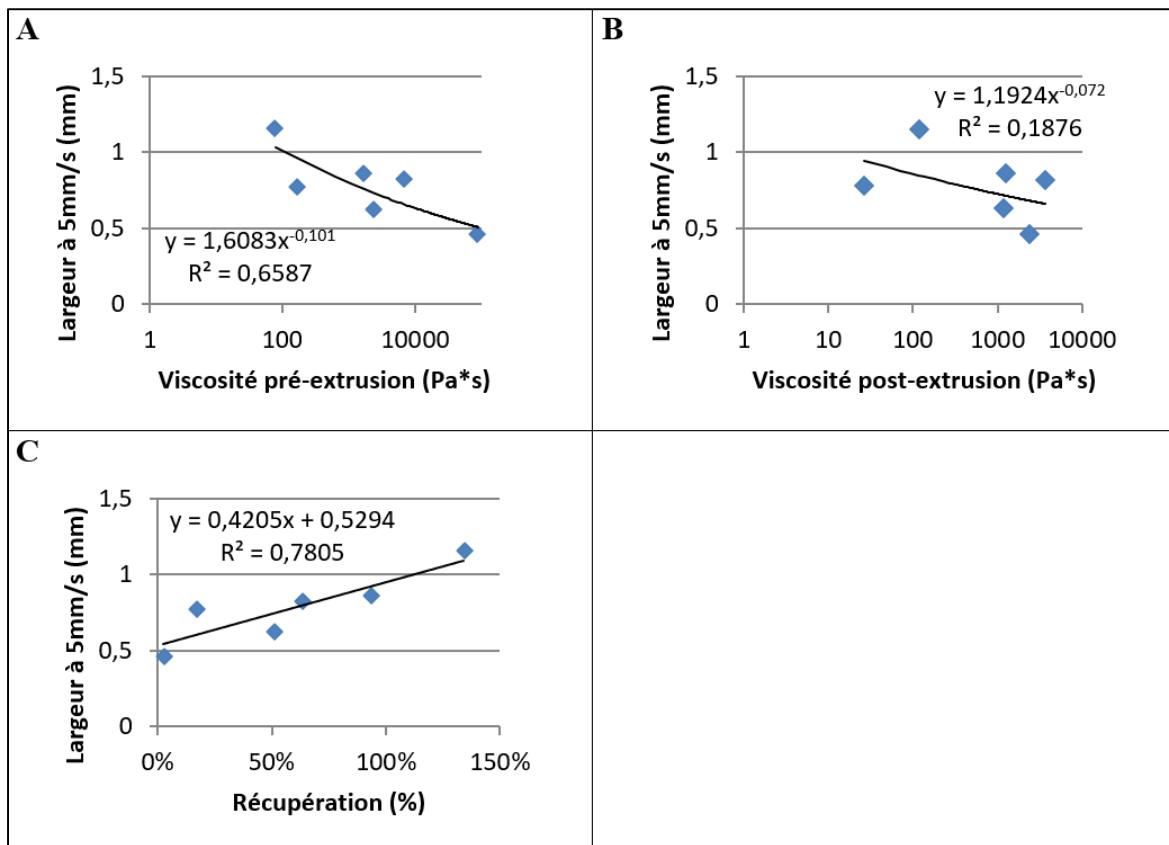


Figure 3.15 B montre la relation entre la **viscosité post-extrusion** et la largeur des filaments extrudés. Il n'y a pas de régression claire (coefficient de détermination très faible) malgré une légère tendance à obtenir des filaments plus fins lorsque la viscosité augmente, tel qu'attendu.

Enfin le pourcentage de récupération (

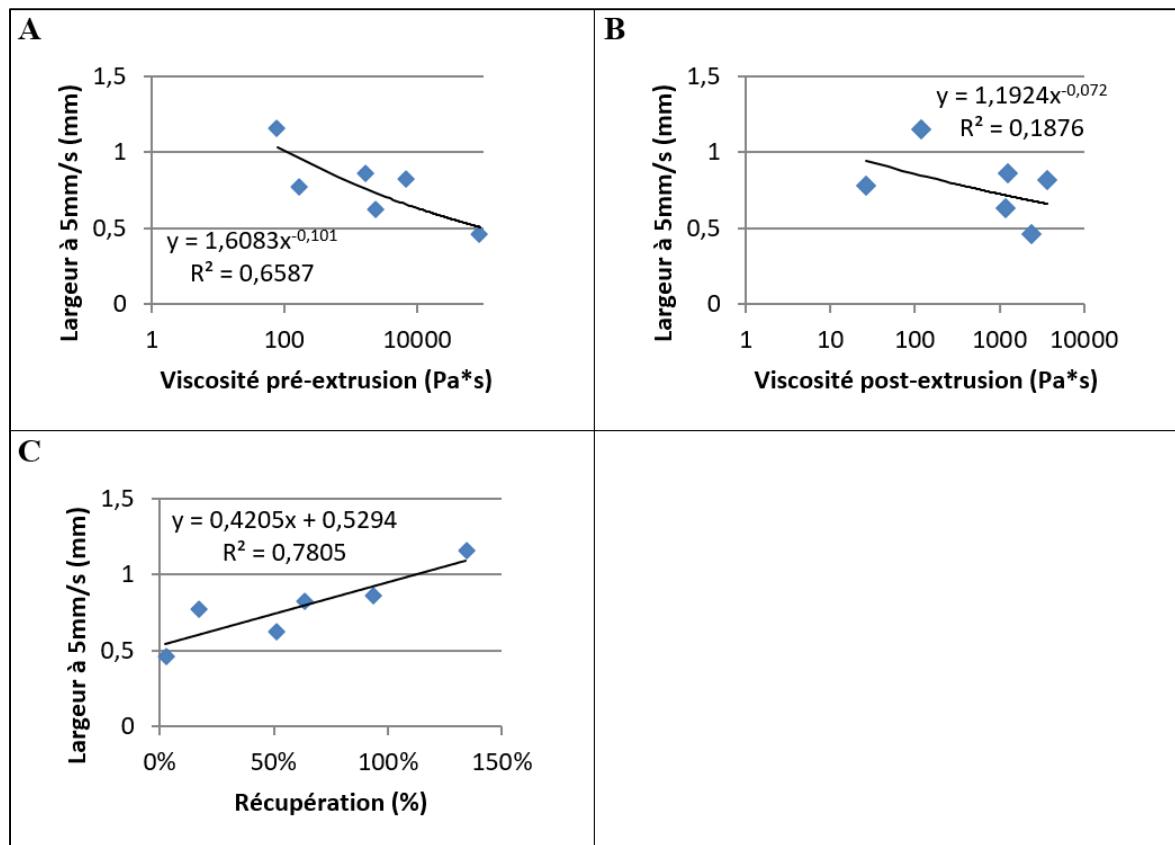


Figure 3.15 C) indique qu'une augmentation du pourcentage de récupération augmente la largeur des filaments. Cette tendance est contre intuitive, car un pourcentage de récupération élevé indique que le gel est peu affecté par le processus d'extrusion. On devrait donc observer la tendance inverse, c'est-à-dire une diminution de la largeur des filaments correspondant à l'augmentation du pourcentage de récupération. Le pourcentage de récupération seul ne permet pas de prendre en compte la valeur de la viscosité du gel déposé et ne donne donc pas une bonne indication de la réalité.

Les résultats des tests de recouvrement ne permettant pas d'expliquer totalement les différences entre les gels, on a étudié également les liens avec les propriétés au point d'écoulement.

Tel que montré sur la Figure 3.16, il n'y a pas de lien clair entre la valeur de la contrainte d'écoulement, ou du module de conservation au point d'écoulement, et la largeur des lignes extrudées.

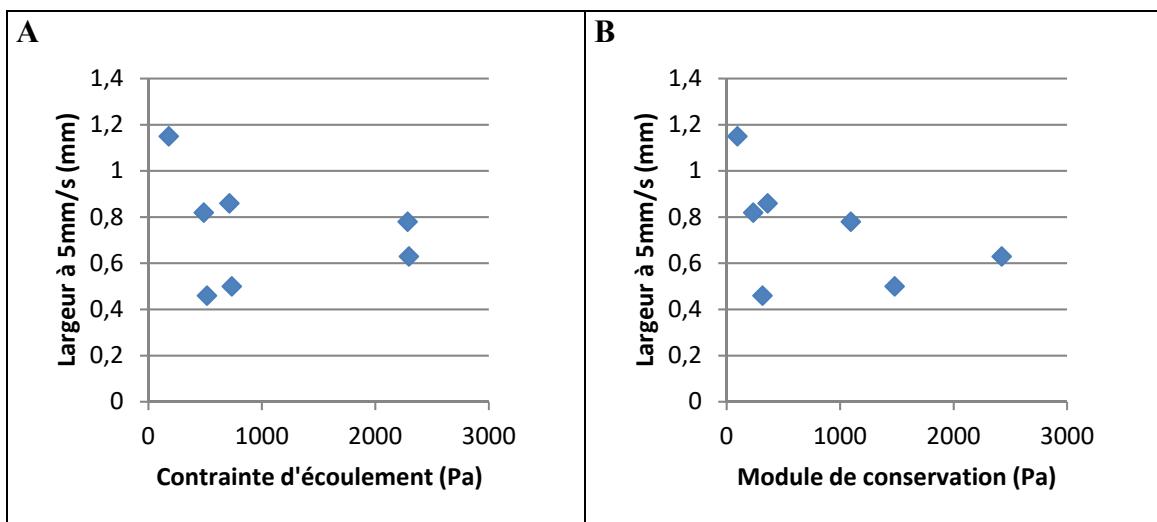


Figure 3.16 Lien entre la largeur des filaments aux propriétés au point d'écoulement. A) Influence de la contrainte d'écoulement sur la largeur à 5mm/s.
B) Effet du module de conservation sur la largeur à 5mm/s

Il ne semble pas y avoir de tendance linéaire entre la contrainte d'écoulement et la largeur des filaments ou entre le module de conservation et la largeur des filaments.

3.8 Corrélation propriétés rhéologiques et fidélité d'impression

La Figure 3.17 présente l'effet de la valeur de la viscosité pré et post-extrusion sur la fidélité d'impression, exprimée sous forme de la valeur Pr pour les structures 3 couches et 10 couches.

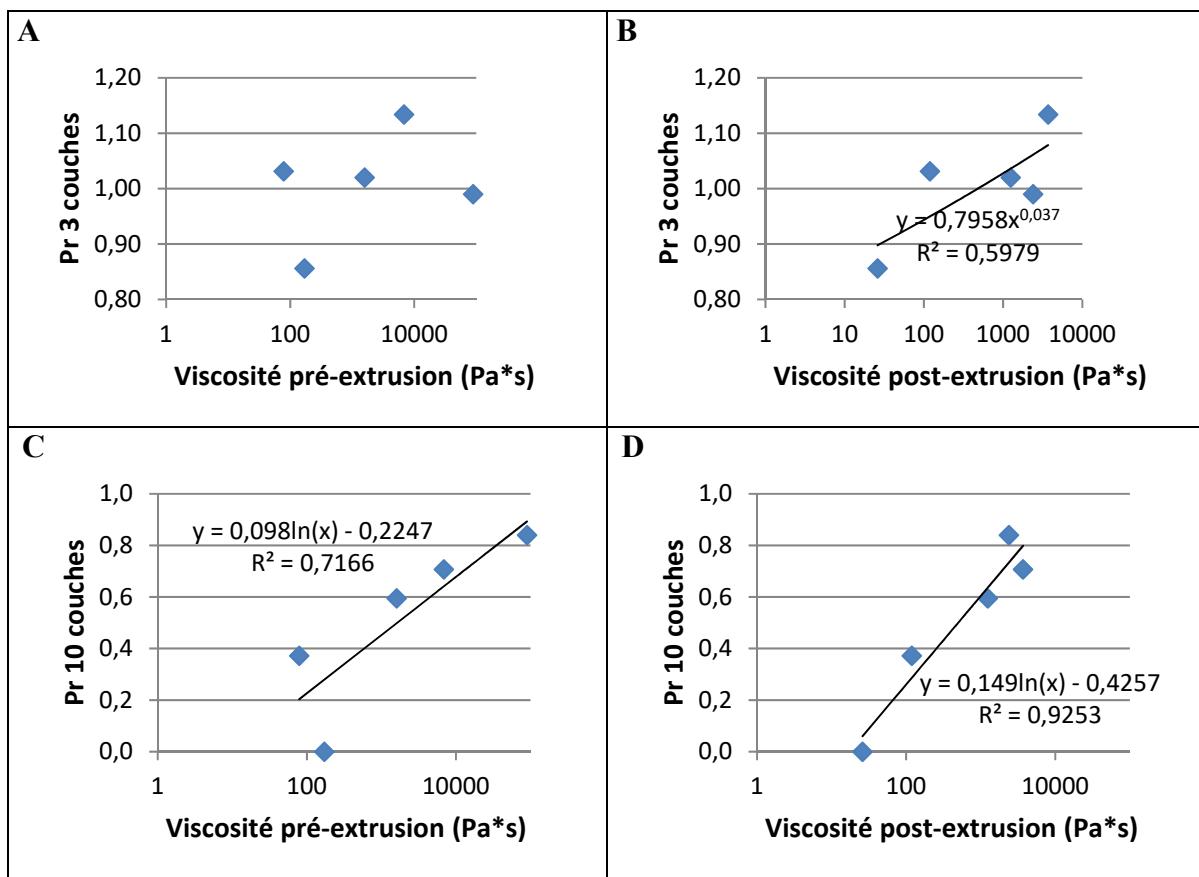


Figure 3.17 Corrélation de la viscosité pré-extrusion et post-extrusion sur la fidélité d'impression d'une structure de 3 A) et B) et 10 couches C) et D) respectivement (buse 27G, vitesse 5mm/s, débit 0,5 μ L/s et hauteur de 0,2mm)

La Figure 3.17 A et la Figure 3.17 C présentent les liens entre la **viscosité pré-extrusion** et la fidélité d'impression d'une structure non gélifiée de 3 et 10 couches respectivement. Dans les deux cas, on vise une valeur de $Pr=1$. Pour les structures en 3 couches, on a pu observer que Pr pouvait être supérieur ou inférieur à 1, et on pourrait donc observer une relation non linéaire sous forme de cloche, avec un maximum pour $Pr=1$. Mais il y a très peu de différence entre les matériaux testés et aucune tendance ne se dégage. Ce phénomène peut être dû au fait que la structure de 3 couches est créée à partir de la largeur des filaments extrudés sur 3 couches également réalisée à la section 3.4, alors que la structure de 10 couches subit le poids de 7 niveaux supplémentaires et donc une plus grande déformation. Pour les structures 10 couches, toutes les valeurs sont inférieures à 1 et on peut observer une tendance claire de type logarithmique ($R^2 = 0,72$ et $0,93$ pour la viscosité pré-extrusion et post-extrusion

respectivement) entre la valeur de la fidélité d'impression et la viscosité pré et post-extrusion. On observe une tendance similaire de l'augmentation de la viscosité sur la diminution de la largeur des filaments (

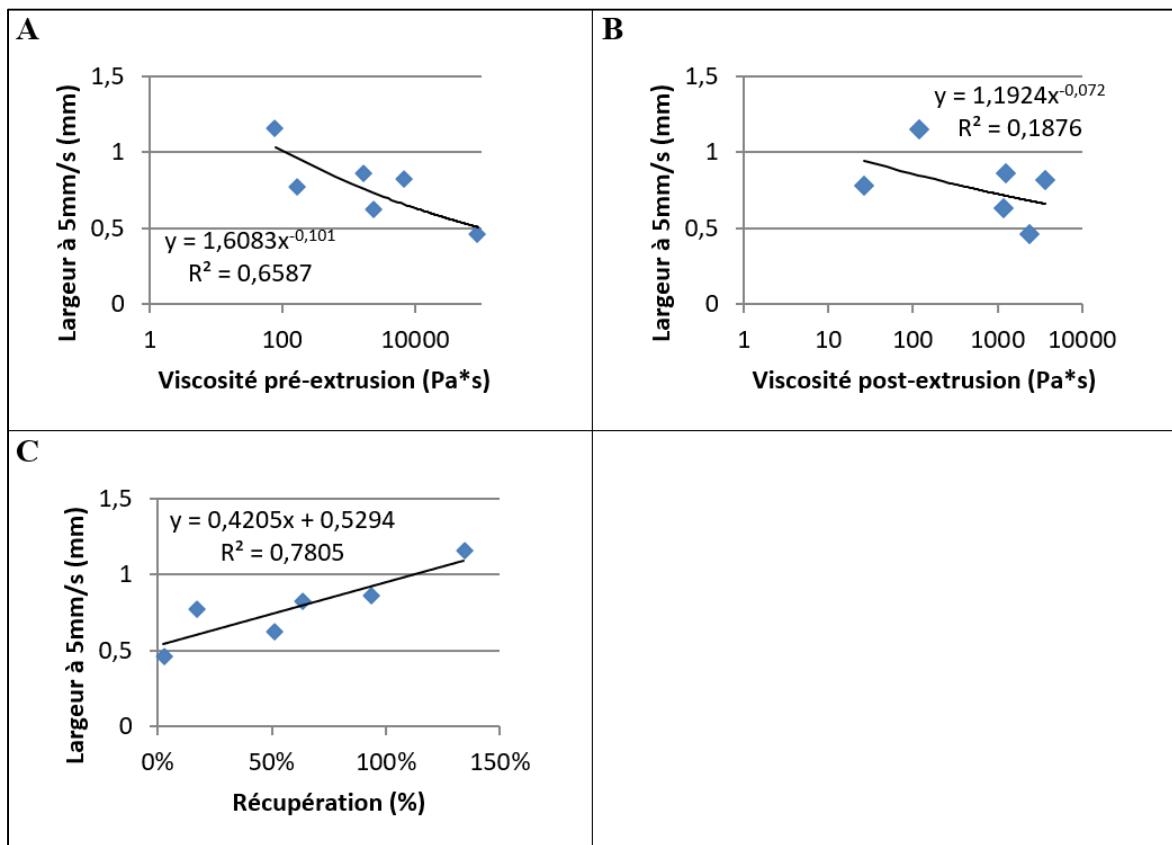


Figure 3.15)

La Figure 3.18 présente l'effet des propriétés rhéologiques au point d'écoulement sur la fidélité d'impression des structures de 3 et de 10 couches.

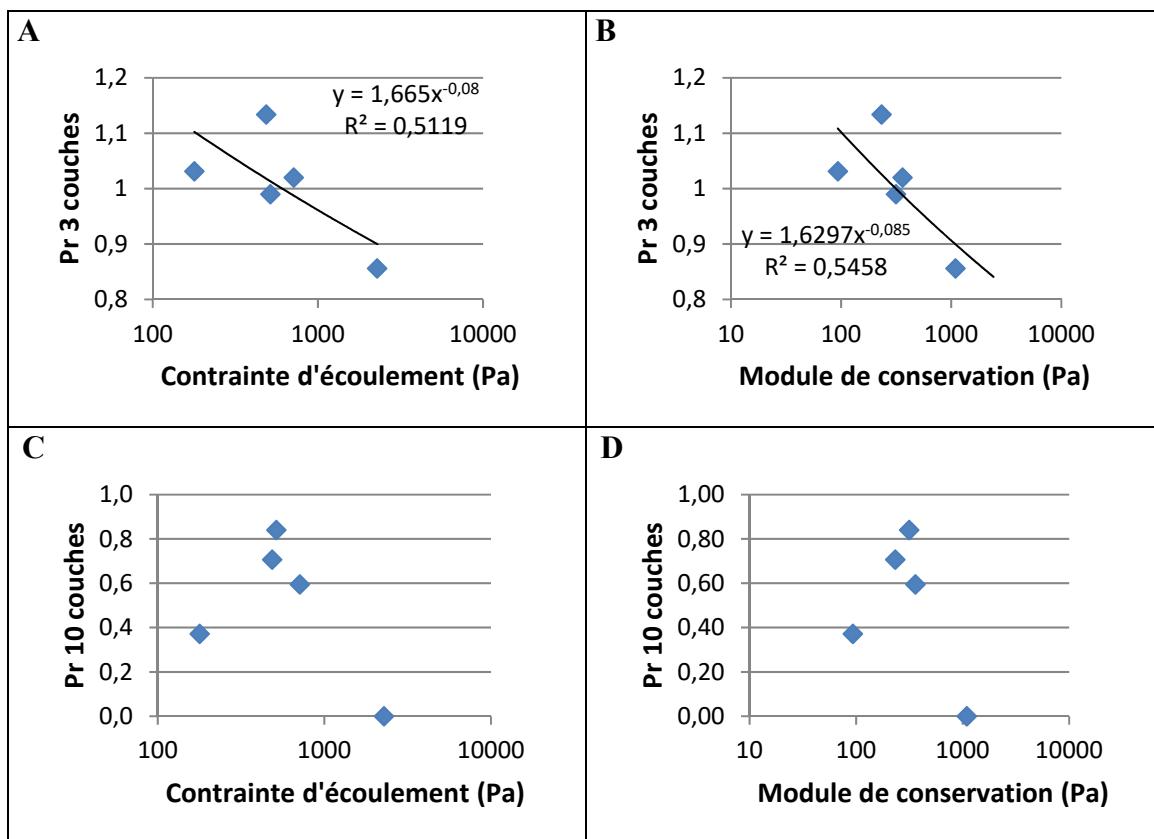


Figure 3.18 Corrélation des propriétés rhéologiques au point d'écoulement sur la fidélité d'impression. A) Influence de la contrainte d'écoulement B) et du module de conservation sur la fidélité d'impression d'une structure de 3 couches et de 10 couches C) et D) respectivement. (buse 27G, vitesse 5mm/s, débit 0,5 μ L/s et hauteur de 0,2mm)

Selon la littérature, la contrainte d'écoulement démontre la capacité d'un gel à résister à la déformation et donc à supporter plusieurs couches de matière. On observe un effet très limité de la contrainte d'écoulement sur la fidélité d'impression de 3 couches, car cette structure a été conçue à partir des dimensions des filaments extrudés sur 3 couches. Les deux structures supportent donc la même charge, ce qui fait en sorte que la fidélité d'impression se rapproche fortement de 1. Pour évaluer l'effet de cette propriété, on observe son effet sur la fidélité d'impression d'une structure de 10 couches. La Figure 3.18 C ne présente pas de tendance de la contrainte d'écoulement par rapport à la fidélité d'impression. On observe le même phénomène avec le module de conservation (La Figure 3.18 D).

3.9 Effet du processus de gélification sur la fidélité d'impression et les propriétés mécaniques des structures imprimées

Dans l'objectif de prendre en compte le cycle de vie complet des gels, la fidélité d'impression a été mesurée avant et après le processus de gélification pour les structures de 3 et 10 couches (Figure 3.19). On observe donc l'effet du temps de gélification et des propriétés rhéologiques sur la fidélité d'impression post-gélification. Un ratio de Pr pré/post-gélification supérieur à 1 signifie que le gel s'est contracté suite à la gélification et donc que l'aire des porosités a augmenté. Un ratio inférieur à 1 signifie que la structure a gonflé et donc que l'aire des porosités a diminué.

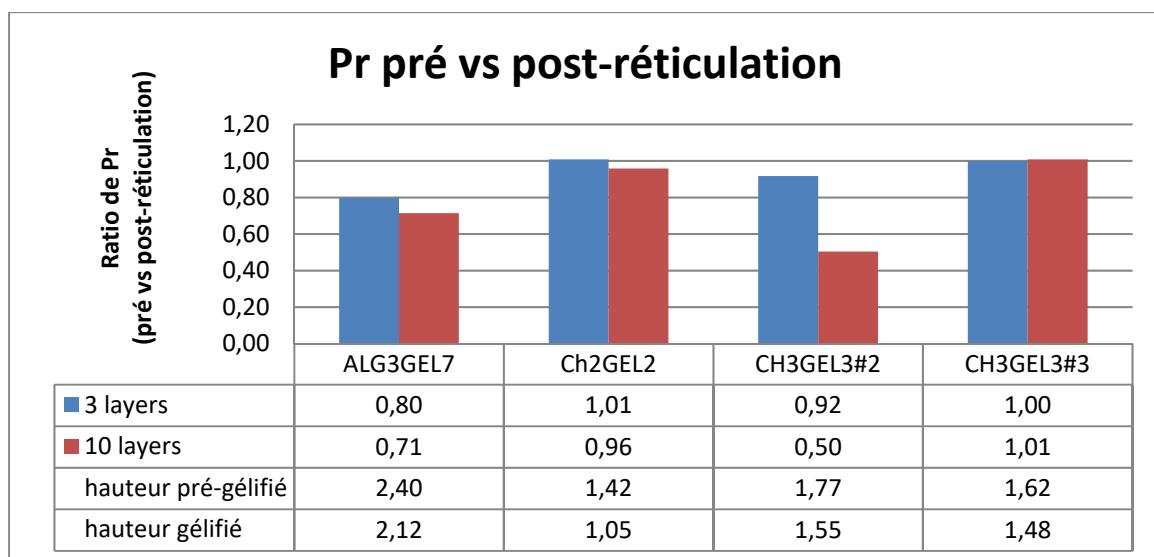


Figure 3.19 Ratio de la fidélité d'impression pré vs post-réticulation ainsi que la hauteur des structures imprimées. Le ratio est calculé en divisant le Pr post-réticulation par le Pr pré-réticulation. Un $\text{Pr} \geq 1$ signifie que le gel a gonflé et un $\text{Pr} \leq 1$ signifie que le gel s'est contracté ($n=3$, moyenne)

On observe que tous les gels se déforment (s'écrasent, car la hauteur diminue) suite au processus de gélification, diminuant ainsi la fidélité d'impression post-gélification. La fidélité d'impression du gel d'ALG3GEL7 diminue de 20 à 30% suite au processus de gélification. La fidélité d'impression du gel de CH3GEL3#2 diminue de près de 50% après la gélification. Le changement de forme de ces gels fait en sorte que l'architecture doit être planifiée en

conséquence. Les gels à base de chitosane ont une variation d'environ 4% sauf exception (CH3GEL3#2 10 couches). Les gels de chitosane sont donc meilleurs pour garder leur forme du début à la fin du procédé de bio-impression.

Toutes les structures ont une hauteur post-réticulation inférieure à celle pré-réticulation. On observe également que malgré le fait que la structure à concevoir était planifiée pour atteindre une hauteur de 2mm, la hauteur finale atteinte varie grandement. Cette différence entre la théorie et la pratique s'explique par le fait que les paramètres n'étaient pas optimaux pour tous les gels et architectures. Aux paramètres choisis, le gel d'ALG3GEL7 atteint le mieux la cible de hauteur, les paramètres sont donc optimaux pour ce gel. Le gel de CH2GEL2 est le plus éloigné de la cible. Ces résultats étaient attendus, car ce gel possède la viscosité post-extrusion, la contrainte d'écoulement et le module de conservation au point d'écoulement les plus faibles des gels présentés.

3.10 Propriétés mécaniques des structures 3D imprimées

Étant donné que les propriétés mécaniques des structures, en plus de leur morphologie, sont importantes pour assurer la manipulabilité et l'utilisation de structures imprimées, des essais préliminaires ont également été effectués pour évaluer les propriétés mécaniques de certains gels, avant et après le processus complet de gélification. La Figure 3.20 présente la contrainte (force divisée par la surface réelle estimée sur les images) en fonction de la déformation des structure 3D de 10 couches des gels durant les tests de compression non confinée.

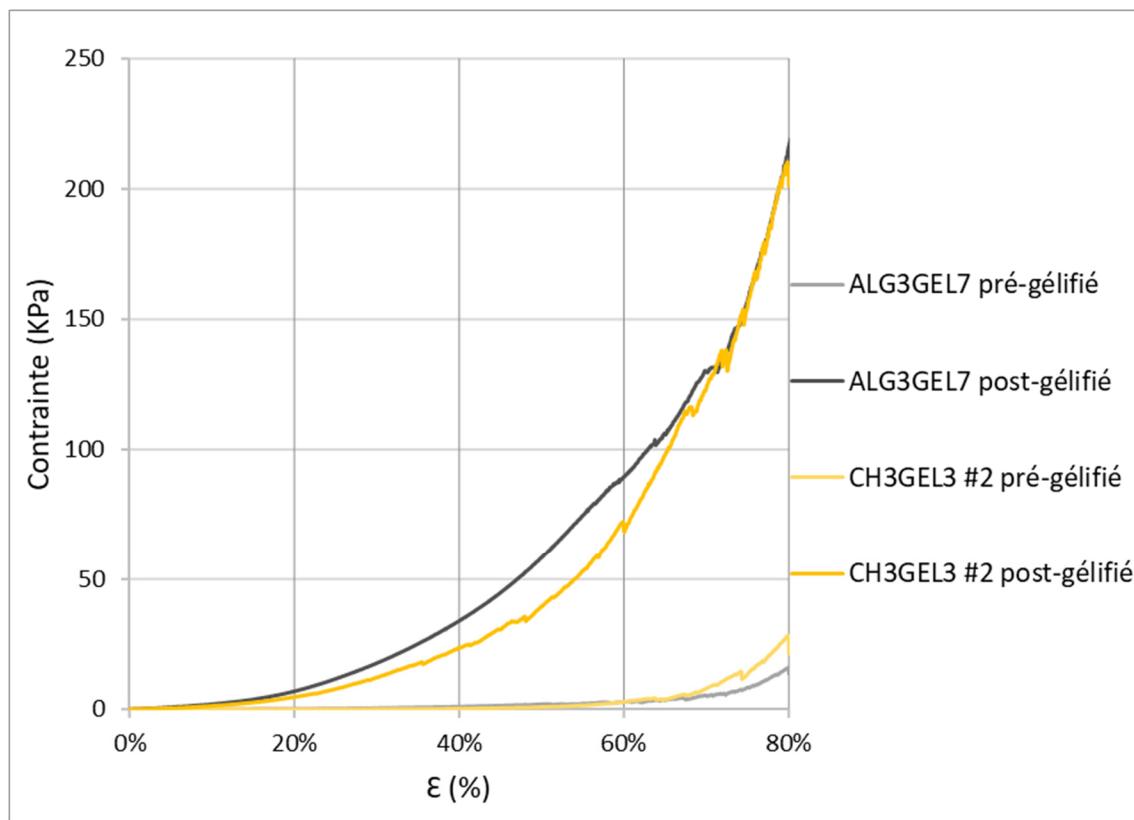


Figure 3.20 Courbe contrainte-déformation en compression non confinée des structures de 10 couches à base de chitosane et d'alginate juste après impression («pré») et après gélification complète («post») ($n \geq 3$, moyenne)

On observe une grande augmentation de la rigidité suite au processus de réticulation par ion calcium (gels à base d'alginate) ou de l'incubation à 37°C (gels à base de chitosane) pendant 24h, même si le faible nombre d'échantillons ne permet pas d'analyse statistique. Certains gels avaient d'ailleurs des propriétés trop faibles pour être mesurés par compression sur le Mach1 (cellule de charge de 100N). Ces données montrent toute l'importance du procédé de gélification.

La Figure 3.21 présente les modules sécants des gels réticulés à 10% et 30% de déformation (correspondant à des déformations réalistes sous conditions biologiques) des gels réticulés.

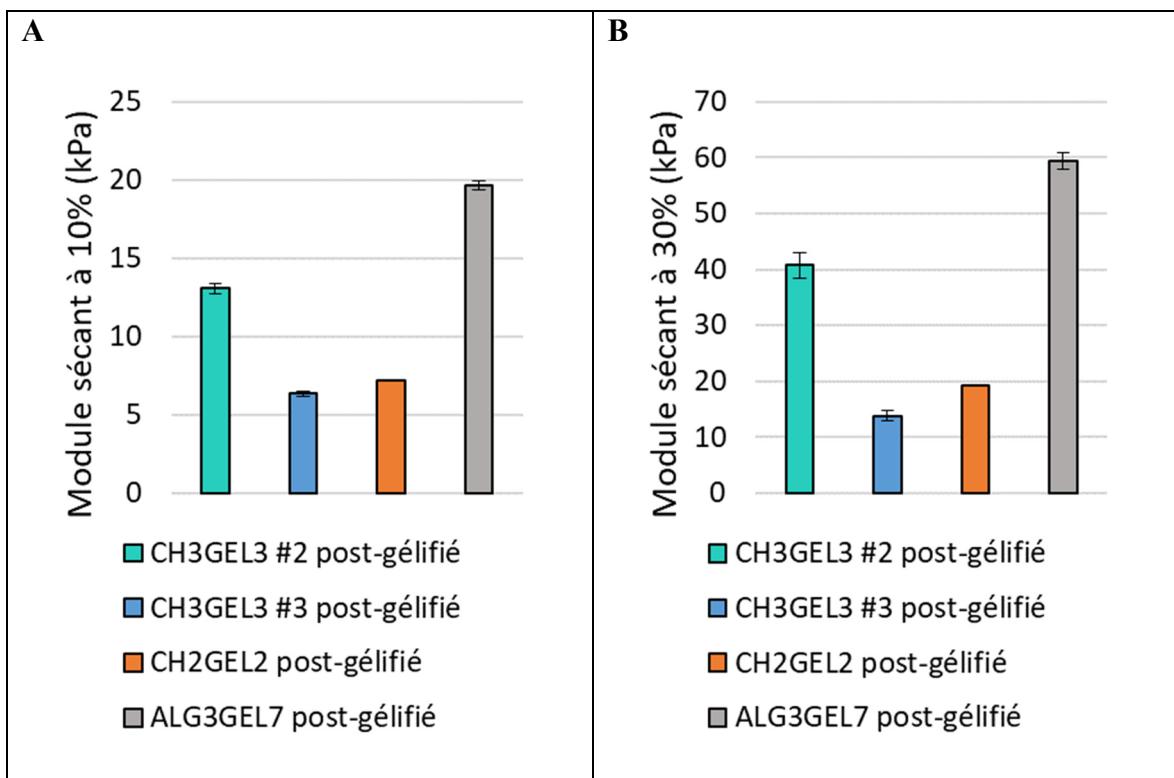


Figure 3.21 Module de Young sécant des gels. ($n \geq 3$ (exception CH2GEL2 $n = 2$), moyenne et DS)

Le gel d'ALG3GEL7, notre contrôle «positif», a une résistance à la déformation supérieure aux gels à base de chitosane une fois réticulé (module équivalent sécant de 20 et 60 kPa à 10 et 30% de déformation respectivement, contre 13 et 41 kPa maximum pour les gels de chitosane). Il faut cependant mentionner qu'une réticulation de 24h dans une solution de CaCl_2 n'est pas réaliste car elle engendrerait une grande mortalité cellulaire. Habituellement, des réticulations pouvant varier entre 30 secondes et 15 min sont effectuées(Paxton et al., 2017) (Ouyang et al., 2016) (Giuseppe et al., 2018). La rigidité des gels à base de chitosane semble plus variable, avec de grosses différences notamment observées entre les deux lots de CH3GEL3 testés (lot #2 et #3). Le lot qui présentait les plus hautes viscosité pré et post-extrusion (lot #2) est également celui qui présente la meilleure rigidité après gélfification complète. Mais le peu de données ne nous permet pas de dire s'il s'agit d'un hasard ou non.

CHAPITRE 4

DISCUSSION, LIMITES ET PERSPECTIVES

4.1 Évaluation des propriétés rhéologiques déterminant la capacité d'impression par extrusion des gels

Le principal **objectif** de ce projet était d'étudier des hydrogels candidats pour la bio-impression et déterminer quelles propriétés rhéologiques pouvaient être déterminantes sur leur capacité d'impression par extrusion. Les propriétés rhéologiques étudiées ont été choisies en fonctions des études précédentes ((Kiyotake et al., 2019), (Townsend et al., 2019), (T. Jiang et al., 2017), (Mouser et al., 2016), (Schwab et al., 2020) et autres). Le comportement des gels sous différents taux de cisaillement a été évalué à l'aide d'un test de récupération, tandis que la contrainte d'écoulement et le module de conservation à l'écoulement ont été évalués à l'aide d'une rampe d'amplitude. Ces choix ont été fait basés sur les hypothèses de la littérature selon lesquelles une récupération de 85% (Kiyotake et al., 2019) en 15 secondes (Townsend et al., 2019) et une contrainte d'écoulement de 100Pa (Townsend et al., 2019) sont nécessaires pour une bonne qualité d'impression.

4.1.1 Rappel des hypothèses de récupération et contrainte à l'écoulement

Récupération de 85% en 15s : Les travaux de Kiyotake et al. (2019) portant sur l'imprimabilité d'un hydrogel de PHA (pentanone-functionalized hyaluronic acid hydrogel) ont montré qu'une récupération de 85% du module de conservation était nécessaire pour maintenir une bonne fidélité d'impression et ont proposé qu'une récupération de 85% pourrait être un bon critère de départ pour observer la fidélité d'impression de nouvelles bioencres. Dans le cas de cette étude, on s'intéresse à la récupération de la viscosité.

Ils observent tout de même que la valeur du module de conservation influence la fidélité d'impression des gels. Ils font mention de gels de PHA ayant différentes concentrations (3% et 4% massique) ayant le même pourcentage de récupération ($89\pm2\%$ et $85\pm6\%$

respectivement), mais une valeur de module de conservation différente (G' initiale d'environ 150Pa et 350Pa), expliquant la variation de fidélité d'impression.

L'article de Jiang et al. (2019) supporte également l'hypothèse qu'une récupération rapide est importante pour empêcher la structure de s'écraser post-extrusion. Ce qui est considéré comme étant rapide n'est pas mentionné.

Contrainte d'écoulement supérieure à 100 Pa : Townsend et al (2019) propose la limite de contrainte d'écoulement de 100Pa pour permettre à une structure de résister au poids de plusieurs couches de matière. Malgré le fait qu'une bioencre puisse être imprimée même si elle possède une contrainte d'écoulement inférieure à 100Pa, la structure ne sera pas en mesure de résister au poids de plusieurs couches de matières et aura tendance à s'aplatir. L'étude de Mouser et al. (2016) supporte également la théorie voulant que la contrainte d'écoulement ait un impact sur la déposition et la formation des filaments.

4.1.2 Récupération et imprimabilité

Nos résultats ne montrent aucun lien entre le pourcentage de récupération et la qualité de l'impression, comme le montre d'une part l'absence de corrélation mais aussi les données obtenues pour l'ALG3GEL7 dont le pourcentage de récupération est le plus bas, soit seulement $2\pm1\%$. Pourtant, la structure imprimée par ce gel est comparable sinon meilleure que celles imprimées par des gels ayant une récupération de 40%. En effet, le gel d'AGL3GEL7 permet d'obtenir la meilleure fidélité d'impression pour 10 couches ($Pr=0,84$) et les filaments les moins larges (0,46mm). Au contraire, le gel de CH2GEL2 a une récupération de 168%, alors qu'il donne la moins bonne fidélité d'impression à 10 couches (0,37) et les filaments les plus larges (1,15mm).

Nos résultats ne sont donc pas en accord avec la proposition de Townsend et Kiyotake selon lesquels une récupération de 85% en moins de 15s permet une bonne fidélité d'impression. Nous avons plutôt observé une certaine corrélation avec la valeur de la **viscosité pré-extrusion**

et post-extrusion et la fidélité d'impression. Une viscosité élevée semble indiquer une meilleure fidélité d'impression.

Contrairement à notre attente, et aux résultats de Tao et al., 2019, les corrélations avec la viscosité post-extrusion se sont avérées plus faibles que celle avec la viscosité pré-extrusion. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que nos essais de recouvrement ont été faits à des taux de cisaillement et à des durées supérieures à la réalité lors de l'extrusion. En effet, afin d'obtenir une valeur de viscosité à haut taux de cisaillement, le cisaillement a dû être appliqué pendant 1 minute, alors que lors de l'extrusion, le taux de cisaillement maximum est présent seulement au bout de la buse d'extrusion durant quelques secondes. Les gels sont donc probablement soumis à un cisaillement trop longtemps lors des tests de rhéologie, diminuant leur récupération et donc la valeur de viscosité post-extrusion plus que la réalité.

4.1.3 Autres limites des tests de récupération :

Le test de récupération a plusieurs limites qui peuvent en partie limiter la validité des résultats. L'essai en rotation (et pas en oscillation) ne permet pas de déterminer les modules G' et G'' qui seraient peut-être plus adaptés que la viscosité.

En calculant la pente $(n-1)$ servant à calculer le taux de cisaillement, on observe dans certains cas que la valeur de n est négative. Cela n'est pas mathématiquement et scientifiquement acceptable. Une valeur de « n » négative indiquerait qu'on obtient une contrainte de cisaillement moins élevée en augmentant le taux de cisaillement (Figure 4.1).

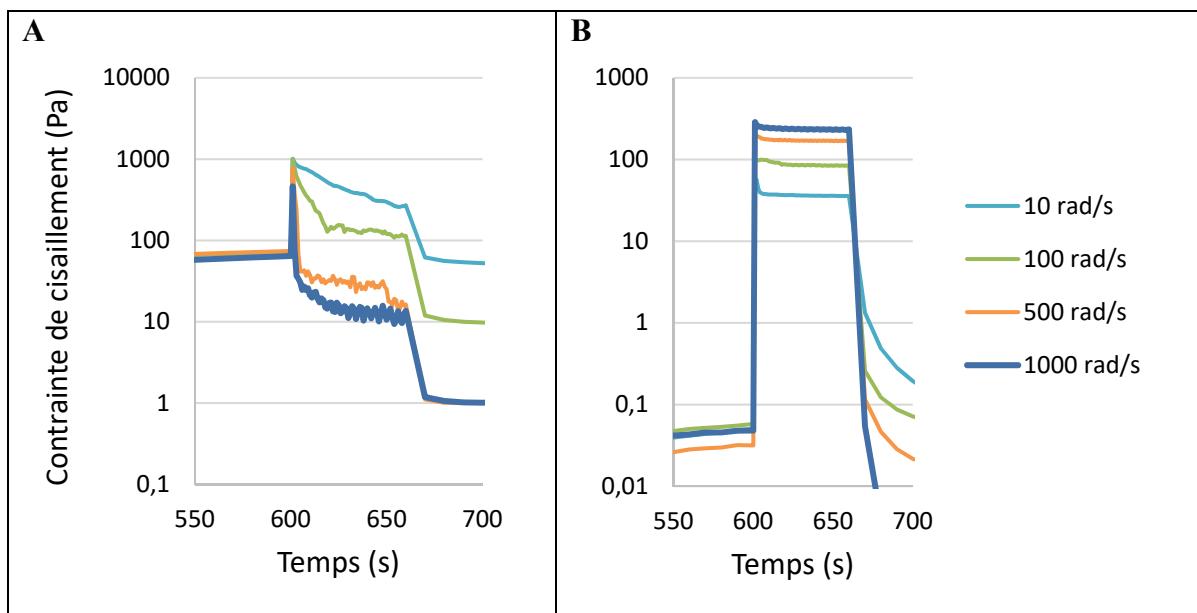


Figure 4.1 Contrainte de cisaillement d'un échantillon A) d'ALG3GEL7 selon différents taux de cisaillement lors de la phase d'extrusion du test de récupération. La phase d'extrusion entre 600 et 660 secondes présente une diminution de la contrainte de cisaillement en augmentant le taux de cisaillement. B) L'échantillon de CH2GEL2 présente un comportement permettant de calculer un « n » positif, la contrainte de cisaillement augmente en haussant le taux de cisaillement

C'est comme si on disait que pour augmenter la vitesse d'une voiture, il faut diminuer l'accélération. Cette mesure de « n » négative tend à indiquer qu'il y a du glissement lors du test de récupération et donc que la valeur de la viscosité mesurée est faussée. Il est donc possible que les résultats de la viscosité post-extrusion soient faussés également.

Une autre limite de cette méthode est l'intégrité structurelle du gel sous haute sollicitation en cisaillement. En effet, en effectuant ce test avec la configuration PP25, on observe que le gel est expulsé d'entre les plaques à partir d'un taux de cisaillement de 500 rad/s. Les résultats ne sont donc pas utilisables. Pour éviter ce phénomène, les chercheurs limitent le taux de cisaillement appliqué selon la capacité du gel à résister au cisaillement (Paxton et al., 2017). Dans notre cas, un taux de cisaillement de 500 et plus est nécessaire pour mesurer le comportement du gel aux conditions d'extrusion. C'est pourquoi on utilise la configuration CC10, mais on peut tout de même observer que le gel tend à sortir de la chambre de test à des taux de cisaillement de plus de 500 rad/s. Ce comportement est donc à prendre en considération en analysant les résultats de récupération. Un test de récupération utilisant le système PP et en

empêchant le gel de s'échapper pourrait régler le problème, mais il existe encore le risque de glissement entre les plaques.

4.2 Contrainte d'écoulement et imprimabilité

La théorie supportée par Mouser et al. indique qu'une augmentation de la contrainte d'écoulement augmente la fidélité d'impression. Parmi les gels testés, seulement certains peuvent être considérés comme étant imprimables malgré le fait qu'ils ont tous une contrainte d'écoulement. En effet, le gel de CH2GEL2 possède une contrainte d'écoulement de 179Pa, mais cette structure résiste très mal au poids de plusieurs couches de matière, car sa fidélité d'impression diminue de 60% entre 3 et 10 couches. On observe également que malgré la présence d'une contrainte d'écoulement élevée dans certains gels (CH3#2 et CH3#3), la fidélité d'impression de 10 couches est non mesurable, car le gel se déforme grandement suite à l'extrusion et le résultat de l'impression est une flaque de gel et non l'architecture voulue, ce qui ne correspond pas à la théorie voulant qu'une contrainte d'écoulement plus élevée augmente la fidélité d'impression (Mouser et al., 2016). On en conclut donc que le seuil minimal de 100Pa (Townsend et al., 2019) est un indicatif, mais qu'il n'est pas critique. Les valeurs obtenues sont également à prendre en considération, car la méthode pour mesurer la contrainte d'écoulement n'est pas parfaitement optimisée pour représenter les conditions d'extrusion.

4.3 Méthode alternative de mesure de la récupération

Une autre méthode utilisée par les chercheurs consiste à mesurer la récupération directement sur la valeur de la contrainte d'écoulement (Tao Jiang et al., 2019). Après avoir déterminé la contrainte d'écoulement par une rampe d'amplitude, le test de récupération est effectué en mode oscillatoire, en appliquant cette contrainte durant la période mimant l'extrusion et en suivant comment le module de conservation revient à sa valeur initiale après le cisaillement. Cette méthode est intéressante pour les gels comme celui d'ALG3GEL7 qui sont stables à température ambiante et qui ont une zone viscoélastique linéaire. Par contre, un gel à base de chitosane comme ceux testés ici cause des problèmes. Étant donné que ces gels ne sont pas

stables à température ambiante et qu'ils changent selon le temps et selon le taux de cisaillement appliqué, il sera difficile d'obtenir une bonne répétabilité et une réaction à la contrainte d'écoulement identique. La contrainte d'écoulement des gels de chitosane est déterminée lorsque le G' baisse de 10% par rapport à la valeur maximale. Par contre, la valeur du G' augmente en fonction de la contrainte appliquée jusqu'à atteindre le point d'écoulement. En utilisant la méthode conseillée par la littérature, la phase pré-extrusion viendrait affecter le gel différemment du test de rampe d'amplitude et donc la valeur de la contrainte d'écoulement serait différente. Cela rend les résultats difficiles à interpréter. Cette méthode pourrait donc être adaptée pour nos gels.

4.4 Effet des paramètres d'impression sur la dimension des filaments extrudés d'un hydrogel

Le **deuxième objectif** de ce projet était de déterminer l'effet et l'importance des paramètres d'impression sur la qualité et la largeur des filaments extrudés (Webb & Doyle, 2017) et (Habib et al., 2018). Le Tableau 4.1 présente les hypothèses initiales de l'effet des paramètres d'impression sur la largeur des filaments extrudés et sur la contrainte de cisaillement appliquée.

Tableau 4.1 Hypothèse de l'impact de la variation des paramètres d'impression sur la largeur des filaments extrudés et sur la contrainte de cisaillement

Paramètre	Largeur des filaments	Contrainte de cisaillement
↑ Vitesse de déplacement	↓	Nul
↑ Débit d'extrusion	↑	↑
↑ Diamètre d'extrusion	↑	↓
↑ Hauteur de couche	↑	Nul

4.4.1 Paramètres influençant la largeur des filaments directement

Outre les propriétés rhéologiques des hydrogels, les paramètres d'impression influencent également la qualité de l'impression. D'après la littérature, les trois principaux paramètres

affectants la dimension des filaments sont la vitesse de déplacement de la buse, le débit d'extrusion et le diamètre de la buse (Webb & Doyle, 2017). L'effet de ces paramètres sur la largeur et la qualité des filaments extrudés a donc été analysé, en particulier la vitesse de déplacement et le débit. L'analyse n'a été faite que sur une seule formulation de chitosane 3% gélatine 3%.

La vitesse semble avoir un effet exponentiel inversement proportionnel à la largeur du filament. Cette observation est également observée par l'équipe de Webb et Doyle (2017) et Habib et al. (2018). En effet, dans la plupart des cas mesurés, la vitesse de déplacement a un effet important sur la largeur des filaments pour des vitesses entre 3 et 7 mm/s. Par contre, au-delà de 7mm/s, l'effet de la vitesse devient presque nul, on obtient donc un plateau. Dans le cas de l'étude de Webb et Doyle, la largeur des gels atteignaient un plateau entre 4 et 6 mm/s, alors que les changements de dimensions étaient observés entre 1 et 4mm/s. À partir d'une vitesse de déplacement de 9 à 11 mm/s combinée à un débit faible ($0,5\mu\text{L}/\text{s}$), on obtient plus fréquemment des discontinuités.

L'effet de la vitesse de déplacement dépend donc des propriétés du gel. Les observations sur nos gels permettent de supposer qu'à partir d'une certaine vitesse, le gel est étiré au maximum et son énergie de surface fait en sorte que la largeur du filament minimum ne peut pas être diminué. Il se peut donc que ce soit la hauteur du filament qui diminue de manière plus importante lors de ces incrémentations (vitesse élevée), car on ne voit pas d'effet sur la largeur. Pour observer ce phénomène de manière à confirmer cette théorie, d'autres tests seraient nécessaires et il faudrait mesurer la hauteur correspondante pour chaque valeur de la vitesse de déplacement.

Le débit semble avoir un effet linéaire sur la valeur de la largeur des filaments. Par contre, on ne peut pas conclure que doubler le débit double la largeur du filament extrudé. Les études de Webb et Doyle et de Habib arrivent à une conclusion similaire et utilisant la pression appliquée plutôt que le débit d'extrusion. On observe donc que ce comportement n'est pas propre au système d'extrusion pneumatique ou par contrôle de débit. Le filament extrudé à haut débit,

donc haut cisaillement, à tendance à se déformer et à créer un phénomène de « melt fracture » ((Maqsood, 1971) (Ariffin, Ariff, & Jikan, 2011)). Aussi, le gel peut avoir tendance à s'accumuler sur la hauteur et sur la largeur, ce qui explique le fait que la variation de débit ne corresponde pas directement à la variation de la largeur. Le débit d'extrusion est limité par les propriétés rhéologiques du gel. Un débit trop faible pour le gel l'empêche de bien sortir de la buse d'extrusion et donc les filaments sont discontinus. Un débit trop élevé pour le gel crée un phénomène de « melt fracture » important et affecte le résultat de l'impression, diminuant éventuellement la fidélité d'impression et l'uniformité des filaments. Les gels testés ont été limités à un débit de $0,5\mu\text{L}/\text{s}$, car des phénomènes de discontinuité commençaient à être observés. Le débit maximal testé était de $3\mu\text{L}/\text{s}$, car la qualité des filaments était grandement affectée en plus de la sur-déposition de matière et de l'extrusion à l'intérieur des couches précédentes. En bio-impression 3D, le débit est habituellement limité par la capacité des cellules à supporter la contrainte de cisaillement induite ((Tao Jiang et al., 2019) (Gillispie et al., 2020)). Cette capacité n'a pas été évaluée dans cette étude, mais des tests supplémentaires mesurant l'effet du débit sur la survie cellulaire dans des gels différents pourrait aider à démontrer l'effet de ce phénomène et l'importance du phénomène de rhéofluidité pour protéger les cellules (Townsend et al., 2019).

Le diamètre d'extrusion semble avoir un effet direct sur la dimension de la largeur des filaments. En effet, diminuer le diamètre d'extrusion diminue la largeur des filaments extrudés. Par contre, lorsque les filaments sont déjà minimaux selon le débit et la vitesse de déplacement, diminuer le diamètre perd de son importance. Cette conclusion semble différente de l'étude de Webb et Doyle (2017), car ceux-ci observent une diminution de la largeur du filament extrudé en passant du gauge de 25 à 27 et 30 sans obtenir de plateau. Il s'agit donc d'un comportement propre à l'hydrogel utilisé et ne devrait pas être généralisé. Dans le cas du CH3GEL3#1, on observe que peu importe le débit, la diminution du diamètre semble diminuer la largeur de la même manière. Par contre, en augmentant la vitesse de déplacement de la buse jusqu'au plateau atteint entre 9 et 11 mm/s, la diminution du diamètre n'a que très peu d'influence. Tout comme pour la vitesse de déplacement, une analyse de la hauteur des filaments pourrait confirmer si l'effet est observable sur la hauteur des filaments ainsi que sur la largeur. La diminution du

diamètre d’extrusion a aussi le même effet que l’augmentation du débit sur la survie cellulaire et sur la création de « melt fracture » (Webb & Doyle, 2017). D’autres tests permettraient de mieux mesurer l’importance de cet effet sur les gels testés.

4.4.2 Effet de la contrainte de cisaillement

Lors de l’extrusion, en augmentant le débit ou la pression d’extrusion ou en diminuant le diamètre d’extrusion, la contrainte de cisaillement appliquée sur le gel augmente (Webb & Doyle, 2017). On peut donc utiliser ces paramètres pour estimer l’effet sur la survie cellulaire (Emmermacher et al., 2020). À l’aide de l’équation de Dealy et de la pente de la rhéofluidité ($n-1$) on est en mesure d’estimer la valeur de la contrainte de cisaillement maximale sur la paroi de la buse d’extrusion.

Différentes méthodes sont utilisées pour calculer la contrainte de cisaillement lors de l’extrusion. On peut choisir des modèles mathématiques tels que celui de Herschel-Bulkley, d’Ostwald-de Waele ou la loi de la puissance utilisée pour cette étude pour estimer la contrainte lors de l’extrusion (Schwab et al., 2020), (Tao Jiang et al., 2019). L’équipe de Emmermacher et al. (2019) utilise une simulation d’écoulement évaluant la contrainte de cisaillement lors du processus d’extrusion à l’aide des propriétés rhéologiques des bioencres. Ils sont ensuite en mesure de comparer avec la théorie de Herschel-Bulkley pour évaluer la contrainte maximale à la sortie de la buse d’extrusion. Ce type d’analyse peut être utilisé pour diminuer la quantité de tests requis pour évaluer l’ensemble des propriétés rhéologiques tel que la contrainte d’écoulement.

4.5 Limites de l'étude

4.5.1 Variabilité des résultats

Suite aux tests réalisés, on observe que les gels à base de chitosane ont un potentiel pour être bio-imprimés par extrusion. Par contre, aucun des gels à base de chitosane n'atteint les résultats obtenus avec les gels d'alginate-gélatine (largeur de filament minimale et meilleure fidélité d'impression). De plus, et surtout, une grande variabilité a été observée pour les gels de chitosane, tant en termes de propriétés rhéologiques que de résultats d'impression et des propriétés mécaniques des structures imprimées, ce qui a nécessité de les analyser séparément, lot par lot. Pour cette raison, la nombre de tests est souvent limité à 3 et quelques tests n'ont pas pu être effectués pour certains lots.

Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette variabilité des résultats : variabilité des bioencres et variabilité liée aux essais.

Pour être en mesure de profiter pleinement des gels à base de chitosane, certaines modifications doivent être faites dans les protocoles et tests utilisés pour assurer une meilleure reproductibilité des lots. La variabilité peut être due à la variabilité du chitosane lui-même, au processus de dissolution du chitosane et son mélange avec la gélatine (température plus constante, problème d'évaporation etc.). Ceci ne faisant pas directement partie des objectifs de la maîtrise, nous n'en discuterons pas davantage ici.

Une autre cause venant influencer les résultats des tests est la variation des propriétés rhéologiques du gel selon le temps. Les tests ont démontré que certains gels sont plus stables à 22°C que d'autres, on observe donc la stabilité sur un très court laps de temps. Par contre, en conservant une solution de chitosane-gélatine pendant plusieurs semaines à 4°C, il se peut que la solution change. L'équipe de Jiang Tao à l'université de McGill travaillant avec le gel d'ALG3GEL7 conseille d'utiliser le gel sur un laps de temps de seulement 1 semaine (T. Jiang et al., 2017). Dans le cas de cette étude, étant donné que la reproductibilité de lot n'était pas atteinte, la quantité des gels était limitée et ils ont donc dû être préservés plus longtemps.

Tous les tests de rampe d'amplitude ($n=3$) pour un même lot de solubilisation ont été réalisés le même jour, donc ce n'est pas ce qui explique la valeur des écarts-types. Pour les tests de récupération, étant donné qu'ils sont plus longs à réaliser pour chaque taux de cisaillement, certains essais ont été réalisés avec quelques jours d'intervalle. Pourtant, en analysant les données séparément, rien ne semble indiquer que les données prises à un jour différent sont influencées.

Cependant, quelques semaines peuvent s'être écoulées entre les tests de récupération et les rampes d'amplitude. Et quelques jours, sinon quelques semaines, séparent les tests rhéologiques des tests d'impression. La largeur des filaments imprimés sur 3 couches est effectuée sur une journée et les tests de fidélité d'impression sont effectués quelques jours plus tard. Tous ces délais donnent du temps au gel de changer. Il se peut donc que la valeur de récupération mesurée sur le gel jeune ne soit pas la même que celle du gel plus vieux utilisé pour les tests d'impression. Pour éviter d'avoir à prendre en compte ce facteur, tous les tests à effectuer sur un lot de gel devraient être réalisés sur le laps de temps le plus court possible. Pour valider cette méthode, les propriétés rhéologiques importantes devraient être mesurées avant et après avoir effectué les tests d'impression.

4.5.2 Choix de l'architecture

L'architecture pour cette étude s'est avérée être difficile à choisir. En effet, en fixant les paramètres d'extrusion pour tous les gels, l'objectif était de diminuer le nombre de paramètres entrant en jeu pour mesurer la fidélité d'impression. Par contre, en fixant les paramètres d'extrusion, la largeur des filaments varie pour chaque gel. Étant donné que la largeur des filaments est différente, l'architecture des structures doit également être adaptée.

Cela vient créer des problèmes dans l'analyse des résultats. En effet, étant donné que toutes les architectures sont différentes, il n'est pas possible de comparer adéquatement les propriétés mécaniques entre les différents gels.

4.5.3 Mesure de la fidélité d'impression

La méthode utilisée pour mesurer la fidélité d'impression a également ses défauts. En effet, il n'est pas commun d'utiliser une architecture de type hexagonale (nid d'abeille) pour mesurer cette propriété. Habib et al. (2018) recommande d'effectuer cette mesure sur des structures carrées pour uniformiser la méthode. Par contre en utilisant un hexagone, on mesure directement la fidélité d'impression de la structure désirée pour ensuite effectuer les tests de compression. La méthode de Habib crée également des problèmes lorsqu'on veut comparer la fidélité d'impression de plusieurs gels ayant des largeurs différentes. En effet, en devant changer de structure carrée pour chaque gel à cause du changement de largeur, on vient perdre l'avantage de l'uniformité de la méthode. Il est donc encore difficile d'avoir une méthode uniforme pour comparer la fidélité d'impression de plusieurs gels entre eux à différentes largeurs et paramètres d'impression.

Un autre problème de la fidélité d'impression en mesurant le ratio P_r est le manque de contrôle sur la forme imprimée. En effet, en mesurant le ratio des aires, on ne contrôle pas la forme extrudée. On peut donc avoir un ratio parfait, mais une forme non désirée (Figure 4.2 A).

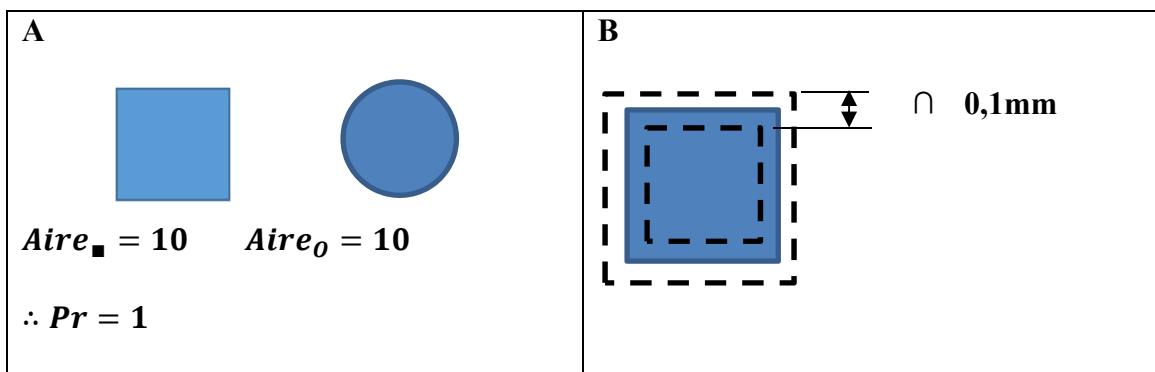


Figure 4.2 Défaut de la mesure de la fidélité d'impression Pr. A) Une forme carrée théorique ayant une aire de 10mm^2 peut avoir une fidélité d'impression parfaite ($Pr=1$) lorsque la forme imprimée est un cercle de 10mm^2 . B) Un profil de surface de $0,1\text{mm}$ contrôle la variation de profil. Pour être acceptée, la forme imprimée ne doit pas dépasser le profil choisi

Par contre, en choisissant un profil de surface comme paramètre de contrôle, on s'assure d'avoir un meilleur contrôle sur la forme imprimée. Un cercle ayant la même aire que celle du carré désiré ne serait donc plus accepté. Le **profil de surface** serait donc une meilleure méthode pour évaluer la fidélité d'impression.

4.5.4 Mesure de la fenêtre d'impression pour les gels

Les tests précédents tels que le test de sensibilité à la température entre 22 et 37°C ont démontré le manque de stabilité à température ambiante pour certains gels. Ce manque de stabilité crée des problèmes d'impression en extrudant des filaments aux dimensions et à la qualité différente au fil du temps aux mêmes paramètres d'impression. En choisissant une extrusion par contrôle de débit, on s'assure d'extruder continuellement la même quantité de matières, mais les propriétés rhéologiques du gel sortant de la buse peuvent tout de même varier avec le temps. Pour régler ce problème avec le gel d'ALG3GEL7, une fenêtre d'impression de 40 minutes a été déterminée où les propriétés du gel permettent une bonne fidélité d'impression et une contrainte suffisamment basse pour protéger les cellules (T. Jiang et al., 2017) Étant donné que pour être manipulé ce gel doit être réchauffé à 37°C , une fois versé dans la cartouche d'extrusion, il doit être refroidi à 25°C pour augmenter sa viscosité et être imprimable.

L'équipe de Kinsella a déterminé qu'un délai de 50 minutes était nécessaire pour donner au gel l'intégrité nécessaire pour être extrudé. Par la suite, une période de 40 minutes est allouée à l'impression sans avoir à appliquer une pression trop haute pour forcer l'extrusion et donc pour éviter d'appliquer une contrainte importante sur les cellules (T. Jiang et al., 2017). On peut donc observer que malgré le fait que ce gel soit stable à température ambiante, pour obtenir une impression optimale, une fenêtre d'impression doit être respectée.

Pour les gels à base de chitosane, une fenêtre d'impression doit être mesurée pour s'assurer que le filament extrudé a les mêmes propriétés tout au long de l'impression. Nous avons déterminé que sa stabilité à température ambiante n'est pas parfaite, il faut donc effectuer des tests de stabilité sur une plus longue durée pour évaluer cette fenêtre d'impression. Théoriquement, pour les gels de chitosane-gélatine, la fenêtre d'impression serait plus longue que celle pour les gels de chitosane seul, car on a observé une plus grande stabilité à température ambiante. La gélatine semble donc être un atout important pour uniformiser l'extrusion de gels à base de chitosane.

4.6 Perspectives

4.6.1 Méthode FRESH pour utiliser les propriétés du chitosane

Les résultats obtenus avec les hydrogels à base de chitosane semblent démontrer un potentiel pour la bio-impression par extrusion. Par contre, les attributs particuliers du chitosane ne sont pas utilisés à leur plein potentiel. La méthode d'extrusion utilisée dans cette étude avantage le gel ALG3Ge17, car il a une stabilité à température ambiante élevée et ses propriétés rhéologiques à température ambiante permettent une bonne fidélité d'impression et une capacité de supporter plusieurs couches de matière. Par contre, le caractère thermosensible des gels à base de chitosane (Rahimnejad et al., 2020) n'est pas utilisé dans une technique où l'impression s'effectue à température ambiante. Pour profiter pleinement des propriétés du

chitosane, le gel devrait être rapidement placé à 37°C pour activer la gélification dès l'extrusion des filaments.

Comme il serait difficile d'assurer une température de 37°C du substrat et de l'environnement de la structure imprimée, la méthode FRESH, qui consiste à imprimer la structure à l'intérieur d'un bain de support, pourrait être une approche prometteuse. La bioencre n'a plus à supporter le poids total de la structure imprimée et peut donc mieux maintenir sa forme le temps que la gélification complète s'effectue. Pour ce faire, l'utilisation d'un bain de support à base d'agarose est recommandée (Roehm & Madihally, 2017) car d'après la littérature, l'agarose a des propriétés adéquate à 37°C, permet d'uniformiser la température du bain de support, puis se liquéfie par l'ajout d'enzymes, ce qui permet d'enlever le bain de support sans nuire à la structure imprimée et aux cellules qu'elle contient. Cette méthode amène son lot de complications et de paramètres supplémentaires à prendre en compte, mais elle est de plus en plus utilisée en bio-impression 3D.

CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

La bio-impression 3D étant en pleine croissance, il est important de standardiser les méthodes d'analyse des bioencres afin de simplifier leur développement et faciliter leur comparaison. Dans cette optique, les propriétés rhéologiques de bioencres à base de chitosane et d'alginate ont été mesurées afin d'évaluer leur impact sur les résultats de l'extrusion et mieux comprendre leurs limites.

De bons résultats de bio-impression par extrusion consistent en des filaments de faible diamètre et une haute fidélité d'impression, c'est-à-dire une bonne coïncidence entre la structure désirée et la structure obtenue. Afin d'obtenir des filaments de petites dimensions, l'effet des paramètres d'extrusion a été analysé. On a déterminé que le débit doit être diminué jusqu'à la limite de créer des discontinuités d'extrusion, la vitesse de déplacement peut être augmentée jusqu'à atteindre un plateau donnant une largeur de filament minimale. Le diamètre de la buse d'extrusion peut être diminué jusqu'à ce que cela crée des discontinuités ou que la contrainte appliquée sur les cellules devienne trop grande. La hauteur d'extrusion (entre 2 couches) doit être ajustée pour éviter une sur-déposition de matière ou de créer des discontinuités d'extrusion.

Certains auteurs ont suggéré que le pourcentage de récupération et la valeur de la contrainte d'écoulement sont critiques pour évaluer le potentiel d'un gel à la bio-impression par extrusion. Une contrainte d'écoulement de minimum 100Pa ainsi qu'une récupération de 85% en 15 secondes suite à l'extrusion ont été proposées comme références de base. Dans le cadre de ce projet, la contrainte d'écoulement ainsi que la viscosité pré et post-extrusion et le pourcentage de récupération ont été déterminés et des corrélations ont été recherchées avec la largeur des filaments et la fidélité d'impression,

Les résultats montrent que l'hypothèse voulant qu'un pourcentage de récupération supérieur à 85% soit nécessaire n'est pas corroborée pour les gels étudiés. Le meilleur résultat d'impression a ainsi été obtenu pour le gel d'alginate-gélatine dont la récupération n'est que

de 2%. La valeur de la viscosité pré-extrusion (et dans une moindre mesure la viscosité post-extrusion) semble mieux prédire une faible largeur de filament et une bonne fidélité d'impression. Les gels testés ne permettent pas vraiment d'analyser le seuil minimal théorique de 100Pa comme contrainte d'écoulement, car ils ont tous une contrainte d'écoulement supérieure à 100Pa. Par contre, on peut conclure que dépasser ce seuil n'est pas suffisant pour s'assurer qu'un gel peut être bio-imprimé par extrusion, car bien qu'ils dépassent cette valeur, certains gels tel que le CH2GEL2 ne sont pas de bons candidats pour la bio-impression.

Les hydrogels à base de chitosane de concentration 3% massique, avec ou sans gélatine, montrent certaines propriétés favorables à la bio-impression mais la qualité d'impression reste inférieure au mélange alginate-gélatine. De plus, il resterait à déterminer si ces gels remplissent les autres attributs du cahier des charges, notamment la bonne survie des cellules contenues dans la bioencre.

D'autres recommandations peuvent être tirées suite à cette étude :

- Les conclusions de cette étude sont limitées par le nombre de points lors des corrélations (5). Il serait intéressant d'effectuer des tests sur un plus grand nombre de gels et sur une plus grande étendue de valeur de contrainte d'écoulement et de viscosité, afin de mieux étudier les paramètres rhéologiques prédisant la qualité d'impression et ainsi guider le développement de futures bioencres candidates à l'extrusion.
- L'amélioration du processus de solubilisation des gels à base de chitosane permettrait de tirer de meilleures conclusions sur chacune des formulations de gels à base de chitosane. Un meilleur contrôle sur le procédé de solubilisation permettrait également d'augmenter la taille de l'échantillon statistique et donc de tirer de meilleures conclusions sur les tendances des gels.
- L'utilisation d'une technique de bio-impression de type FRESH permettrait de profiter davantage des propriétés thermosensibles des gels de chitosane et potentiellement de travailler avec des concentrations plus faibles (2%) grâce au support mécanique offert par le bain de support.

- D'autres tests peuvent être effectués sur l'extrusion des différents gels en tentant d'obtenir le filament le plus mince possible tout en ayant une bonne qualité et d'évaluer la fidélité d'impression sur des structures de 10 couches créées à partir de ces filaments optimisés. Il est ensuite possible de déterminer si la fidélité d'impression est dépendante de l'architecture choisie et de la largeur des filaments.
- Afin de mieux se comparer à la littérature, le test de récupération pourrait être effectué en mesurant le module de conservation (G') plutôt que la viscosité. Cela permettrait de déterminer si on obtient les mêmes tendances avec ces deux propriétés rhéologiques et de standardiser la méthodologie des tests.

ANNEXE I

PROTOCOLE DE SOLUBILISATION CHITOSANE GÉLATINE

But de l'expérimentation : Solubiliser du chitosane et de la gélatine pour la bio-impression 3D. Solution de CH2GEL2 ou CH3GEL3.

Tableau-A I-1 Composition des gels à base de chitosane

Nom du gel	Concentration initiale %(m/v)		Concentration initiale HCl (M)	Concentration finale %(m/v)	
	CH	GEL	HCL	CH	GEL
CH2GEL2	3.33	3.33	0.1	2	2
CH3GEL3	5	5	0.15	3	3

Matériel nécessaire :

- | | |
|---|---|
| A. Gélatine de type A (dérivée de peau porc),
B. Chitosane (Mw : 255400g/mol, DDA89%),
C. HCL 1M, | D. Mélangeur magnétique,
E. Rotor,
F. Tubes 50mL. |
|---|---|

Solubilisation :

1. Ajouter le volume souhaité de HCl à la concentration correspondante dans un bécher de 150mL;
2. Ajouter le mélangeur magnétique et agiter à 600rpm;
3. Chauffer le HCl à 37°C;
4. Peser la quantité souhaitée de gélatine en fonction du volume à préparer;
5. Disperser la gélatine petit à petit (augmenter la vitesse d'agitation lorsque la poudre reste en surface);
6. Laisser sous agitation à 600rpm à 37°C pendant 1h;

7. Retirer le mélangeur magnétique;
8. Transférer la solution dans un bain à 37°C;
9. Descendre le rotor et enclencher l'agitation à 300rpm;
10. Peser la quantité souhaitée de chitosane en fonction du volume à préparer;
11. Disperser le chitosane petit à petit (augmenter la vitesse d'agitation lorsque la poudre reste en surface);
12. Laisser sous agitation à 350rpm pendant 3h.

Stérilisation :

1. Transvaser la solution dans des contenants pouvant aller en stérilisation (fioles 10mL à sertir)
Les fioles doivent être identifiées avec le numéro de lot comportant le type de chitosane, la date de solubilisation et les initiales de l'opérateur :
Exemple : P18_CH3_GEL3_2020.05.29_TLD/0.15MHCl;
2. Mettre un ruban pour autoclavage;
3. La chitosane/gélatine doit ensuite être conservée à 4°C.

ANNEXE II

PRÉPARATION DES AGENTS GÉLIFIANTS

But de l'expérimentation :

Préparation des agents gélifiants et préparation des thermogels de chitosane associés à des éléments ne pouvant pas être mélangés dans le chitosane ou l'agent gélifiant (cellules dans sérum physiologique, PBS ou milieu de culture/solution de doxycycline ...).

Les formulations décrites ici dans ce protocole sont les suivantes :

Les hydrogels sont nommés en fonction des concentrations des solutions utilisées et du pH.
SHC 0.075M/BGP01M

Matériel nécessaire :

- A. Eau Milli-Q,
- B. BGP Sigma G9422,
- C. Barreau magnétique,
- D. Luer lock,
- E. SHC MP 199797.

Préparation des agents gélifiants pour la méthode 3 seringues :

BGP à 0.5M + SHC 0.375 M (10ml)

- A. 0.315g SHC,
- B. 10ml BGP à 0.5 M.

ANNEXE III

PRÉPARATION DES CARTOUCHES POUR EXTRUSION

CH3 : Le lueur-lock se connecte à la seringue de 3mL contenant la solution de chitosane, le volume mort du lueur-lock se remplit avec la solution de chitosane contenue dans la seringue. On connecte ensuite la seringue contenant l'agent gélifiant. On peut enfin procéder au mélange en effectuant 21 allers complets d'une seringue à l'autre.

CH2GEL2 : Le mélange se fait de façon similaire au CH3, mais on a besoin de seulement 15 allers pour obtenir une solution homogène.

CH3GEL3 : Étant donné que ce gel est très visqueux, le volume mort du lueur-lock ne se remplit pas adéquatement et on obtient des bulles. Il faut donc d'abord connecter le lueur-lock à la seringue contenant l'agent gélifiant. On remplit ensuite le volume mort d'agent gélifiant pour le connecter à la seringue contenant la solution de chitosane et de gélatine et effectuer 21 allers complets.

En respectant ces méthodes de préparation, on évite d'introduire des bulles d'air qui peuvent venir nuire au processus d'extrusion et on diminue le nombre d'allers, ce qui diminue le stress appliqué dans le gel.

La bio-imprimante de 3DDiscovery de RegenHu possède une cartouche sur mesure pour la bio-impression par extrusion. Cette cartouche peut être remplie en transférant le gel d'une seringue standard à l'aide d'un lueur-lock femelle. Il faut d'abord connecter le lueur-lock à la seringue contenant le gel, remplir le volume mort du lueur-lock avec le gel, pour ensuite connecter la cartouche d'extrusion. On insère ensuite 0.5mL de gel dans la cartouche pour remplir le volume mort. Pour évacuer l'air contenu dans la cartouche avec le gel, on déconnecte le lueur-lock de la cartouche et à l'aide d'allers-retours du piston d'extrusion, on pousse l'air vers la sortie de la cartouche. Il est maintenant possible de reconnecter le lueur-lock à la cartouche et de transférer le restant du gel contenu dans la seringue. Il est important d'éviter la présence de bulles dans le gel avant l'extrusion pour minimiser les discontinuités dans les lignes extrudées.

ANNEXE IV

SOLUBILISATION ALGINATE GÉLATINE

But de l'expérimentation : Reproduire le gel à base d'alginate gélatine développé par l'équipe du Professeur Kinsella à McGill (T. Jiang et al., 2017).

Matériel nécessaire :

- | | |
|---|--------------------------|
| A. Alginate de sodium, | D. Tubes 50mL, |
| B. Gélatine de type B (dérivée de peau bovine), | E. Mélangeur magnétique, |
| C. Eau Mili-Q, | F. Plaque chauffante. |

Méthode :

1. Ajouter le volume souhaité d'eau Mili-Q dans un bêcher de 150mL;
2. Insérer un mélangeur magnétique dans le bêcher avec l'eau;
 - 1.1 Activer la rotation à 600rpm.
3. Chauffer l'eau pour atteindre une température de 60°C;
4. Peser la quantité souhaitée d'alginate en fonction du volume à préparer;
 - 1.1 Si 3% (m/v), ajouté 3g à 100mL d'eau Mili-Q.
5. Peser la quantité souhaitée de gélatine en fonction du volume à préparer;
 - 1.1 Si 7% (m/v), ajouté 7g à 100mL d'eau Mili-Q.
6. Dissiper les poudres petit à petit (augmenter la vitesse au besoin pour permettre une solubilisation homogène);
 - 1.1 Agiter à 60°C pendant 1 heure.
7. Retirer la solution de la plaque chauffante et mélanger à température ambiante pendant 2h;
8. Conserver la solution à 4°C.

ANNEXE V

MESURE DE VISCOSITÉ

But de l'expérimentation : Déterminer la mesure de la viscosité de solutions telles que le chitosane en variant le taux de cisaillement (shear rate) entre 0.01 et 100/s

Matériel nécessaire : Rhéomètre Physica MCR 301 (Anton Paar), bain de circulation d'eau, géométries de mesure couette (CC10 CPTD200), solution du polymère à tester.

Procédure de démarrage :

1. Vérifier la pression de l'air au manomètre. Elle doit être d'environ 70 psi. Si la pression n'est pas suffisante, il ne faut pas toucher au rhéomètre. Contacter la personne-ressource (Boris 30309);
2. Allumer le bain de circulation d'eau. À vérifier par le biais du ventilateur rouge présent sur le tuyau noir à l'entrée du bain;
3. Allumer le rhéomètre et attendre de voir le message «Status OK»;
4. Attendre 1h;
5. Enlever la protection blanche (à remettre avant chaque remplacement de cellule de mesure et après chaque utilisation du rhéomètre).

Méthode de calibration :

1. Ouvrir le protocole «air check» pour commencer les calibrations;
2. Cliquer sur «Device», puis sur «Control Panel»;
3. Cliquer sur «Initialize»;
4. Mettre la géométrie CC10 CPTD200 et attendre le message de confirmation ‘Reading MS OK’. **Pour cela, fixer le cylindre (géométrie) à sa place en alignant les deux traits;**
5. Cliquer sur «lift position»;
6. Cliquer sur «reset normal force»;
7. Cliquer sur «Service» ensuite sur «Meas. System», «start». Après environ 1 minute, la mesure est terminée, cliquer alors sur «save»;
8. Cliquer sur «Motor adjustement» une fenêtre s'ouvre en demandant «replace data ?». Cliquer sur «OK», et «start»;

9. Une fois le test terminé, aller sur le protocole «air check» puis cliquer sur le dernier onglet «start the test». Il ne faut pas sortir de l'intervalle. S'il ne sort pas, passer à la suite. S'il sort, recommencer à l'étape 10;
10. Sauver la mesure et fermer le protocole «air check».

Méthode d'utilisation:

1. Ouvrir le fichier en suivant le lien suivant :
[I:\Chercheurs\Lerouge_Sophie\LBeV_commun\Documentation
LBBeV\Protocoles\Rheoplus\Mesure de viscosité](I:\Chercheurs\Lerouge_Sophie\LBeV_commun\Documentation\LBBeV\Protocoles\Rheoplus\Mesure de viscosité) ;
2. Sauvegarder le fichier sous un autre nom (*.ORX) dans un dossier personnel;
3. Cliquer sur l'icône rouge «Measurement» et vérifier que les valeurs dans la fenêtre qui s'ouvre sont les mêmes que sur la figure 1 plus bas;
4. Dans «Setup rheometer», appuyer sur «Set» pour ramener la température de la cellule à 22°C;
5. Appuyer sur «lift position» pour que la géométrie descende à 45 mm;
6. Déposer 1mL de la solution dans la chambre;
7. Appuyer sur «Meas position»;
8. Appuyer sur «Continue»;
9. Appuyer sur «Play»;
10. Une fenêtre s'ouvre. Nommer l'échantillon, puis appuyer sur «Start»;
11. Une fois la mesure terminée, appuyer sur «Setup rheometer», puis sur «lift position» pour que la géométrie remonte à 45 mm;
12. Enlever la géométrie pour la laver à l'eau puis la sécher à l'éthanol 70 %. *Attention faites en sorte que l'eau ne touche pas la partie électronique (puce) de la géométrie;*
13. À l'aide d'un Kimwip nettoyer la plaque du bas et sécher à l'éthanol 70%;
14. Remettre la géométrie dans le cas où il va y avoir un autre échantillon à tester;
15. Reprendre les étapes de 5 à 11;
16. Pour arrêter l'appareil à la fin des analyses ;
 - 16.1. Dans la fenêtre «Setup rheometer», appuyer sur «Switch off» pour remettre la température à T amb, puis éteindre le logiciel (fermer les fenêtres);

- 1.1 Au niveau de l'écran facial du rhéomètre, mettre l'appareil en mode hors-ligne en appuyant sur «Online» pour l'éteindre. Appuyer sur «Ref», puis attendre quelques secondes;
- 2.1 Éteindre l'appareil;
- 3.1 Éteindre le bain.
17. Noter la date, le nom, les géométries et les cellules utilisées, ainsi que la durée après chaque utilisation du rhéomètre.

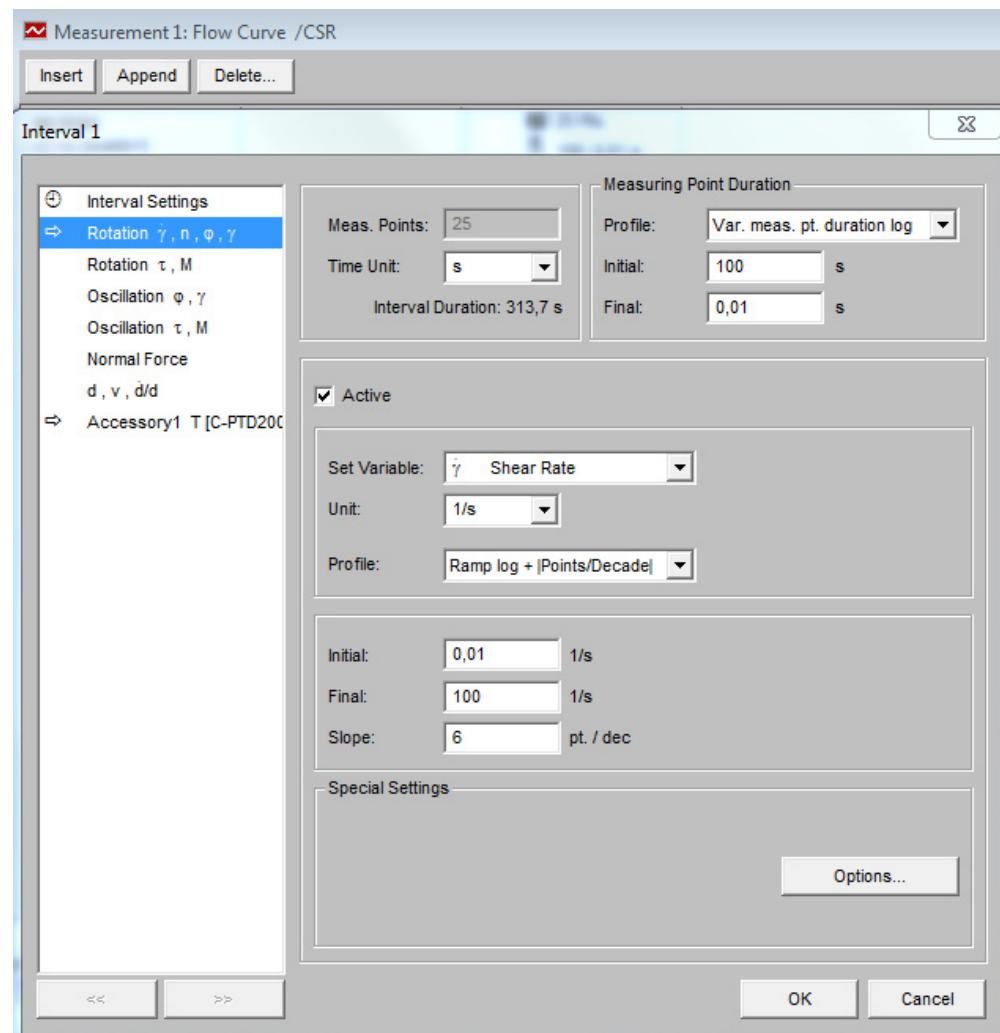


Figure-A V-1 Paramètres de test de viscosité du rhéomètre

ANNEXE VI

VISCOSITÉ DES GELS DE CHITOSANE

Chitosane 3%

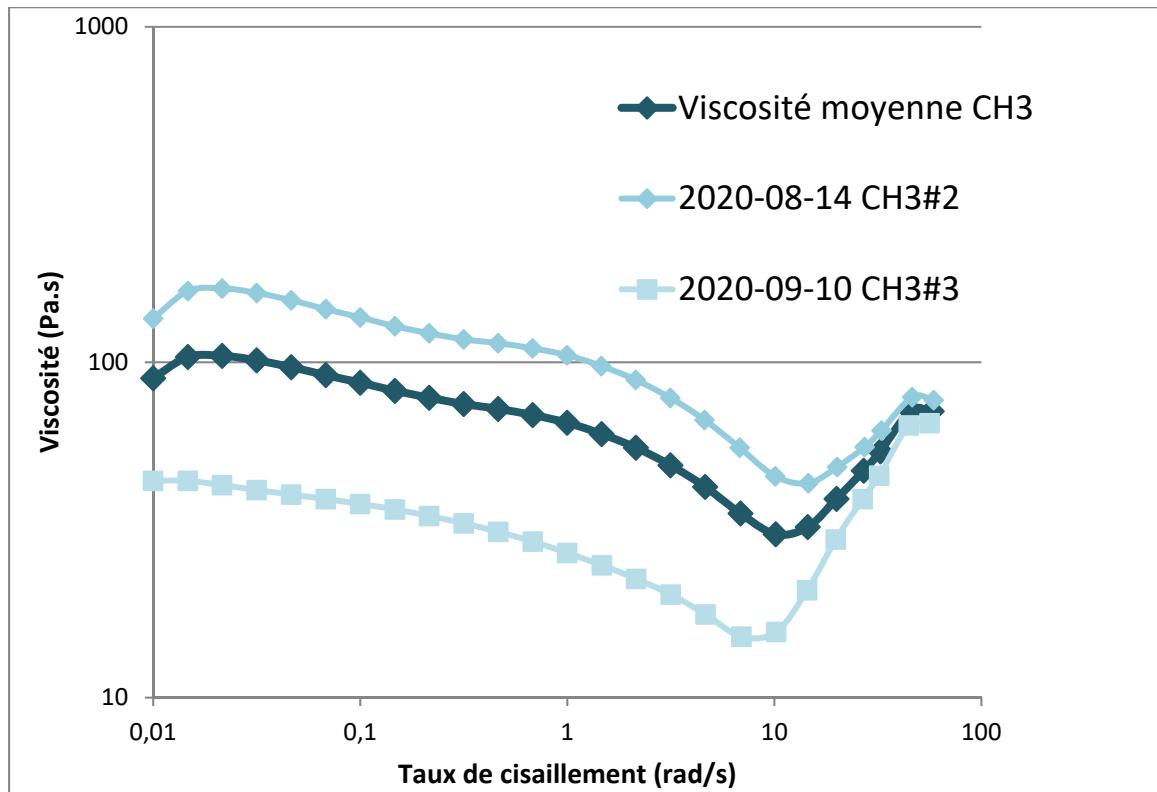


Figure-A VI-1 Viscosité de la solution de chitosane 3% selon le taux de cisaillement

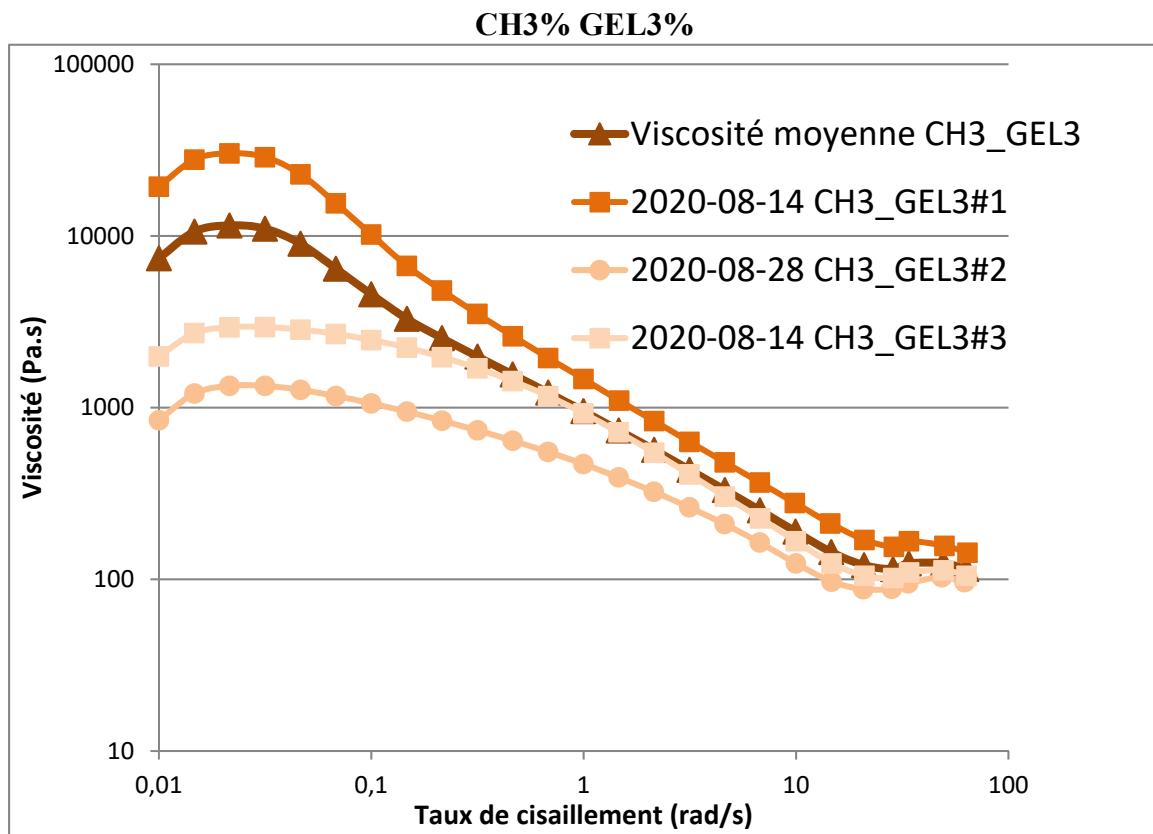


Figure-A VI-2 Viscosité de la solution de CH3% GEL3% selon le taux de cisaillement

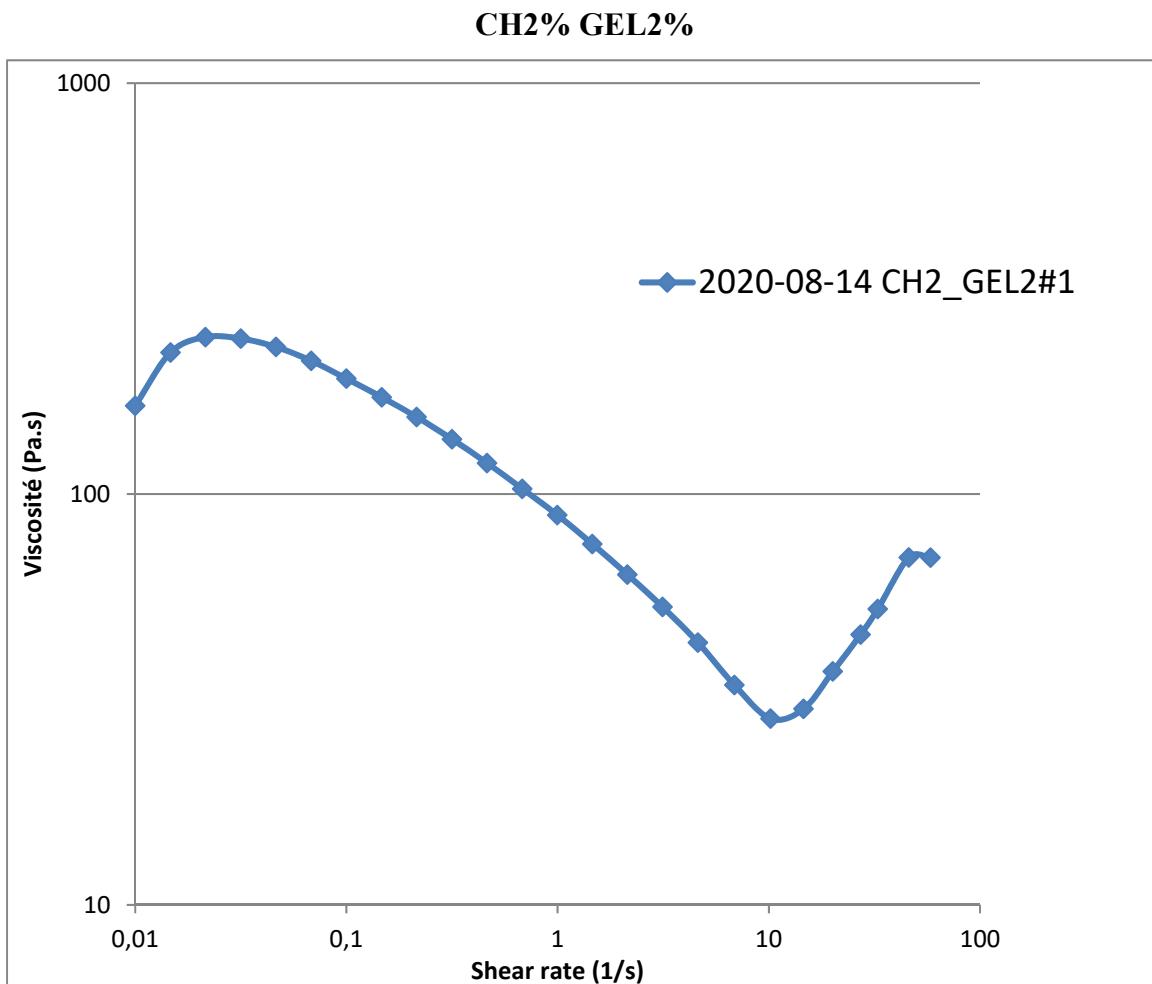


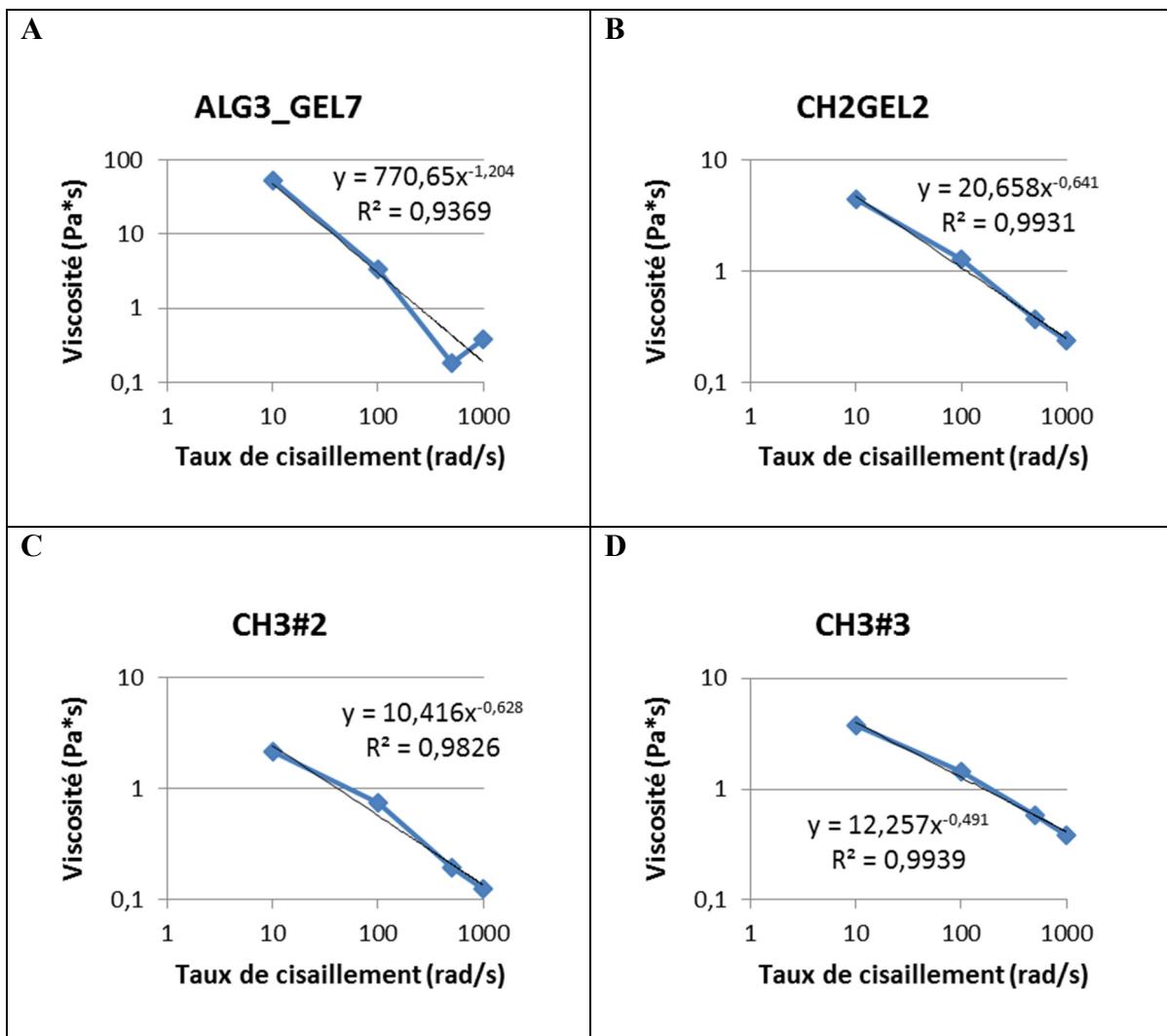
Figure-A VI-3 Viscosité de la solution de CH2% GEL2% selon le taux de cisaillement

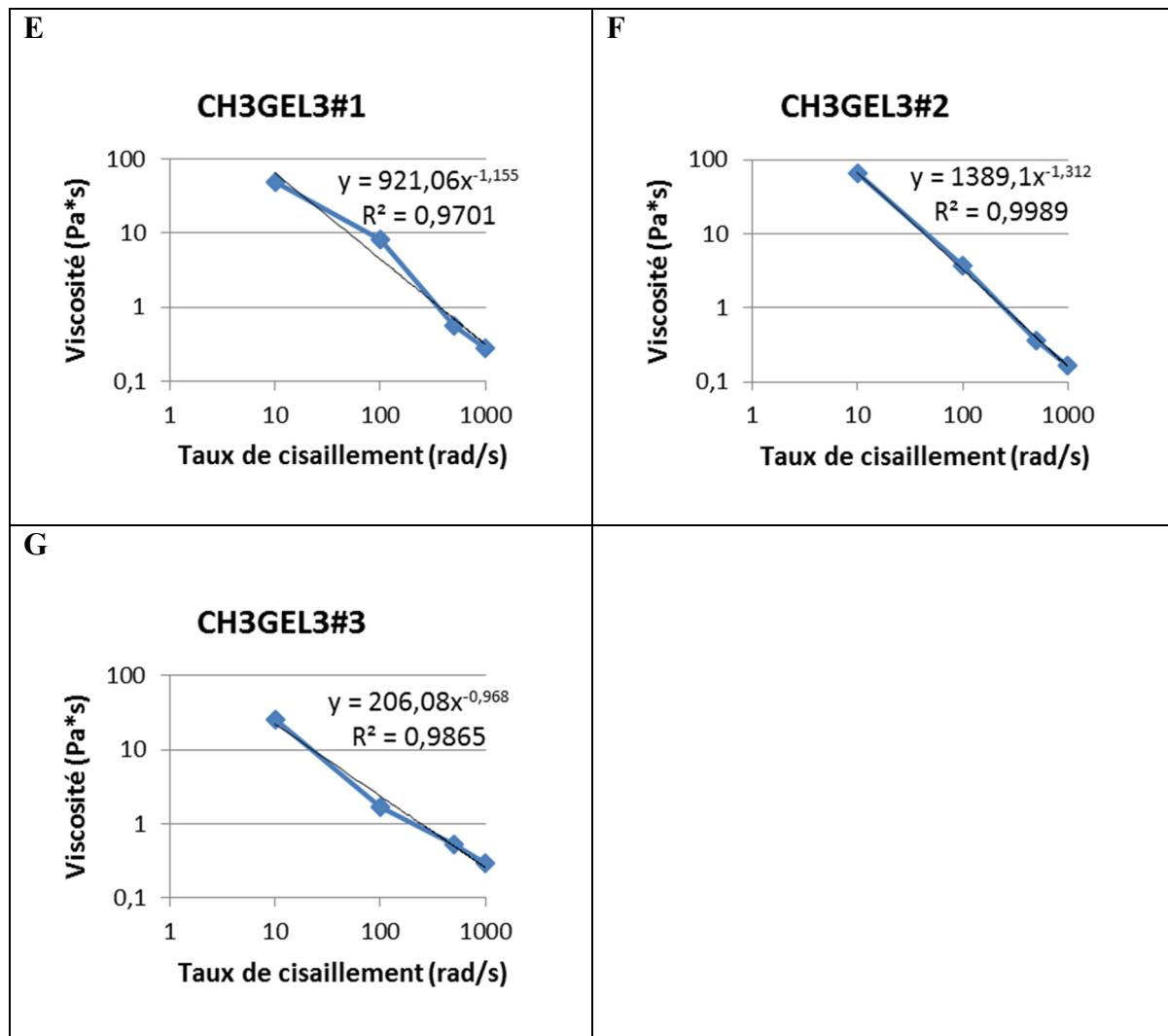
ANNEXE VII

COURBE DE RHÉOFLUIDITÉ

Courbe de viscosité en fonction du taux de cisaillement obtenu à partir des résultats de la viscosité dans la phase de haut cisaillement lors du test de récupération. La courbe de tendance exponentielle est présentée pour obtenir la pente de la courbe ($n-1$).

Tableau-A VII-1 Tests de rhéofluidité des gels testés





ANNEXE VIII

EFFET DES PARAMÈTRES D'EXTRUSION SUR LA LARGEUR ET LA QUALITÉ DES FILAMENTS

Tableau-A VIII-1 Mesures des filaments d'ALG3GEL7, buse 27G, hauteur d'extrusion 0,2mm

Bioink : ALG3GEL7												
Buse : 27G conical												
Hauteur 0,2 mm												
Débit	Vitesse	Continuité	Uniformité	Score	Moyenne	Déviation	Largeur					
[mm³/] [mm/sec]		/3	/3	/6	largeur	standard	[mm]					
0,5	3	3	1	4	0,56	0,01	0,54	0,58	0,57	0,55	0,56	0,55
	5	3	2	5	0,46	0,02	0,48	0,44	0,46	0,46	0,45	0,48
	7	3	3	6	0,38	0,01	0,38	0,39	0,38	0,38	0,39	0,37
	9	3	3	6	0,35	0,02	0,32	0,33	0,35	0,34	0,38	0,36
	11	3	3	6	0,30	0,02	0,29	0,33	0,29	0,29	0,26	0,32
1	3	3	1	4	0,83	0,02	0,84	0,80	0,84	0,85	0,82	0,81
	5	3	1	4	0,62	0,02	0,58	0,64	0,64	0,61	0,60	0,64
	7	3	1	4	0,50	0,04	0,44	0,47	0,52	0,51	0,56	0,53
	9	3	2	5	0,44	0,02	0,41	0,43	0,44	0,45	0,44	0,46
	11	3	3	6	0,38	0,02	0,38	0,40	0,40	0,37	0,37	0,35

Tableau-A VIII-2 Mesures des filaments de CH2GEL2, buse 27G, hauteur d'extrusion 0,2mm

Bioink : CH2GEL2												
Buse : 27G conical												
Hauteur	0,2	mm										
Débit	Vitesse	Continuité	Uniformité	Score	Moyenne	Déviation	Largeur					
[mm ³ /]	[mm/sec]	/3	/3	/6	largeur	standard	[mm]					
0,5	3	3	2	5	1,33	0,15	1,49	1,47	1,38	1,24	1,37	1,04
	5	3	2	5	1,15	0,06	1,16	1,21	1,20	1,14	1,19	1,02
	7	3	2	5	1,07	0,08	1,01	0,99	1,04	1,23	1,15	1,01
	9	3	2	5	0,99	0,27	0,80	0,68	0,91	0,91	1,49	1,18
	11	3	1	4	0,63	0,07	0,70	0,71	0,65	0,62	0,53	0,58

Tableau-A VIII-3 Mesures des filaments de CH3 #2, buse 27G, hauteur d'extrusion 0,2mm

Bioink : CH3#2									
Buse : 27G conical									
Hauteur	0,2 mm								
Débit	Vitesse	Continuité	Uniformité	Score	Moyenne	Déviation	Largeur		
[mm^3/]	[mm/sec]	/3	/3	/6	largeur	standard	[mm]		
0,5	3	3	2	5	0,77	0,11	0,65	0,75	0,91
	5	3	2	5	0,63	0,02	0,61	0,65	0,63
	7	3	3	6	0,56	0,00	0,56	0,57	0,56
	9	2	3	5	0,45	0,05	0,43	0,40	0,52
	11	1	2	3	0,47	0,02	0,49	0,44	0,46
1	3	3	2	5	0,82	0,13	0,67	0,99	0,81
	5	3	2	5	0,75	0,04	0,79	0,69	0,78
	7	3	3	6	0,70	0,05	0,64	0,74	0,73
	9	3	3	6	0,57	0,08	0,50	0,54	0,68
	11	2	2	4	0,44	0,04	0,46	0,46	0,39

Tableau-A VIII-4 Mesures des filaments de CH3#3, buse 27G, hauteur d'extrusion 0,2mm

Bioink : CH3#3												
Buse : 27G conical												
Hauteur	0,2 mm											
Débit	Vitesse	Continuité	Uniformité	Score	Moyenne	Déviation	Largeur					
[mm ³ /]	[mm/sec]	/3	/3	/6	largeur	standard	[mm]					
0,5	3	3	3	6	0,96	0,07	0,88	0,86	0,96	1,03	1,07	0,99
	5	3	3	6	0,78	0,04	0,82	0,80	0,71	0,79	0,78	0,76
	7	3	3	6	0,71	0,11	0,57	0,60	0,64	0,79	0,85	0,81
	9	3	3	6	0,62	0,10	0,53	0,50	0,52	0,69	0,75	0,70
	11	3	3	6	0,60	0,09	0,55	0,49	0,53	0,75	0,59	0,68
1	3	3	3	6	1,57	0,18	1,67	1,82	1,73	1,43	1,41	1,37
	5	3	3	6	1,13	0,04	1,16	1,07	1,19	1,14	1,10	1,13
	7	3	3	6	1,00	0,04	1,08	1,01	1,01	0,94	0,96	0,98
	9	3	3	6	0,91	0,06	0,92	0,98	0,98	0,83	0,87	0,89
	11	3	3	6	0,82	0,06	0,89	0,87	0,87	0,73	0,75	0,79

Tableau-A VIII-5 Mesures des filaments de CH3GEL3#2, buse 27G, hauteur d'extrusion 0,2mm

Bioink : CH3GEL3#2															
Buse : 27G conical															
Hauteur 0,2 mm															
Débit	Vitesse	Continuité	Uniformité	Score	Moyenne	Déviation	Largeur								
[mm ³ /]	[mm/sec]	/3	/3	/6	largeur	standard	[mm]								
0,5	3	3	3	6	0,89	0,12	0,91	1,15	0,99	0,86	0,79	0,91	0,70	0,86	0,80
	5	3	3	6	0,82	0,09	0,84	0,97	0,80	0,70	0,82	0,96	0,81	0,76	0,73
	7	3	3	6	0,59	0,10	0,54	0,75	0,80	0,57	0,54	0,51	0,51	0,51	0,61
	9	2	3	5	0,53	0,07	0,50	0,43	0,40	0,54	0,52	0,53	0,66	0,60	0,56
	11	2	3	5	0,44	0,07	0,41	0,34	0,40	0,51	0,39	0,36	0,48	0,53	0,54
1	3	3	3	6	1,24	0,15	1,31	1,26	1,56	1,15	1,35	1,14	1,31	1,07	1,05
	5	3	3	6	1,12	0,24	1,47	1,35	1,18	1,35	1,17	1,15	0,78	0,90	0,76
	7	3	2	5	0,94	0,12	1,11	1,01	1,05	1,03	0,85	0,79	0,94	0,79	0,83
	9	3	2	5	0,79	0,10	0,73	0,96	0,82	0,84	0,87	0,70	0,78	0,61	0,83
	11	3	2	5	0,72	0,14	0,54	0,61	0,72	0,60	1,03	0,85	0,75	0,65	0,72

Tableau-A VIII-6 Mesures des filaments de CH3GEL3#3, buse 27G, hauteur d'extrusion 0,2mm

Bioink : CH3GEL3#3												
Buse : 27G conical												
Hauteur 0,2 mm												
Débit	Vitesse	Continuité	Uniformité	Score	Moyenne	Déviation	Largeur					
[mm^3/]	[mm/sec]	/3	/3	/6	largeur	standard	[mm]					
0,5	3	3	2	5	1,07	0,06	1,10	0,99	1,01	1,15	1,12	1,02
	5	3	3	6	0,86	0,12	0,72	0,68	0,88	0,90	1,03	0,94
	7	3	3	6	0,89	0,04	0,88	0,92	0,81	0,94	0,91	0,86
	9	3	3	6	0,79	0,03	0,77	0,76	0,83	0,80	0,82	0,79
	11	3	3	6	0,70	0,06	0,70	0,64	0,62	0,80	0,72	0,69
1	3	3	3	6	1,42	0,09	1,36	1,41	1,29	1,52	1,56	1,38
	5	3	3	6	1,32	0,09	1,44	1,28	1,17	1,33	1,41	1,33
	7	3	3	6	1,11	0,11	0,91	1,01	1,16	1,16	1,21	1,20
	9	3	2	5	0,98	0,14	1,15	0,94	0,72	0,91	1,09	1,09
	11	2	2	4	0,74	0,18	0,70	0,71	1,10	0,55	0,57	0,79

Tableau-A VIII-7 Mesures des filaments de CH3GEL3#1, buse 25G, hauteur d'extrusion 0,3mm

Bioink : CH3GEL3#1																
Buse : 25G conical																
Hauteur 0,3 mm																
Débit	Vitesse	Continuité	Uniformité	Score	Moyenne	Déviation	Largeur									
[mm^3/]	[mm/sec]	/3	/3	/6	largeur	standard	[mm]									
0,5	3	2	2	4	0,63	0,10	0,67	0,66	0,86	0,64	0,57	0,56	0,67	0,54	0,48	
	5	1	2	3	0,52	0,05	na			0,55	0,56	0,45	na			
	7	1	2	3			na			na			na			
	9	1	2	3			na			na			na			
	11	1	2	3			na			na			na			
1	3	3	2	5	0,97	0,12	0,97	0,90	1,03	1,14	0,83	1,08	0,84	0,81	1,08	
	5	3	3	6	0,80	0,13	0,94	0,80	0,95	0,92	0,78	0,75	0,62	0,55	0,86	
	7	2	3	5	0,65	0,08	0,65	0,81	0,61	0,67	0,67	0,65	0,55	0,50	0,70	
	9	2	3	5	0,59	0,05	0,60	0,60		0,63	0,54	0,66	0,49	0,55	0,62	
	11	1	3	4	0,56	0,05	0,66	0,60	0,58	0,53	0,50		0,54	0,52	0,51	
2	3	3	1	4	1,39	0,18	1,65	1,55	1,48	1,56	1,24	1,22	1,42	1,30	1,07	
	5	3	2	5	1,08	0,12	1,03	1,12	1,04	1,13	0,87	0,95	1,20	1,29	1,05	
	7	3	2	4	0,86	0,08	0,68	0,85	0,81	0,98	0,85	0,83	0,86	0,92	0,94	
	9	3	2	5	0,84	0,09	1,03	0,78		0,86	0,73	0,84	0,73	0,88	0,89	
	11	2	2	4	0,69	0,07	0,75	0,63		0,59	0,69	0,71	0,67	0,82	0,65	
3	3	3	2	5	1,83	0,39	1,85	2,47	2,41	2,04	1,50	1,29	1,40	1,77	1,69	
	5	3	2	5	1,23	0,15	1,02	1,17	1,34	1,52	1,25	1,11	1,09	1,36	1,24	
	7	3	2	4	1,09	0,16	1,22	1,02	0,79	1,09	0,97	0,99	1,26	1,25	1,24	
	9	3	2	5	0,90	0,11	0,89	1,11	0,90	0,79	0,75	1,01	0,92	0,92	0,79	
	11	2	2	4	0,81	0,14	0,64	0,63	1,01	0,66	0,76	0,91	0,798	0,97	0,88	

Tableau-A VIII-8 Mesures des filaments de CH3GEL3#1, buse 27G, hauteur d'extrusion 0,3mm

Bioink : CH3GEL3#1												
Buse : 27G conical												
Hauteur	0,3	mm	Débit	Vitesse	Continuité	Uniformité	Score	Moyenne	Déviation	Largeur		
[mm^3/l]	[mm/sec]	/3	/3	/6	largeur	standard				[mm]		
0,5	3	3	2	5	0,65	0,14	0,66	0,53	0,63	0,85	0,79	0,44
	5	2	2	4	0,55	0,01	0,54	0,57	0,55	na		
	7	2	2	4	0,63	0,04	0,66	0,66	0,57	na		
	9	2	2	4	0,56	0,05	0,51	0,62	0,54	na		
	11	2	2	4			na			na		
1	3	3	2	5	0,79	0,14	0,90	0,97	0,84	0,61	0,83	0,59
	5	3	2	5	0,66	0,12	0,51	0,67	0,66	0,91	0,61	0,61
	7	3	2	5	0,56	0,13	0,66	0,43	0,77	0,41	0,50	0,59
	9	3	2	5	0,55	0,12	0,50	0,76	0,61	0,48	0,37	0,58
	11	2	2	4	0,47	0,05	0,42	0,58	0,48	0,44	0,47	0,44
2	3	3	2	5	1,15	0,13	0,93	1,35	1,25	1,11	1,12	1,14
	5	3	2	5	0,94	0,11	0,77	0,83	0,97	1,08	0,99	1,01
	7	3	2	4	0,83	0,17	0,95	1,00	0,96	0,51	0,80	0,77
	9	3	2	5	0,73	0,13	0,57	0,84	0,96	0,67	0,73	0,63
	11	3	3	6	0,57	0,09	0,45	0,72	0,48	0,53	0,64	0,59
3	3	3	2	5	1,47	0,07	1,49	1,55	1,37			
	5	3	2	5	1,21	0,09	1,12	1,34	1,19			
	7	3	2	4	0,99	0,02	1,01	0,99	0,96			
	9	3	2	5	0,81	0,06	0,89	0,76	0,78			
	11	3	2	5	0,81	0,03	0,81	0,86	0,78			

Tableau-A VIII-9 Mesures des filaments de CH3GEL3#1, buse 27G, hauteur d'extrusion 0,2mm

Bioink : CH3GEL3#1												
Buse : 27G conical												
Hauteur	0,2	mm										
Débit	Vitesse	Continuité	Uniformité	Score	Moyenne	Déviation	Largeur					
[mm³/l]	[mm/sec]	/3	/3	/6	largeur	standard	[mm]					
0,5	3	3	2	5	0,56	0,05	0,51	0,52	0,58	0,55	0,66	0,54
	5	3	2	5	0,50	0,04	0,58	0,50	0,45	0,46	0,49	0,49
	7	3	2	5	0,50	0,11	0,46	0,41	0,69	0,55	0,56	0,35
	9	2	3	5	0,44	0,12	0,39	0,37	0,44	0,41	0,35	0,71
	11	2	3	5	0,38	0,05	0,39	0,33	0,37	0,32	0,42	0,46
1	3	3	1	4	0,81	0,05	0,82	0,89	0,80	0,76	0,86	0,75
	5	3	2	5	0,70	0,06	0,78	0,72	0,70	0,60	0,68	0,74
	7	3	2	5	0,64	0,12	0,73	0,59	0,52	0,65	0,84	0,51
	9	3	2	5	0,62	0,11	0,44	0,70	0,51	0,77	0,68	0,65
	11	3	3	6	0,40	0,07	0,28	0,42	0,41	0,38	0,51	0,42
2	3	3	1	4	1,14	0,08	1,02	1,26	1,15	1,13	1,08	1,22
	5	3	1	4	0,99	0,04	1,00	0,91	1,00	1,02	1,01	0,99
	7	3	2	4	0,84	0,08	0,91	0,84	0,93	0,88	0,71	0,77
	9	3	2	5	0,77	0,03	0,74	0,81	0,76	0,76	0,82	0,74
	11	3	2	5	0,65	0,08	0,81	0,67	0,58	0,67	0,60	0,59

ANNEXE IX

LARGEUR À 5MM/S ET 7MM/S

Tableau-A IX-1 Effet de la viscosité sur la largeur des filaments avec une vitesse de déplacement de 5 et 7mm/s

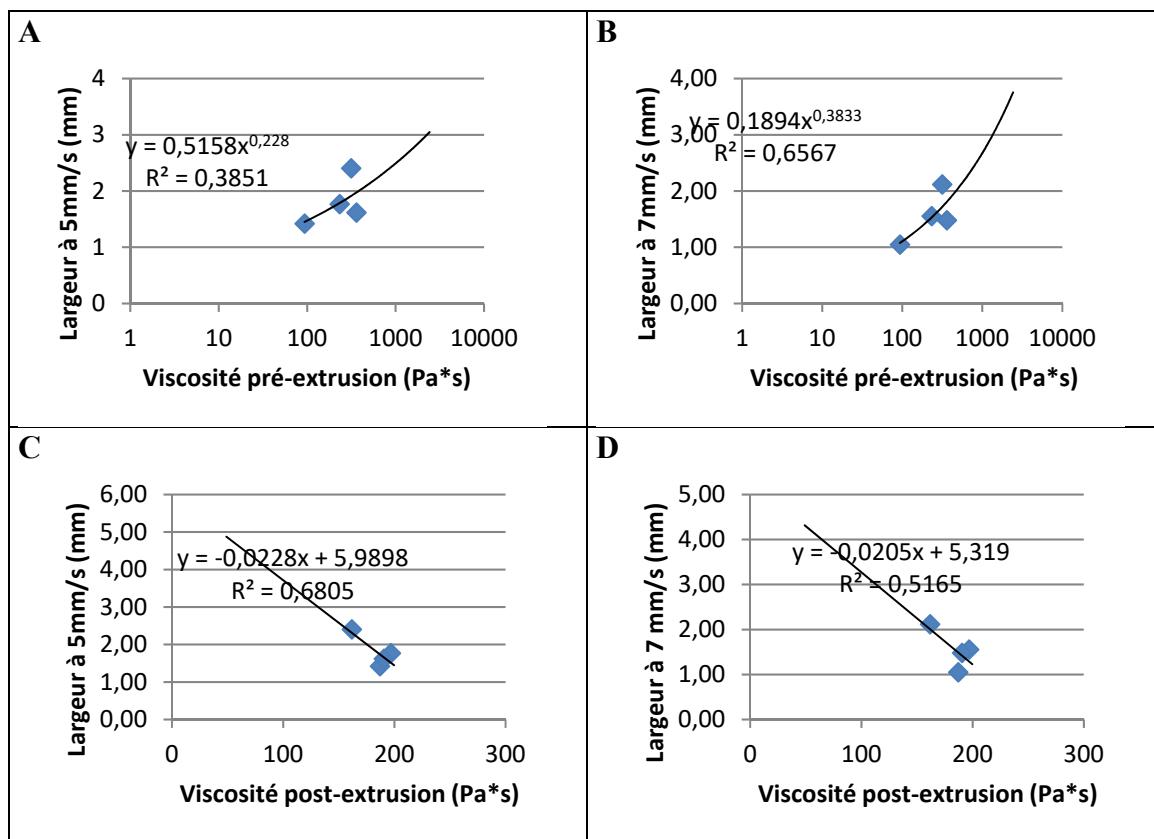
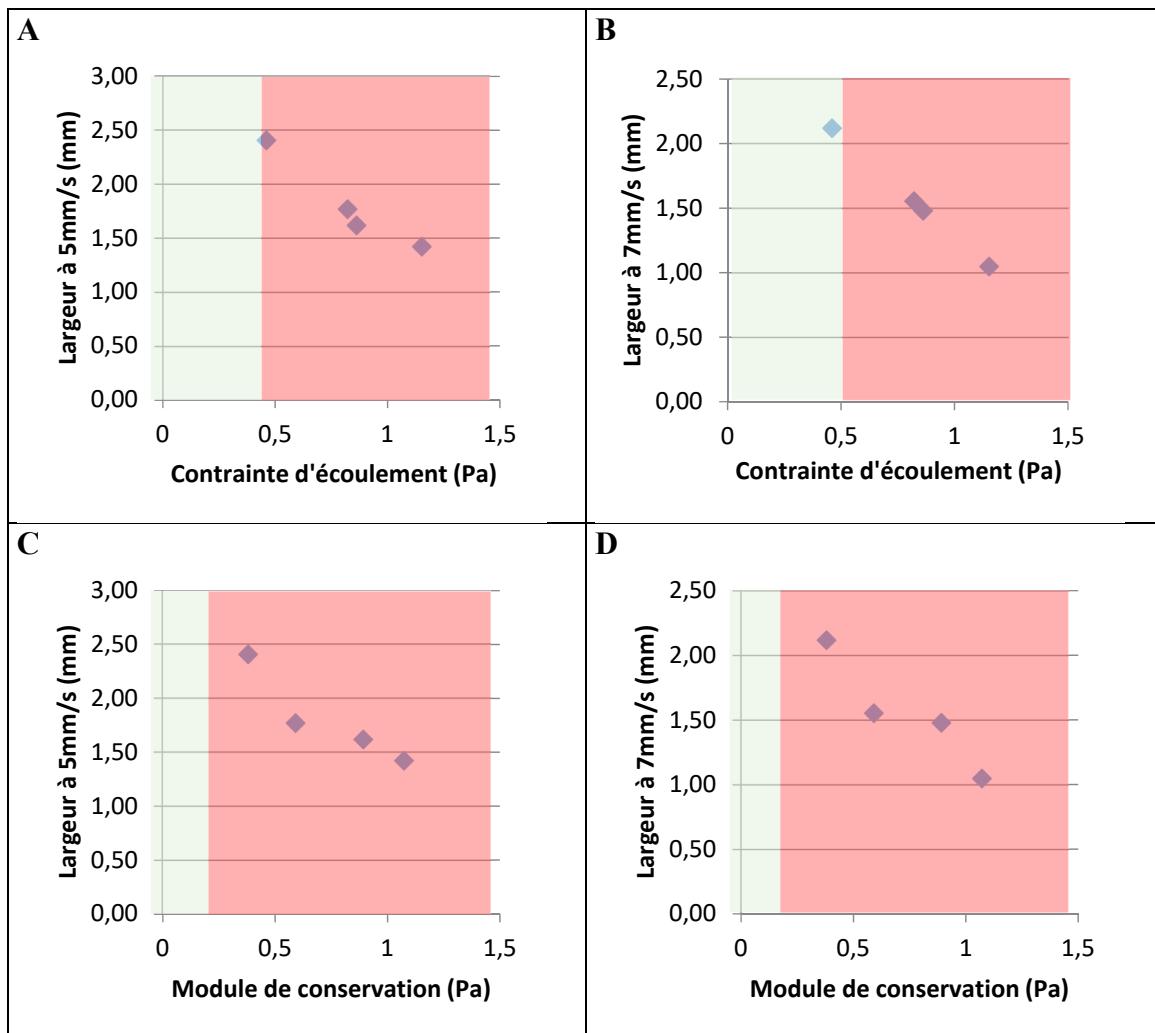


Tableau-A IX-2 Effet de la contrainte d'écoulement sur la largeur des filaments avec une vitesse de déplacement de 5 et 7mm/s



LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ariffin, A., Ariff, Z. M., & Jikan, S. S. (2011). Evaluation on extrudate swell and melt fracture of polypropylene/kaolin composites at high shear stress. *Journal of Reinforced Plastics and Composites*, 30(7), 609-619. doi: 10.1177/0731684411399140
- Arslan-Yildiz, A., El Assal, R., Chen, P., Guven, S., Inci, F., & Demirci, U. (2016). Towards artificial tissue models: past, present, and future of 3D bioprinting. *Biofabrication*, 8(1), 014103. doi: 10.1088/1758-5090/8/1/014103. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26930133>
- Atala, S. V. M. A. (2014). 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, 32, 773-785. doi: <https://doi.org/10.1038/nbt.2958>
- Bishop, E. S., Mostafa, S., Pakvasa, M., Luu, H. H., Lee, M. J., Wolf, J. M., . . . Reid, R. R. (2017). 3-D bioprinting technologies in tissue engineering and regenerative medicine: Current and future trends. *Genes Dis*, 4(4), 185-195. doi: 10.1016/j.gendis.2017.10.002. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29911158>
- Brent, G. (2019). Determining the Effect of Structure and Function on 3D Bioprinted Hydrogel Scaffolds for Applications in Tissue Engineering.
- Chenite, A., Buschmann, M. D., Wang, D., Chaput, C., & Kandani, N. (2001). Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions. *Carbohydrate Polymers*, 46(1), 39-47. doi: [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00281-2](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00281-2).
- Cidonio, G., Glinka, M., Dawson, J. I., & Oreffo, R. O. C. (2019). The cell in the ink: Improving biofabrication by printing stem cells for skeletal regenerative medicine. *Biomaterials*, 209, 10-24. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.04.009
- Compaan, A. M., Song, K., & Huang, Y. (2019). Gellan Fluid Gel as a Versatile Support Bath Material for Fluid Extrusion Bioprinting. *ACS Appl Mater Interfaces*, 11(6), 5714-5726. doi: 10.1021/acsami.8b13792. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30644714>
- Croisier, F., & Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780-792. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009
- Daly, A. C., Critchley, S. E., Rencsok, E. M., & Kelly, D. J. (2016). A comparison of different bioinks for 3D bioprinting of fibrocartilage and hyaline cartilage.

Biofabrication, 8(4), 045002. doi: 10.1088/1758-5090/8/4/045002. Repéré à
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27716628>

Davarpanah, S. M., Ván, P., & Vásárhelyi, B. (2020). Investigation of the relationship between dynamic and static deformation moduli of rocks. *Geomechanics and Geophysics for Geo-Energy and Geo-Resources*, 6(1). doi: 10.1007/s40948-020-00155-z

Dealy, J., & Wissbrun, K. (1990). *Melt Rheology and Its Role in Plastics Processing: Theory and Applications*.

Emmermacher, J., Spura, D., Cziommer, J., Kilian, D., Wollborn, T., Fritsching, U., . . . Lode, A. (2020). Engineering considerations on extrusion-based bioprinting: interactions of material behavior, mechanical forces and cells in the printing needle. *Biofabrication*, 12(2), 025022. doi: 10.1088/1758-5090/ab7553. Repéré à
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32050179>

Ersamo, N., Witherel, C. E., & Spiller, K. L. (2016). Differences in time-dependent mechanical properties between extruded and molded hydrogels. *Biofabrication*, 8(3), 035012. doi: 10.1088/1758-5090/8/3/035012. Repéré à
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27550945>

Gillispie, G., Prim, P., Copus, J., Fisher, J., Mikos, A. G., Yoo, J. J., . . . Lee, S. J. (2020). Assessment methodologies for extrusion-based bioink printability. *Biofabrication*, 12(2), 022003. doi: 10.1088/1758-5090/ab6f0d. Repéré à
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31972558>

Giuseppe, M. D., Law, N., Webb, B., R, A. M., Liew, L. J., Sercombe, T. B., . . . Doyle, B. J. (2018). Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting. *J Mech Behav Biomed Mater*, 79, 150-157. doi: 10.1016/j.jmbbm.2017.12.018. Repéré à
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29304429>

Gleadall, A., Visscher, D., Yang, J., Thomas, D., & Segal, J. (2018). Review of additive manufactured tissue engineering scaffolds: relationship between geometry and performance. *Burns Trauma*, 6, 19. doi: 10.1186/s41038-018-0121-4. Repéré à
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29988731>

Gopinathan, J., & Noh, I. (2018). Recent trends in bioinks for 3D printing. *Biomater Res*, 22, 11. doi: 10.1186/s40824-018-0122-1. Repéré à
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29636985>

Habib, A., Sathish, V., Mallik, S., & Khoda, B. (2018). 3D Printability of Alginate-Carboxymethyl Cellulose Hydrogel. *Materials (Basel)*, 11(3). doi: 10.3390/ma11030454. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29558424>

- Jiang, T., Munguia-Lopez, J. G., Flores-Torres, S., Grant, J., Vijayakumar, S., Leon-Rodriguez, A., & Kinsella, J. M. (2017). Directing the Self-assembly of Tumour Spheroids by Bioprinting Cellular Heterogeneous Models within Alginate/Gelatin Hydrogels. *Sci Rep*, 7(1), 4575. doi: 10.1038/s41598-017-04691-9. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28676662>
- Jiang, T., Munguia-Lopez, J. G., Flores-Torres, S., Kort-Mascort, J., & Kinsella, J. M. (2019). Extrusion bioprinting of soft materials: An emerging technique for biological model fabrication. *Applied Physics Reviews*, 6(1), 011310. doi: 10.1063/1.5059393
- Kiyotake, E. A., Douglas, A. W., Thomas, E. E., Nimmo, S. L., & Detamore, M. S. (2019). Development and quantitative characterization of the precursor rheology of hyaluronic acid hydrogels for bioprinting. *Acta Biomater*, 95, 176-187. doi: 10.1016/j.actbio.2019.01.041. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30669003>
- Kyle, S., Jessop, Z. M., Al-Sabah, A., & Whitaker, I. S. (2017). 'Printability' of Candidate Biomaterials for Extrusion Based 3D Printing: State-of-the-Art. *Adv Healthc Mater*, 6(16). doi: 10.1002/adhm.201700264. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28558161>
- Liu, F., Chen, Q., Liu, C., Ao, Q., Tian, X., Fan, J., . . . Wang, X. (2018). Natural Polymers for Organ 3D Bioprinting. *Polymers (Basel)*, 10(11). doi: 10.3390/polym10111278. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30961203>
- Liu, Q., Li, Q., Xu, S., Zheng, Q., & Cao, X. (2018). Preparation and Properties of 3D Printed Alginate(-)Chitosan Polyion Complex Hydrogels for Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*, 10(6). doi: 10.3390/polym10060664. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30966698>
- Loai, S. (2019). Clinical Perspectives on 3D Bioprinting Paradigms for Regenerative Medicine. *Regenerative Medicine Frontiers*. doi: 10.20900/rmf20190004
- Maciulaitis, J., Rekstyte, S., Usas, A., Jankauskaite, V., Gudas, R., Malinauskas, M., & Maciulaitis, R. (2016). Characterization of tissue engineered cartilage products: Recent developments in advanced therapy. *Pharmacol Res*, 113(Pt B), 823-832. doi: 10.1016/j.phrs.2016.02.022. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26926094>
- Maqsood, A. (1971). <Alam Maqsood M.Sc. 1971, Critical Stress and Recoverable Shear for Polymer Melt Fracture.pdf>.
- Markstedt, K., Mantas, A., Tournier, I., Martinez Avila, H., Hagg, D., & Gatenholm, P. (2015). 3D Bioprinting Human Chondrocytes with Nanocellulose-Alginate Bioink for Cartilage Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules*, 16(5), 1489-1496.

doi: 10.1021/acs.biomac.5b00188. Repéré à
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25806996>

Matai, I., Kaur, G., Seyedsalehi, A., McClinton, A., & Laurencin, C. T. (2020). Progress in 3D bioprinting technology for tissue/organ regenerative engineering. *Biomaterials*, 226, 119536. doi: 10.1016/j.biomaterials.2019.119536. Repéré à
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31648135>

Mouser, V. H., Melchels, F. P., Visser, J., Dhert, W. J., Gawlitta, D., & Malda, J. (2016). Yield stress determines bioprintability of hydrogels based on gelatin-methacryloyl and gellan gum for cartilage bioprinting. *Biofabrication*, 8(3), 035003. doi: 10.1088/1758-5090/8/3/035003. Repéré à
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27431733>

Noor, N., Shapira, A., Edri, R., Gal, I., Wertheim, L., & Dvir, T. (2019). 3D Printing of Personalized Thick and Perfusionable Cardiac Patches and Hearts. *Advanced Science*, 1900344. doi: 10.1002/advs.201900344

Ouyang, L., Yao, R., Zhao, Y., & Sun, W. (2016). Effect of bioink properties on printability and cell viability for 3D bioplotting of embryonic stem cells. *Biofabrication*, 8(3), 035020. doi: 10.1088/1758-5090/8/3/035020. Repéré à
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27634915>

Paxton, N., Smolan, W., Bock, T., Melchels, F., Groll, J., & Jungst, T. (2017). Proposal to assess printability of bioinks for extrusion-based bioprinting and evaluation of rheological properties governing bioprintability. *Biofabrication*, 9(4), 044107. doi: 10.1088/1758-5090/aa8dd8. Repéré à
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28930091>

Prendergast, M. E., Solorzano, R. D., & Cabrera, D. (2017). Bioinks for biofabrication: current state and future perspectives. *Journal of 3D Printing in Medicine*, 1(1), 49-62. doi: 10.2217/3dp-2016-0002. Repéré à
<https://www.futuremedicine.com/doi/abs/10.2217/3dp-2016-0002>

Rahimnejad, M., Labonté-Dupuis, T., Demarquette, N. R., & Lerouge, S. (2020). A rheological approach to assess the printability of thermosensitive chitosan-based biomaterial inks. *Biomedical Materials*. doi: 10.1088/1748-605X/abb2d8

Ribeiro, A., Blokzijl, M. M., Levato, R., Visser, C. W., Castilho, M., Hennink, W. E., . . . Malda, J. (2017). Assessing bioink shape fidelity to aid material development in 3D bioprinting. *Biofabrication*, 10(1), 014102. doi: 10.1088/1758-5090/aa90e2. Repéré à
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28976364>

Roehm, K. D., & Madihally, S. V. (2017). Bioprinted chitosan-gelatin thermosensitive hydrogels using an inexpensive 3D printer. *Biofabrication*, 10(1), 015002. doi:

- 10.1088/1758-5090/aa96dd. Repéré à
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29083312>
- Schwab, A., Levato, R., D'Este, M., Piluso, S., Eglin, D., & Malda, J. (2020). Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting. *Chem Rev.* doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00084. Repéré à
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32856892>
- Tan, Z., Parisi, C., Di Silvio, L., Dini, D., & Forte, A. E. (2017). Cryogenic 3D Printing of Super Soft Hydrogels. *Sci Rep.*, 7(1), 16293. doi: 10.1038/s41598-017-16668-9.
Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29176756>
- Townsend, J. M., Beck, E. C., Gehrke, S. H., Berkland, C. J., & Detamore, M. S. (2019). Flow Behavior Prior to Crosslinking: The Need for Precursor Rheology for Placement of Hydrogels in Medical Applications and for 3D Bioprinting. *Prog Polym Sci.*, 91, 126-140. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2019.01.003. Repéré à
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31571701>
- Webb, B., & Doyle, B. J. (2017). Parameter optimization for 3D bioprinting of hydrogels. *Bioprinting*, 8, 8-12. doi: 10.1016/j.bprint.2017.09.001
- Winter, H. H., & Chambon, F. (1986). Analysis of linear viscoelasticity of a crosslinking polymer at the gel point. *Journal of rheology*, 30(2), 367-382.
- Yan, Y., Wang, X., Pan, Y., Liu, H., Cheng, J., Xiong, Z., . . . Lu, Q. (2005). Fabrication of viable tissue-engineered constructs with 3D cell-assembly technique. *Biomaterials*, 26(29), 5864-5871. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.027. Repéré à
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15949552>