

Développement d'un hydrogel à base de réseaux interpénétrés de polymères pour la médecine régénérative

par

Aude GIGODOT

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

MONTRÉAL, LE 17 JANVIER 2025

ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC



Aude Gigodot, 2025



Cette licence [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) signifie qu'il est permis de diffuser, d'imprimer ou de sauvegarder sur un autre support une partie ou la totalité de cette œuvre à condition de 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

M. Ali Ahmadi, codirecteur de mémoire
Département de génie mécanique à l'École de technologie supérieure

Mme Inès Hamouda, co-directrice de mémoire
Département de génie mécanique à Polytechnico di Torino

Mme Marie-Hélène Beauséjour, présidente du jury
Département de génies des systèmes à l'École de technologie supérieure

Mme Emna Helal, 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 17 DÉCEMBRE 2024

À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements à ma directrice de projet, Pr Sophie Lerouge, pour m'avoir permis de travailler sur un sujet riche et varié, ainsi que pour son accompagnement et la confiance qu'elle m'a accordée tout au long de ces deux années passées au sein du laboratoire de Biomatériaux et BioFabrication (BBF) du centre de recherche du CRCHUM. Je tiens également à la remercier pour les nombreux enseignements apportés dans la science des matériaux pour l'ingénierie tissulaire et le domaine de la recherche. Mes remerciements vont également à mon co-directeur, Dr Ali Ahmadi, pour son encadrement et sa bienveillance. Je remercie ma co-directrice, Dr Inès Hamouda, qui m'a formée sur la majorité des manipulations que j'ai réalisées, ainsi que pour son accompagnement et investissement au sein de mon projet malgré la distance qui nous séparait. Je remercie l'ensemble de mes collègues pour leur aide, soutien et bienveillance. En particulier, je remercie Francesco Touani Kameni pour m'avoir formé sur les expériences de culture cellulaire, ainsi que ma collègue et amie Pakshid Hosseinzadeh pour son aide lors des expériences de culture cellulaire et les essais de IRTF. Je remercie Sara Badr de m'avoir formée et aiguillée sur l'impression 3D et de m'avoir motivée au quotidien. De même, je remercie Sydney Wheatley pour son investissement au sein du laboratoire et qui sans elle, une telle organisation ne serait pas possible. Je remercie Lucas Bouchard pour ses nombreuses explications concernant le testeur mécanique. Je remercie également Alyssa-Jayne Tain, Julie Bertucceli, Werner Thaillades, Laurie Kappel, Elisabeth Poirier, Mohammadamin Zohourfazeli, Hanna Hamoud-Michel, Baptiste Marin, Eli Daoust, Claire Phan et Mélanie Roger. Mes remerciements vont également au Dr Kirill Levin pour avoir réalisé les tests de RMN à l'université de McGill, au Dr Julien Lamontagne pour m'avoir formée sur le lyophilisateur ainsi qu'au Dr Sylvie Gervais qui m'a formée sur l'outil d'analyse statistique Statgraphics. Je remercie ma mentor, Dr Marie Mataburuka, qui m'a aidée à affiner mon choix de carrière professionnelle ainsi que les Drs Irène Guzman Soto et Emilio Alarcon du programme Create Intbiotech. Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement mes proches pour leur soutien et encouragements. En particulier : mes parents, mes grands-parents, Clément Ceron, Mouhamedou Dahi, Élorie Soussand, Éthel Soussand, Léa Vong, Dorine Picard et Ambre Butet.

Développement d'un hydrogel à base de réseaux interpénétrés de polymères pour la médecine régénérative

Aude GIGODOT

RÉSUMÉ

Les hydrogels constituent d'excellentes matrices 3D pour la modélisation *in vitro* des tissus humains. Cependant, les hydrogels constitués de polymères naturels présentent généralement de faibles propriétés mécaniques et une faible stabilité *in vitro*. Le principal défi consiste à mimer les tissus durs tels que le cartilage, en particulier reproduire les propriétés mécaniques et biologiques du microenvironnement *in vivo*.

Le principal objectif vise à créer un réseau de polymères interpénétrés (IPN) et bio-encre à base de chitosane thermosensible (CH) et de gélatine méthacrylée (GM) permettant l'encapsulation de cellules et démontrant de bonnes propriétés mécaniques pour imiter le cartilage.

Plusieurs formulations d'IPN à base de CH et de GM ont été évaluées en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et biologiques. Des solutions CH-GM ont été préparées suivant différents ratios en fixant la concentration finale de CH (1,67% w/v). Des lots de GM avec un faible, moyen et haut degré de substitution (DS) ont été préparés (40, 60 et 90 %) et évalués au sein de l'IPN. La cinétique de réticulation a été suivie par rhéologie *in situ*, en appliquant une lumière bleue (405 nm, 1 500 mW) à 37°C conduisant à la réticulation chimique du GM et à la réticulation physique du CH avec le β -glycérophosphate et le carbonate de sodium.

L'ajout de GM à 2%, en particulier avec le plus haut DS, au réseau CH améliore significativement les propriétés mécaniques de l'hydrogel par rapport au CH seul (module de compression : ~40 kPa contre 7 kPa). Cette amélioration est attribuée au nombre élevé de groupes méthacrylates dans le GM densifiant considérablement le réseau de polymères. Cet IPN est également plus adapté à l'impression 3D sans bain de support. La biocompatibilité a été évaluée par l'encapsulation de fibroblastes L929 dans l'encre sélectionnée, montrant une bonne viabilité et croissance cellulaire jusqu'au 7ème jour, mais pourrait être davantage améliorée en réduisant le temps d'exposition à la lumière par 5.

Nous présentons ici des bio-encres prometteuses à partir de formulations d'hydrogel IPN basées sur des polymères naturels, avec une imprimabilité et des propriétés mécaniques améliorées.

Mots clefs : hydrogel injectable, réseau interpénétré, bio-encre, cartilage

Development of a Hydrogel based on Interpenetrating Polymer Networks for Regenerative Medicine

Aude GIGODOT

ABSTRACT

Hydrogels are excellent cell-supportive materials for the *in vitro* modelling of human tissues. However, hydrogels made from natural polymer sources generally exhibit weak mechanical properties and low stability *in vitro*. The main challenge is in the generation of hard tissues, such as cartilage, by reproducing both the mechanical and biological *in vivo* microenvironment properties.

We aim to create an interpenetrating polymer network (IPN) hydrogel and bio-ink based on heat-sensitive chitosan (CH) and methacryloyl gelatin (GM) that enables cell encapsulation while demonstrating good mechanical properties to mimic cartilage.

Several IPN formulations based on CH and GM were evaluated on their physicochemical and bio-properties. CH-GM solutions were prepared at various ratios with fixed final concentration of CH (1.67% w/v). GM batches with low, medium and high degree of substitution (DS) were prepared (40, 60 and 90%) and evaluated within the IPN. The crosslinking kinetics was monitored by *in situ* rheology, applying blue light (405 nm, 1 500 mW) at 37°C leading to the chemical crosslinking of GM and the physical crosslinking of CH with β -glycerolphosphate and sodium carbonate.

The addition of 2%GM with the higher DS to the CH network significantly enhances the mechanical properties of the hydrogel compared to CH alone (compressive modulus of ~40 kPa instead of 7 kPa). This improvement is largely attributed to the high number of methacrylate groups in GM, which considerably densifies the polymer network. This IPN is also more suitable for 3D printing without a support bath. Biocompatibility was assessed through L929 fibroblasts encapsulation within the selected ink, showing good cell viability and growth until the 7th day, with potential improvement by reducing the exposure time to 2 minutes.

We report here promising bio-inks from IPN hydrogel formulations based on natural polymers with enhanced mechanical properties and printability.

Keywords: Injectable hydrogels, Interpenetrating Networks, Bio-ink, Cartilage

TABLE DES MATIÈRES

	Page
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 REVUE DE LA LITTÉRATURE	3
1.1 Matrices pour l'ingénierie tissulaire	3
1.1.1 Définition et raisons d'être.....	3
1.1.2 Matrices pour l'ingénierie tissulaire	4
1.1.3 Bio-impression 3D : une technologie prometteuse	6
1.1.4 Cahier des charges d'une bio-encre	7
1.1.5 Hydrogels : définition et propriétés	8
1.2 Hydrogels de gélatine méthacrylée (GelMA)	10
1.2.1 Synthèse de réaction	10
1.2.2 Amélioration de la méthode de synthèse	12
1.2.3 Mécanisme de photopolymérisation	15
1.2.4 Propriétés biologiques et mécaniques	17
1.2.5 Effet de la température et du pH sur les propriétés de la GelMA.....	18
1.2.6 Bio-impression 3D de la GelMA	20
1.3 Chitosane.....	22
1.3.1 Structure et propriétés du chitosane.....	22
1.3.2 Hydrogels de chitosane thermosensibles	23
1.3.3 Limitations du chitosane comme bio-encre	25
1.4 Réseau de polymères interpénétrés (IPN) à base de chitosane-GelMA	26
CHAPITRE 2 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	29
2.1 Résumé de la revue de la littérature	29
2.2 Objectifs et hypothèses de l'étude	30
2.3 Conditions et contrôles utilisés	31
CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE	33
3.1 Fabrication et caractérisation de la GelMA	33
3.1.1 Matériel	33
3.1.2 Procédé.....	33
3.1.3 Détermination du DS	35
3.1.4 Préparation des hydrogels de GelMA	35
3.2 Préparation des hydrogels de chitosane	36
3.2.1 Matériel	36
3.2.2 Procédé.....	36
3.3 Préparation des hydrogels de chitosane-GelMA.....	38
3.3.1 Mise au point de la méthode	38
3.3.2 Méthode de préparation retenue pour la solution A.....	38
3.3.3 Préparation des hydrogels de chitosane-GelMA.....	39
3.4 Caractérisation physico-chimique et mécanique des hydrogels	40

3.4.1	Tests de rhéologie	40
3.4.2	Tests de compression	42
3.4.3	Osmolarité et pH des hydrogels	45
3.5	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).....	45
3.6	Impression 3D des hydrogels et IPN	45
3.7	Biocompatibilité et encapsulation cellulaire	47
3.7.1	Culture cellulaire.....	47
3.7.2	Encapsulation cellulaire (3D)	47
3.7.3	Tests de viabilité cellulaire	48
3.8	Analyse statistique	49
CHAPITRE 4 RÉSULTATS		51
4.1	Hydrogels de GelMA.....	51
4.1.1	Modulation du DS et reproductibilité	51
4.1.2	Choix du temps d'exposition à la lumière bleue.....	55
4.1.3	Effet de la concentration de la GelMA sur ses propriétés rhéologiques...	56
4.1.4	Effet du degré de substitution de la GelMA sur ses propriétés rhéologiques.....	57
4.1.5	Effet de l'autoclave sur les propriétés rhéologiques et mécaniques	59
4.2	Hydrogels de chitosane-GelMA	61
4.2.1	Réticulation des hydrogels.....	61
4.2.2	Analyse par Infrarouges	67
4.2.3	Effet du DS et de la concentration en GelMA	71
4.2.4	Chargement cyclique	76
4.2.5	Étude de la stabilité des propriétés mécaniques après immersion	79
4.2.6	Effet de la concentration en photoinitiateur et du temps d'exposition	81
4.3	Impression 3D des encres à base de chitosane-GelMA	84
4.3.1	Étude du comportement rhéofluidifiant des hydrogels.....	84
4.3.2	Tests d'impression 3D	85
4.4	Biocompatibilité de l'encre sélectionnée à base de chitosane-GelMA.....	90
CHAPITRE 5 DISCUSSION		97
5.1	Méthode de synthèse des IPN de chitosane-GelMA.....	97
5.2	Tests de compression mécanique.....	98
5.3	Compatibilité avec l'encapsulation cellulaire	99
5.4	Impression 3D des encres de Chitosane-GelMA	103
5.5	Autres matrices injectables pour la régénération du cartilage hyalin	105
CONCLUSION.....		107
ANNEXE I TEMPÉRATURE DE TRANSITION SOL-GEL ET GEL-SOL DE LA GELMA		109
ANNEXE II EFFET DE LA CONCENTRATION INITIALE EN HCL SUR LES IPN CH-GM		111

ANNEXE III REPRODUCTIBILITÉ DES LOTS DE CH-2%GM DS90%	115
ANNEXE IV TESTS D'EXTRUSION DU CH-3%GÉLATINE	117
LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	119

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1.1. Degrés de substitution obtenus suivant les principaux paramètres utilisés dans la littérature lors de la synthèse de la GelMA. AM : anhydride méthacrylique	14
Tableau 1.2. Méthode de fabrication des (semi)-IPN à base de chitosane et de GelMA dans la littérature	27
Tableau 2.1. Nomenclature des formulations de CH-GM étudiées	32
Tableau 3.1. Concentrations initiales (Ci) et finales (Cf) après mélange des 3 seringues, en chitosane et agents gélifiants (BGP/SHC).....	37
Tableau 3.2. Concentrations initiales (Ci) pour préparer les solutions de polymères à base de chitosane-GelMA (ou gélatine) en vue d'obtenir les concentrations finales (Cf) souhaitées dans l'hydrogel (Volume initial = 600 μ L et Volume final = 1 mL)	39
Tableau 4.1. Degré de substitution (DS) des différents lots de GelMA de type B synthétisés en fonction des paramètres de réaction utilisés (AM : anhydride méthacrylique).....	53
Tableau 4.2. Degré de substitution (DS) des différents lots de GelMA de type A synthétisés en fonction des paramètres de réaction utilisés (AM : anhydride méthacrylique).....	54

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1.1 Illustration de la bio impression 3D par extrusion utilisant un système pneumatique avec ou sans bain de support (BioRender)	7
Figure 1.2. Représentation simplifiée de (semi)-réseaux interpénétrés de polymères (IPN) Image reproduite et modifiée de Inamdar, Cherukattu, Anand, & Kandasubramanian (2018)	10
Figure 1.3. Schéma simplifié de la synthèse de la GelMA (BioRender)	12
Figure 1.4. Mécanisme simplifié de la photo-réticulation de la GelMA (BioRender) ...	16
Figure 1.5. Structure secondaire de la gélatine et GelMA (avant réticulation) sous l'effet de la température Image inspirée de Van Den Bulcke et al., (2000) (BioRender)	19
Figure 1.6. Désacétylation de la chitine donnant le chitosane Tirée de Pal, Sarkar, Anis, Wiszumirska, & Jarzębski (2021).....	23
Figure 1.7 . Mécanisme simplifié de la gélification du chitosane en présence des agents gélifiants BGP et SHC (BioRender)	24
Figure 2.1. Schématisation des différents objectifs du projet	31
Figure 3.1. Différentes étapes de la synthèse de la GelMA (BioRender)	34
Figure 3.2. Préparation de la solution acide de chitosane (BioRender)	37
Figure 3.3. Méthode de préparation des solutions de chitosane-GelMA (BioRender)...	39
Figure 3.4. Système de photopolymérisation mis en place pour les tests de rhéologie (BioRender)	40
Figure 3.5. Préparation des hydrogels de chitosane-GelMA réticulés physiquement et/ou chimiquement (BioRender)	43
Figure 3.6. Méthode d'obtention d'une courbe d'hystérésis lors d'un cycle de compression jusqu'à 20% de déformation (BioRender)	44
Figure 3.7. Encapsulation cellulaire par la méthode de mélange trois seringues (BioRender)	48
Figure 4.1. Spectres RMN du proton de la gélatine et de la GelMA type A avec un DS~90% et un DS~50% (TopSpin 4.2.0)	52

Figure 4.2. Photopolymérisation de la GelMA à 10% _{w/v} (type A, DS~91%) en présence du photoinitiateur LAP à 0,05% _{w/v} à différents temps d'exposition à la lumière bleue ($\lambda = 405$ nm), T=37°C. Les flèches indiquent lorsque la lumière est allumée puis éteinte en fonction des différentes conditions	56
Figure 4.3. Modules de stockage (G') et de perte (G'') des hydrogels de GelMA (type A, DS~90%) à différentes concentrations exposés pendant 10 min à la lumière bleue en présence du photoinitiateur LAP à 0,05% _{w/v} , T=37°C	57
Figure 4.4. Modules de stockage (G') et de perte (G'') des hydrogels de GelMA (10% _{w/v} , type A) avec différents degrés de substitution (DS), réticulés pendant 10 min à la lumière bleue en présence du photoinitiateur LAP à 0,05% _{w/v} , T=37°C	58
Figure 4.5. Modules de stockage (G') et de perte (G'') des hydrogels de GelMA à 10% _{w/v} (type A, DS~96%) autoclavés ou non et photo-réticulés ($\lambda=405$ nm) en présence de LAP à 0,05% _{w/v} pendant 10 min à 37°C, n=3	60
Figure 4.6. Effet de l'autoclave (a) sur le module de compression à 20% de déformation et (b) la contrainte à la rupture des hydrogels de GelMA (121°C, 20 min), n=3 (RStudio) n.s : non significatif (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)	60
Figure 4.7. Fioles de la solution acide de chitosane-GelMA (a) lorsqu'aucun des polymères n'est autoclavé (b) lorsque seule la GelMA n'est pas autoclavée et (c) lorsque les deux sont autoclavés (121°C, 20 min), température ambiante	62
Figure 4.8. Module de stockage (G') des hydrogels de 1,67%chitosane (CH), de 2%GelMA DS~90% (2%GM), de 1,67%chitosane-2%GelMA DS~90% (CH-2%GM) et de CH-2%GM lorsque la GelMA n'est pas autoclavée (CH-(2%GM N.A)) lorsqu'exposés à la lumière bleue (405 nm) pendant 10 min et chauffés à 37°C en présence du photoinitiateur LAP et/ou des agents gélifiants (BGP/SHC)	63
Figure 4.9. Hydrogels de 1,67%chitosane 2%GelMA (CH-2%GM) dont le DS est de 60% (a) ou 90% (b) après exposition 10 min à la lumière bleue (405 nm) puis incubation 24 h à 37°C.....	64

- Figure 4.10. Module sécant à 20% de déformation (kPa) des hydrogels de Chitosane-GelMA DS~90% avec 2%_{w/v} (CH-2%GM) ou 3%_{w/v} de GelMA (CH-3%GM) lorsqu'exposés à la lumière et/ou incubés 24h à 37°C, n=3 (RStudio). Test ANOVA suivi du test de Tukey : p-value < 0,05 : *, p-value < 0,01 : ** p-value < 0,001 : *** et p-value < 0,0001 : **** 66
- Figure 4.11. Formation de réseaux de polymères interpénétrés (IPN) ou semi-IPN à base de chitosane et de GelMA (BioRender) 67
- Figure 4.12. Spectres infrarouges de la GelMA type A avec un degré de substitution de 60 ou 90% photo réticulée (t=10 min, $\lambda=405$ nm) ou non ainsi que de la gélatine type A 68
- Figure 4.13. Spectres infrarouges à transformée de Fourier des hydrogels de chitosane (CH), de gélatine et GelMA de type A (DS=60 ou 90%) ainsi que des hydrogels de chitosane-Gélatine (CH-Gélatine) et chitosane-GelMA (CH-GM) ayant été réticulés en présence d'agents gélifiants (37°C) et/ou photopolymérisés (t=10 min, $\lambda = 405$ nm)..... 70
- Figure 4.14. Modules de stockage (G') et de perte (G'') des hydrogels de 1,67% Chitosane et 1,67%Chitosane-2%GelMA DS=0, 40, 60 ou 90% lorsque réticulés à 37°C en présence d'agents gélifiants (pas d'exposition à la lumière), n \geq 3 72
- Figure 4.15. Effet du degré de substitution (DS) sur le module de stockage (G') des hydrogels de chitosane (CH), de chitosane-gélatine (CH-GM DS0%) et de chitosane-GelMA (CH-GM) à une concentration en gélatine/GelMA fixée à 2%_{w/v}. Hydrogels réticulés à 37°C en présence d'agents gélifiants et/ou photopolymérisés en présence du photoinitiateur LAP (0,05%_{w/v}, t=10 min), n \geq 3 73
- Figure 4.16. Effet du degré de substitution (DS) sur (a) le module sécant à 20% de déformation, (b) la contrainte à la rupture et des hydrogels de chitosane-GelMA (CH-GM) pour différentes concentrations en GelMA (GM) (2%_{w/v}, 3%_{w/v} et 5%_{w/v}), n \geq 3 (RStudio) DS=0% : gélatine. Test de Kruskal-Wallis suivi du test post-hoc de Dunn – p-value ajustée (correction de Bonferroni) p < 0,05 : *, p < 0,01 : **, p < 0,001 : *** et p < 0,0001 : **** 75
- Figure 4.17. Effet du degré de substitution (DS) sur la déformation à la rupture des hydrogels de chitosane-GelMA (CH-GM) pour différentes concentrations en GelMA (GM) (2%_{w/v}, 3%_{w/v} et 5%_{w/v}), n \geq 3 (RStudio).. 76

- Figure 4.18. Évolution du module sécant à 20% de déformation des hydrogels de CH-2%Gélatine (CH-Gel), CH-2%GelMA avec différents degrés de substitution (DS) au cours de différents cycles de compression, tests de Kruskal-Wallis (p-value > 0,05), n=3 CH : chitosane..... 77
- Figure 4.19. Courbes hystérésis des hydrogels de (a) 1,67%CH (b) 1,67%CH-2%Gélatine (c) 1,67%CH-2%GelMA DS40% (d) 1,67%CH-2%GelMA DS60% et (e) 1,67%CH-2%GelMA DS90% réticulés en présence d'agents gélifiants et/ou de photoinitiateur (LAP 0,05%_{w/v}, 405 nm, 10 min) puis testés en compression cyclique jusqu'à 20% de déformation, n=3 CH : chitosane 78
- Figure 4.20. (a) Module sécant à 20% de déformation et (b) contrainte à la rupture des hydrogels de 1,67%chitosane HCl 0,12 M (CH), de 1,67%chitosane-2%gélatine (CH-GM DS0%), de 1,67%chitosane-2%GelMA DS60% (CH-GM DS60%) et de 1,67%chitosane-2%GelMA DS90% (CH-GM DS90%) lorsque non immergé en milieu aqueux et sept jours après immersion dans le PBS 1X ou milieu de culture DMEM complet, n ≥ 3 (RStudio) Test de Kruskal-Wallis suivi du test post-hoc de Dunn (p-value ajustée par la correction de Bonferroni) : p < 0,05 : *, p < 0,01 : **, p < 0,001 : *** et p < 0,0001 : **** 80
- Figure 4.21. Cinétique de gélification des hydrogels de 1,67%Chitosane-2%GelMA DS90% (CH-2%GM DS90%) en fonction de la concentration du photoinitiateur LAP (0,05% ou 0,1%_{w/v}) et du temps d'exposition à la lumière bleue (5 ou 10 min), n=3, T=37°C 82
- Figure 4.22. (a) Module sécant à 20% de déformation et (b) contrainte à la rupture des hydrogels de 1,67%Chitosane-2%GelMA DS90% (CH-2%GM DS90%) en fonction de la concentration du photoinitiateur LAP (0,05% ou 0,1%_{w/v}) et du temps d'exposition à la lumière bleue (5 ou 10 min), n=3 (RStudio). Test de Kruskal-Wallis suivi du test post-hoc de Dunn (p-value ajustée par la correction de Bonferroni) : p < 0,05 : *, p < 0,01 : ** p < 0,001 : *** et p < 0,0001 : **** 83
- Figure 4.23. Évolution de la viscosité des hydrogels de CH-GM en fonction du taux de cisaillement pour différentes concentrations en GM et différents DS, T=22°C 85
- Figure 4.24. Indice d'imprimabilité (Pr) et taux d'écoulement (Sp) des différents hydrogels de chitosane-2%Gélatine/GelMA (CH-2%Gel/GM) pour différents degrés de substitution (DS) et paramètres optimaux d'impression définis. Grilles : 20 mm x 20 mm (1 couche)..... 86

- Figure 4.25. Comparaison de la résolution d'impression des premières et quatrièmes couches de grilles de $20 \times 20 \times 1 \text{ mm}^3$ à base de 1,67%Chitosane 2%GelMA DS90% (CH-2%GM DS90%) imprimées à une vitesse de 15 ou 20 mm/s et à une pression d'extrusion de 40 ou 50 kPa, puis photopolymérisées une fois l'impression terminée (2 min, 405 nm). Échelle des images prises au microscope optique (grossissement x4) : $890 \mu\text{m}$.
Pr : indice d'imprimabilité. Sp : taux d'étalement 88
- Figure 4.26. Comparaison de la résolution d'impression de grilles de $20 \times 20 \times 1 \text{ mm}^3$ à base de 1,67%Chitosane 2%GelMA DS90% (CH-2%GM DS90%) imprimées à une vitesse de 20 mm/s et une pression de 40 kPa lorsqu'exposées pendant 2 min à la lumière bleue (405 nm) à la fin de l'impression ou entre chaque couche. Échelle des images prises au microscope optique (grossissement x4) : $890 \mu\text{m}$.
Pr : indice d'imprimabilité. Sp : taux d'étalement 89
- Figure 4.27. Effet de la photopolymérisation des hydrogels de 1,67%Chitosane-2%GelMA DS90% (CH-GM) en présence de LAP à 0,05%_{w/v} (t=10 min, 405 nm) sur la viabilité des fibroblastes L929 P5 encapsulés. Échelle image prise au microscope : $320 \mu\text{m}$ 91
- Figure 4.28. Images prises au microscope à fluorescence (grossissement x4) des fibroblastes P5 encapsulés dans les hydrogels de 1,67%Chitosane, 1,67%Chitosane-2%Gélatine et 1,67%Chitosane-2%GelMA DS90% réticulés en présence de lumière bleue (t=10 min photoinitiateur LAP 0,05%_{w/v}) et/ou réticulés thermiquement à 37°C en présence d'agents gélifiants. En vert : cellules vivantes. En rouge : cellules mortes. Échelle : $320 \mu\text{m}$ 92
- Figure 4.29. Activité métabolique des fibroblastes L929 P5 encapsulés dans les hydrogels de 1,67%Chitosane, 1,67%Chitosane-2%Gélatine et 1,67%Chitosane-2%GelMA DS90% réticulés en présence de lumière bleue (t=10 min, photoinitiateur LAP 0,05%_{w/v}) et/ou réticulés thermiquement à 37°C en présence d'agents gélifiants. Test de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$) 93
- Figure 4.30. Images prises au microscope à fluorescence (grossissement x4) des fibroblastes P6 encapsulés dans les hydrogels de 1,67%Chitosane-2%GelMA DS90% réticulés en présence du photoinitiateur LAP à 0,05%_{w/v} pendant 10 min ou à 0,1%_{w/v} pendant 5 min ou simplement exposées pendant 10 min à la lumière bleue en l'absence de LAP En rouge : cellules mortes. Échelle : $320 \mu\text{m}$ 94

Figure 4.31. Activité métabolique des fibroblastes L929 P6 encapsulés dans les hydrogels de 1,67%Chitosane-2%GelMA DS90 réticulés en présence du photoinitiateur LAP à 0,05% _{w/v} pendant 10 min ou à 0,1% _{w/v} pendant 5 min, ou simplement exposés pendant 10 min à la lumière bleue en l'absence de LAP. Test de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$)	95
Figure 5.1. Représentation schématique du faisceau	101
Figure 5.2. Structure bicouche à base de 2%chitosane (Acide Acétique 0,15 M) HAP et de 1,67%chitosane (HCl 0,12 M) 2%GelMA DS90%, HAP : hydroxyapatite	102
Figure 5.3. Différentes méthodes de photopolymérisation pouvant être utilisées en bio impression 3D Image tirée de Lim et al., (2020)	105

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AM	Anhydride méthacrylique
BGP	β -glycérophosphate
BMSC	Cellules souches mésenchymateuse de la moëlle osseuse
CB	Tampon carbonate bicarbonate
CH	Chitosane
CH-Gel	Chitosane-Gélatine
CH-GM	Chitosane-GelMA
CRCHUM	Centre de recherche du centre hospitalier de l'université de Montréal
DDA	Degré de désacétylation
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DS	Degré de substitution
D ₂ O	Oxide de deuterium
Eth-1	Éthidium homodimer-1
FRESH	<i>Freeform Reversible Embedding of Suspended Hydrogels</i>
GAG	Glycosaminoglycanes
GelMA ou GM	Gélatine méthacrylée
GMA	GelMA de type A
GMB	GelMA de type B
G'	Module de stockage
G''	Module de perte
HAP	Hydroxyapatite

HCl	Acide chlorhydrique
IPN	Réseau de polymères interpénétrés, en anglais <i>interpenetrating polymer network</i>
Irgacure 2959	2-hydroxy-4'-(2-hydroxyéthoxy)-2-méthylpropiophénone
IRTF	Infrarouges à transformées de Fourier
LAP	Lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate
MEC	Matrice extracellulaire
MM	Masse molaire
MMP	Métalloprotéase matricielle
NaOH	Hydroxyde de sodium
n.s	Non significatif
PB	Tampon phosphate
PBS	Tampon phosphate salin
PI	Point isoélectrique
Pr	Indice d'imprimabilité
Ru/SPS	Ruthénium/persulfate de sodium
SBF	Sérum bovin fœtal
SHC	Hydrogénocarbonate de sodium
Sp	Taux d'étalement
UV	Ultraviolet

LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS DE MESURE

bpm	Battement par minute
°C	Degré Celsius
G	Gauge
g	Gramme
g/mol	Gramme par mole
Hz	Hertz
kD	Kilo Dalton
kPa	Kilopascal
λ	Longueur d'onde
μm	Micromètre
μM	Micromole
mL	Millilitre
mL/g	Millilitre par gramme
mL/min	Millilitre par minute
mm/s	Millimètre par seconde
mmol	Millimole
mOsm/kg	Milliosmoles par kilogramme
mW	Milli Watt
mW/cm ²	Milli Watt par centimètre carré
min	Minute
M	Mole

XXVI

nm	Nanomètre
N	Newton
cm ⁻¹	Nombre d'onde
ppm	Partie par million
Pa	Pascal
%w/v	Pourcentage masse par volume
s	Seconde
rpm	Tour par minute

INTRODUCTION

L'ingénierie tissulaire vise à restaurer la fonction des tissus ou organes endommagés (Gerlach & Arndt, 2010). C'est le cas notamment pour la régénération du cartilage articulaire, dont la dégénérescence réduit drastiquement la qualité de vie des personnes atteintes et s'accompagne généralement de douleurs intenses. L'avascularisation du tissu cartilagineux limite considérablement sa capacité à se régénérer et conduit à des dommages souvent irréversibles. Les traitements actuels mis en place, souvent symptomatiques ou invasifs, ne permettent qu'une restauration partielle des fonctions du tissu. Il s'avère donc primordial de trouver de nouveaux traitements moins invasifs comme des matériaux injectables, permettant davantage de mimer la structure et les propriétés du tissu naturel. La bio-impression 3D est une technologie émergente dont la précision et la reproductibilité favorisent la fabrication de matrices biomimétiques. En combinant l'utilisation de matrices injectables avec la bio-impression 3D, il est envisageable de développer des traitements innovants comme la possibilité de d'abord injecter un matériau dans la région lésée puis d'y ajouter par la suite une structure bio-imprimée plus complexe comportant des cellules vivantes.

L'utilisation de matrices injectables chargées en cellules ouvre de grandes perspectives dans ce domaine. Certaines matrices présentent l'avantage de gélifier *in situ* par effet thermique, chimique ou en présence de lumière. Ces dernières permettent de combler des régions à géométries complexes et irrégulières sans nécessiter une intervention chirurgicale lourde. D'autres part, ces matrices injectables permettent de créer des structures 3D *in vitro*, afin de les implanter dans la région lésée ou de servir comme modèles 3D pour l'étude des mécanismes biologiques ou des médicaments. Les hydrogels à base de polymères naturels, en raison de leur forte teneur en eau et de leur biocompatibilité, sont d'excellents candidats comme matrices. Toutefois, ils sont généralement trop faibles mécaniquement pour supporter les contraintes physiologiques s'exerçant sur les tissus durs tels que le cartilage ou l'os. C'est le cas des hydrogels de chitosane thermosensibles gélifiant à température corporelle, même si l'équipe de la Professeure Sophie Lerouge a permis d'augmenter significativement leurs propriétés mécaniques grâce à l'ajout d'hydrogénocarbonate de sodium (SHC) à l'agent gélifiant β -

glycérophosphate (BGP) (Assaad, Maire, & Lerouge, 2015). La gélatine méthacrylée (GelMA), polymérisable par rayonnement UV ou visible, suscite quant à elle un intérêt grandissant dans la communauté scientifique en raison de ses propriétés ajustables en fonction de l'application visée, de sa haute biocompatibilité, de sa meilleure résistance mécanique et stabilité par rapport à la gélatine (He et al., 2023). Mais ses propriétés sont également trop faibles pour le cartilage et elle tend à gonfler en milieu aqueux. Afin d'accroître les propriétés mécaniques des hydrogels, il est envisageable de créer des réseaux interpénétrés de polymères (IPN) en vue de combiner les avantages respectifs des différents polymères employés (Silverstein, 2020).

Ce projet de maîtrise a pour objectif principal de créer des bio-encres IPN à base de chitosane thermosensible et de GelMA permettant l'encapsulation cellulaire tout en ayant de bonnes propriétés mécaniques afin de mimer le cartilage. Dans cette perspective, le document est découpé en cinq chapitres. Le premier chapitre présente l'état de l'art. Plus précisément, seront présentés les enjeux et rôles des matrices pour l'ingénierie tissulaire, la technique de bio-impression 3D par extrusion, les propriétés des hydrogels et en particulier ceux de GelMA et de chitosane thermosensible, ainsi que d'IPN à base de ces deux polymères. Les objectifs et hypothèses de l'étude seront présentés dans le second chapitre. Le troisième chapitre constitue la section méthodologique. Les principaux résultats seront présentés dans le quatrième chapitre, puis discutés dans le cinquième chapitre. Enfin, le présent document s'achèvera sur une conclusion générale du projet.

CHAPITRE 1

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.1 Matrices pour l'ingénierie tissulaire

1.1.1 Définition et raisons d'être

L'ingénierie tissulaire vise à « restaurer ou remplacer la fonction des tissus ou organes endommagés » [traduit de l'anglais] (Gerlach & Arndt, 2010). Elle permet également de créer des modèles 3D vivants visant à mieux comprendre le fonctionnement d'un tissu ou organe ainsi qu'à tester différents traitements médicamenteux (Ashammakhi et al., 2022). Dans certains cas, ceux-ci peuvent présenter une alternative à l'utilisation de modèles animaux, selon le principe des 3R (*Refine, Reduce, Replace*) (De Vries et al., 2015). L'ingénierie tissulaire est particulièrement intéressante pour la régénération de tissus avasculaires tel que le cartilage, puisque leur réparation naturelle est extrêmement limitée et conduit à une dégénérescence souvent irréversible (Terzopoulou et al., 2022). Par exemple, la dégénérescence des disques intervertébraux est l'une des principales causes de douleurs dorsales et nécessite plus de 250 000 opérations chirurgicales par an aux États-Unis d'Amérique (Perera et al., 2021), ce qui coûte en moyenne plus de 100 milliards de dollars par an (Dagenais, Caro, & Haldeman, 2008). Les traitements médicaux sont actuellement insatisfaisants puisqu'ils visent principalement à réduire la douleur et ne permettent pas de recouvrer les propriétés natives du disque (Adoungotchodo, 2022 ; Long, Torre, Hom, Assael, & Iatridis, 2016 ; Perera et al., 2021). De même, la dégradation du cartilage articulaire ne cesse d'augmenter à l'échelle mondiale en raison de la population vieillissante et de la recrudescence de facteurs de risques comme l'obésité. L'ostéoarthrite conduit à une diminution considérable de la qualité de vie des personnes atteintes et les coûts annuels estimés aux États-Unis d'Amérique sont environ de 45 milliards de dollars (X. Zhao et al., 2019). Dans ces deux cas, comme pour d'autres applications, l'ingénierie tissulaire permet de développer des méthodes alternatives minimalement invasives, en utilisant un mélange de biomatériaux, de cellules et de molécules

bioactives afin de mimer la structure et les fonctions des tissus biologiques (Lanza, R, Langer, R, Vacanti, J.P, & Atala, A, 2020).

1.1.2 Matrices pour l'ingénierie tissulaire

Les matrices, en anglais *scaffolds*, utilisées en ingénierie tissulaire sont primordiales pour la reconstitution des tissus lésés. Elles visent à reproduire la matrice extracellulaire (MEC) native essentielle au développement et à la survie cellulaire. Il s'agit d'un support temporaire permettant aux cellulesensemencées (2D) ou encapsulées (3D) d'adhérer, de migrer, de proliférer et de se différencier une fois implantées dans le corps humain. Le choix des matériaux constituant la matrice est d'une importance capitale puisqu'il définit le comportement cellulaire ainsi que les propriétés biomécaniques. Les *scaffolds* à base de polymères suscitent un intérêt grandissant puisqu'ils ressemblent à la structure des supramolécules de la MEC et que leur diversité permet de couvrir un large domaine d'applications. Les polymères peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Il est essentiel que la matrice possède des propriétés proches du tissu d'intérêt. En effet, une différence significative des propriétés mécaniques entre la matrice et le tissu remplacé peut engendrer son descellement, sa rupture ou encore la nécrose du tissu environnant. De plus, des contraintes trop fortes ou trop faibles peuvent nuire aux cellules encapsulées. Par exemple, des contraintes mécaniques physiologiques favorisent la prolifération des chondrocytes et peuvent faciliter la différenciation des cellules souches mésenchymateuse osseuses (BMSCs) (J. Zhao et al., 2016). Une fois implantée, la matrice doit résister aux contraintes et au stress environnants, tout en permettant aux cellules de la coloniser et de progressivement la substituer par la MEC qu'elles sécrètent (Jafari et al., 2017 ; Nikolova & Chavali, 2019). La matrice implantable doit être biocompatible, c'est-à-dire restaurer les fonctions du tissu substitué sans engendrer de réponse adverse chez l'hôte. La réponse immunitaire de l'hôte peut conduire à la formation de tissu fibrotique autour de l'implant et déclencher une inflammation chronique (Terzopoulou et al., 2022). Dans de nombreux cas, elle doit également être biodégradable, c'est-à-dire qu'elle doit pouvoir être décomposée par des processus biologiques sans que les produits de sa dégradation soient toxiques. La vitesse de dégradation de la matrice implantée et celle de la

régénération du tissu doivent être similaires (Iervolino et al., 2023 ; Rastin, Ormsby, Atkins, & Losic, 2020). La porosité est un critère essentiel, d'autant plus lorsque les cellules sont encapsulées dans la matrice, puisqu'elle permet aux cellules d'accéder aux nutriments et à l'oxygène tout en assurant l'évacuation des déchets cellulaires (Jafari et al., 2017 ; Nikolova & Chavali, 2019). La taille optimale des pores dépend du type cellulaire utilisé. Par exemple, les chondrocytes prolifèrent davantage lorsque le diamètre des pores est de 150 à 250 μm (Q. Zhang, Lu, Kawazoe, & Chen, 2014). D'autres propriétés sont essentielles comme le pH, l'osmolarité, la bonne intégration de l'implant au tissu environnant, son aptitude à être stérilisé sans détériorer sa structure ou encore favoriser les interventions chirurgicales minimalement invasives (Terzopoulou et al., 2022). Les matrices peuvent exister sous différentes formes : poreuses, fibreuses, en mousse ou encore sous forme de microsphères. Elles peuvent également être chargées de molécules bioactives comme des facteurs de croissances afin de renforcer leur biomimétisme (Jafari et al., 2017 ; Nikolova & Chavali, 2019). Dans le cadre de ce projet, on s'intéresse aux matrices injectables chargées en cellules. Elles ont l'avantage d'être minimalement invasives et sont aptes à combler des cavités de formes complexes et irrégulières. Une propriété requise supplémentaire est qu'elles soient suffisamment fluides afin d'être injectées à l'aide d'une seringue ou d'un cathéter, mais de se solidifier rapidement *in situ* dans le corps. Différentes techniques peuvent être employées afin d'initier leur solidification. Par exemple, elles peuvent gélifier sous l'effet de la température corporelle ou bien être combinées à des photoinitiateurs et l'utilisation d'une source lumineuse. Toutefois, il est essentiel de contrôler leur cinétique de gélification afin d'éviter qu'elles ne se répandent dans le corps ou ne se solidifient avant même d'atteindre la zone d'intérêt (Kretlow, Klouda, & Mikos, 2007). Ces qualités sont également requises lorsque l'on cherche à créer des matrices 3D implantables mimant les tissus vivants, par exemple par la technique de bio-impression 3D par extrusion, détaillée ci-après.

1.1.3 Bio-impression 3D : une technologie prometteuse

La bio-impression 3D permet de surmonter de nombreuses difficultés rencontrées dans les autres méthodes traditionnelles de fabrication de modèles 3D, notamment le manque de reproductibilité, de précision, de personnalisation ainsi que la difficulté de créer des structures multicouches (Jafari et al., 2017 ; Nikolova & Chavali, 2019). Il s'agit d'une technique de fabrication additive assistée par ordinateur (CAO) permettant de créer des structures 3D relativement complexes grâce à la manipulation d'encres et de cellules vivantes. Elle assure une distribution homogène des cellules dans le biomatériau tout en contrôlant sa forme et sa porosité. Il est également possible de créer des structures complexes hétérogènes à base de différentes encres, mimant davantage les tissus vivants comme le tissu osseux. Différentes techniques de bio-impression 3D existent, telles que la stéréolithographie, l'impression assistée par laser, l'impression à jet d'encre ou encore l'impression par extrusion. Malgré sa moins bonne résolution d'impression ($\sim 200 \mu\text{m}$), la bio-impression 3D par extrusion est une des techniques les plus couramment répandue en raison de sa simplicité d'utilisation et de son coût relativement faible. Elle permet également d'imprimer des structures avec une haute densité cellulaire à l'aide d'une grande diversité de biomatériaux. Une fois que les différents paramètres d'impression sont définis comme la température de la cartouche, la température du lit d'impression, la vitesse de déplacement de l'aiguille ou la pression d'extrusion, l'impression peut démarrer. La bio-encre est ainsi extrudée à travers l'aiguille fixée sur la tête d'impression à l'aide d'un piston, d'un système pneumatique ou d'une vis, puis déposée sur le lit d'impression (Gu, Fu, Lin, & He, 2020 ; Mobaraki, Ghaffari, Yazdanpanah, Luo, & Mills, 2020 ; Rahimnejad, 2022). Pour les encres photosensibles, il est également possible de les polymériser à l'aide de têtes d'impression à lumière visible ou ultraviolette (UV) (Gaglio, Baruffaldi, Pirri, Napione, & Frascella, 2024). Étant donné les faibles propriétés mécaniques des bio-encres, on utilise de plus en plus souvent la méthode FRESH également appelée « *Freeform Reversible Embedding Suspended Hydrogels* » (Figure 1.1), qui prévient l'affaissement et la déformation de la structure en cours d'impression grâce à l'utilisation d'un bain de support. Il permet également de contrôler de façon homogène la température. La matrice utilisée comme bain de support peut aisément être éliminée une fois l'impression

terminée sans que la structure d'intérêt ne se détériore (Yogeshwaran, Goodarzi Hosseinabadi, Gendy, & Miri, 2024).

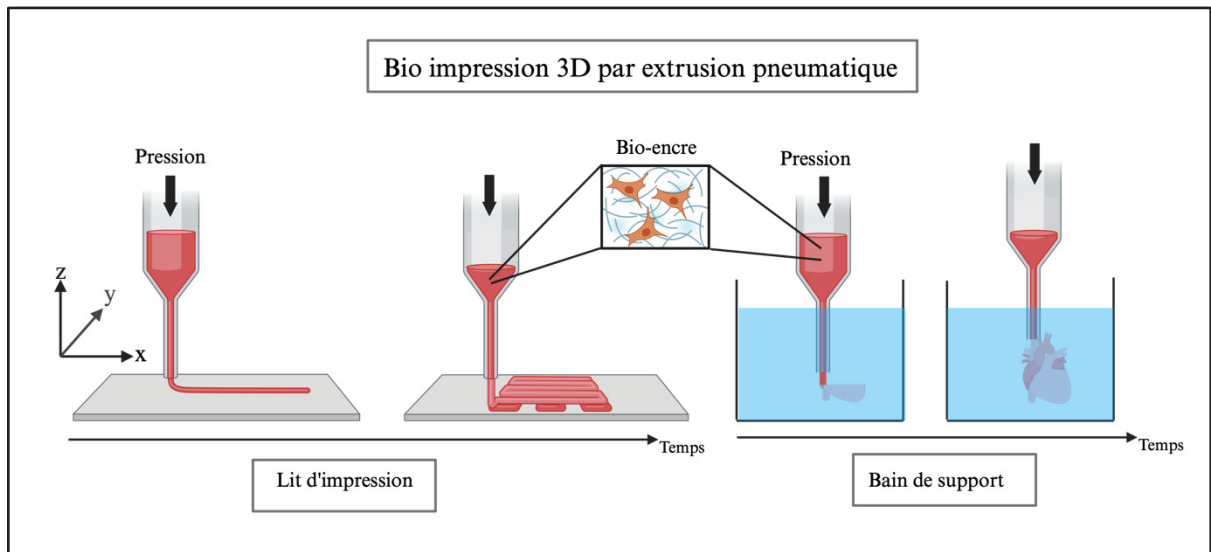


Figure 1.1 Illustration de la bio impression 3D par extrusion utilisant un système pneumatique avec ou sans bain de support (BioRender)

1.1.4 Cahier des charges d'une bio-encre

Le biomatériau contenant les cellules, utilisé en bio-impression 3D, est appelé bio-encre. Pour être utilisée en bio-impression 3D par extrusion, une bio-encre doit posséder des caractéristiques spécifiques. Tout d'abord, elle doit être biocompatible et avoir une viscosité adéquate pour permettre un mélange homogène des cellules sans exercer de contraintes de cisaillement qui pourraient les endommager. La bio-encre doit pouvoir s'écouler à travers l'aiguille sous une pression raisonnable, ce qui nécessite qu'elle soit rhéofluidifiante, c'est-à-dire que sa viscosité diminue sous l'effet de la contrainte de cisaillement. Une encre ne doit être ni trop visqueuse, pour éviter de boucher l'aiguille ou de former des filaments irréguliers et discontinus, ni trop fluide, pour ne pas s'écouler sous l'effet de la gravité (Rahimnejad, 2022 ; Rastin et al., 2020). Une viscosité élevée augmente la pression d'extrusion, ce qui accroît les contraintes sur les cellules et réduit leur viabilité (Aldana, Valente, Dilley, & Doyle, 2021). Idéalement, la contrainte de cisaillement exercée sur les cellules encapsulées et générée

lors du processus d'extrusion ainsi que la viscosité de la bio-encre ne doit pas excéder une valeur de 5 kPa (Blaeser et al., 2016). Une fois déposée sur le lit d'impression, la bio-encre doit gélifier rapidement pour limiter son étalement et posséder des propriétés mécaniques suffisantes pour supporter le poids des couches supérieures sans s'affaisser, afin d'obtenir une bonne résolution et fidélité de forme après impression, qui est l'un des critères essentiels pour évaluer la qualité d'une bio-encre (Rahimnejad, 2022 ; Rastin et al., 2020). L'autre critère principal est la compatibilité avec la survie et fonctions des cellules encapsulées. La bio-encre doit donc aussi avoir des propriétés physico-chimiques adaptées pour permettre l'impression dans des conditions physiologiques, par exemple à des températures assurant la survie cellulaire (Rahimnejad, Labonté-Dupuis, Demarquette, & Lerouge, 2021 ; Rastin et al., 2020). La bio-encre doit avoir un pH proche de 7,4 ainsi qu'une osmolalité s'approchant de 330 mOsm/L (Adoungotchodo, 2022). Surtout elle doit être riche en eau, dont les cellules ont besoin pour survivre. C'est pourquoi les hydrogels sont les candidats prometteurs comme bio-encre.

1.1.5 Hydrogels : définition et propriétés

Les hydrogels sont composés de chaînes polymériques hydrophiles, reliées entre elles par des liaisons chimiques ou physiques, formant ainsi un réseau tridimensionnel capable de retenir une grande quantité d'eau. Leurs propriétés dépendent principalement de la nature des polymères qui les composent et du type de réticulation employé (*i.e.*, physique, chimique ou enzymatique) (Gerlach & Arndt, 2010 ; Ho et al., 2022 ; Ullah, Othman, Javed, Ahmad, & Akil, 2015 ; Yang, 2012). Les hydrogels physiques reposent sur des interactions faibles entre les chaînes polymériques tels que les liaisons hydrogènes, liaisons de Van der Waals, des interactions ioniques ou hydrophobes (Gerlach & Arndt, 2010 ; Ho et al., 2022 ; Ullah et al., 2015). À l'inverse, le réseau tridimensionnel des hydrogels chimiques repose sur des liaisons covalentes. Par conséquent, les hydrogels chimiques sont plus stables et plus résistants mécaniquement que les hydrogels physiques (Adoungotchodo, 2022 ; Gerlach & Arndt, 2010). Par contre ils ne possèdent généralement pas les propriétés biologiques requises à une bonne adhésion et développement cellulaire (Jafari et al., 2017). Au contraire, les hydrogels à base

de polymères naturels tels que la gélatine, l'alginate, le chitosane ou encore la fibroïne de soie possèdent d'excellentes propriétés biologiques propices au bon développement cellulaire. Toutefois, ils manquent de stabilité et sont généralement trop faibles mécaniquement pour mimer les tissus durs tels que le cartilage ou les os. L'utilisation de polymères semi-synthétiques comme la gélatine méthacrylée (GelMA), dont les groupements méthacrylates peuvent former des liaisons covalentes en présence de lumière et de photoinitiateur, permet de trouver un meilleur équilibre entre propriétés mécaniques et biologiques (Ho et al., 2022). Toutefois, quel que soit le type de chaînes polymériques qui composent l'hydrogels, ces derniers sont généralement trop faibles mécaniquement pour reproduire des tissus durs comme le cartilage qui est capable de résister à des compressions de l'ordre du MPa bien que majoritairement constitué d'eau (Pahoff et al., 2019 ; Terzopoulou et al., 2022). Une stratégie prometteuse consiste à créer des réseaux de polymères interpénétrés (IPN). Il s'agit d'au moins deux réseaux réticulés de polymères, qui sont entremêlés mais qui ne sont pas liés chimiquement entre eux (Figure 1.2). Lorsqu'un seul réseau de polymères est réticulé et contient un polymère linéaire physiquement entremêlé, on parle de semi-IPN. La création d'IPN conduit souvent à l'obtention d'un matériau combinant les avantages des polymères qui le constituent (Silverstein, 2020). Dans le cadre de cette maîtrise, on s'est intéressé à la GelMA et ses potentiels IPN avec le chitosane.

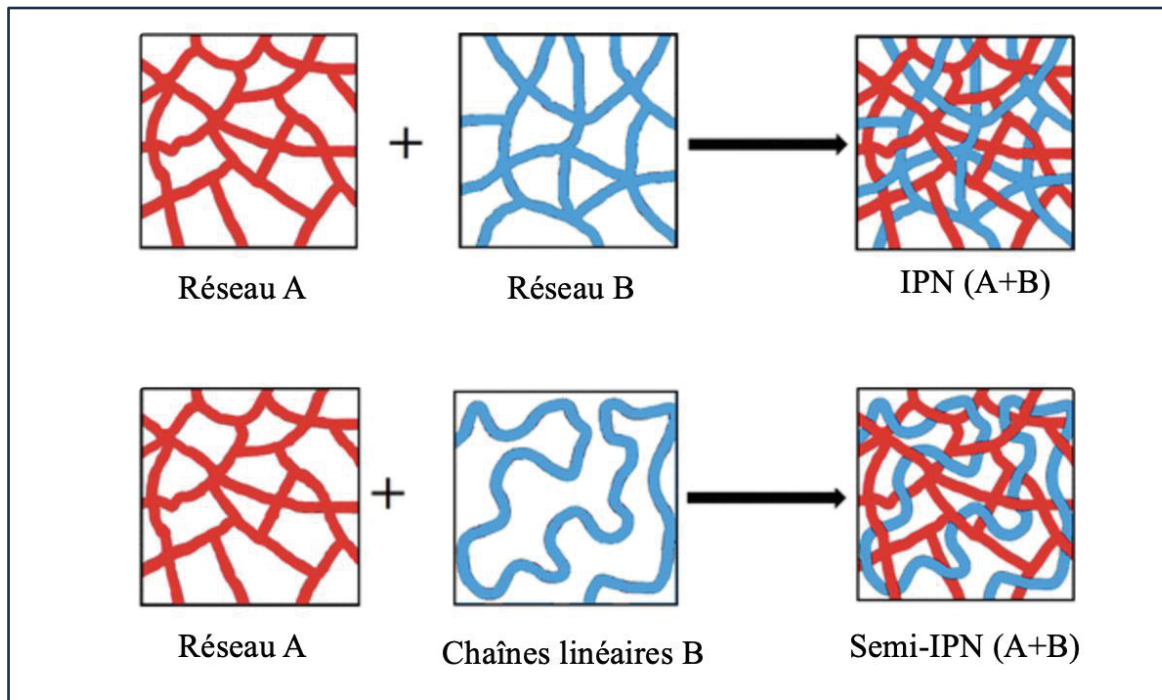


Figure 1.2. Représentation simplifiée de (semi)-réseaux interpénétrés de polymères (IPN)
Image reproduite et modifiée de Inamdar, Cherukattu, Anand, & Kandasubramanian (2018)

1.2 Hydrogels de gélatine méthacrylée (GelMA)

1.2.1 Synthèse de réaction

Le collagène est la principale protéine structurelle constituant les tissus conjonctifs des vertébrés (Sajkiewicz & Kolbuk, 2014). Sa dénaturation conduit à l'obtention de la gélatine dont son processus de fabrication comporte de nombreuses étapes. En particulier, la première étape consiste à effectuer un pré traitement du collagène qui dépend de sa source comme la peau de porc, les os de bœuf, la peau de poisson, etc. (Sultana, Ali, & Ahamad, 2018). Afin d'hydrolyser les liaisons peptidiques du collagène peu densément interconnecté (ex : peau de porc), un pré traitement acide est utilisé ce qui conduit à l'obtention de la gélatine de type A. Au contraire, pour rompre les liaisons covalentes du collagène densément interconnecté (ex : collagène bovin), un pré traitement alcalin est privilégié et donne lieu à la gélatine de type B (Pahoff et al., 2019). Les différents procédés de fabrication de la gélatine affectent sa structure et donc ses propriétés physico-chimiques (Young, White, & Daniele, 2020). En effet,

l'asparagine et la glutamine du collagène sont conservés dans la gélatine de type A tandis qu'ils sont respectivement remplacés dans la gélatine de type B par l'acide aspartique et l'acide glutamique (Ahmed, 2017 ; Sewald et al., 2018). Par conséquent, la gélatine de type A possède une structure plus proche du collagène que celle de type B (B. Lee, Lum, Seow, Lim, & Tan, 2016). Une des caractéristiques essentielles de la gélatine est le facteur de Bloom mesurant entre autres sa résistance à la compression et sa dureté après gélification physique pendant 16 à 18 h à 10°C. Les chaînes α qui constituent la structure secondaire de la gélatine sont en grande partie responsables de sa valeur de Bloom, généralement comprise entre 50 et 325 g. Plus la proportion de chaînes α est élevée, plus la valeur de Bloom l'est aussi, traduisant une plus grande rigidité. A la température du corps humain (37°C), la gélatine est soluble en milieu aqueux et possède une faible résistance à la compression. Afin d'améliorer ses propriétés mécaniques et d'accroître sa stabilité (Sajkiewicz & Kołbuk, 2014), il est possible de la modifier chimiquement pour qu'en présence de photoinitiateurs et d'une source lumineuse adéquate celle-ci puisse former un réseau covalent (He et al., 2023). Les groupements aminés (par exemple : lysine et résidus hydroxylysine) et hydroxyles (par exemple : sérine, thréonine, hydroxyproline) de la gélatine peuvent réagir avec l'anhydride méthacrylique (AM) sous l'effet de la température, conduisant respectivement à la formation de groupements méthacrylamides ou méthacrylates (Claaßen et al., 2018 ; Di Muzio et al., 2021 ; Yue et al., 2017). Les produits de la réaction sont la GelMA (GM) ainsi que l'acide méthacrylique comme présentés sur la Figure 1.3 (Shirahama, Lee, Tan, & Cho, 2016). D'après Zhu et al., (2019) le degré de substitution (DS) de la GM est défini comme étant le ratio de groupements aminés et hydroxyles remplacés par les groupements méthacrylamides et méthacrylates lors de sa synthèse. Différents facteurs intervenant lors de la synthèse de la GM comme la source de la gélatine, la quantité d'AM ajouté (B. H. Lee, Shirahama, Cho, & Tan, 2015), la température, la vitesse d'agitation ou encore le temps de réaction impactent le DS final (Shirahama et al., 2016). Par exemple, Peyret et al., (2023) expliquent que l'ajout d'AM en excès à la solution de gélatine à un faible débit permet d'accroître le DS. L'ajout d'excès d'AM tend à augmenter la proportion de groupes méthacrylates tandis que les groupes méthacrylamides sont maintenus quasi-constants (Claaßen et al., 2018 ; Di Muzio et al., 2021). Cette observation permet de

mettre en évidence la plus haute réactivité des groupes aminés de la gélatine par rapport aux groupes hydroxyles (Yue et al., 2017).

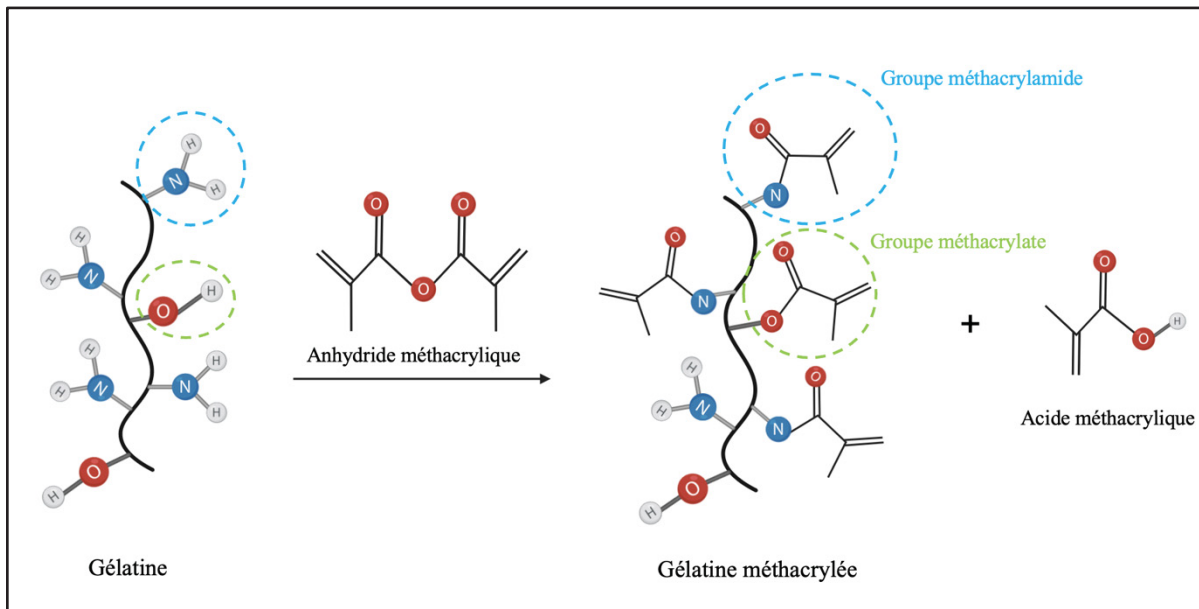


Figure 1.3. Schéma simplifié de la synthèse de la GelMA (BioRender)

1.2.2 Amélioration de la méthode de synthèse

L'enjeu principal lors de la synthèse de la GM est d'obtenir le DS ciblé tout en maintenant une grande reproductibilité d'un lot à un autre. Cette synthèse est d'autant plus complexe lorsque le DS visé s'approche de 100% (Iervolino et al., 2023). La méthode conventionnelle de synthèse de la GM, développée en 2000 par Van den Bulcke et al., utilisait comme solvant pour dissoudre la gélatine le PBS 1X, une solution tampon saline au phosphate dont le pH est généralement proche de 7,4 (Shukla, Mitruka, & Pati, 2022). Toutefois, le sous-produit issu de la réaction entre la gélatine et l'AM tend à fortement acidifier le pH final de la solution qui peut atteindre des valeurs proches de 3,7. Lorsque le pH de la solution est inférieur au point isoélectrique (PI) de la gélatine, les groupes aminés sont dit protonés, c'est-à-dire chargés positivement. Les groupes ainsi chargés réagissent moins efficacement avec l'AM et ne permettent généralement pas l'obtention d'un haut DS (B. H. Lee et al., 2015). Afin de pallier l'acidification de la solution au cours de la synthèse de la GM, il a été proposé d'ajuster de

façon séquentielle le pH à l'aide d'une base comme l'hydroxyde de sodium (NaOH) (B. H. Lee et al., 2015). Cela requiert d'augmenter le temps de réaction entre la gélatine et l'AM, qui passe à trois heures au lieu d'une heure, ce qui permet d'ajuster le pH six fois toutes les 30 min (B. H. Lee et al., 2015). Cette méthode laborieuse s'est avérée plus efficace mais nécessite encore l'ajout de l'AM en excès. Or, ce solvant est très volatile et toxique (Pepelanova, Kruppa, Scheper, & Lavrentieva, 2018).

L'utilisation du tampon carbonate bicarbonate (CB) est une bonne alternative au PBS 1X et conduit à l'obtention de plus hauts DS (B. H. Lee et al., 2015). Ainsi, Chen, Wang, Lai, Tan, & Wang (2023) ont montré que le tampon CB permet de réduire de 4 à 8 fois le volume de AM par rapport au PBS pour l'obtention d'un même DS. D'ailleurs, Shirahama, Lee, Tan, & Cho (2016) ont proposé une méthode de synthèse en une seule étape basée sur l'utilisation du CB. La concentration molaire optimale de CB est de 0,25 M conduisant à une solution tampon de pH 9-9,4 ; ce qui permet d'être au-dessus du PI de la gélatine type A (7-9) et type B (4-5) (B. H. Lee et al., 2015 ; Shirahama et al., 2016). Au contraire, l'utilisation du tampon CB à une concentration plus élevée comme 0,5 M inhibe la réaction car le pH très basique proche de 11 engendre l'hydrolyse des groupes méthacrylates (B. H. Lee et al., 2015 ; Shirahama et al., 2016 ; Zheng, Zhu, Ferracci, Cho, & Lee, 2018). D'après Shirahama et al., (2016) les paramètres optimaux de synthèse sont l'utilisation du CB à 0,25 M (pH~9), un temps de réaction de 1h, un ratio AM/gélatine de 0,1 mL/g et une concentration de gélatine entre 10 et 20%_{w/v}. Cependant, nombreuses études ultérieures continuent d'utiliser le PBS 1X et différents paramètres comme en témoigne le Tableau 1.1 qui résume les méthodes utilisées dans différents travaux sur la GM.

Tableau 1.1. Degrés de substitution obtenus suivant les principaux paramètres utilisés dans la littérature lors de la synthèse de la GelMA. AM : anhydride méthacrylique

Type de gélatine	AM (mL)/gélatine (g)	Solvant	Méthode utilisée	Temps de réaction	Température (°C)	Degré de Substitution (DS)	Référence
A (175 g Bloom)	0,1/1 ; 0,8/1 ou 2/1	PBS 1X (pH = 7,4) ; CB 0,1 M (pH=9) ou CB 0,25 M (pH=9)	Conventionnelle, séquentielle ou une seule étape	1 à 3h	35 - 50	>85%	Shirahama et al., (2016)
A (300 g Bloom) ou B (225 g Bloom)	0,025/1 ; 0,0375/1 ; 0,05/1 ou 0,2/1	CB 0,1 M (pH = 9)	Séquentielle ou une seule étape	1h	50	~30 ; 40 ; 45 ; 50 ; 70 et 95%	Pepelanova et al., (2018)
B (250 g Bloom)	0,0317/1 ou 0,0938/1	CB 0,25 M (pH = 9,4)	Une seule étape	1h	55	~ 60 ou 100%	Zhu et al., (2019)
A (300 g Bloom)	0,1/1	DMSO	Conventionnelle adaptée	3h	50	0,35 ± 0,07 mmol d'AM/g	Di Muzio et al., (2021)
B (200 g Bloom)	0,3/1 ou 0,06/1	PBS 1X (pH=7,4) ou CB 0,25 M (pH = 9)	Conventionnelle, séquentielle ou une seule étape	1h ou 3h	50	~ 60 ; 77 et 93%	Shukla et al., (2022)
A (175 ou 300 g Bloom) ou type B / poisson	-	CB 0,1 M (pH=9,6)	Séquentielle	3h	55	~ 63 ; 83 ; 87 et 95%	Aljaber et al., (2023)
A (300 g Bloom)	0,02/1 ; 0,08/1 ; 0,1/1 ou 0,8/1	PBS 1X (pH = 7,4) ou CB 0,25 M (pH=9)	Conventionnelle ou une seule étape	1h	60	~20 ou 80%	Chen et al., (2023)
A	0,017/1 ; 0,035/1 ou 0,095/1	CB 0,1 M (pH=9)	Séquentielle	3h	50	~30 ; 60 ou 90%	(He et al., 2023)

1.2.3 Mécanisme de photopolymérisation

La photopolymérisation est un procédé permettant aux hydrogels photosensibles, telle que la GM, de former un réseau covalent afin d'accroître leur propriétés mécaniques et leur stabilité (Monteiro et al., 2018). Les doubles liaisons présentes sur les groupes méthacrylates et méthacrylamides réagissent en présence d'un photoinitiateur lorsque celui-ci est exposé à une longueur d'onde spécifique (He et al., 2023) (Figure 1.4). Une fois l'énergie absorbée, les photoinitiateurs se scindent en radicaux libres et initient une réaction de polymérisation en chaîne (He et al., 2023 ; Paul, 2023). Afin de gagner en stabilité, les radicaux libres réagissent avec les liaisons doubles C=C présentes dans la GM conduisant à la formation de radicaux, qui à leur tour réagissent soit avec des liaisons doubles, soit avec d'autres radicaux de GM. La réaction de polymérisation s'achève lorsque tous les radicaux de GM ont réagi, formant ainsi la formation de liaisons covalentes entre les chaînes de polymères de la GM (He et al., 2023). Du fait de leur haute réactivité, les radicaux libres peuvent également réagir avec des molécules biologiques comme l'ADN et causer des dommages cellulaires. Il est primordial de choisir un système de photopolymérisation permettant de maintenir une bonne viabilité cellulaire. Le système de photopolymérisation est défini par le type et la concentration du photoinitiateur, l'intensité lumineuse, la longueur d'onde et le temps d'exposition à la lumière (Bryant, Nuttelman, & Anseth, 2000). D'autres facteurs peuvent impacter la viabilité cellulaire comme la production de chaleur et le type de cellules utilisé puisqu'elles réagissent de façon distincte aux facteurs environnants (Monteiro et al., 2018). Il existe différentes classes de photoinitiateurs. Par exemple, le 2-hydroxy-4'-(2-hydroxyéthoxy)-2-méthylpropiophénone (Irgacure 2959) et le phényl-2,4,6-triméthylbenzoylphosphinate de lithium (LAP) sont de classe I, tandis que le système Ruthénium/Persulfate de Sodium (Ru/SPS) est de classe II. Le mécanisme d'initiation de la réaction est plus complexe chez les photoinitiateurs de classe II puisqu'il nécessite l'utilisation de deux composants : un photosensibilisateur et un co-initiateur (Paul, 2023). L'Irgacure 2959 est le plus couramment employé dans la littérature. Toutefois, son utilisation requiert l'usage des rayons ultraviolets (UV) de longueur d'onde (λ) d'environ 365 nm. Il a été démontré que l'exposition aux UVs est délétère pour les cellules (Urushibara, Kodama, & Yokoya, 2014). De plus, l'Irgacure 2959 peut réagir avec l'oxygène conduisant à

la formation d'espèces cytotoxiques pour les cellules. Pour des applications biomédicales, il est donc préférable d'utiliser des photoinitiateurs réagissant à la lumière visible comme le LAP ($\lambda = 405 \text{ nm}$), l'éosine Y ou Ru/SPS ($\lambda = 525 \text{ nm}$) (He et al., 2023 ; Lim et al., 2019 ; Monteiro et al., 2018 ; Pahoff et al., 2019). La lumière visible présente également l'avantage de posséder une meilleure profondeur de pénétration. Lim et al., (2019) ont montré qu'un cylindre de 10 mm de hauteur pouvait être complètement polymérisé en présence de Ru/SPS et de lumière visible alors que le système Irgacure 2959/UV avait une profondeur de pénétration d'environ 6 à 8 mm. Une surexposition à la lumière peut accroître la production de chaleur mais augmente également le nombre de radicaux libres, et donc diminue la viabilité cellulaire. À l'inverse, une sous-exposition à la lumière cause la présence de radicaux libres n'ayant pas réagi dans la solution et affaiblie les propriétés mécaniques de la GM (Nguyen, Goering, Elespuru, Sarkar Das, & Narayan, 2020).

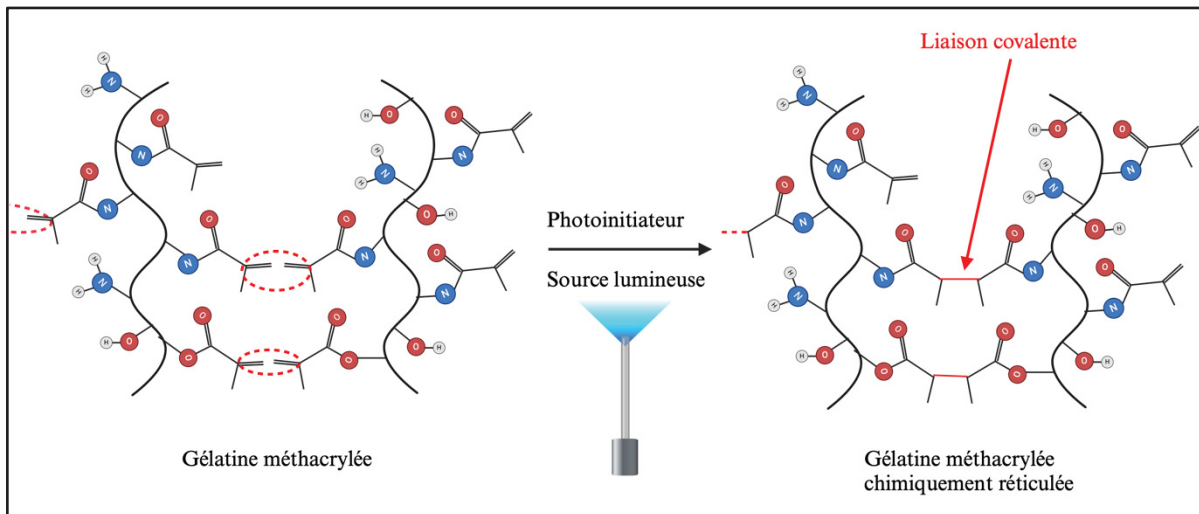


Figure 1.4. Mécanisme simplifié de la photo-réticulation de la GelMA (BioRender)

1.2.4 Propriétés biologiques et mécaniques

La réaction de synthèse de la GM conserve en majorité la structure initiale de la gélatine. Ainsi, les motifs RGD (séquence Argine - Glycine - Acide Aspartique) servant de point d'accroche aux cellules sont conservés et la GM peut être dégradée par les métalloprotéases matricielles (MMP) conférant à ce polymère semi-synthétique une excellente biocompatibilité et biodégradabilité (Di Muzio et al., 2021 ; He et al., 2023). Toutefois, la méthode de synthèse, la concentration en polymère et la photo-réticulation définissent ses propriétés finales. Ces facteurs déterminent la densité du réseau moléculaire et de réticulation. Ils impactent directement la porosité, la viscosité, le taux de gonflement, la dégradation, la résistance mécanique et la cytocompatibilité de l'hydrogel. En contrôlant précisément ces facteurs, il est possible de couvrir un vaste champ d'applications de l'ingénierie tissulaire (He et al., 2023 ; Leu Alexa et al., 2021 ; Ramesh & Ramalingam, 2021). Toutes les propriétés précédemment citées sont étroitement liées. L'augmentation du DS et/ou de la concentration du polymère tend à densifier le réseau et rigidifier l'hydrogel. Un DS élevé traduit la présence de nombreux groupes méthacrylates et méthacrylamides, qui, sous l'effet de la photopolymérisation, sont aptes à former de nombreuses liaisons covalentes entre les chaînes de GM. Une densité de réticulation élevée se traduit par une diminution de la taille des pores réduisant le volume libre auquel les molécules d'eau ont accès. L'étirement des chaînes étant plus restreint, la capacité de gonflement de l'hydrogel est également réduite. De même, plus la proportion de liaisons covalentes est élevée par rapport aux liaisons physiques, plus la dégradation est ralentie (He et al., 2023 ; Iervolino et al., 2023 ; Joshi, Ahmed, Vig, Vega Erramuspe, & Auad, 2021 ; Ramesh & Ramalingam, 2021 ; Rastin et al., 2020). Augmenter la concentration du photoinitiateur, l'intensité lumineuse et/ou le temps d'exposition participe à l'amélioration des propriétés mécaniques (He et al., 2023). Toutefois, cette amélioration se produit au détriment de la cytocompatibilité du gel. Même si Xu et al., (2021) ont montré que les cellules du noyau pulpeux adhèrent davantage sur la GM à 15%_{w/v} par rapport à la GM à 5%_{w/v} mais les cellules encapsulées disposent de moins d'espace pour proliférer et se différencier. L'accès à l'oxygène et aux nutriments est plus restreint et l'évacuation des déchets cellulaires est limitée (He et al., 2023). Pahoff et al., (2019) soulignent que les hydrogels de GM ont une résistance à la

compression pouvant aller d'environ 5 à 180 kPa, ce qui est bien inférieur aux propriétés du cartilage articulaire dont le module de compression peut atteindre 1,5 MPa. Pour mimer les tissus durs tels que le cartilage et l'os, il est donc essentiel d'envisager d'associer la GM à d'autres matériaux (Pahoff et al., 2019).

1.2.5 Effet de la température et du pH sur les propriétés de la GelMA

La substitution des groupes aminés lors de la réaction de synthèse impacte considérablement le PI de la GM (Leu Alexa et al., 2021). Le PI de la GM type A et B possédant un haut DS est de 4,5 et 4,1 respectivement, soit bien inférieure à celui de la gélatine (Ben Messaoud, Aveic, Wachendoerfer, Fischer, & Richtering, 2023 ; Sewald et al., 2018). Par conséquent, le pH est un paramètre influençant fortement les propriétés mécaniques de la GM. Paul, (2023) a mis en évidence l'impact du pH sur le module de compression et le taux de gonflement de la GM (type A, DS=80%) en le faisant varier de 5 à 9. Le taux de gonflement de la GM a tendance à s'accroître avec l'augmentation du pH et cela d'autant plus que le pH est proche de 8 – 9 (Paul, 2023). En effet, plus le pH augmente et s'éloigne du PI de la GM, plus les groupements carboxyles -COOH sont ionisés, ce qui a pour conséquence d'accroître les répulsions électrostatiques entre les chaînes. L'hydrogel de GM en milieu basique est donc davantage apte à retenir une grande quantité d'eau, justifiant l'augmentation de son taux de gonflement (Paul, 2023). Toutefois, la capacité d'un hydrogel à gonfler en milieu aqueux s'accompagne généralement d'une réduction de ses propriétés mécaniques (He et al., 2023). Il est important de noter que le pH n'est pas le seul facteur impactant les propriétés de la GM, mais la température joue également un rôle majeur. Tout comme la gélatine, la GM possède des propriétés thermoréversibles grâce à sa structure secondaire. Elle adopte une conformation aléatoire ou hélicoïdale selon la température à laquelle elle se trouve. Toutefois, les groupements méthacrylates et méthacrylamides créent une gêne stérique entravant la formation de liaisons hydrogènes entre les chaînes de GM. Par conséquent, plus le DS est élevé, moins la GM est apte à adopter une conformation en triple hélice. Ainsi, la GM possédant un faible DS est plus résistante mécaniquement que celle possédant un haut DS lorsque la GM subit uniquement une gélification physique comme c'est le cas lorsque l'on diminue la température

(Chen et al., 2023 ; De Maeseneer et al., 2024 ; Leu Alexa et al., 2021 ; Leucht, Volz, Rogal, Borchers, & Kluger, 2020 ; Young et al., 2020). Il est donc aussi possible de tirer profit de sa thermo sensibilité. Par exemple, l'étude de Young et al., (2020) a montré que les propriétés mécaniques de la GM étaient amplifiées lorsqu'elle subit une gélification physique (à basse température) avant la photopolymérisation. En effet, le module de stockage (G'), caractérisant le comportement solide du gel, peut atteindre une valeur finale huit fois plus élevée lorsque la GM est photopolymérisée après refroidissement à 4°C (Young et al., 2020).

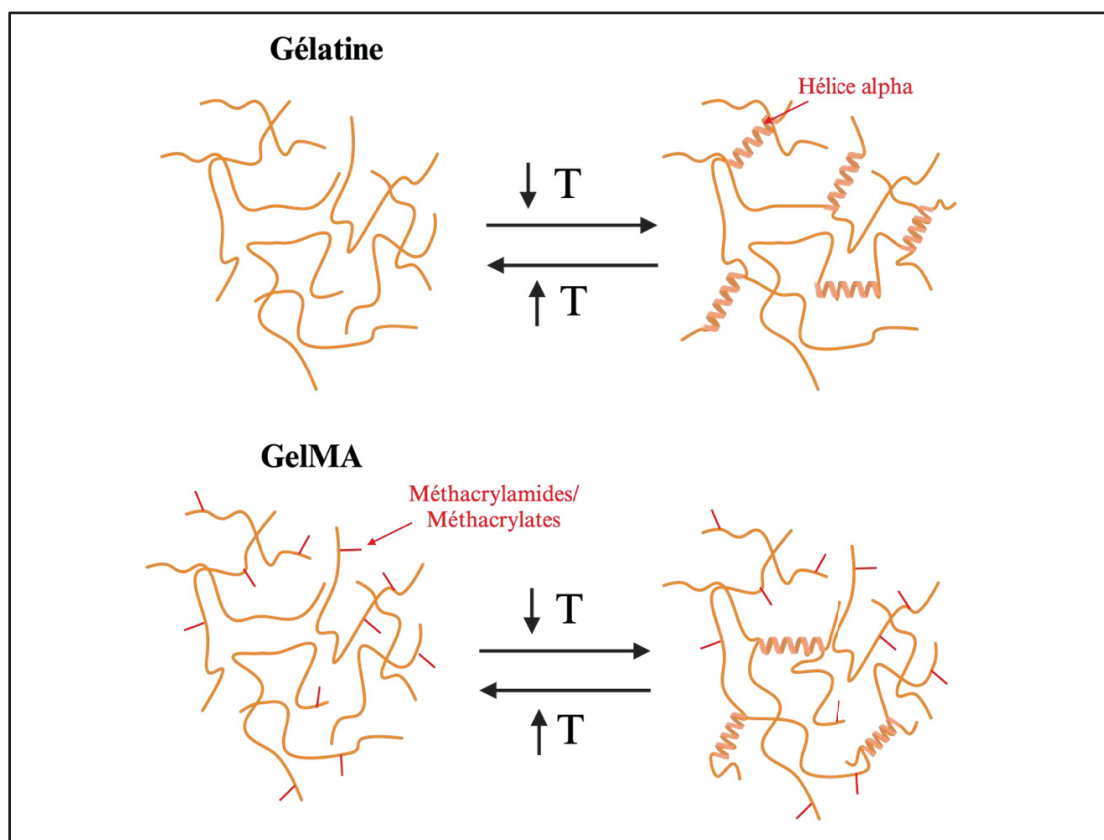


Figure 1.5. Structure secondaire de la gélatine et GelMA (avant réticulation) sous l'effet de la température
Image inspirée de Van Den Bulcke et al., (2000) (BioRender)

1.2.6 Bio-impression 3D de la GelMA

La GM possède de nombreuses propriétés biologiques et mécaniques pertinentes pour les applications en ingénierie tissulaire. La polymérisation de la GM nécessitant l'apport de lumière, ses applications comme matériau injectable se concentrent sur les tissus en surface ou atteignables par laparoscopie, et surtout sur la fabrication *in vitro* de structures implantables. Plusieurs équipes ont étudié le potentiel de la GM pour la bio-impression 3D. Cependant, ses avantages peuvent devenir des contraintes lorsqu'il est question de l'imprimer en présence de cellules encapsulées. Si une faible concentration de GM est propice à la migration et survie cellulaire, sa faible viscosité rend son impression quasiment impossible sans bain de support. Par exemple, la GM à 5,75%_{w/v} forme des filaments irréguliers qui s'étalent après impression à température ambiante (Leucht et al., 2020). La faible viscosité de l'encre ne lui permet ni de maintenir sa forme après extrusion ni de supporter le poids des couches supérieures (Leu Alexa et al., 2021 ; Yin, Yan, Wang, Fu, & Suo, 2018). Bien que certaines études indiquent que la GM peut être imprimée à partir d'une concentration égale à 7,5%_{w/v} (Mouser et al., 2016), d'autres montrent que des concentrations inférieures à 10%_{w/v} nuisent à la résolution d'impression (Shen et al., 2024). Les variations dans les propriétés de la GM, telles que le DS et l'origine de la gélatine, peuvent influencer ces résultats. Augmenter la concentration de GM améliore la résolution d'impression et les propriétés mécaniques, comme le montre un hydrogel à 30%_{w/v} dont le module de compression est de 280 kPa (Aldana et al., 2021). Cependant, des concentrations supérieures à 15%_{w/v} peuvent compromettre la survie cellulaire en raison d'une diminution de la taille des pores (Jongprasitkul, Turunen, Parihar, & Kellomäki, 2023 ; Levato et al., 2014 ; Shen et al., 2024 ; M. Zhou, Lee, Tan, & Tan, 2019) et d'une pression d'extrusion accrue (Davern, Hipwood, Bray, Meinert, & Klein, 2024). En effet, pour des concentrations proches de 30%_{w/v}, l'extrusion devient difficile, voire impossible, en raison de la viscosité excessive (Leu Alexa et al., 2021). À température ambiante ou corporelle, la GM présente une faible viscosité (Rastin et al., 2020 ; X. Wang et al., 2024). Abaisser la température de travail favorise la formation de sa structure triple hélice, permettant une solidification (Leucht et al., 2020). Toutefois, cela représente également un enjeu considérable puisque maintenir la bio-encre à une température inférieure à son point de transition sol-gel pendant une assez longue

durée est délétère pour les cellules encapsulées (Jongprasitkul et al., 2023). Une gélification physique excessive augmente la rigidité de la GM entraînant la formation de filaments irréguliers. D'après Wang et al., (2024) l'impression de 5%_{w/v} GM type B à 28°C entraîne la formation de gouttes en raison de son état liquide, tandis que cette même encre ayant refroidit 5 min à 4°C devient trop visqueuse et ne permet pas l'impression de filaments réguliers. De plus, il est difficile de stabiliser la température de la cartouche, de l'aiguille et du lit d'impression (Jongprasitkul et al., 2023). Afin de pallier les problèmes cités précédemment, mélanger la GM à d'autres polymères, comme la gélatine, l'alginate, l'acide hyaluronique ou encore le polyéthylène glycol diacrylate (PEGDA), permet d'accroître significativement la résolution d'impression ainsi que certaines propriétés physico-chimiques et mécaniques (Shen et al., 2024). Certains polysaccharides peuvent être utilisés pour augmenter la viscosité comme la gomme de xanthane ou de gellane mais les propriétés mécaniques restent insuffisantes (Iervolino et al., 2023 ; J. Li et al., 2023 ; Mouser et al., 2016). D'autres études ont privilégié l'ajout de nano-matériaux comme l'hydroxyapatite (HAP) connue pour améliorer les propriétés de compression (X. Zhou et al., 2016). Dans notre cas, nous nous intéressons à une combinaison avec le chitosane.

1.3 Chitosane

1.3.1 Structure et propriétés du chitosane

Le chitosane (CH) est un polysaccharide linéaire obtenu à partir de la désacétylation de la chitine provenant de la carapace des crustacés comme le crabe ou la crevette. La chitine est le deuxième polymère naturel le plus répandu dans le monde et constitue une source bio renouvelable. Le CH est composé d'unités D-glucosamine et N-acétyl-D-glucosamine réparties de manière aléatoire le long des chaînes (Chenite et al., 2000 ; Zargar, Asghari, & Dashti, 2015) (Figure 1.6). Le degré de désacétylation (DDA) peut être défini comme étant la « quantité relative de groupements acétylés retirés à la macromolécule de chitine lors de sa préparation » et doit être supérieur à 50% pour permettre la formation du CH (Crini, Grégorio, Guibal, Éric, Morcellet, Michel, Torri, Giangiacomo, & Badot, Pierre-Marie, 2009). Il s'agit d'un paramètre essentiel puisqu'il influence ses propriétés comme sa solubilité. Par exemple, plus le DDA est élevé, plus la réaction inflammatoire du CH est limitée (Chenite et al., 2000). Ce polymère peu coûteux possède de nombreuses qualités pertinentes pour l'utilisation en ingénierie tissulaire comme la biocompatibilité, la biodégradabilité, la bio adhésion, la non toxicité ou encore des propriétés antibactériennes (Zargar et al., 2015). Sa structure s'approche également de celle des GAG de la MEC des tissus humains et abondamment présents dans le cartilage (Saravanan, Vimalraj, Thanikaivelan, Banudevi, & Manivasagam, 2019). Toutefois, le CH est insoluble dans l'eau à un pH proche des conditions physiologiques ($\sim 7,4$) et risque de précipiter (Chenite et al., 2000). Il se solubilise en milieu acide lorsque le pH est inférieur à son pKa ($\sim 6,2 - 6,5$). En milieu acide, les groupes aminés sont protonés, ce qui a pour conséquence d'accroître les répulsions électrostatiques entre les chaînes de CH et de faciliter sa solubilisation. Différents acides peuvent être utilisés comme l'acide acétique, l'acide chlorhydrique (HCl) ou bien l'acide nitrite. Cependant, il est insoluble dans les acides sulfuriques et phosphoriques (Zargar et al., 2015). Une fois dissout en milieu acide, le pH peut être augmenté à l'aide d'ajout de bases fortes comme le NaOH mais pose des complications pour l'encapsulation de cellules vivantes et l'injectabilité (Assaad et al., 2015).

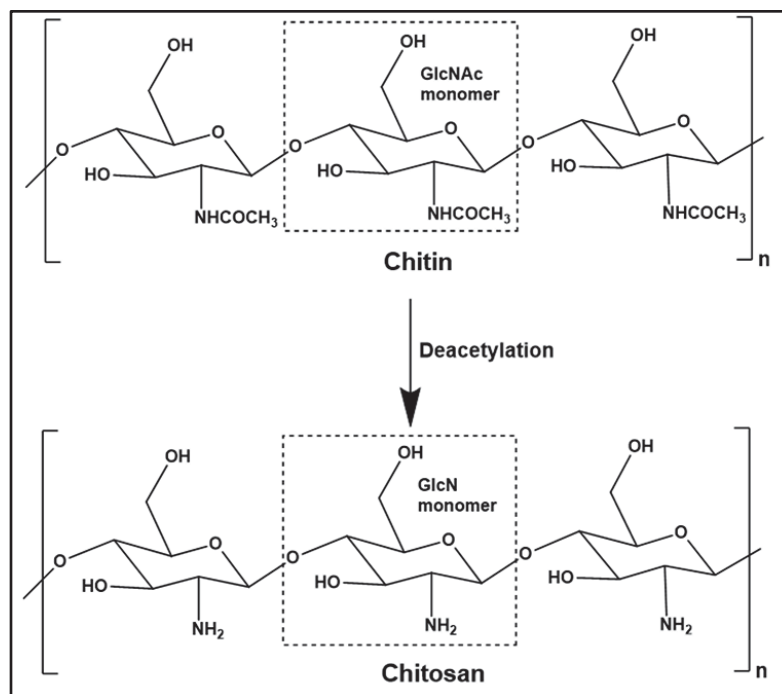


Figure 1.6. Désacétylation de la chitine donnant le chitosane
Tirée de Pal, Sarkar, Anis, Wiszumirska, & Jarzębski (2021)

1.3.2 Hydrogels de chitosane thermosensibles

L'utilisation de bases faibles comme le β -glycérophosphate (BGP) permet de solubiliser le CH à pH neutre tout en lui conférant des propriétés thermosensibles réversibles. Le CH-BGP peut gélifier *in situ* à 37°C, ce qui est particulièrement intéressant pour des applications minimalement invasives (Chenite et al., 2000). Comme schématisé sur la Figure 1.7, le BGP négativement chargé interagit avec les protons du CH réduisant donc les répulsions électrostatiques et permettant aux chaînes de CH de se rapprocher, puis lorsque la température augmente, le pKa du CH change, favorisant le transfert de proton du CH au BGP, permettant au CH de former des interactions hydrophobes ou liaisons hydrogènes (Assaad et al., 2015). Pour une concentration en BGP favorable à la survie cellulaire, la vitesse de gélification est faible. L'augmentation de la concentration en agents gélifiants s'accompagne d'une augmentation de l'osmolarité des hydrogels, ce qui est défavorable à la survie cellulaire. De plus ces hydrogels ont des propriétés mécaniques très faibles (<12 kPa à 50% de déformation). L'équipe de la Professeure Sophie Lerouge a montré que l'utilisation de l'hydrogénocarbonate

de sodium (SHC) comme base faible permet d'accroître très significativement les propriétés mécaniques des hydrogels de CH. Seul, le SHC forme un gel dont la gélification est lente, mais la combinaison de SHC et du BGP ou d'une autre base faible comme le tampon phosphate (PB) permet d'atteindre de bonnes propriétés mécaniques malgré une gélification rapide et une osmolarité physiologique (Assaad et al., 2015). La concentration en agents gélifiants doit être adaptée à la concentration de CH et d'acide dans lequel il est dissout. En effet, plus la concentration d'acide est élevée, plus le CH est protoné, ce qui nécessite davantage d'agents gélifiants pour le neutraliser. De plus, les protons en excès dans la solution acide vont interagir avec l'agents gélifiants. Assaad et al., (2015) ont démontré que pour préparer du CH à 2%_{w/v} dissout dans du HCl à 0,1 M, la concentration finale optimale de SHC est de 0,075 M.

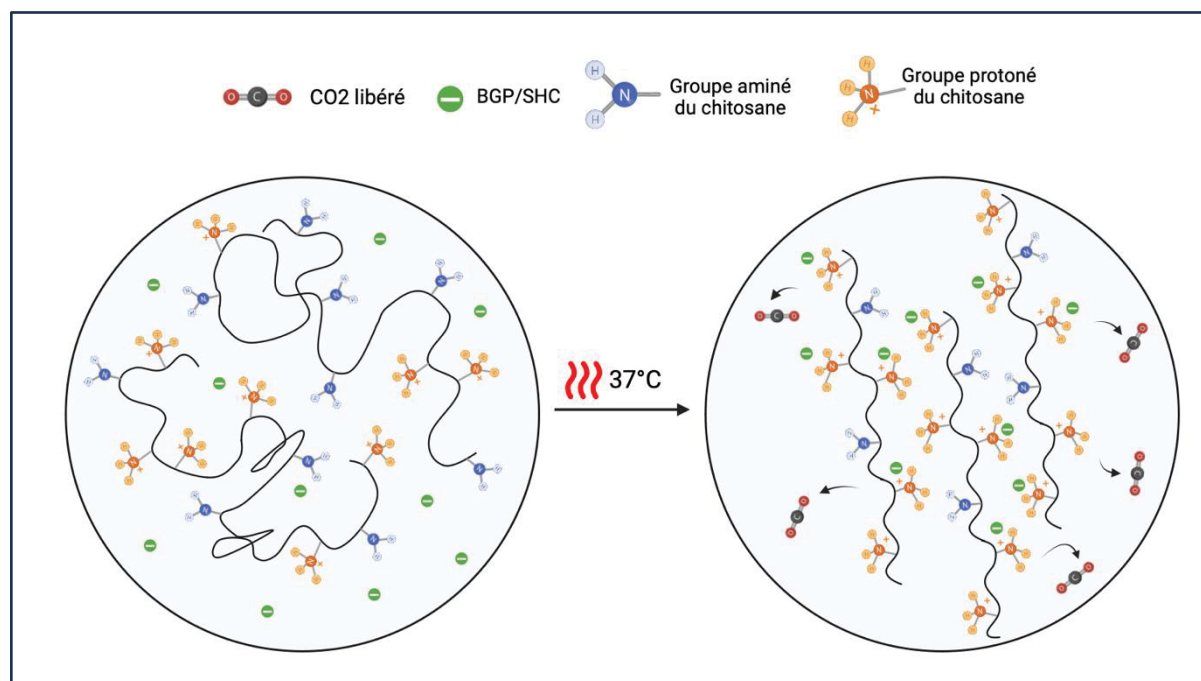


Figure 1.7 . Mécanisme simplifié de la gélification du chitosane en présence des agents gélifiants BGP et SHC (BioRender)

1.3.3 Limitations du chitosane comme bio-encre

Les hydrogels de CH sont très facilement injectables et gélifient *in situ* ; ils sont donc des candidats extrêmement intéressants pour la thérapie cellulaire. Par contre, leur utilisation comme bio-encre pour la bio-impression 3D pose beaucoup plus de défis (Rahimnejad et al., (2021). L'un des inconvénients majeurs de ces hydrogels, est leur instabilité au cours du temps. En particulier, leur viscosité évolue avec le temps car ils commencent à gélifier à température ambiante mais beaucoup plus lentement qu'à la température du corps. Afin qu'ils bénéficient d'une bonne récupération de leurs propriétés viscoélastiques après extrusion, il est essentiel que les hydrogels ne commencent pas à gélifier avant l'impression. C'est pourquoi les hydrogels de CH à base de BGP/SHC possédant une cinétique de gélification plus lente que ceux à base de PB/SHC à température pièce sont privilégiés pour l'impression par extrusion. Il a également été démontré que la résolution d'impression du CH à 3%_{w/v} était significativement supérieure à celle du CH à 2%_{w/v} (Rahimnejad et al., 2021). Toutefois, les hydrogels de CH dont la concentration est de 3%_{w/v} possèdent une faible viabilité cellulaire (Rahimnejad, Adoungotchodo, Demarquette, & Lerouge, 2022). Afin de limiter le taux d'étalement des structures après impression, il est envisageable de chauffer le lit d'impression à 37°C pour initier le processus de gélification. Cependant, la température des couches les plus éloignées du support diminue. Pour surmonter cette difficulté, il est envisageable d'utiliser un bain de support. Or, ce-dernier doit répondre à de nombreux critères comme être biocompatible, doit être aisément retiré sans abimer la structure imprimée et présenter les propriétés rhéologiques adéquates à la température d'impression. En particulier, le bain de support doit être suffisamment rigide pour maintenir en place la structure imprimée tout en permettant la pénétration de l'aiguille d'impression. Mais il est également nécessaire que la bio-encre remplisse d'autres critères puisqu'elle ne doit plus pouvoir s'écouler une fois déposée dans le bain de support (Rahimnejad et al., 2022). Il est donc complexe d'imprimer des hydrogels de CH ayant une bonne cytocompatibilité sans utiliser de bain de support ou sans y incorporer d'autres polymères.

1.4 Réseau de polymères interpénétrés (IPN) à base de chitosane-GelMA

Jusqu'à présent très peu d'études, résumées dans le Tableau 1.2, se sont intéressées à la création de réseaux interpénétrés (IPN) à base de GM et de CH. Leur travaux sont prometteurs puisqu'en faisant varier la concentration en CH de 0,5 à 2%_{w/v} et celle de GM de 10 à 20%_{w/v}, Suo et al., (2018) sont parvenus à réaliser des semi-IPN (réticulation chimique) et IPN (réticulation chimique et physique) dont le module sécant à 15% de déformation pour la meilleure formulation peut atteindre 233 kPa. Les travaux de Paul, (2023) confortent ces résultats puisque le module de compression de semi-IPN pour un ratio en CH/GM équivalent et réticulé avec différents photoinitiateurs (l'Irgacure 2959, le LAP ou le système Ru/SPS) atteint des valeurs similaires. L'ajout de CH à la GM permet également de ralentir la cinétique de dégradation des hydrogels (Suo et al., 2018) et le taux de gonflement (Paul, 2023). Malgré de bonnes propriétés mécaniques, leur méthode de fabrication des (semi)-IPN de CH-GM n'est pas compatible avec l'encapsulation cellulaire comme en témoignent les résultats dans l'étude de Paul (2023) dont la viabilité cellulaire des chondrocytes est inférieure à 20%. Ces résultats peuvent en partie s'expliquer en raison de l'acidité de l'hydrogel (pH=5,5), notamment due à la non neutralisation du CH (Paul, 2023).

Afin de pallier les difficultés rencontrées lors de la culture cellulaire, le CH a été substitué par un de ses dérivés : le glycol CH (Paul et al., 2023). Des études récentes se sont également intéressées à la formation d'IPN à base de GM et d'autres dérivés du CH comme le CH-carboxyméthyle (L. Wang et al., 2023). Toutefois, utiliser des dérivés du CH présente des limites. En effet, leur synthèse est plus compliquée à contrôler et l'utilisation de produits chimiques lors de la réaction de synthèse risque de compromettre leur approbation par certains organismes comme la *Food and Drug Administration*.

Dans cette étude, nous nous intéressons donc à la fabrication d'hydrogels IPN à base de CH thermosensible et de GM.

Tableau 1.2. Méthode de fabrication des (semi)-IPN à base de chitosane et de GelMA dans la littérature

Formulations CH/GelMA	DDA chitosane/DS GelMA	Méthode de mélange	Méthode de réticulation	Modules de compression (kPa)	Essais biologiques	Application	Référence
0,5 à 1%CH - 15%GelMA	DDA=75-85% (autoclavé) / DS=80% type A	GelMA 35% _{w/v} (PBS 1X) + CH 3% _{w/v} (1% v/v CH3COOH/150 mM NaCl) pendant 48 h	Chimique 0,5 mM Ru/20 mM SPS (<i>t</i> =5 min, 405 nm, 9 mW/cm ²)	~160 à 250	Encapsulation chondrocytes - viabilité < 20%	Ingénierie tissulaire pour la régénération du cartilage	Paul, (2023)
			Chimique 0,25% _{w/v} Irgacure 2959 (<i>t</i> =15 min, 365 nm, 2,6 mW/cm ²)	~220 à 270	Aucun		
			Chimique 0,15% w/v LAP (<i>t</i> =3 min, 405 nm, 9 mW/cm ²)	~180 à 240	Aucun		
0,5 à 2%CH - 10%GelMA	GelMA type A	CH 3% _{w/v} (1% _{v/v} CH3COOH + 0.1% _{w/v} Irgacure 2959) + GelMA 30% _{w/v} (1% _{v/v} CH3COOH + 0.1% _{w/v} Irgacure 2959)	Chimique (semi IPN) 0,1% _{w/v} Irgacure 2959 (<i>t</i> =30 s, 365 nm, 1,5 W/cm ²)	~ 40 à 60	Ensemencement de BMSC 1 × 10 ⁵ cell/cm ² - bonne prolifération	Ingénierie tissulaire	Suo et al., (2018)
			Chimique et physique (IPN) 0,1% _{w/v} Irgacure 2959 (<i>t</i> =30 s, 365 nm, 1,5 W/cm ²) + NaOH	~ 60 à 120			
			Chimique et physique (IPN) 0,1% _{w/v} Irgacure 2959 (<i>t</i> =30 s, 365 nm, 1,5 W/cm ²) + NaOH	~ 230			

CHAPITRE 2

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

2.1 Résumé de la revue de la littérature

L'ingénierie tissulaire du cartilage est pertinente pour soigner les défauts cartilagineux de façon peu invasive et/ou pour l'élaboration de modèles 3D pour l'étude des pathologies et la validation de traitements en phase précliniques. Toutefois elle présente un défi considérable puisqu'il est difficile de concevoir des biomatériaux combinant biodégradabilité, propriétés mécaniques de l'ordre de MPa et excellente viabilité cellulaire. La GM et le CH sont tous deux des polymères biocompatibles et biodégradables particulièrement intéressants. Le CH peut former des hydrogels physiques gélifiants à 37°C et sa composition est proche des glycosaminoglycanes (GAG) de la matrice extracellulaire du cartilage. La GM, quant à elle, est un polymère dont les propriétés peuvent facilement être modulées en fonction de l'application visée en faisant varier sa concentration, son degré de substitution (DS) et/ou son système de photo-réticulation. Toutefois, ces deux polymères sont difficilement imprimables sans bain de support et ne possèdent pas les propriétés mécaniques adéquates pour mimer à eux seuls les tissus durs, tel que le cartilage.

L'hypothèse principale de ce projet est que la création de réseau interpénétrés de polymères (IPN) à base de CH et de GM pourrait permettre de surmonter les difficultés énoncées précédemment et être imprimable sans bain de support, tout en maintenant une excellente viabilité cellulaire. À notre connaissance, aucune étude ne s'est intéressée à la création de réseaux IPN à base de CH thermosensible et de GM. Cette combinaison pourrait favoriser l'encapsulation cellulaire, limite principale rencontrée dans la littérature actuelle et favoriser la création d'une nouvelle bio-encre.

2.2 Objectifs et hypothèses de l'étude

L'objectif général de cette maîtrise est de créer des IPN et bio-encres à base de CH thermosensible et de GM permettant l'encapsulation cellulaire tout en démontrant de bonnes propriétés mécaniques pour mimer le cartilage. Cet objectif a été divisé en trois sous-objectifs (Figure 2.1) :

Objectif 1 : Développer et caractériser des hydrogels thermosensibles à base de CH-GM. Ceci se divise en trois sous-objectifs :

1.1 : Mettre au point une méthode de fabrication de la GM reproductible, permettant de moduler le degré de substitution (DS)

1.2 : Étudier les formulations d'IPN CH-GM en faisant varier la concentration en GM ainsi que son DS (faible, moyen et élevé) tout en évaluant l'effet de la réticulation thermique et de la photo-réticulation sur leurs propriétés rhéologiques et mécaniques.

1.3 : Évaluer la stabilité des propriétés mécaniques des formulations prometteuses d'IPN.

Objectif 2 : Évaluer la faisabilité d'impression 3D des encres de CH-GM sans bain de support, comparativement au CH et CH-Gélatine (non méthacrylée).

Objectif 3 : Évaluer le potentiel de l'IPN pour la survie de cellules encapsulées.

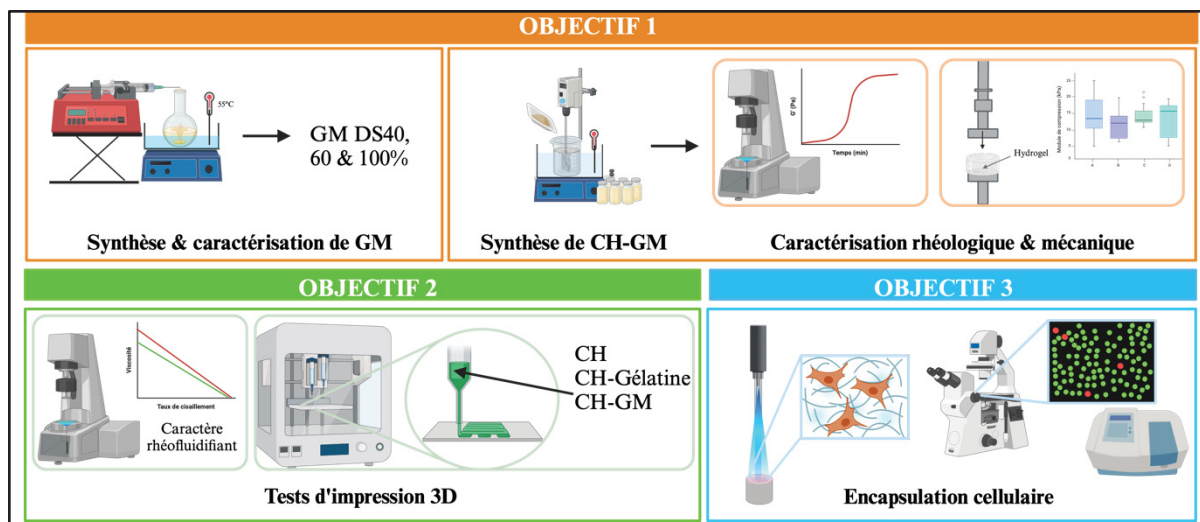


Figure 2.1. Schématisation des différents objectifs du projet

2.3 Conditions et contrôles utilisés

Afin de répondre aux objectifs de l'étude, différentes formulations à base de CH thermosensible et de GM ont été préparées et réticulées en présence des agents gélifiants BGP+SHC et/ou du photoinitiateur LAP (lumière visible) présentés dans les sections 1.3.2 et 1.2.3. Tout d'abord, une formulation contenant 1%CH et 10%GM a été préparée. Ce ratio n'ayant pas conduit à des résultats satisfaisants, la concentration du CH a été augmentée à 1,67%_{w/v} et la concentration en GM diminuée à 2%_{w/v}, 3%_{w/v} et 5%_{w/v}. Pour chacune de ces formulations de CH-GM, des GM avec différents DS ont été utilisés : ~40% (faible), ~60% (moyen) et ~90% (élevé). Les formulations sont nommées en indiquant la concentration finale de GM et son DS tel que présenté dans le Tableau 2.1, la concentration initiale en HCl est ajoutée entre parenthèses si nécessaire. Ces formulations ont été comparées avec les hydrogels thermosensibles de 1,67%CH et 1,67%CH-Gélatine (semi-IPN) avec une concentration en gélatine de 2%_{w/v}, 3%_{w/v} et 5%_{w/v}.

Tableau 2.1. Nomenclature des formulations de CH-GM étudiées

Nomenclature	Concentration finale en CH (% _{w/v})	Concentration finale en GM (% _{w/v})	Degré de substitution de la GM (%)
CH-2%GM DS40%	1,67	2	40
CH-3%GM DS40%	1,67	3	40
CH-5%GM DS40%	1,67	5	40
CH-2%GM DS60%	1,67	2	60
CH-3%GM DS60%	1,67	3	60
CH-5%GM DS60%	1,67	5	60
CH-2%GM DS90%	1,67	2	90
CH-3%GM DS90%	1,67	3	90

CHAPITRE 3

MÉTHODOLOGIE

3.1 Fabrication et caractérisation de la GelMA

3.1.1 Matériel

La gélatine type A (porcine, 300 g bloom), la gélatine type B (bovine, 225 g bloom), le lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LAP, MM : 294,21 g/mol), l'anhydride méthacrylique (AM, MM : 154,16 g/mol), le carbonate de sodium (Na_2CO_3 , SigmaUltra, minimum 99.0%) et l'oxide de deutérium (D_2O , 99.9 atom% D) ont été fournis par Sigma-Aldrich (États-Unis d'Amérique). Le bicarbonate de sodium (NaHCO_3 , M : 84,01 g/mol) a été fourni par Supelco® (Sigma-Aldrich, Allemagne). Le tampon salin phosphate (PBS, 10 X) provient de Wisent Inc (Canada).

3.1.2 Procédé

La fabrication de la GelMA (type A ou B) a été mise au point en se basant sur la littérature (Shirahama et al., 2016) et est illustrée par la Figure 3.1. Tout d'abord, une solution tampon carbonate bicarbonate (CB) à 0,25 M (pH=9,4) a été réalisée en dissolvant 0,795 g de carbonate de sodium puis 1,465 g de bicarbonate de sodium dans 100 mL d'eau distillée. Ensuite, 10 g de gélatine ont été dissouts dans la solution CB à 50-55°C. Après dissolution complète et sous agitation magnétique, 1 ou 2 mL d'anhydride méthacrylique a été ajouté au goutte à goutte à l'aide d'un pousse seringue (0,02 ou 0,1 mL/min) et laissé réagir 1 à 3 h, suivant le DS ciblé. La réaction a ensuite été arrêtée par l'ajout de 250 mL de PBS 1X. La solution a été dialysée durant 7 à 10 jours contre l'eau distillée (à 50°C) dans des membranes de dialyses (3,5 kD) sous agitation magnétique à l'abris de la lumière. L'eau distillée a été changée 2 à 3 fois par jour afin d'éliminer les résidus d'anhydride méthacrylique et autres produits de la réaction (Zheng et al., 2018). La solution a été filtrée (0,22 µm). Après congélation à -80°C pendant

24 h, la solution a été lyophilisée pendant 72 heures. La préparation finale de GelMA à l'aspect de mousse blanche cotonneuse a été stockée à -20°C jusqu'à utilisation.

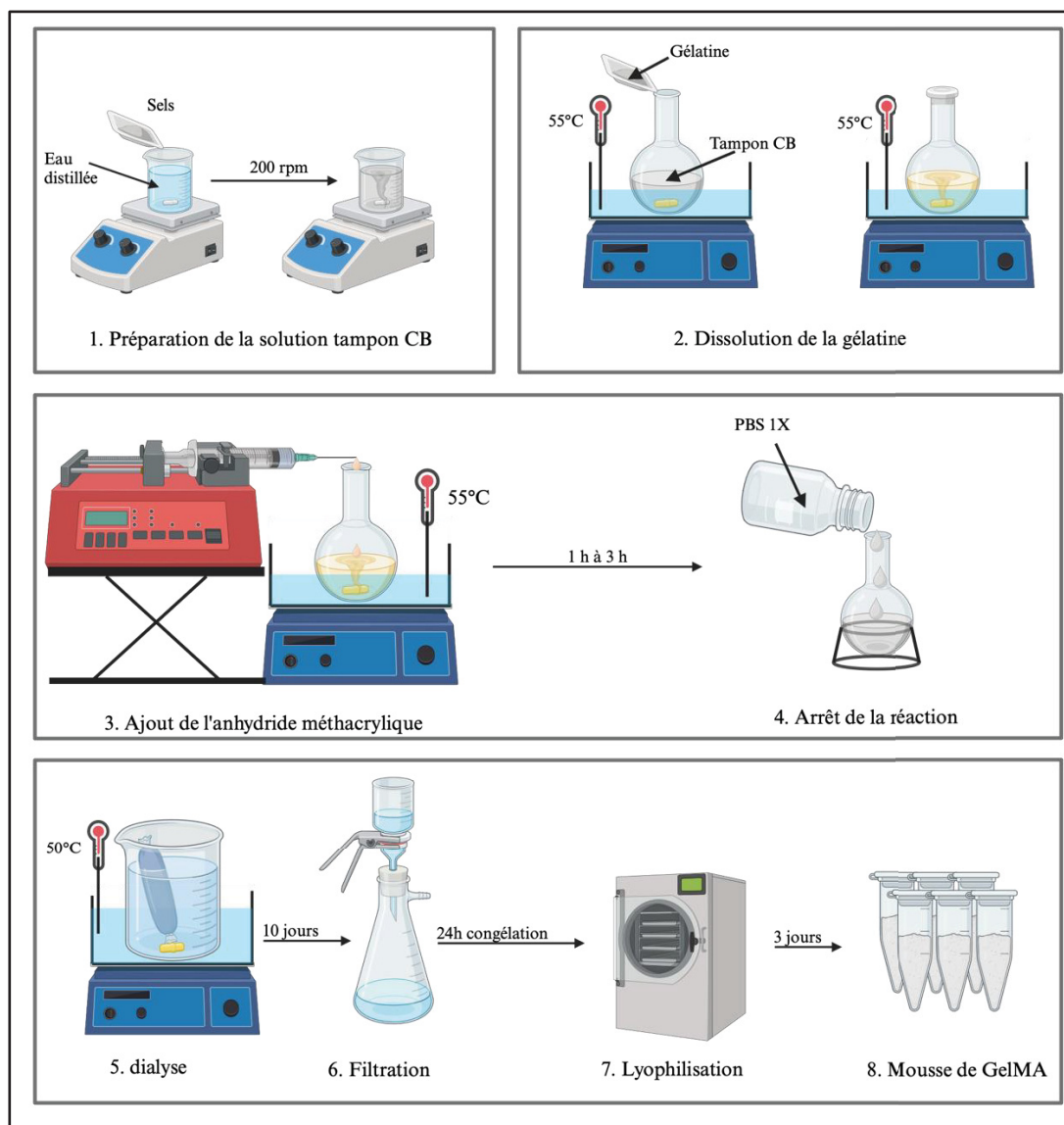


Figure 3.1. Différentes étapes de la synthèse de la GelMA (BioRender)

3.1.3 Détermination du DS

Les différents échantillons de GelMA lyophilisés ont été analysés par résonance magnétique du proton (RMN- H^1) afin de déterminer leur degré de substitution (DS). Pour cela, 10 mg d'échantillon ont été dissouts dans 1 mL d'oxide de deutérium (D_2O) et analysés à température ambiante en utilisant un spectrophotomètre RMN (Varian Inova, QANUC 500 MHz), et les spectres ont été analysés avec le logiciel TopSpin (version 4.2.0, Bruker). Le pic caractéristique du solvant D_2O (à 4,8 ppm) a été conservé sur les spectres afin d'effectuer la correction de phase. Le pic de l'acide aminé aromatique comptant pour 5 protons et situé entre 7,23 ppm et 7,5 ppm a été pris comme référence (Iervolino, F., et al., 2023 ; Peyret, C., et al., 2023). Le signal de la lysine méthylène située entre 2,8 ppm et 2,95 ppm a été mesuré et utilisé pour calculer le DS comme indiqué dans l'équation 3.1 ci-dessous (Iervolino, F., et al., 2023) :

$$DS (\%) = \left(1 - \frac{\text{Intégrale du signal de la lysine de la GelMA}}{\text{Intégrale du signal de la lysine de la gélatine}} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

Chaque mesure de l'intégrale du signal de la lysine sur le logiciel Bruker TopSpin a été réalisée trois fois. Ainsi, le DS calculé de chaque échantillon est obtenu de la moyenne de tripliqua d'analyse d'intégrale.

3.1.4 Préparation des hydrogels de GelMA

Les solutions de GelMA ont été préparées en dissolvant la GelMA lyophilisée dans du PBS 1X (pH=7,4). Afin d'évaluer l'impact de la stérilisation sur les propriétés mécaniques et rhéologiques de la GelMA, certaines fioles de GelMA (type A, DS=96%) ont été autoclavées (121°C, 20 min). Les solutions de GelMA autoclavées ou non ont été conservées à 4°C jusqu'à utilisation.

Pour former les hydrogels, avant exposition à la lumière bleue, les préparations de GelMA ont été mélangées avec la solution de photoinitiateur lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate (LAP) dissout dans l'eau distillée de manière à obtenir une

concentration finale de LAP dans l'hydrogel égale à 0,05%_{w/v} ou 0,1%_{w/v}. La photo-réticulation a ensuite été effectuée à l'aide d'une fibre optique ($\lambda=405$ nm, 1500 mW, Thorlab, Canada).

3.2 Préparation des hydrogels de chitosane

3.2.1 Matériel

Le chitosane (CH) (P18LMW, DDA=89%, MM : $255\,400 \pm 2\,524$ g/mol) provient de Primex. Le sel β -glycérol phosphate disodique pentahydrate (BGP, $C_3H_7Na_2O_6P \cdot 5H_2O$, MM : 306,11 g/mol) et le bicarbonate de sodium (Supelco®, SHC, $NaHCO_3$, MM : 84,01 g/mol) ont été fournis par Sigma-Aldrich (Allemagne). L'acide chlorhydrique (HCl, 1 M) provient de Fisher Scientific (États Unis d'Amérique).

3.2.2 Procédé

Le CH est préparé suivant la méthode implémentée au laboratoire. La poudre de CH stérile a été dissoute dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl). Plusieurs formulations ont été préparées en faisant varier la concentration de CH à 1,67%_{w/v}, 2,67%_{w/v} et 3,33%_{w/v} et celle de HCl à 0,10 M ou 0,12 M (Tableau 3.1). Après 3 h d'agitation mécanique à environ 800 rpm, les solutions acides de chitosane ont été stérilisées par autoclave (121°C, 20 min), puis conservées à 4°C jusqu'à utilisation (Figure 3.2).

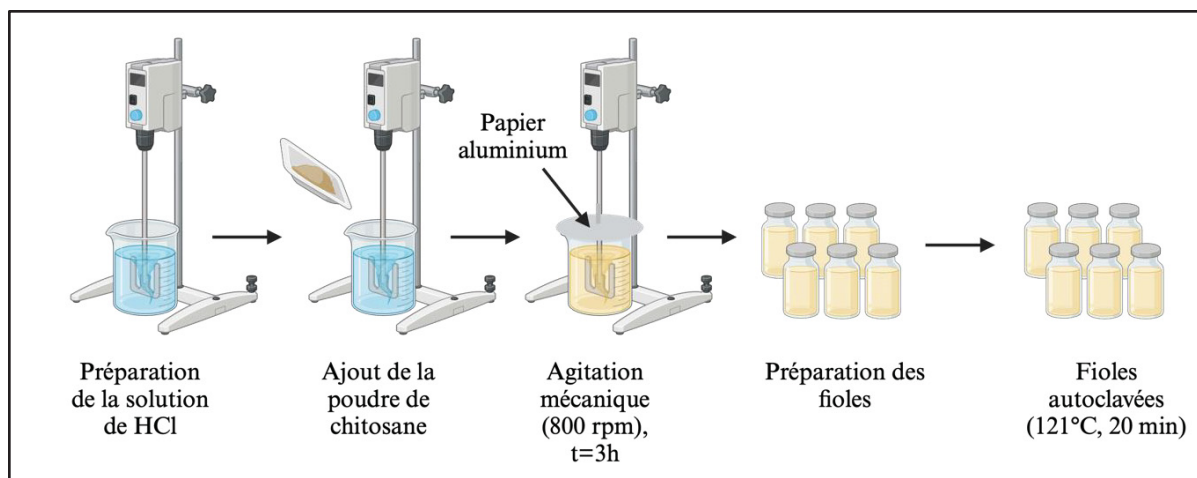


Figure 3.2. Préparation de la solution acide de chitosane (BioRender)

La solution d'agents gélifiants a été préparée en dissolvant le BGP puis le SHC dans l'eau distillée sous agitation magnétique de manière à obtenir les concentrations de 0,5 M et 0,375 M respectivement (pH=8,4). Pour les expériences de culture cellulaire, la solution a été filtrée sous hotte stérile à l'aide de filtres seringues (0,22 μ m).

Les hydrogels ont été préparés en mélangeant la solution acide de chitosane (solution A) avec la solution d'agents gélifiants (solution B), puis avec une solution de PBS 1X à pH=7,4 (solution C) dans un rapport de 3 : 1 : 1 (v/v), à l'aide de seringues de 1 mL reliées entre elles par un connecteur femelle-femelle.

Tableau 3.1. Concentrations initiales (C_i) et finales (C_f) après mélange des 3 seringues, en chitosane et agents gélifiants (BGP/SHC)

Chitosane		BGP		SHC	
C_i (%w/v)	C_f (%w/v)	C_i (M)	C_f (M)	C_i (M)	C_f (M)
1,67	1	0,5	0,1	0,375	0,075
2,67	1,67	0,5	0,1	0,375	0,075
3,33	2	0,5	0,1	0,375	0,075

3.3 Préparation des hydrogels de chitosane-GelMA

3.3.1 Mise au point de la méthode

L'élaboration de la méthode de fabrication des hydrogels semi-et IPN à base de CH et de GM a été laborieuse et a nécessité plusieurs essais-erreurs étant donné la viscosité importante des solutions de CH et GelMA qui rendait impossible de les préparer séparément puis de les mélanger.

3.3.2 Méthode de préparation retenue pour la solution A

La méthode retenue (Figure 3.3) repose sur la dissolution de la gélatine ou GM type A (DS~40 ; ~60 ou ~90%) et du CH dans la solution de HCl à 0,12 ou 0,10 M **au bain marie à 37°C**. Une fois que la GM est ajoutée à la solution acide, celle-ci est mélangée mécaniquement à une vitesse moyenne (~400 rpm). Puis, la poudre de CH est progressivement ajoutée à la solution acide de GM de manière à ne pas former de grumeaux. Une fois que la poudre de CH a été totalement versée, la vitesse d'agitation est augmentée jusqu'à 800 rpm. Le bécher est recouvert de papier aluminium afin de prévenir l'évaporation. Après 3 h de mélange **au bain marie à 37°C**, la solution est stérilisée par autoclave (121°C, 20 min). Cette dernière méthode conduit à l'obtention de solutions homogènes et manipulables à la seringue. Les formulations de CH-Gélatine, servant de contrôle, ont été préparées suivant la même méthode. Les concentrations sont résumées dans le Tableau 3.2. Dans un premier temps, une solution de 1%CH 10%GM DS90% a été préparée car se rapproche des ratios rencontrés dans la littérature. Les résultats n'ayant pas été concluants (hydrogel gluant et pâteux), la concentration en CH a été augmentée et fixée à 1,67%_{w/v}. Par conséquent, la concentration en GM a été réduite et variée à 2, 3 ou 5%_{w/v} avec différents DS (40, 60 et 90%). Suite aux résultats peu prometteurs du CH-5%GM DS40 et 60%, nous avons décidé de ne pas préparer la formulation CH-5%GM DS90%.

Tableau 3.2. Concentrations initiales (Ci) pour préparer les solutions de polymères à base de chitosane-GelMA (ou gélatine) en vue d'obtenir les concentrations finales (Cf) souhaitées dans l'hydrogel (Volume initial = 600 μ L et Volume final = 1 mL)

Nomenclature	Chitosane		GelMA ou gélatine	
	Ci (% _{w/v})	Cf (% _{w/v})	Ci (% _{w/v})	Cf (% _{w/v})
1,67%CH 2%GM	2,67	1,67	3,33	2
1,67%CH 3%GM	2,67	1,67	5	3
1,67%CH 5%GM	2,67	1,67	8,33	5
1%CH 10%GM	1,67	1	16,67	10

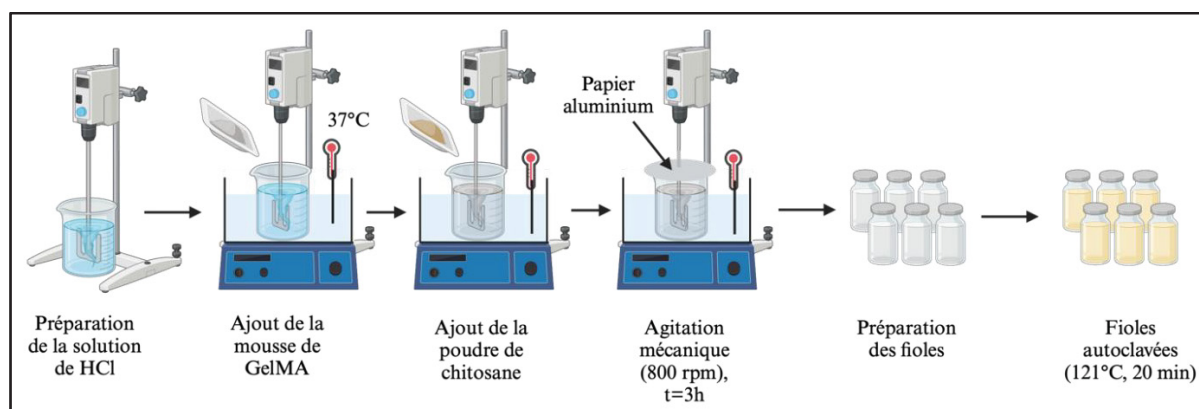


Figure 3.3. Méthode de préparation des solutions de chitosane-GelMA (BioRender)

3.3.3 Préparation des hydrogels de chitosane-GelMA

Les hydrogels ont été préparés en prélevant 600 μ L de la solution de CH-GM à température ambiante (solution A) puis en la mélangeant avec la solution d'agents gélifiants (solution B), puis avec une solution de PBS 1X à pH=7,4 contenant le photoinitiateur LAP (solution C) dans un rapport de 3 :1 :1 (v/v) à l'aide de seringues de 1 mL reliées entre elles par un connecteur femelle-femelle (15 poussées allers-retours, 150 bpm).

3.4 Caractérisation physico-chimique et mécanique des hydrogels

3.4.1 Tests de rhéologie

Les propriétés rhéologiques des formulations ont été analysées à l'aide d'un rhéomètre Physica MCR 301 (Anton Paar, Allemagne) relié à un contrôleur de température à circulation d'eau (Julabo AWC100, Allemagne). Le système était conçu de manière à ce que la fibre optique (405 nm, 1500 mW) éclaire l'hydrogel par le dessous (plateau en verre) et permette une photopolymérisation au cours de la réalisation du test comme présenté sur la Figure 3.4. Comme la photopolymérisation ne se produit pas dans l'obscurité, la lumière de la pièce était gardée éteinte.

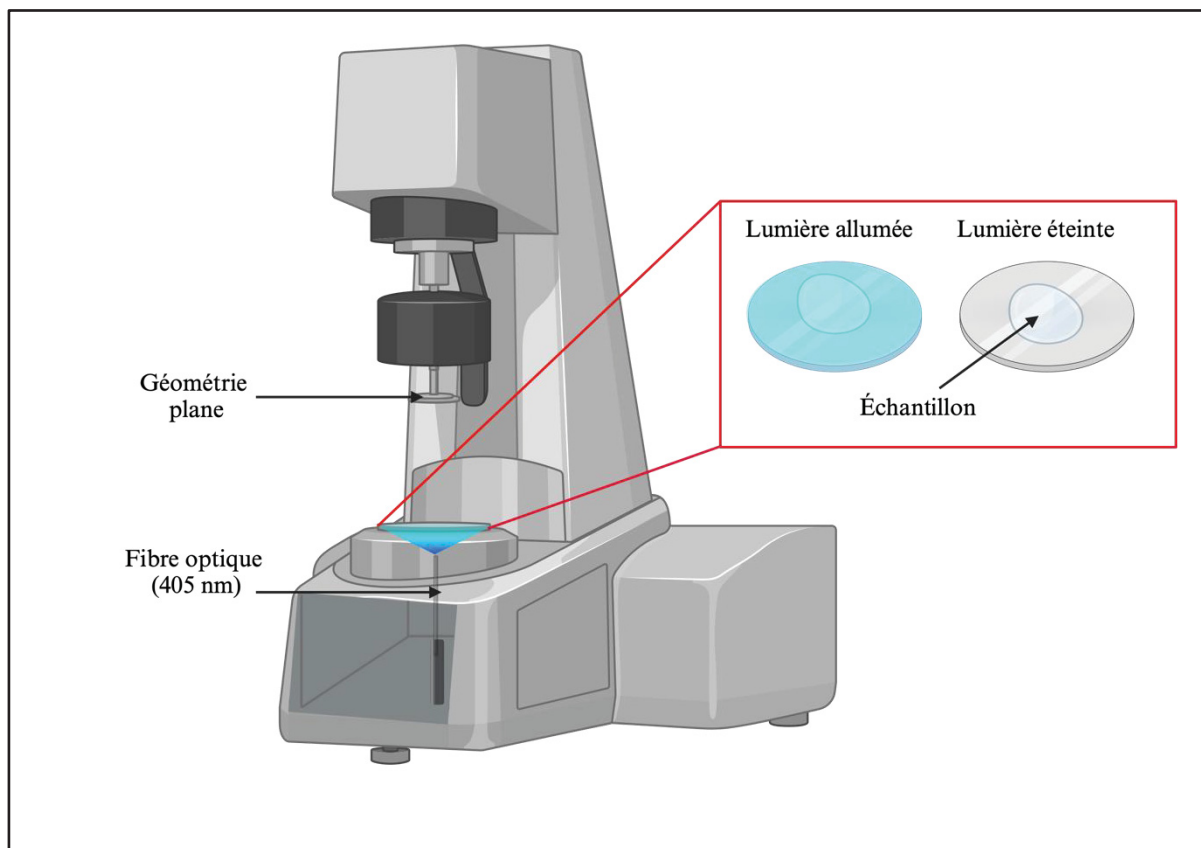


Figure 3.4. Système de photopolymérisation mis en place pour les tests de rhéologie (BioRender)

L'étude rhéologique par cisaillement a été réalisée à l'aide d'une plaque parallèle de verre et d'une géométrie plate (PP25-TG) dont l'espacement entre la géométrie supérieure et le plateau est de 1 mm. De l'huile minérale (Fisher Scientific, États-Unis d'Amérique) a été appliquée autour de l'échantillon ébavuré afin de prévenir son évaporation. Les différents tests suivants ont été réalisés :

- (a) Caractérisation de la cinétique de gélification des hydrogels : des balayages temporels ont été réalisés pendant 40 min à 22°C et/ou 37°C dans la région linéaire viscoélastique des formulations à une déformation constante de 1% et une fréquence constante de 1 Hz. L'évolution au cours du temps des modules de stockage G' et de pertes G'' a été réalisée en présence ou non de lumière bleue (405 nm). Pour évaluer la capacité de photopolymérisation et la cinétique de gélification des hydrogels de GM et de CH-GM, la fibre optique placée sous la plaque de verre à 4,2 cm de l'échantillon a été allumée au temps $t = 2$ min pendant 10 min.
- (b) Caractérisation du régime linéaire viscoélastique des hydrogels : des balayages en fréquence (0,1 Hz à 10 Hz, déformation 1%) et des balayages en amplitude (1% à 1000% de déformation, fréquence 1 Hz) ont également été réalisés à 37°C.
- (c) Température de transition sol-gel. La caractérisation de la température de transition sol-gel de la GM a été réalisée à l'aide d'une plaque parallèle métallique avec géométrie conique (CP25, Angle 1°, écart 47 μm). La plaque métallique a été utilisée car elle permet d'atteindre plus rapidement la température d'intérêt. La température de transition sol-gel a été déterminée par le croisement des modules de G' et lors d'une rampe de températures de 40°C à 4°C puis de 4°C à 40°C (à une vitesse de 1°C/min), à une déformation de 1% et à une fréquence de 1 Hz. La température de transition sol-gel de la gélatine (type A ou B) a également été évaluée, en guise de référence.

La viscosité et le caractère rhéofluidifiant des formulations ont été étudiés en mode rotationnel à l'aide d'une géométrie à cylindres coaxiaux (CC10/T200).

- (a) La viscosité des solutions de gélatine et GM en fonction de la température a été mesurée en réalisant une rampe de température de 40°C à 4°C (1°C/min) à un taux de cisaillement de 1 s^{-1} .

- (b) La viscosité en fonction du taux de cisaillement des solutions a été évalué de $0,01 \text{ s}^{-1}$ à 100 s^{-1} à 22°C .

3.4.2 Tests de compression

Afin de comprendre l'impact de la photo-réticulation et de la température sur les propriétés des gels, les tests de compression ont été réalisés sur des échantillons soumis à une réticulation chimique et/ou physique, tel que résumé à la Figure 3.5. Directement après mélange des solutions A, B et C, la préparation a été versée dans un moule cylindrique afin de former des gels de 14 mm de diamètre et 6 mm de hauteur. Les CH-GM (IPN) ont d'abord été exposés 10 min à la lumière bleue (405 nm, 1 500 mW), puis incubés 24 h à 37°C . Ceux de GM et les semi-IPN de CH-GM (réticulation chimique) ont été exposés seulement à la lumière bleue pendant 10 min, puis laissés reposer 10 min dans le noir à température ambiante. Enfin, les gels de CH, CH-gélatine et de CH-GM (réticulation physique) ont seulement été incubés 24 h à 37°C .

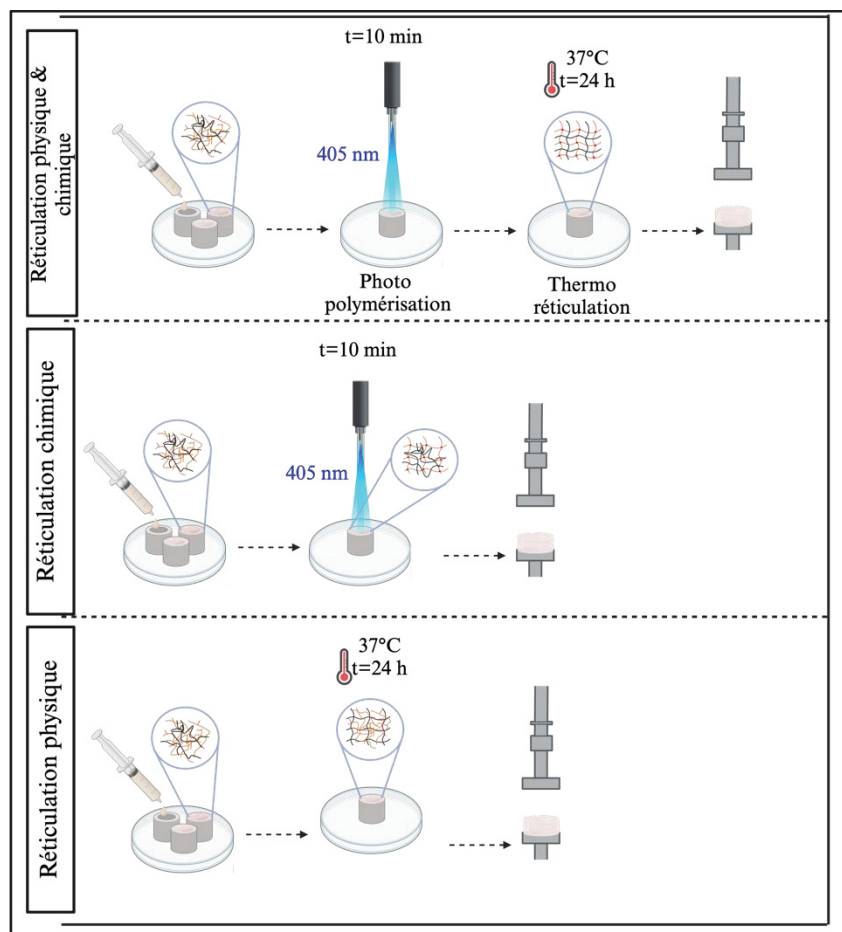


Figure 3.5. Préparation des hydrogels de chitosane-GelMA réticulés physiquement et/ou chimiquement (BioRender)

Les tests de compression non confinée ont été réalisés à l'aide de l'appareil Mach-1TM Micromechanical System (Biomomentum, Laval, Canada) à température ambiante. Les échantillons ont été placés au centre du plateau et du piston de compression et la force de compression uni axiale a été appliquée à l'aide d'une cellule de charge de 100 N (résolution : 5 mN) jusqu'à 80% de déformation à un taux de 100% déformation/min. Les modules de compression (ou modules sécants) ont été déterminés par le calcul de la pente de la courbe contrainte-déformation entre 0 et 20% de déformation (région linéaire). Au moins trois répliques techniques ont été réalisés par formulation. De plus, la contrainte et la déformation maximales (à la rupture, ou à 80% de déformation s'il n'y avait pas de rupture) ont été déterminées.

Afin d'évaluer la résistance à la fatigue de certains hydrogels, des tests de compression cycliques ont également été réalisés. Pour ce faire, une cellule de charge de 17 N (résolution : 0,85 mN) a été utilisée pour comprimer les hydrogels jusqu'à 20% de déformation (v100%/min) pendant 20 cycles. Durant chaque cycle, les hydrogels ont été maintenus à 20% de déformation pendant 10 s afin de mettre en évidence le processus de relaxation. Lorsque le piston de compression retournait à sa position initiale, 10 s de pause était effectués entre deux cycles consécutifs. Les courbes d'hystérésis des premiers et derniers cycles ont été évaluées (Figure 3.6). Puisque la surface est un paramètre essentiel pour déterminer le module de compression, le diamètre des gels démoulés a été contrôlé. Pour ceux dont le diamètre s'est rétracté après incubation à 37°C, des photos ont été prises en présence d'une règle graduée afin de calculer le diamètre réel du gel sur ImageJ.

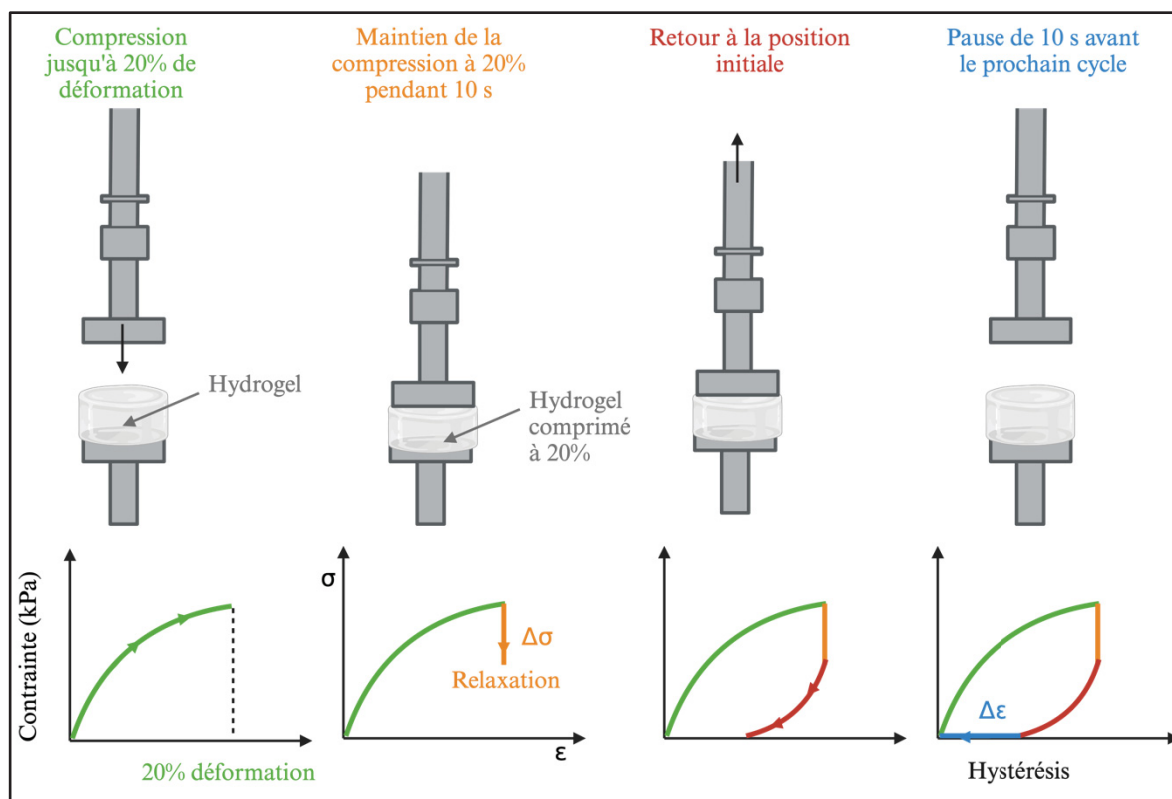


Figure 3.6. Méthode d'obtention d'une courbe d'hystérésis lors d'un cycle de compression jusqu'à 20% de déformation (BioRender)

Afin d'étudier le maintien des propriétés mécaniques des hydrogels en solution, des tests de compression ont été effectués sur les gels les plus prometteurs après immersion à 37°C dans le PBS 1X (pH=7,4) ou le milieu de culture DMEM complet (pH =8,1), pendant 7 jours. Le milieu d'immersion a été changé au jour 3.

3.4.3 Osmolarité et pH des hydrogels

Après 24 heures de gélification à 37 °C, les hydrogels retenus pour l'encapsulation cellulaire ont été pressés et filtrés à travers un filtre seringue (0,45 µm) afin de récupérer le filtrat et de mesurer leur osmolarité (Advanced Micro Osmometer, Model 3300, Advanced Instruments). Le pH de ces solutions a également été mesuré à l'aide du pH-mètre (UltraBasic, Denver Instrument).

3.5 Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Des tests de spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) ont été réalisés à l'aide du spectromètre (PerkinElmer) à une résolution de 2 cm⁻¹ et 32 scans. Pour cela, les hydrogels de GM, gélatine, CH, CH-gélatine et CH-GM ont été congelés 24 h à -80°C puis lyophilisés (HarvestRight, États-Unis d'Amérique) toute une nuit. La GM synthétisée était déjà lyophilisée et n'a donc pas eu besoin de l'être de nouveau.

3.6 Impression 3D des hydrogels et IPN

L'impression 3D a été réalisée à l'aide de l'instrument BioX (Cellink). Afin de tirer profit des propriétés de la gélatine et de la GM, le lit d'impression a été stabilisé à 4°C pour permettre une gélification physique et favoriser le maintien de la structure. L'instrument est muni d'une tête à lumière bleue (405 nm) afin de photopolymériser la GM. Plusieurs modes d'exposition à la lumière bleue sont disponibles. Afin de favoriser une réticulation homogène, la LED réticulait la structure imprimée en se déplaçant linéairement une fois l'impression terminée ou bien entre l'impression de deux couches successives.

Tout d'abord, des essais avaient été réalisés à l'aide d'une géométrie en créneaux afin d'évaluer la vitesse de déplacement de l'aiguille (diamètre interne : 250 μm) et la pression d'extrusion adaptée aux différentes formulations testées. Pour cela, la vitesse était fixée puis la pression augmentée à la fin de chaque créneau. Ou à l'inverse, la pression était fixée et la vitesse augmentée. Toutefois, cette méthode permettait difficilement de mettre en évidence les irrégularités et discontinuités de la structure au cours de l'impression. En effet, un système pression/vitesse pouvait paraître optimal sur la portion de la géométrie en créneaux étudiée, mais lorsqu'il fallait imprimer une plus grande structure la résolution d'impression s'avérait mauvaise. Pour la suite des essais, la résolution d'impression et la fidélité de forme ont été évaluées sur des grilles de 20 x 20 mm^2 (1 à 4 couches – 64 pores) en maintenant la pression d'extrusion et la vitesse d'impression constantes. Suivant le résultat obtenu, ces paramètres étaient ajustés jusqu'à définir le meilleur système d'impression pour la formulation testée. L'indice d'imprimabilité (Pr) et le taux d'étalement (Sp) (Seymour, Shin, & Heilshorn, 2021) ont été mesurés sur les grilles présentant une bonne résolution à l'œil, c'est-à-dire dont les pores n'étaient pas totalement obstrués, les filaments cassés, discontinus et/ou irréguliers. Les différents pores des grilles retenues ont ensuite été photographiés au microscope optique (grossissement x4). Le périmètre L (μm), l'aire A (μm^2) et le diamètre des filaments e (μm) des différents pores de la grille ont été calculés sur ImageJ. L'indice Pr a été déterminé suivant l'équation 3.2 :

$$\text{Pr} = \frac{L^2}{16 \times A} \quad (3.2)$$

Lorsque Pr est inférieur à 1, cela signifie que les pores sont obstrués. Lorsqu'ils le sont totalement, Pr est nul.

Le taux d'étalement Sp du gel a quant à lui été calculé selon l'équation 3.3 :

$$\text{Sp} = \frac{e \text{ (}\mu\text{m)}}{\text{diamètre interne de l'aiguille d'impression}(\mu\text{m})} \quad (3.3)$$

Plus Sp est proche de 1, moins le filament s'est élargi et étalé et plus la structure imprimée sera proche de la structure dessinée.

3.7 Biocompatibilité et encapsulation cellulaire

3.7.1 Culture cellulaire

Les fibroblastes L929 Passage 4 à 7 ont été cultivés dans du milieu de culture *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) contenant de la L-glutamine à 2% (v/v) complété par 10% (v/v) de sérum bovin fœtal (SBF) et 1% (v/v) pénicilline/streptomycine (Wisent Inc, Canada) dans une atmosphère humide à 37°C contenant 5% de CO₂. Les solutions polymériques ont été stérilisées par autoclave (121°C, 20 min), les agents gélifiants avec ou sans photoinitiateur ont été filtrés à l'aide d'un filtre seringue (22 µm).

3.7.2 Encapsulation cellulaire (3D)

Les fibroblastes L929 à passage 5 (P5) ont été encapsulés dans les formulations de gel les plus prometteuses à une concentration de 1 million de cellules/mL, en suivant la méthode décrite à la section 3.3.3, à la différence que la solution C était formée de la suspension cellulaire dans du DMEM complet (Figure 3.7). Un volume de 100 µL de solution pré-hydrogel a été versé dans les puits d'une plaque de 48 puits. Les pré hydrogels de CH-GM ont chacun été exposés pendant 10 min à la lumière bleue (405 nm) avant d'être incubés 6 min à 37°C, puis recouverts de 300 µL de DMEM complet. Pour imiter les mêmes conditions de photo-réticulation des hydrogels CH-GM, les pré hydrogels de CH et CH-Gélatine ont été laissés à température ambiante pendant 10 min avant d'être incubés 6 min à 37°C et recouverts de 300 µL DMEM complet. Une plaque différente a été utilisée pour chaque point temporel des conditions CH-GM (jours 1, 3 et 7) et pour chaque essai biologique (*live/dead* et test Alamar). Le pré-hydrogel a été réticulé rapidement après mélange (irradiation puis incubation) et le milieu de culture a ensuite été déposé sur les gels afin d'éviter toute altération des cellules en contact avec la solution de polymère. Les gels ont été cultivés durant 7 jours en changeant le milieu de culture tous les deux jours.

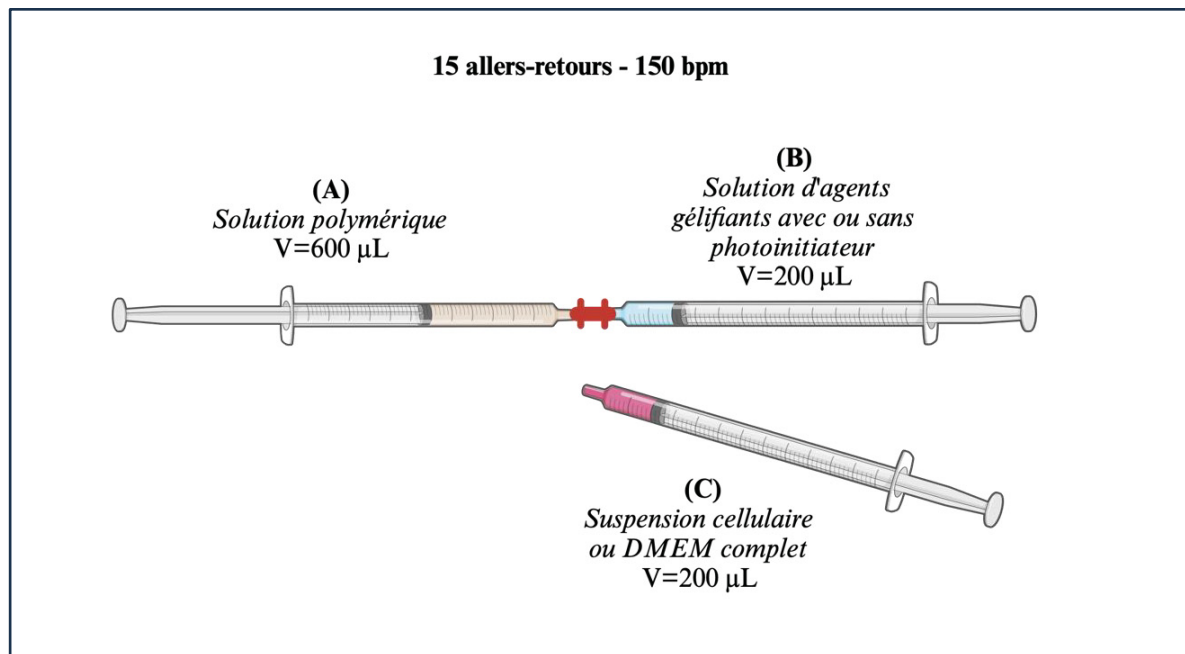


Figure 3.7. Encapsulation cellulaire par la méthode de mélange trois seringues (BioRender)

3.7.3 Tests de viabilité cellulaire

Live/dead : La viabilité cellulaire a été analysée grâce aux essais de *live/dead*. La solution de colorant a été préparée sous hotte stérile en mélangeant la solution de calcéine de 100 µM (Invitrogen, États-Unis d'Amérique) à celle d'éthidium homodimer-1 (Eth-1) de 110 µM (Invitrogen, États-Unis d'Amérique) dans du SBF afin d'obtenir en concentrations finales 2 µM de calcéine et 5,5 µM d'Eth-1. Après avoir retiré le milieu de culture, un volume de 300 µL de colorant a été ajouté dans chaque puits et incubé 45 min à 37°C à l'abris de la lumière. Le colorant a ensuite été retiré et remplacé par du milieu de culture DMEM ne contenant pas de SBF. Les cellules encapsulées ont été visualisées au microscope à fluorescence (Revolve Microscope) au grossissement x4. Différentes zones de chaque puits ont été photographiées.

Bleu d'Alamar : Afin de mesurer l'activité métabolique des cellules encapsulées un test au bleu d'Alamar a été réalisé. Le colorant stérile est constitué d'une solution de résazurine (Biotium, États-Unis d'Amérique) à 10%_{v/v} et de milieu de culture DMEM complet. Un volume de 500 µL de colorant a été déposé au-dessus de chaque puits après avoir délicatement

retiré le milieu de culture. Les plaques ont été incubées 4 h à 37°C à l'abris de la lumière. Après incubation, le colorant situé dans chaque puits a délicatement été homogénéisé par une dizaine d'allers-retours à la pipette. Puis 100 µL de chaque puits ont été analysées par fluorescence (dans une plaque de 96 puits) à l'aide d'un spectrophotomètre (Victor 2) à une longueur d'onde d'excitation de 540 nm et d'émission de 615 nm.

3.8 Analyse statistique

Au moins trois réplicas par expérience ont été réalisés (sauf indication contraire). Les résultats sont présentés sous forme de moyen avec écart-type. Étant donnée la très petite taille des échantillons (<10), il a été préféré de réaliser une analyse statistique descriptive combinée à l'utilisation de tests (non) paramétriques. Pour ce faire, des graphiques boîtes à moustaches ou bien des diagrammes en bâton mettant en évidence la dispersion des jeux de données ont été représentés. Les tests d'hypothèses ont été réalisés à l'aide du langage de programmation R. Pour les jeux de données vérifiant la loi normale, les tests ANOVA suivi du test de Tukey ont été réalisés. Lorsque l'hypothèse de normalité (Shapiro-Wilk) est réfutée des tests non paramétriques ont été réalisés tel que le test de Kruskal-Wallis. Lorsque l'hypothèse selon laquelle aucun groupe significatif n'existe est rejetée ($p\text{-value} < 0,05$), une analyse post-hoc de Dunn (correction de Bonferroni) a été réalisée afin de mettre en évidence les groupes présentant des différences significatives ($p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: *** et $p < 0,0001$: ****). Dans le cas où seulement deux groupes ont été comparés, le test de Wilcoxon-Mann-Whitney a été réalisé.

CHAPITRE 4

RÉSULTATS

4.1 Hydrogels de GelMA

Avant de nous intéresser aux (semi)-IPN de chitosane-GelMA (CH-GM), nous avons d'abord mis au point la méthode de synthèse de la GelMA ainsi que sa caractérisation.

4.1.1 Modulation du DS et reproductibilité

L'utilisation de la GelMA (GM) au sein de notre équipe de recherche est relativement récente. Des essais préliminaires de synthèse de GM de type B (GMB) avaient été réalisés en utilisant la méthode conventionnelle décrite par Van Den Bulcke et al., (2000). Les degrés de substitution (DS) des différents lots obtenus étaient seulement d'environ 40%, ce qui donne de faibles propriétés mécaniques. De plus, la solution de GM à 10%_{w/v} possédait un pH compris entre 4 et 5, ce qui est toxique pour les cellules. Afin d'obtenir un pH proche des conditions physiologiques et un DS supérieur ou égal à 60%, une nouvelle technique de synthèse a été instaurée, en adaptant la méthode de synthèse en une seule étape décrite par Shirahama et al., (2016) et reposant sur l'utilisation du tampon CB (0,25 M). Dans un premier temps, différents paramètres de synthèse ont été évalués et ajustés en fonction des DS obtenus. Puis, deux combinaisons de paramètres ont été conservées afin d'évaluer la reproductibilité de la synthèse. Ainsi, cinq lots de GMB et dix lots de GMA ont été produits.

Chaque GM synthétisée a été analysée par RMN du proton et comparée avec le spectre de la gélatine (A ou B) (Figure 4.1). Sur chacun des spectres de GM synthétisée, les pics à 5,5 et 5,7 ppm caractéristiques des protons méthacrylates apparaissent (Figure 4.1 a). De plus, le pic de la lysine à ~3 ppm diminue en intensité (Figure 4.1 b). Ces résultats montrent que la réaction de synthèse a été réalisée avec succès.

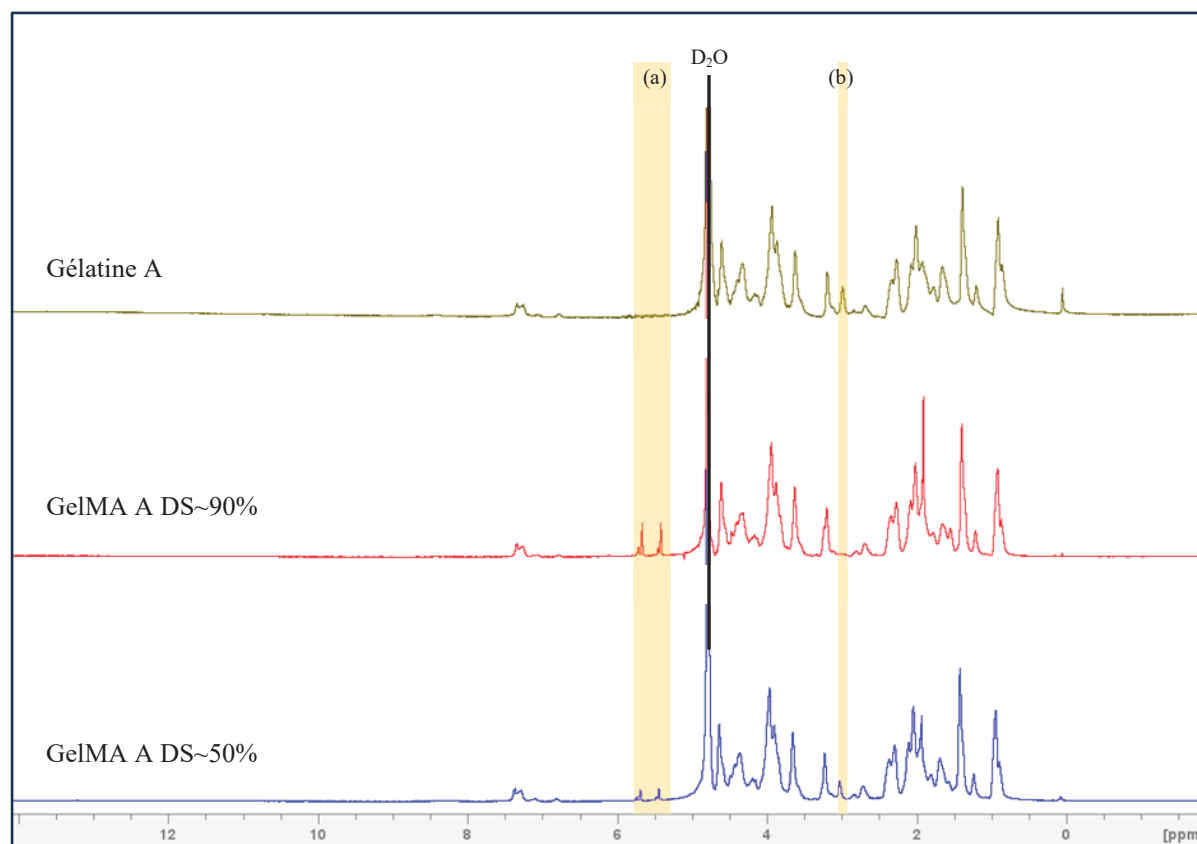


Figure 4.1. Spectres RMN du proton de la gélatine et de la GelMA type A avec un DS~90% et un DS~50% (TopSpin 4.2.0)

Les DS obtenus pour la GMB sont très variables et résumés dans le Tableau 4.1. Seul le premier lot de type B réalisé s'approche du DS cible, en revanche il a été impossible de le reproduire par la suite. Abaisser le débit d'addition de l'anhydride méthacrylique (AM) a permis d'approcher un DS d'une valeur de 60% mais ne remplit pas l'objectif initial.

Tableau 4.1. Degré de substitution (DS) des différents lots de GelMA de type B synthétisés en fonction des paramètres de réaction utilisés (AM : anhydride méthacrylique)

DS ciblé (%)	Volume AM (mL)	Débit d'addition (mL/min)	Temps de la réaction	DS obtenu (%)	DS moyen (%)
100	1	0,1	1 h 30	91,4 ± 1,1	57,2 ± 24,4
				33,9 ± 4,2	
				54,9 ± 2,5	
				48,8 ± 3,8	
≥80	1	0,02	1 h 30	57,7 ± 1,4	-

Compte tenu des difficultés rencontrées lors de la synthèse de la GMB et en vue de la mélanger au CH, la GMA (dont le point isoélectrique est plus élevé) a été privilégiée pour le reste de l'étude (Tableau 4.2). Les premiers essais de synthèse de GMA dont le débit d'addition de l'AM est de 0,02 mL/min n'ont pas été concluants. En effet, le DS obtenu est d'environ 44% et de 57% pour un temps de réaction égal à 1h30 et 3h respectivement. L'augmentation du débit d'addition de l'AM à 0,1 mL/min, tout en conservant un temps de réaction de 1h30, a permis d'obtenir différents lots avec un DS de 68,2% ± 17,3%. Doubler le volume d'AM ainsi qu'augmenter le temps de la réaction a conduit à l'obtention de GMA avec un DS égal à 88,6% ± 6,5%. **Cette dernière méthode permet d'obtenir un DS proche de 90% avec une assez bonne reproductibilité.** La variabilité du DS lorsque celui-ci s'approche de 100% peut s'expliquer par la méthode RMN-H¹. En effet, plus le DS est élevé, plus le pic caractéristique de la lysine à ~3 ppm diminue en intensité voire disparaît, ce qui augmente le risque d'erreur lors du calcul de l'intégrale du signal.

Tableau 4.2. Degré de substitution (DS) des différents lots de GelMA de type A synthétisées en fonction des paramètres de réaction utilisés (AM : anhydride méthacrylique)

DS ciblé (%)	Volume AM (mL)	Débit d'addition (mL/min)	Temps de la réaction	DS obtenu (%)	DS moyen (%)
≥80	1	0,02	1 h 30	44,0 ± 4,0	-
≥80	1	0,02	3 h	56,6 ± 1,0	-
≥80	2	0,1	2 h	92,1 ± 2,7	88,6 ± 6,5
				82,6 ± 5,7	
				83,6 ± 1,0	
				95,8 ± 1,2	
60	1	0,1	1 h 30	66,7 ± 1,6	68,2 ± 17,3
				48,8 ± 6,5	
				66,4 ± 1,1	
				90,9 ± 1,0	

Les températures de transition sol-gel et gel-sol ont été mesurées par essais rhéologiques à l'aide d'une rampe de température allant de 4°C à 40°C (Tableau-A I-1 en ANNEXE 1, p.105). La température de transition sol-gel pour la gélatine et la GM correspond à l'intersection des modules de perte (G'') et de stockage (G') lorsque la température diminue. Au contraire, la température de transition gel-sol correspond à l'intersection de G' et G'' lorsque la température augmente. Contrairement à l'étude de M. Zhou et al., (2019), quel que soit le type de GM synthétisée, les températures de transition sol-gel et gel-sol ne sont pas impactées de manière considérable par la valeur du DS. À l'exception de la GMB DS~55%, les températures de transition de la GM sont inférieures de 3 à 4°C par rapport à la gélatine de même type, et sont proches de la température ambiante (20-24°C). Pour tous les lots synthétisés, la température de transition sol-gel est environ inférieure de 5 à 7°C à celle de transition gel-sol (26-29°C). Ceci s'explique par le fait que l'énergie requise pour passer de la structure triple hélice à une structure aléatoire est plus importante, justifiant une température de transition gel-sol plus élevée (He et al., 2023).

4.1.2 Choix du temps d'exposition à la lumière bleue

Comme expliqué dans le premier chapitre, la concentration en photoinitiateur, la longueur d'onde et l'intensité de la source lumineuse utilisée ainsi que le temps d'exposition à la lumière sont des paramètres essentiels pour la réticulation de la GM et jouent un rôle sur ses propriétés. Le photoinitiateur LAP à une concentration de 0,05%_{w/v} est couramment utilisé dans la littérature et n'impacte pas négativement la viabilité cellulaire. Toutefois, il est important de choisir le temps d'exposition à la lumière adéquat pour polymériser les hydrogels photo sensibles. Pour cela différents temps d'exposition à la lumière bleue ($\lambda = 405 \text{ nm}$, 7 mW/cm^2) ont été évalués pour polymériser la GM à 10%_{w/v} (Figure 4.2). La gélification de la GM est observée pour un temps d'exposition supérieur ou égal à 4 min (courbes jaunes), tandis que pour un temps d'exposition équivalent à 3 min la GM reste à l'état liquide (courbes vertes). Le module de stockage G' final augmente avec l'augmentation du temps d'exposition : $\sim 230 \text{ Pa}$ ($t=4 \text{ min}$), $\sim 1360 \text{ Pa}$ ($t=5 \text{ min}$), $\sim 7170 \text{ Pa}$ ($t=10 \text{ min}$) et $\sim 10\,580 \text{ Pa}$ ($t=15 \text{ min}$). Prolonger l'exposition au-delà de 10 min conduit à des gains de G' de moins en moins importants et pourrait compromettre d'autres expériences comme l'encapsulation cellulaire. Un temps d'exposition à la lumière de 10 min permet d'atteindre d'excellentes valeurs de G' et est retenu pour la suite du projet. Enfin, un temps de latence d'environ 3 min est observé entre le moment où la lumière est allumée et le moment où la polymérisation s'initie.

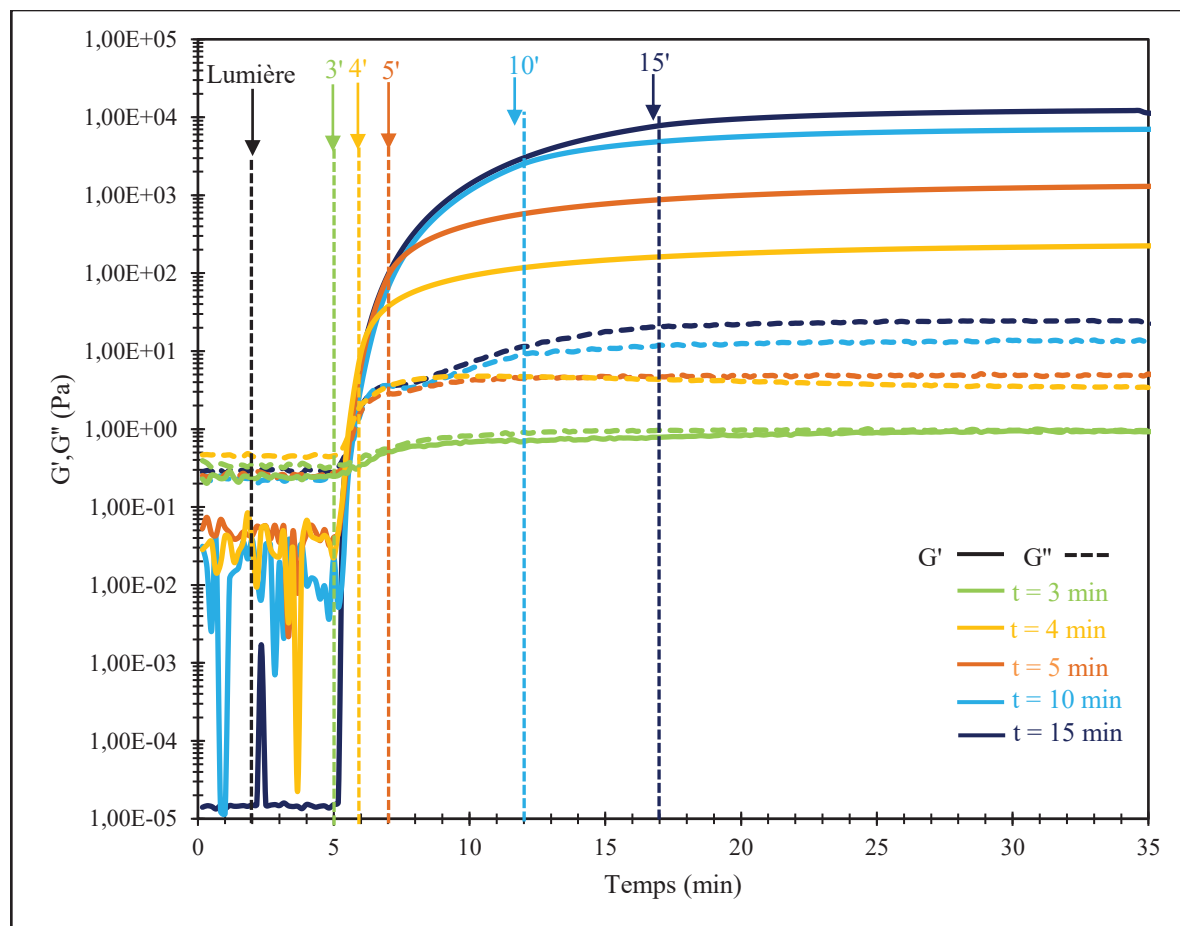


Figure 4.2. Photopolymérisation de la GelMA à 10%_{w/v} (type A, DS~91%) en présence du photoinitiateur LAP à 0,05%_{w/v} à différents temps d'exposition à la lumière bleue ($\lambda = 405$ nm), $T=37^{\circ}\text{C}$. Les flèches indiquent lorsque la lumière est allumée puis éteinte en fonction des différentes conditions

4.1.3 Effet de la concentration de la GelMA sur ses propriétés rhéologiques

Bien que l'effet de la concentration de la GM sur ses propriétés soit bien connu, il est important d'effectuer quelques tests rhéologiques en faisant varier la concentration de la GM synthétisée afin de s'assurer que leurs propriétés soient conformes aux attentes. D'après la Figure 4.3, l'augmentation de la concentration en GM s'accompagne de l'augmentation du module de stockage G' . De plus, la polymérisation s'initie plus rapidement avec une augmentation de la concentration. Toutefois, une concentration en GM de 2%_{w/v} est insuffisante pour permettre une gélification chimique. Ces résultats sont consistants avec ceux trouvés dans la littérature

démontrant qu'une concentration minimale de 3%_{w/v} est requise pour initier une photopolymérisation dans ces conditions (O'Connell et al., 2018 ; Seymour et al., 2021). En effet, les chaînes de GM sont probablement trop éloignées les unes des autres pour interagir entre elles lorsque sa concentration est de 2%_{w/v}.

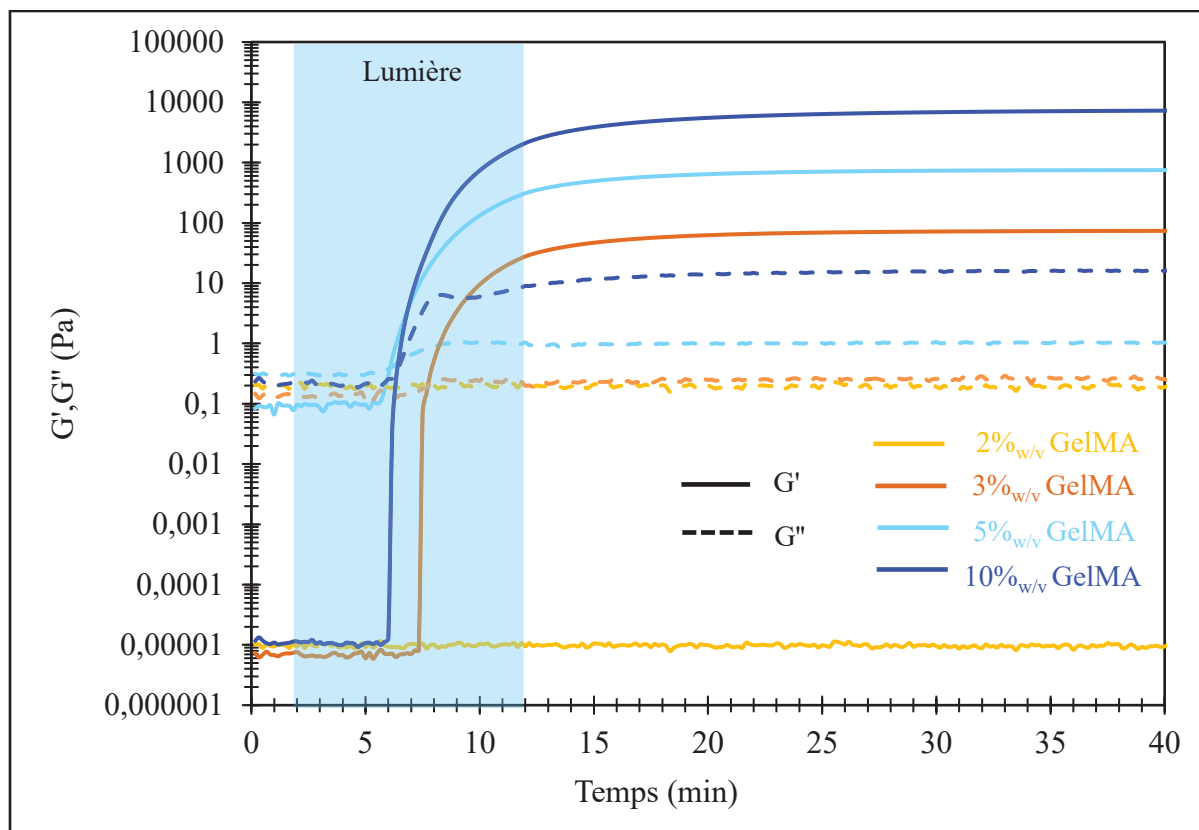


Figure 4.3. Modules de stockage (G') et de perte (G'') des hydrogels de GelMA (type A, DS~90%) à différentes concentrations exposés pendant 10 min à la lumière bleue en présence du photoinitiateur LAP à 0,05%_{w/v}, $T=37^{\circ}\text{C}$

4.1.4 Effet du degré de substitution de la GelMA sur ses propriétés rhéologiques

L'impact du degré de substitution (DS) a également été étudié par rhéologie (Figure 4.4). Tel qu'attendu, le module de stockage (G') augmente avec l'augmentation du DS. En effet, plus le nombre de groupes méthacrylates et méthacrylamides est élevé, plus les doubles liaisons $\text{C}=\text{C}$ sont aptes à être mobilisées sous l'effet de la lumière pour former des liaisons covalentes. Un léger retard de polymérisation est observé lorsque le DS vaut 40%.

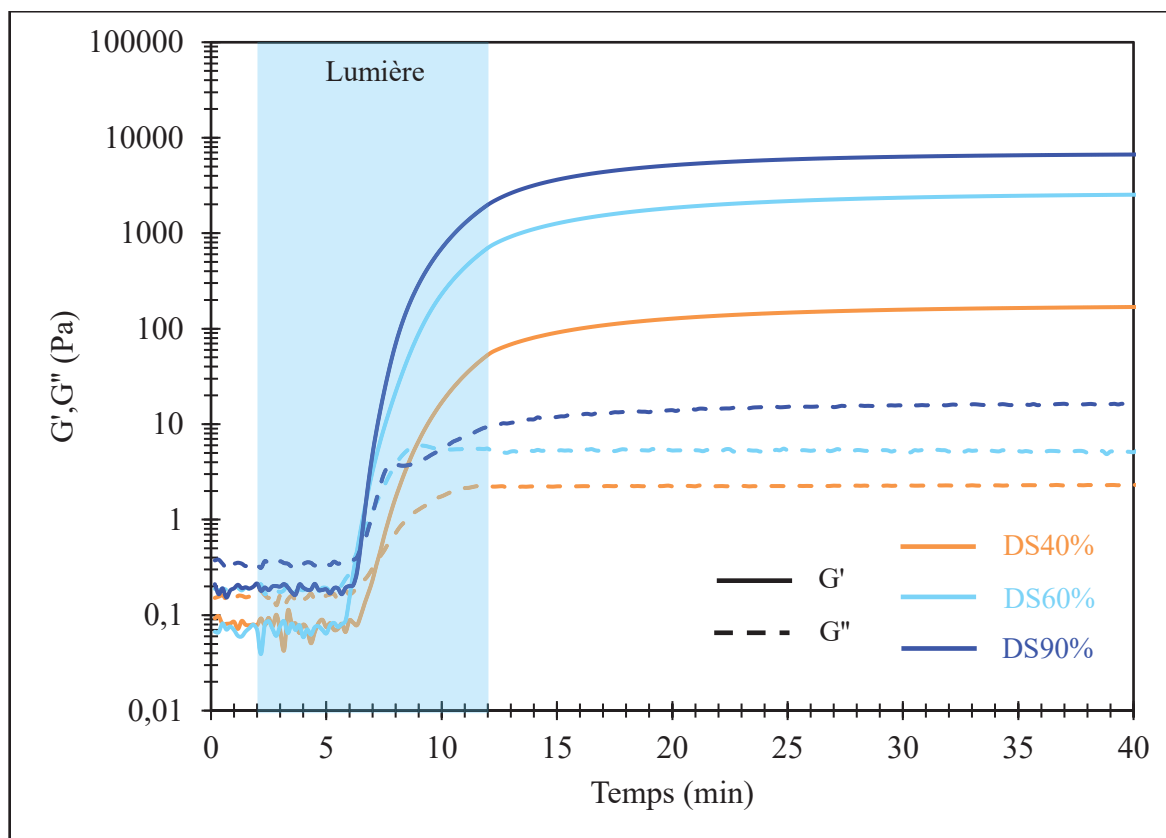


Figure 4.4. Modules de stockage (G') et de perte (G'') des hydrogels de GelMA (10%_{w/v}, type A) avec différents degrés de substitution (DS), réticulés pendant 10 min à la lumière bleue en présence du photoinitiateur LAP à 0,05%_{w/v}, $T=37^{\circ}\text{C}$

4.1.5 Effet de l'autoclave sur les propriétés rhéologiques et mécaniques

Afin d'utiliser les hydrogels dans des applications biomédicales, il est essentiel de les stériliser avec une technique adaptée avant d'y ajouter les cellules vivantes. Les solutions de CH-GM sont trop visqueuses pour être filtrées. L'alternative est l'autoclave, une technique de stérilisation par traitement thermique (121°C, 20 min) très efficace et largement utilisée au sein de notre équipe de recherche pour stériliser le CH. Toutefois, l'effet de l'autoclave sur la GM reste encore assez mal connu. Quelques études ont évalué l'impact de l'autoclave sur la mousse de GM ou bien sur les hydrogels de GM photopolymérisés (Rizwan, Chan, Comeau, Willett, & Yim, 2020 ; Shyam & Palaniappan, 2023 ; F. Zhang, Scull, Gluck, Brown, & King, 2023). Nous avons donc étudié l'impact de l'autoclave sur les propriétés rhéologiques (Figure 4.5) et mécaniques (Figure 4.6) de la GM dissoute dans le PBS 1X.

La polymérisation de la GM autoclavée s'initie environ 1 min après la GM non stérile et son module de stockage (G') est proche mais légèrement inférieur et significativement plus variable : 6232 ± 2394 Pa et 6863 ± 415 Pa à $t=40$ min, pour la GM autoclavée et non autoclavée respectivement. Les hydrogels de GM autoclavés ou non sont tous les deux transparents. Le module sécant à 20% de déformation de la GM autoclavée est légèrement plus faible que celui de la GM non stérile, mais non significative ($p>0,05$) : $20,6 \pm 2,2$ kPa et $23,4 \pm 2,2$ kPa, respectivement (Figure 4.6 a). La déformation à la rupture de la GM est d'un peu plus de 60% (~62% et ~64% respectivement). Les valeurs de contrainte à la rupture sont presque similaires, mais la variation entre les répliques de la GM autoclavée est plus conséquente que la GM non stérile : 102 ± 72 kPa et 108 ± 8 kPa, respectivement (Figure 4.6 b). Ces résultats montrent que l'autoclave affaiblie légèrement les propriétés rhéologiques et mécaniques de la GM en générant davantage de variabilité.

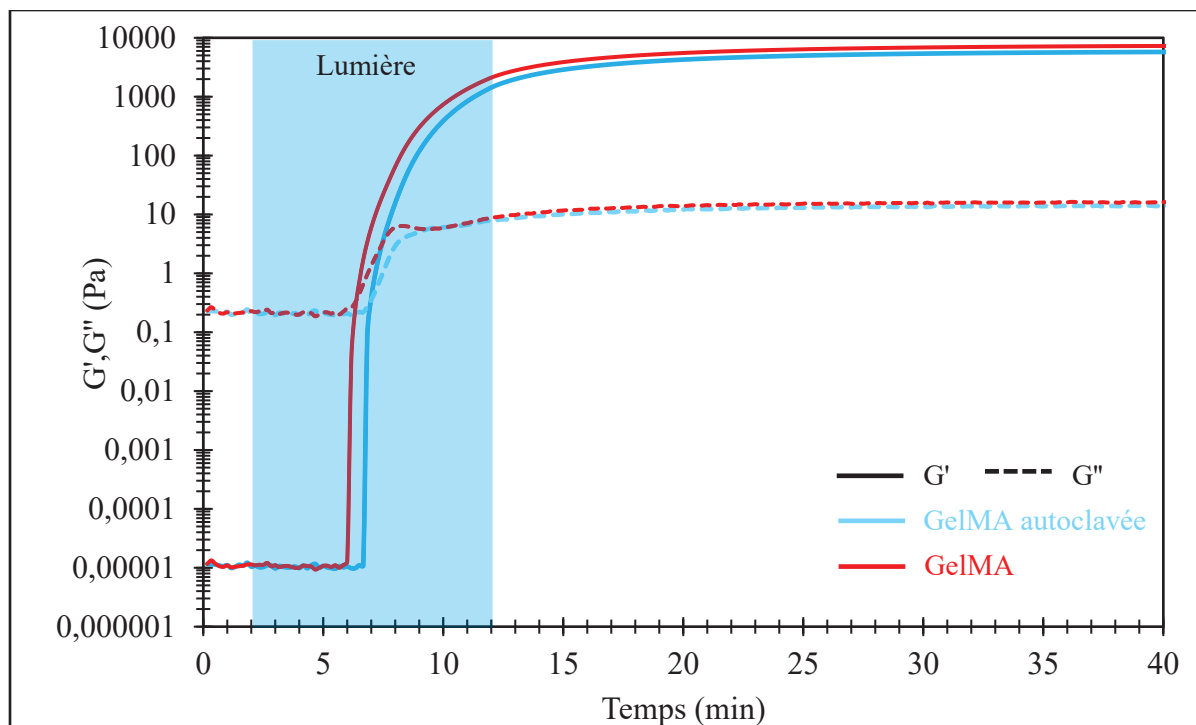


Figure 4.5. Modules de stockage (G') et de perte (G'') des hydrogels de GelMA à 10%_{w/v} (type A, DS~96%) autoclavés ou non et photo-réticulés ($\lambda=405$ nm) en présence de LAP à 0,05%_{w/v} pendant 10 min à 37°C, $n=3$

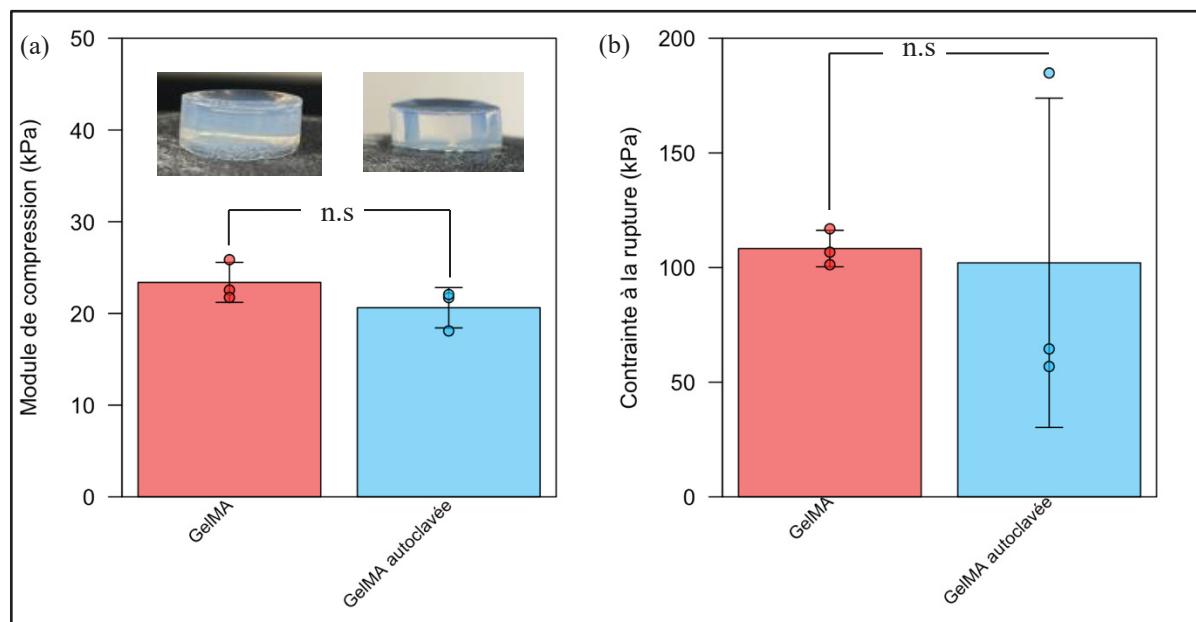


Figure 4.6. Effet de l'autoclave (a) sur le module de compression à 20% de déformation et (b) la contrainte à la rupture des hydrogels de GelMA (121°C, 20 min), $n=3$ (RStudio)
n.s : non significatif (Test de Wilcoxon-Mann-Whitney)

4.2 Hydrogels de chitosane-GelMA

4.2.1 Réticulation des hydrogels

Dans un premier temps, il est essentiel de s'assurer de la faisabilité de créer des réseaux (semi)-interpénétrés de polymères (IPN) à base de chitosane (CH) et de GelMA (GM).

Tout d'abord, l'impact de l'autoclave sur la GM lorsqu'elle est ajoutée au CH a été évaluée. Pour cela, la GM non stérile a été dissoute dans la solution acide de CH autoclavée, puis laissée sous agitation mécanique pendant 3 h au bain marie à 37°C. Afin de bien comprendre l'impact de l'autoclave sur la GM incorporée au CH, il était essentiel d'utiliser du CH autoclavé puisque sa stérilisation peut également affecter les propriétés mécaniques du mélange.

Ainsi, la méthode mise au point permet d'obtenir après mélange à l'agitateur mécanique et au bain marie une solution blanche à l'aspect mousseux (Figure 4.7 a). Après autoclave (121°C, 20 min) une solution jaune transparente est obtenue (Figure 4.7 c). Lorsque la GM non autoclavée est ajoutée au CH, qui lui a été préalablement autoclavé, la solution est jaune opaque et hétérogène (Figure 4.7 b). L'opacité de cette dernière peut justifier l'absence de photopolymérisation lorsqu'exposé à la lumière bleue pendant 10 min et une allure de courbe similaire à celle de l'hydrogel thermosensible de CH (Figure 4.8). Au contraire, lorsque les deux polymères ont été autoclavés, la photopolymérisation a lieu (courbe jaune Figure 4.8). L'autoclave, en éliminant les bulles, est donc bénéfique pour la réticulation chimique du CH-GM puisqu'elle rend la solution CH-GM transparente permettant la pénétration de la lumière de la solution pré-hydrogel.

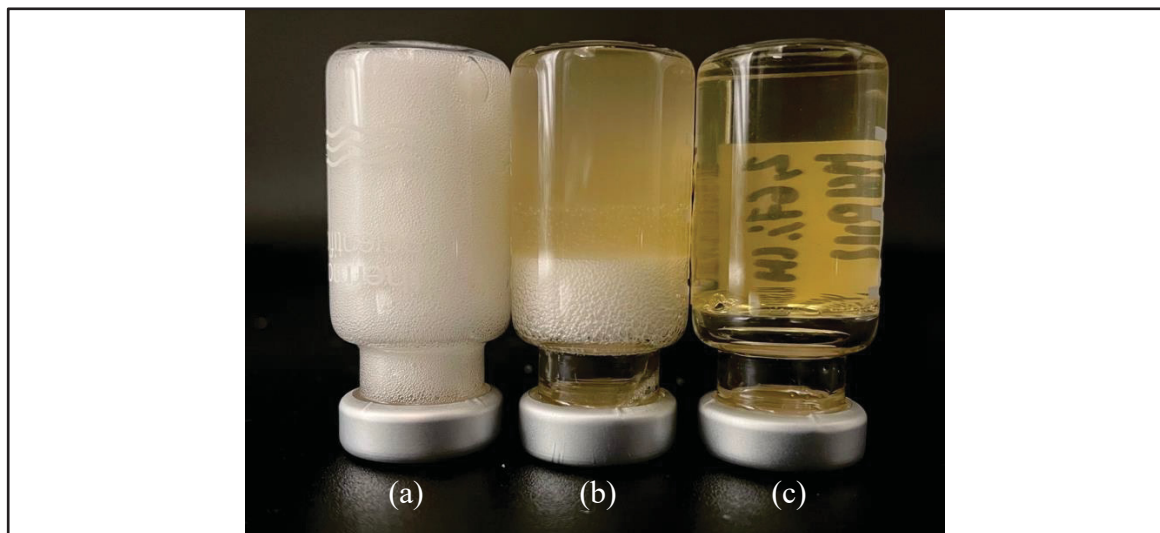


Figure 4.7. Fioles de la solution acide de chitosane-GelMA (a) lorsqu'aucun des polymères n'est autoclavé (b) lorsque seule la GelMA n'est pas autoclavée et (c) lorsque les deux sont autoclavés (121°C, 20 min), température ambiante

Comme observé à la section 4.1.3, même pour un DS~90%, les hydrogels de GM à 2%_{w/v} ne réticulent pas en présence de LAP à 0,05%_{w/v} et exposés pendant 10 min à la lumière bleue (405 nm, 7 mW/cm²). Toutefois, sur la Figure 4.8 la photopolymérisation de la GM à 2%_{w/v} peut être observée lorsqu'elle est ajoutée au réseau de CH (courbe jaune). Son module de stockage (G') initiale est plus faible que celui du CH mais augmente fortement une fois que la photo-réticulation de la GM est initiée. Ainsi même à de très faibles concentrations, la GM est capable de former un réseau covalent lorsqu'elle est ajoutée au CH.

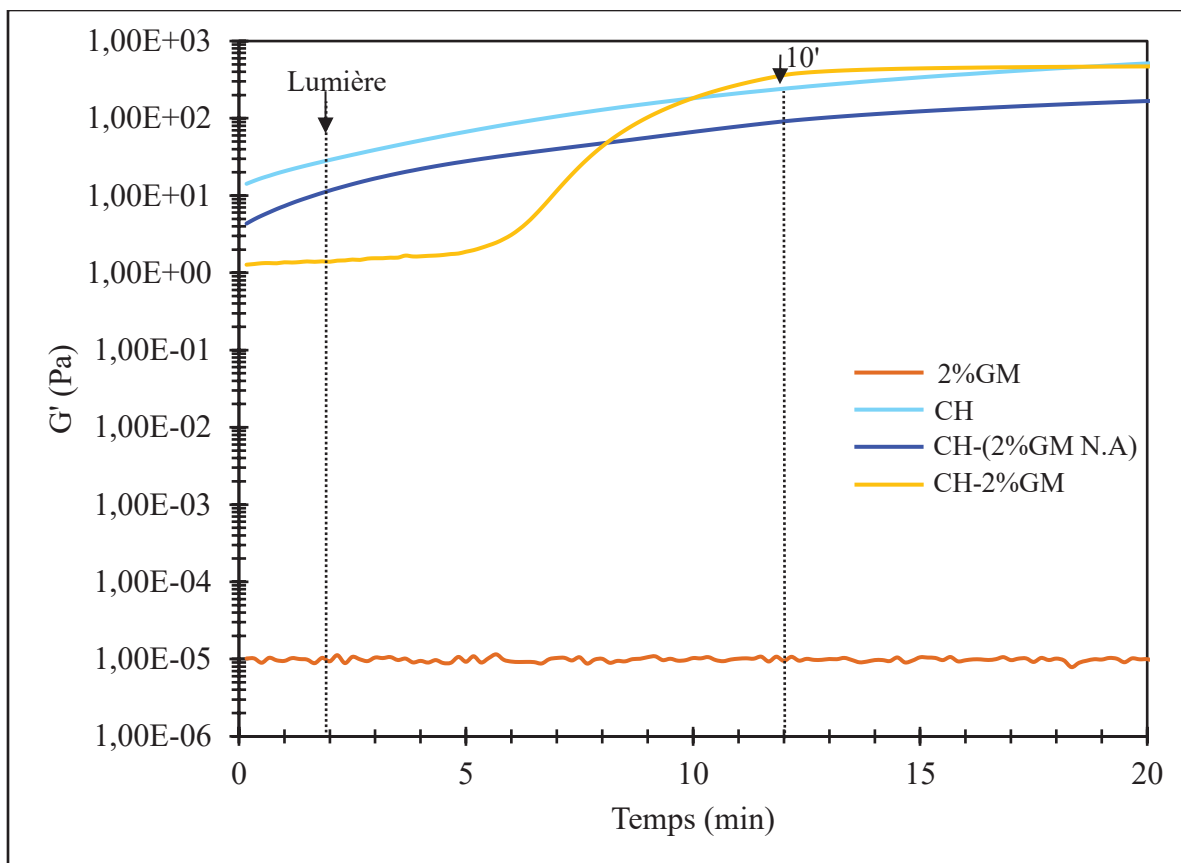


Figure 4.8. Module de stockage (G') des hydrogels de 1,67%chitosane (CH), de 2%GelMA DS~90% (2%GM), de 1,67%chitosane-2%GelMA DS~90% (CH-2%GM) et de CH-2%GM lorsque la GelMA n'est pas autoclavée (CH-(2%GM N.A)) lorsqu'exposés à la lumière bleue (405 nm) pendant 10 min et chauffés à 37°C en présence du photoinitiateur LAP et/ou des agents gélifiants (BGP/SHC)

Il est difficile d'observer l'effet de la température sur la réticulation des hydrogels de CH-GM en se basant uniquement sur les études rhéologiques. Afin de mieux comprendre l'effet de la réticulation chimique d'une part, et l'effet de la réticulation physique d'autre part, des tests de compression ont été réalisés sur les hydrogels de CH-GM DS90% lorsque la concentration en GM est de 2% ou 3%_{w/v}. Pour cela, les hydrogels ont soit uniquement été exposés à la lumière bleue pendant 10 min (Lumière), soit uniquement incubés à 37°C pendant 24 h (Température). Ils ont ensuite été comparés aux gels ayant d'abord été exposés à la lumière puis incubés 24 h à 37°C (Combinaison des deux).

Lorsque les hydrogels de CH-GM DS90% sont uniquement exposés 10 min à la lumière bleue ou uniquement incubés 24h à 37°C aucune modification apparente de leur volume n'est observée. En revanche, lorsqu'ils sont d'abord exposés 10 min à la lumière, puis incubés 24h à 37°C, les hydrogels se contractent (*i.e*, perdent en volume et leur diamètre rétrécit). La Figure 4.9 met en évidence la différence de diamètre observé chez les hydrogels de CH-2%GM DS60% (a) et ceux de CH-2%GM DS90% (b). Par exemple alors que le diamètre du CH-2%GM DS60% est de 14 mm, celui du CH-2%GM DS90% est de $11,7 \pm 1,2$ mm lorsqu'exposés à la lumière puis incubés à 37°C. Lorsqu'exposés à la lumière, le réseau riche en groupes méthacrylamides et méthacrylates (DS~90%) de la GM réagit et forme des liaisons covalentes. Sous l'effet de la chaleur, les chaînes de CH interagissent entre elles par des liaisons faibles. Toutefois, les chaînes de CH entremêlées dans le réseau chimique de la GM sont fortement contraintes. Il est possible que les chaînes polymériques du CH et de GM adoptent une conformation plus compacte pouvant accroître l'hydrophobicité de l'hydrogel. Par conséquent, une partie de l'eau est chassée du réseau engendrant la formation d'un hydrogel plus dense et rigide.

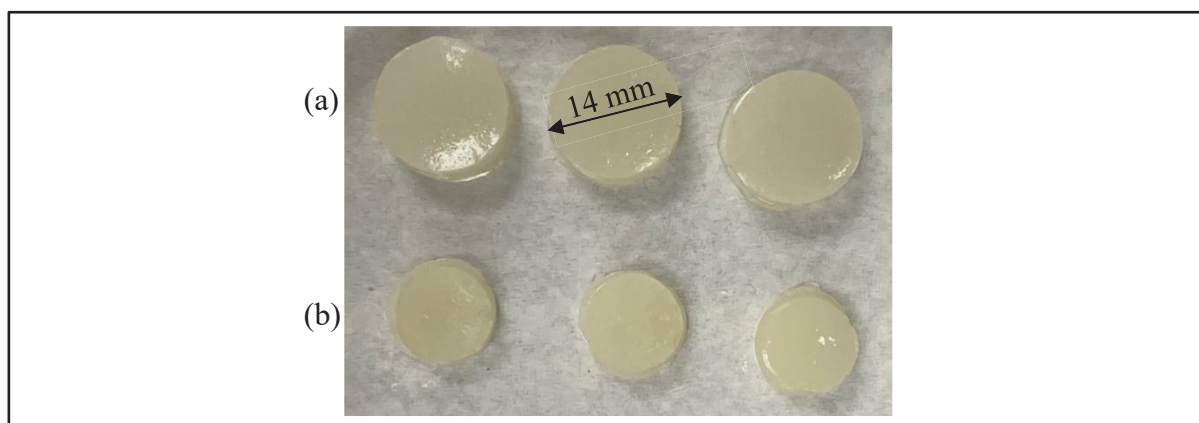


Figure 4.9. Hydrogels de 1,67%chitosane 2%GelMA (CH-2%GM) dont le DS est de 60% (a) ou 90% (b) après exposition 10 min à la lumière bleue (405 nm) puis incubation 24 h à 37°C

Une différence entre les différentes conditions de réticulation est observée, en particulier la différence est significative entre les conditions « Lumière » et « Combinaison des deux » lorsque 2%GM est ajoutée au CH ($p < 0,0001$). En effet, pour les hydrogels CH-2%GM le

module de compression à 20% de déformation vaut $9,2 \pm 2,9$ kPa lorsqu'exposés à la lumière, $19,5 \pm 2,7$ kPa lorsqu'incubés à 37°C et $37,6 \pm 6,4$ kPa lorsqu'exposés à la lumière et incubés à 37°C (Figure 4.10). Une légère différence (n.s) est observée entre les modes de réticulation pour les hydrogels de CH-3%GM mais avec des modules généralement plus bas. Les résultats semblent mettre en évidence un effet synergique de la réticulation physique et chimique sur la résistance à la compression des hydrogels de CH-GM. Le mécanisme de réticulation est résumé sur la Figure 4.11. Lorsque l'hydrogel est exposé à la lumière, les liaisons doubles C=C des groupes méthacrylates et méthacrylamides de la GM forment des liaisons covalentes formant ainsi un gel chimique (réticulation chimique) dans lesquelles les chaînes de CH sont « emprisonnées ». Lorsque l'hydrogel est chauffé à 37°C, le transfert de protons du CH vers les agents gélifiants est accéléré permettant aux chaînes de CH à leur tour d'interagir via des liaisons faibles (réticulation physique). Les chaînes de CH et de GM s'entremêlent sans que des liaisons covalentes ne se forment entre elles : il s'agit d'un réseau interpénétré de polymères (IPN). Lorsque seulement un des polymères (CH ou GM) est réticulé (solution soumise seulement à la lumière ou à la température), alors il s'agit d'un semi-IPN. Avec 3%_{w/v} de GM la flexibilité des chaînes est réduite, ce qui explique peut-être le plus faible gain obtenu en combinant lumière et chauffage.

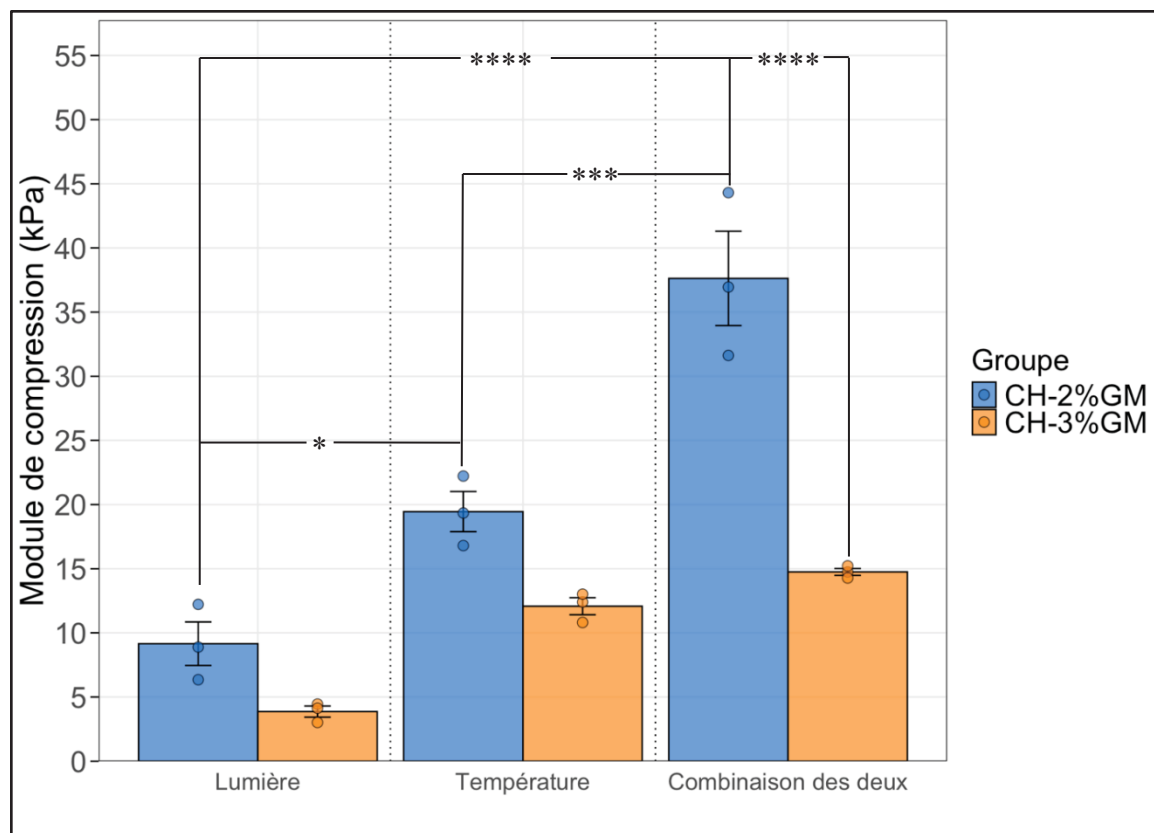


Figure 4.10. Module sécant à 20% de déformation (kPa) des hydrogels de Chitosane-GelMA DS~90% avec 2%_{w/v} (CH-2%GM) ou 3%_{w/v} de GelMA (CH-3%GM) lorsqu'exposés à la lumière et/ou incubés 24h à 37°C, n=3 (RStudio). Test ANOVA suivi du test de Tukey : p-value < 0,05 : *, p-value < 0,01 : ** p-value < 0,001 : *** et p-value < 0,0001 : ****

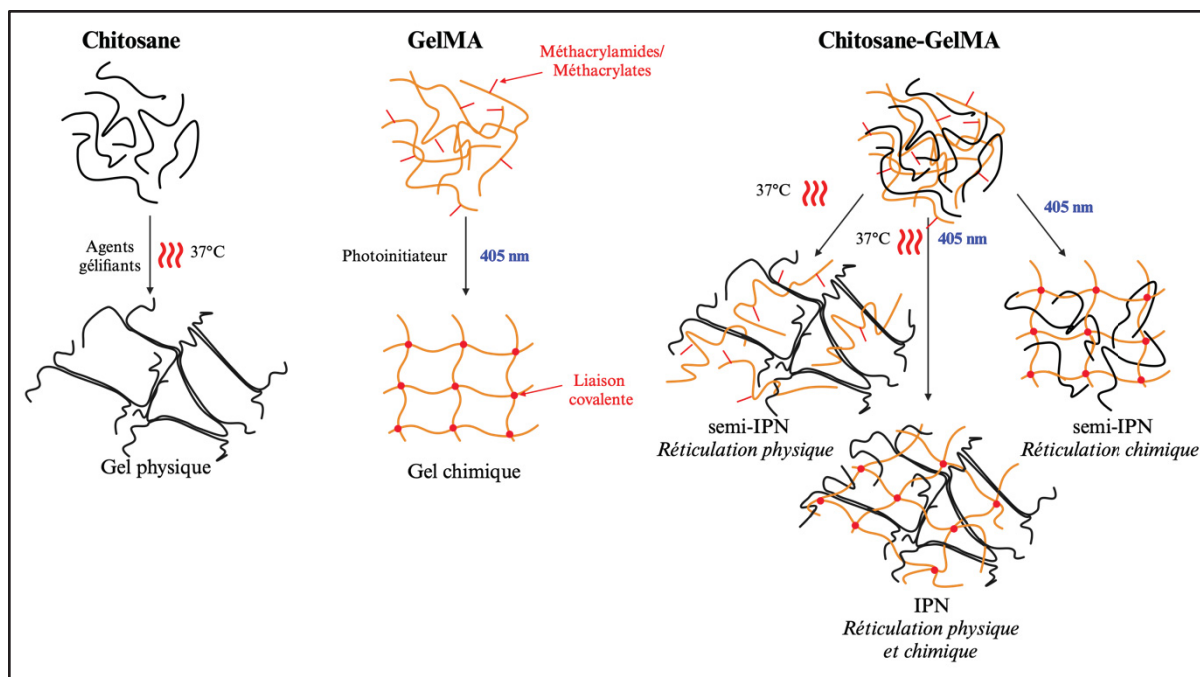


Figure 4.11. Formation de réseaux de polymères interpénétrés (IPN) ou semi-IPN à base de chitosane et de GelMA (BioRender)

4.2.2 Analyse par Infrarouges

Des analyses infrarouges à transformées de Fourier (IRTF) ont été réalisées pour évaluer la photopolymérisation des hydrogels à base de GM et comprendre les liaisons impliquées dans le mélange à base de CH et de gélatine/GM. Dans un premier temps, la GM lyophilisée (DS=60 ou 90%), référée comme GM non réticulée, et les hydrogels de gélatine et GM de type A ont été analysés (Figure 4.12). Les spectres de la gélatine et de la GM présentent les pics caractéristiques des amides primaire (C=O), secondaire (N-H) et tertiaire (N-H) à 1636 cm^{-1} , 1542 cm^{-1} et 1237 cm^{-1} respectivement. À environ 3290 cm^{-1} , peut également être observé le pic associé au signal des groupes O-H et N-H. Lorsque la GM n'est pas réticulée, un léger pic correspondant aux signaux $=\text{C-H}$ et $\text{C}=\text{C-H}_2$ des groupes méthacrylates et méthacrylamides peut être observé à 558 cm^{-1} . Le signal correspondant à la double liaison carbone-carbone se superpose avec celui de l'amide primaire, et est plus intense pour la GM non réticulée, en particulier pour celle dont le DS est de 90%. L'intensité des pics de l'amide I est quasiment identique chez la gélatine et la GM ayant été photopolymérisée quel que soit son DS. Ces

résultats démontrent que la réticulation de la GM s'est réalisée avec succès puisque les doubles liaisons ont permis de former des liaisons covalentes.

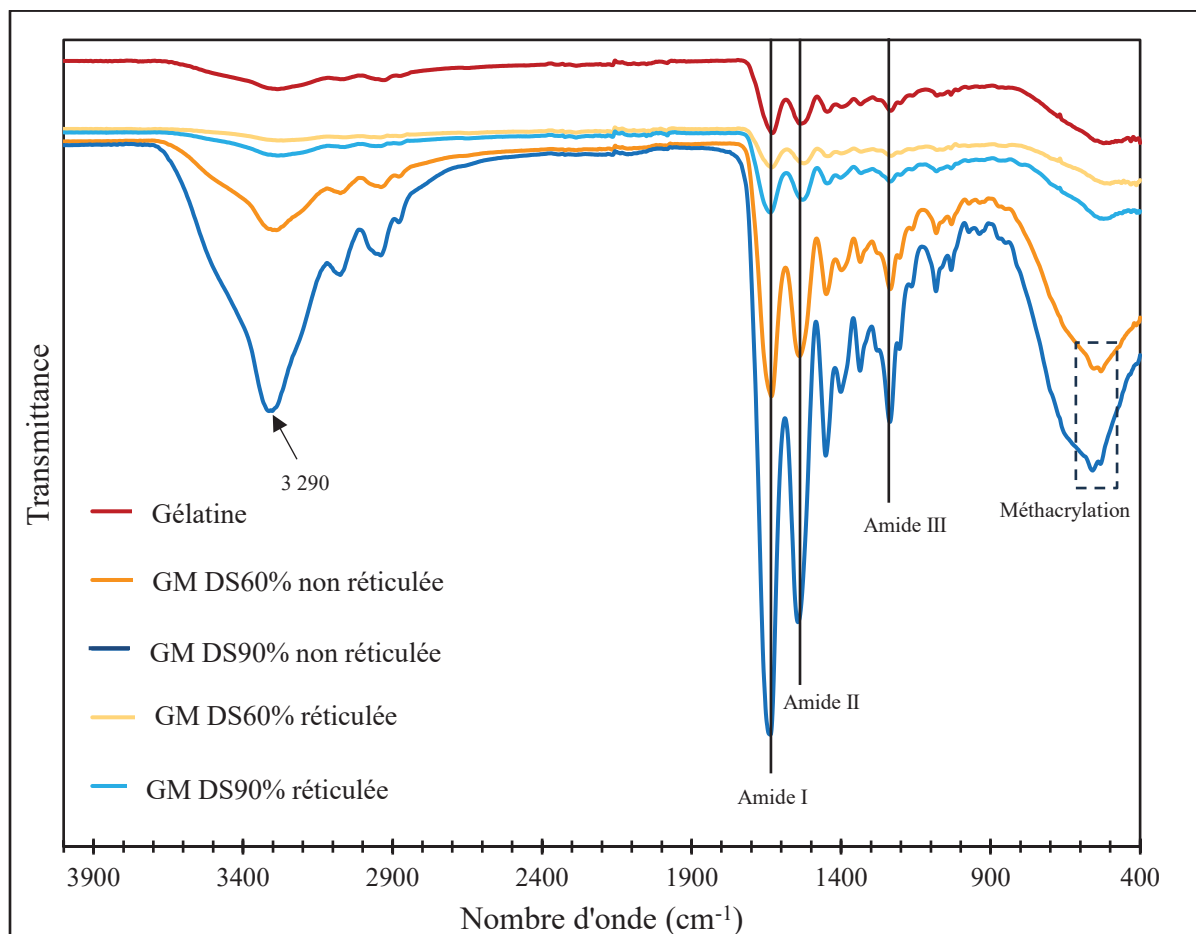


Figure 4.12. Spectres infrarouges de la GelMA type A avec un degré de substitution de 60 ou 90% photo réticulée ($t=10$ min, $\lambda=405$ nm) ou non ainsi que de la gélatine type A

Dans un second temps, les spectres des hydrogels thermosensibles de CH, CH-Gélatine et de CH-GM (DS=60 ou 90%) réticulés en présence des agents gélifiants sont comparés dans la Figure 4.13. La large bande caractéristique des signaux O-H et N-H entre 3100 cm^{-1} et 3600 cm^{-1} est également présente sur le spectre du CH. D'autres bandes caractéristiques sont observées comme celles correspondant à l'amide I et l'amide II à environ 1658 et 1583 cm^{-1} respectivement. Entre 900 et 1050 cm^{-1} , des bandes intenses caractéristiques des groupes phosphates (P-O, P-O-C et P=O) apparaissent sur les spectres et témoignent de la présence du

β -glycérophosphate (BGP). Il est difficile d'observer la présence de pics caractéristiques du bicarbonate de sodium (SHC) puisque celui-ci se transforme en CO_2 une fois mélangé à la solution acide de chitosane. Les hydrogels n'ayant pas été rincés avant d'être lyophilisés présentent des traces des agents gélifiants qui sont restés piégés dans le réseau polymérique. Ces résultats concordent avec ceux trouvés dans la littérature (Assaad et al., 2015).

Enfin, les hydrogels de CH-Gélatine et de CH-GM présentent à la fois les pics caractéristiques du CH thermosensible et de la gélatine ou de la GM réticulée, montrant que les deux composants n'ont pas été dégradés lors de la réaction. L'absence de nouvelle bande sur ces hydrogels met en avant qu'aucune liaison covalente ne s'est créée entre les polymères de CH et de GM/gélatine.

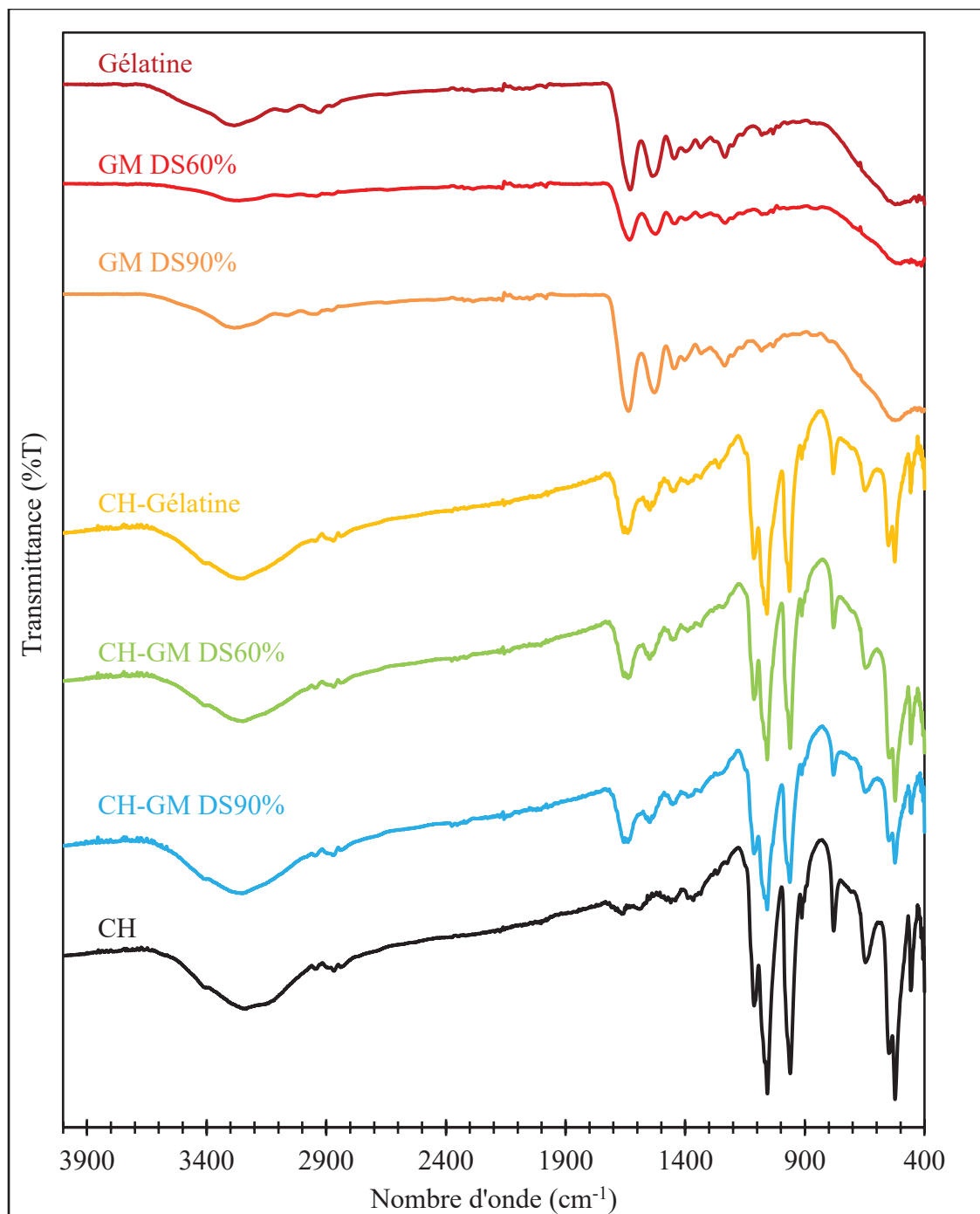


Figure 4.13. Spectres infrarouges à transformée de Fourier des hydrogels de chitosane (CH), de gélatine et GelMA de type A (DS=60 ou 90%) ainsi que des hydrogels de chitosane-Gélatine (CH-Gélatine) et chitosane-GelMA (CH-GM) ayant été réticulés en présence d'agents gélifiants (37°C) et/ou photopolymérisés ($t=10$ min, $\lambda = 405$ nm)

4.2.3 Effet du DS et de la concentration en GelMA

Afin de mieux comprendre la réticulation et d'optimiser les formulation, l'impact de plusieurs paramètres sur les propriétés rhéologique et en compression des IPN a été étudié, notamment la concentration en GM ainsi que son DS la concentration en photoinitiateur ou encore la concentration initiale en acide chlorhydrique (HCl) utilisée lors de la préparation du mélange prépolymère (ces derniers résultats sont présentés en ANNEXE II, p.104).

Tel que montré à la Figure 4.14, l'ajout de GM au CH ralentit la cinétique de gélification à 37°C de ce-dernier. En effet, la gélification du CH en présence du BGP et du SHC est très rapide et commence avant même lancement du test de rhéologie ($G' < G''$). En revanche, la cinétique de gélification en présence de la gélatine à 2%_{w/v} est plus lente et prend environ deux minutes (courbe verte Figure 4.14). Plus le DS de la GM augmente, plus la cinétique de gélification est ralentie en l'absence d'exposition à la lumière. Ces résultats peuvent être la conséquence d'un encombrement stérique dû au groupes méthacrylates et méthacrylamides.

Cette idée est renforcée d'après la Figure 4.15 lorsque le CH-GM est exposé simultanément à la lumière et à 37°C. En effet, l'ajout de la gélatine/GM au CH abaisse la valeur du module de stockage quel que soit le DS. L'encombrement stérique semble entraver la gélification physique du CH et cela d'autant plus que le réseau de GM photopolymérise. Lorsque la concentration en GM est fixée à 2%_{w/v} (Figure 4.15), la photopolymérisation est davantage observée lorsque le DS augmente (cohérent avec résultats de la section 4.1.4) mais G' se stabilise plus rapidement pour un DS égal à 90%. La photopolymérisation semble alors fortement prédominer.

Tel que présenté en ANNEXE II, p.108, la densification du réseau de GM (GM=3%_{w/v}) semble davantage restreindre la gélification du CH. L'impact du DS semble être réduit lorsque la concentration en GM est de 3%_{w/v}. En effet, contrairement à une concentration en GM équivalente à 2 ou 5%_{w/v}, les courbes des hydrogels de CH-GM sont plus proches les uns des autres notamment pour un DS de 40 et 60%.

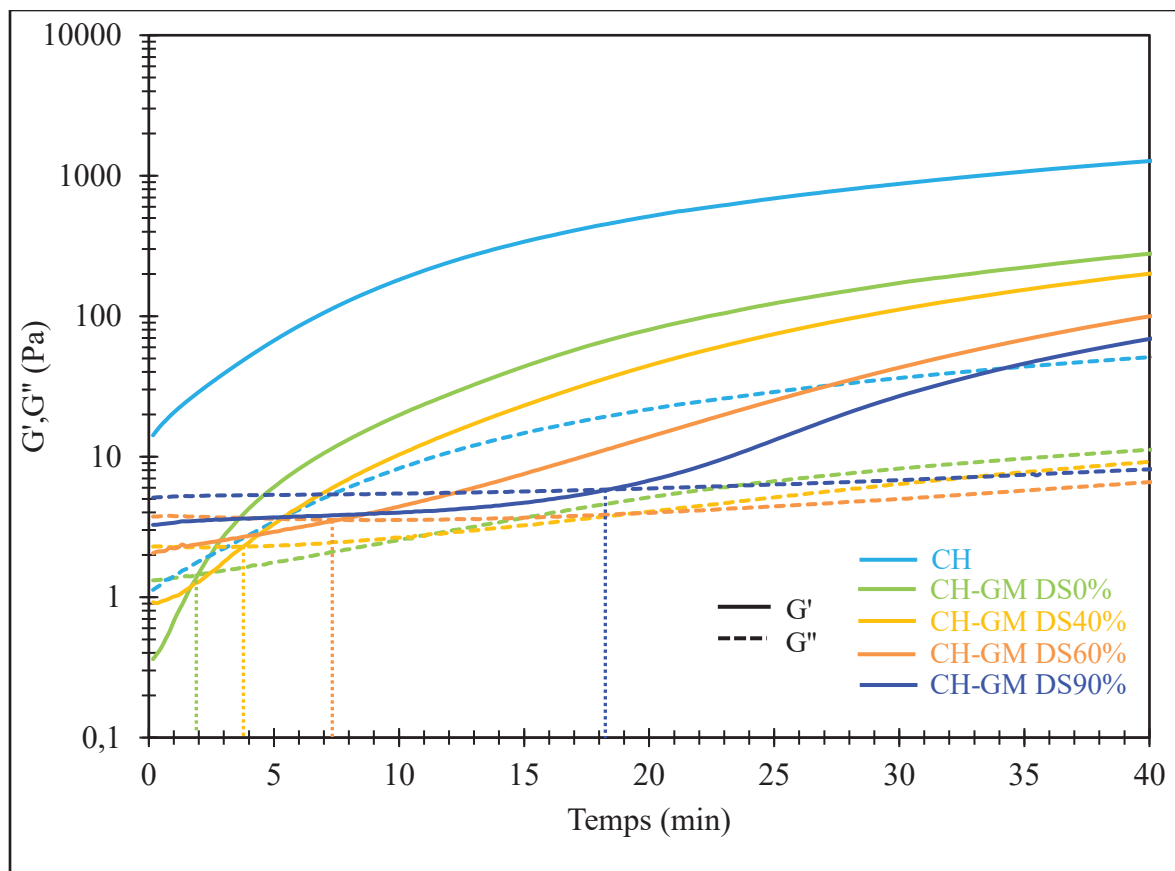


Figure 4.14. Modules de stockage (G') et de perte (G'') des hydrogels de 1,67%Chitosane et 1,67%Chitosane-2%GelMA DS=0, 40, 60 ou 90% lorsque réticulés à 37°C en présence d'agents gélifiants (pas d'exposition à la lumière), $n \geq 3$

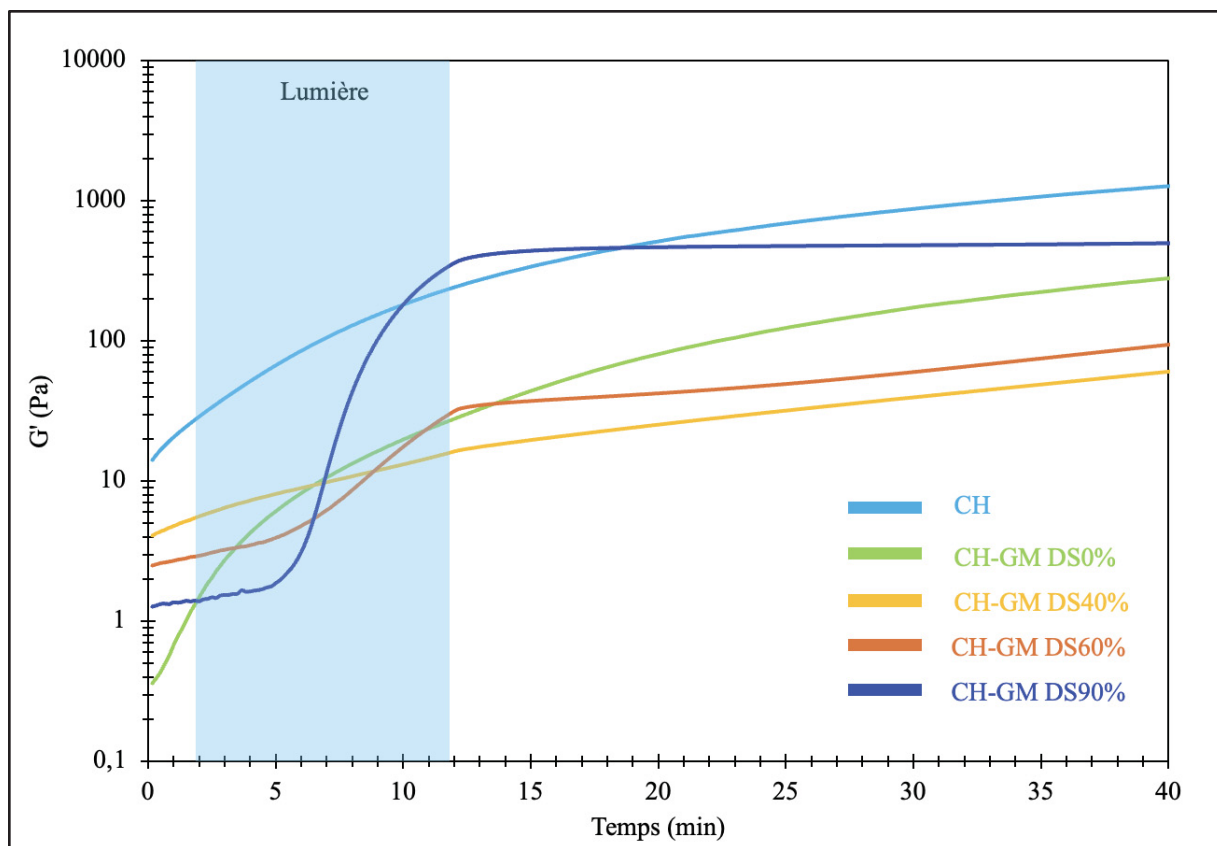


Figure 4.15. Effet du degré de substitution (DS) sur le module de stockage (G') des hydrogels de chitosane (CH), de chitosane-gélatine (CH-GM DS0%) et de chitosane-GelMA (CH-GM) à une concentration en gélatine/GelMA fixée à 2%_{w/v}. Hydrogels réticulés à 37°C en présence d'agents gélifiants et/ou photopolymérisés en présence du photoinitiateur LAP (0,05%_{w/v}, $t=10$ min), $n \geq 3$

Les propriétés mécaniques des différentes formulations à base de chitosane-Gélatine (CH-GM DS0%) et de chitosane-GelMA (CH-GM DS40, 60 ou 90%) ont ensuite été évaluées en compression uni axiale jusqu'à 80% de déformation. La reproductibilité des différents lots de CH-GM DS90% a été évaluée et est présenté en ANNEXE III, p.111.

À l'exception du CH-3%Gélatine (CH-3%GM DS0%), une amélioration du module de compression est observée pour toutes les formulations par rapport aux hydrogels de CH (Figure 4.16 a). Les meilleures propriétés mécaniques sont obtenues pour les IPN contenant seulement 2% de gélatine ou GM, en particulier lorsque le DS vaut 90%. Pour les formulations contenant de la GM, le module tend à légèrement augmenter en fonction du DS et s'accompagne d'une

augmentation de la variabilité. Ainsi, le module sécant à 20% de déformation du CH-2%GM DS60% et CH-2%GM DS90% sont de $20,6 \pm 6,8$ kPa et de $30,5 \pm 10,1$ kPa, respectivement contre environ 7 kPa pour le CH seul. La différence est surtout marquée en termes de contrainte à la rupture (>300 kPa au lieu de 36 kPa pour le CH seul) (Figure 4.16 b). Les IPN contenant 3 ou 5%_{w/v} de GM n'atteignent pas ces valeurs, surtout en termes de résistance à la rupture. Une baisse s'observe aussi en termes de déformation à la rupture par rapport aux IPN contenant 2%_{w/v} de GM.

Il est également possible d'émettre l'hypothèse que plus le DS est élevé dans les hydrogels de CH-2%GM, plus l'hydrogel gagne en stabilité lorsqu'immergé en milieu aqueux à 37°C.

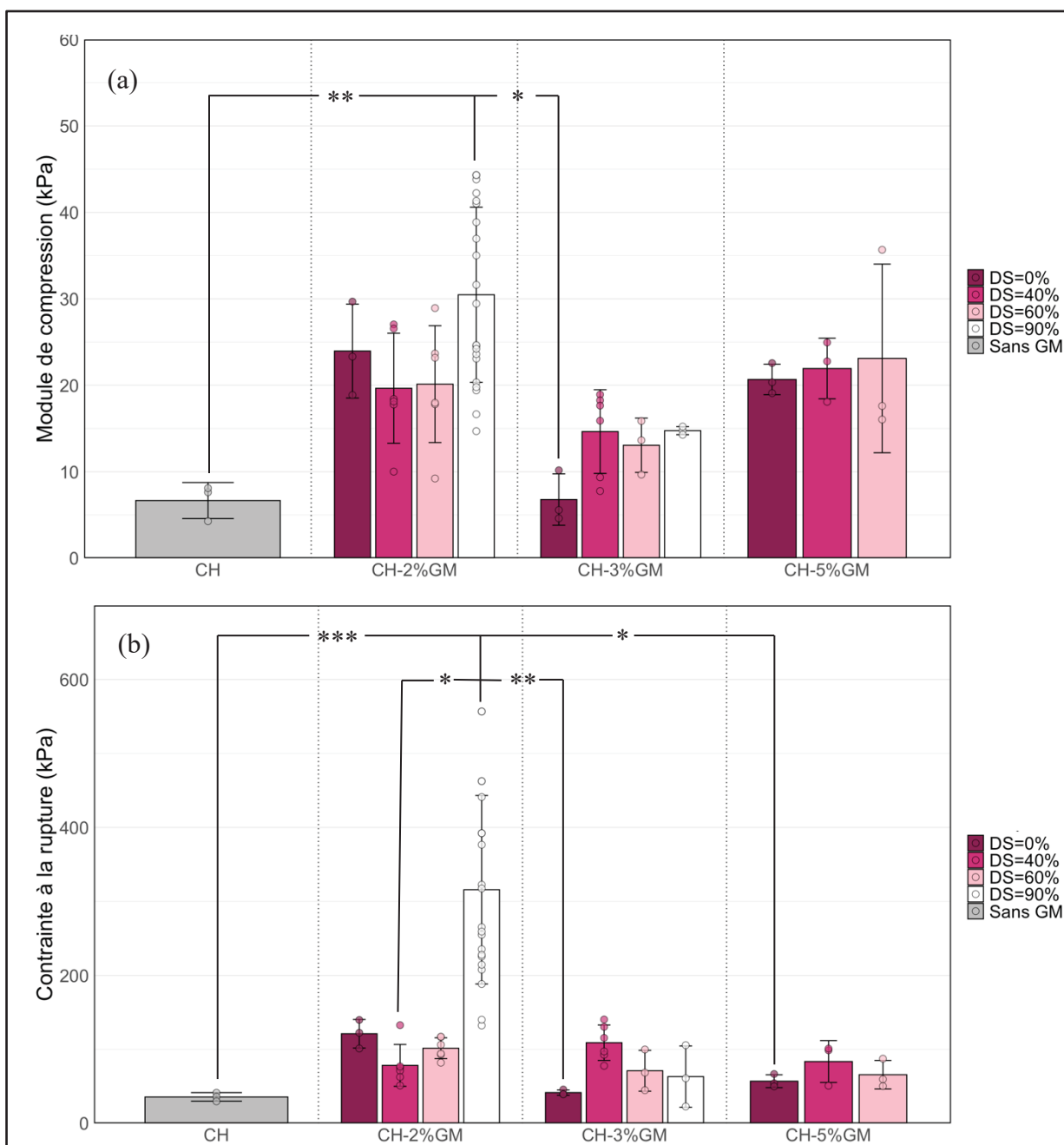


Figure 4.16. Effet du degré de substitution (DS) sur (a) le module sécant à 20% de déformation, (b) la contrainte à la rupture et des hydrogels de chitosane-GelMA (CH-GM) pour différentes concentrations en GelMA (GM) (2%_{w/v}, 3%_{w/v} et 5%_{w/v}), $n \geq 3$ (RStudio) DS=0% : gélatine. Test de Kruskal-Wallis suivi du test post-hoc de Dunn – p-value ajustée (correction de Bonferroni) $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: *** et $p < 0,0001$: ****

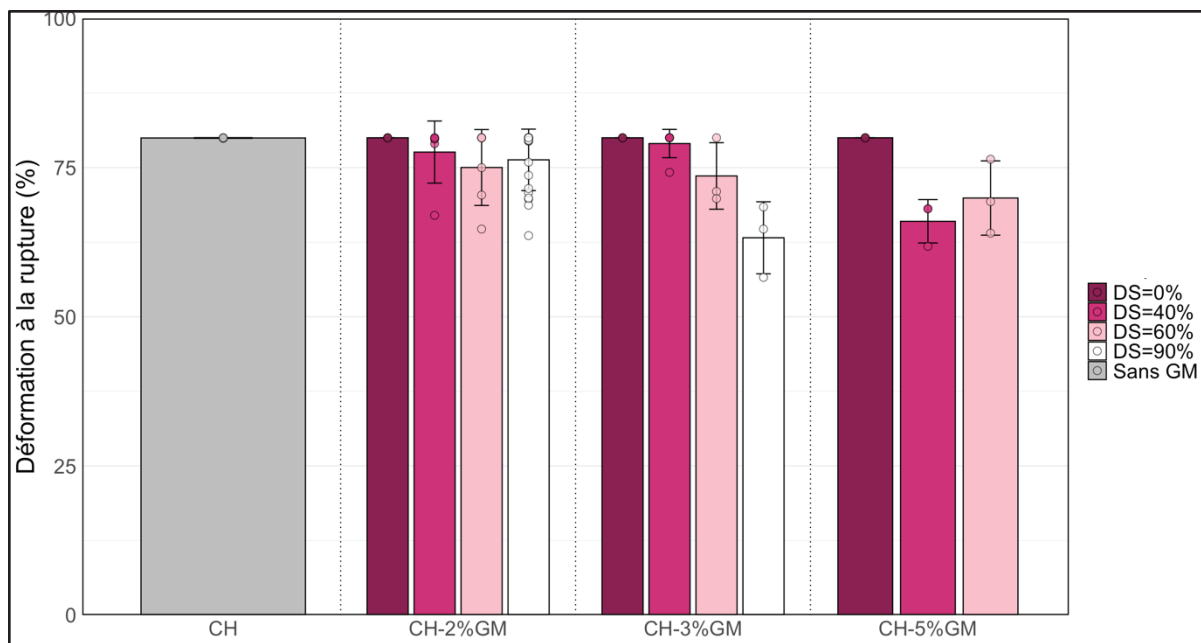


Figure 4.17. Effet du degré de substitution (DS) sur la déformation à la rupture des hydrogels de chitosane-GelMA (CH-GM) pour différentes concentrations en GelMA (GM) (2%_{w/v}, 3%_{w/v} et 5%_{w/v}), $n \geq 3$ (RStudio)

4.2.4 Chargement cyclique

Les IPN de CH-2%GM montrant les meilleures propriétés mécaniques, ont été conservés pour les analyses suivantes, notamment lors de tests de compression cyclique jusqu'à 20% de déformation (Figure 4.18 et Figure 4.19). Afin d'évaluer la relaxation des hydrogels, ces derniers ont été maintenus à 20% de déformation pendant 10 s avant que le piston de compression ne retourne à sa position initiale. Ces tests confirment le net avantage de l'IPN CH2%GM DS90% (p ajusté proche de la significativité). Sur les courbes, on constate une large hystérésis au 1^{er} cycle et une déformation permanente de l'échantillon. La valeur du module sécant à 20% de déformation du CH reste relativement stable au cours des différents cycles de compression : $6,6 \pm 2,1$ kPa (cycle 1) et $6,5 \pm 1,5$ (cycle 20). Ces résultats suggèrent que le réseau du CH s'adapte rapidement une fois contraint. Au contraire, les courbes hystérésis des hydrogels de CH-2%Gel et CH-2%GM s'amincissent et s'affaissent au cours des cycles s'accompagnant d'une diminution de la variation de la contrainte $\Delta\sigma$ et de la variation de déformation $\Delta\epsilon$ (Figure 4.19 b, c, d et a). De la même manière, la valeur du module sécant à

20% de déformation diminue drastiquement entre le premier et le dernier cycle. En effet, la valeur du module du CH-2%Gel au premier cycle est de $22,5 \pm 6,3$ kPa tandis qu'elle vaut $6,6 \pm 1,5$ kPa au dernier cycle. Des valeurs quasi-similaires sont obtenues pour le CH-2%GM DS40 et 60%. Toutefois, le module sécant du CH-2%GM DS90% vaut $64,1 \pm 20,7$ kPa lors du premier cycle et $41,2 \pm 13,0$ kPa lors du dernier cycle. Malgré l'affaiblissement de la résistance à la fatigue causé par l'ajout de la gélatine ou de la GM au CH, les résultats mettent en évidence qu'une augmentation considérable du DS permet d'accroître la rigidité initiale et maintenir une rigidité supérieure aux autres hydrogels après 20 cycles de déformation à 20%.

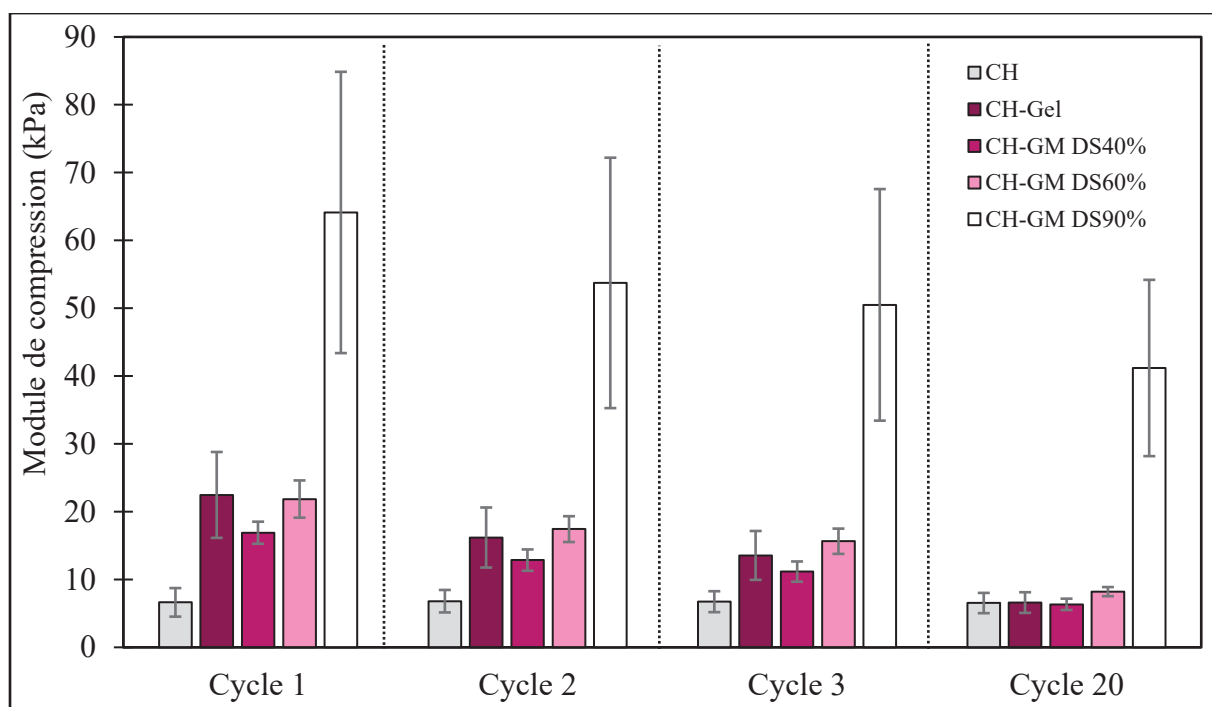


Figure 4.18. Évolution du module sécant à 20% de déformation des hydrogels de CH CH-2%Gélatine (CH-Gel), CH-2%GelMA avec différents degrés de substitution (DS) au cours de différents cycles de compression, tests de Kruskal-Wallis (p -value > 0,05), $n=3$
CH : chitosane

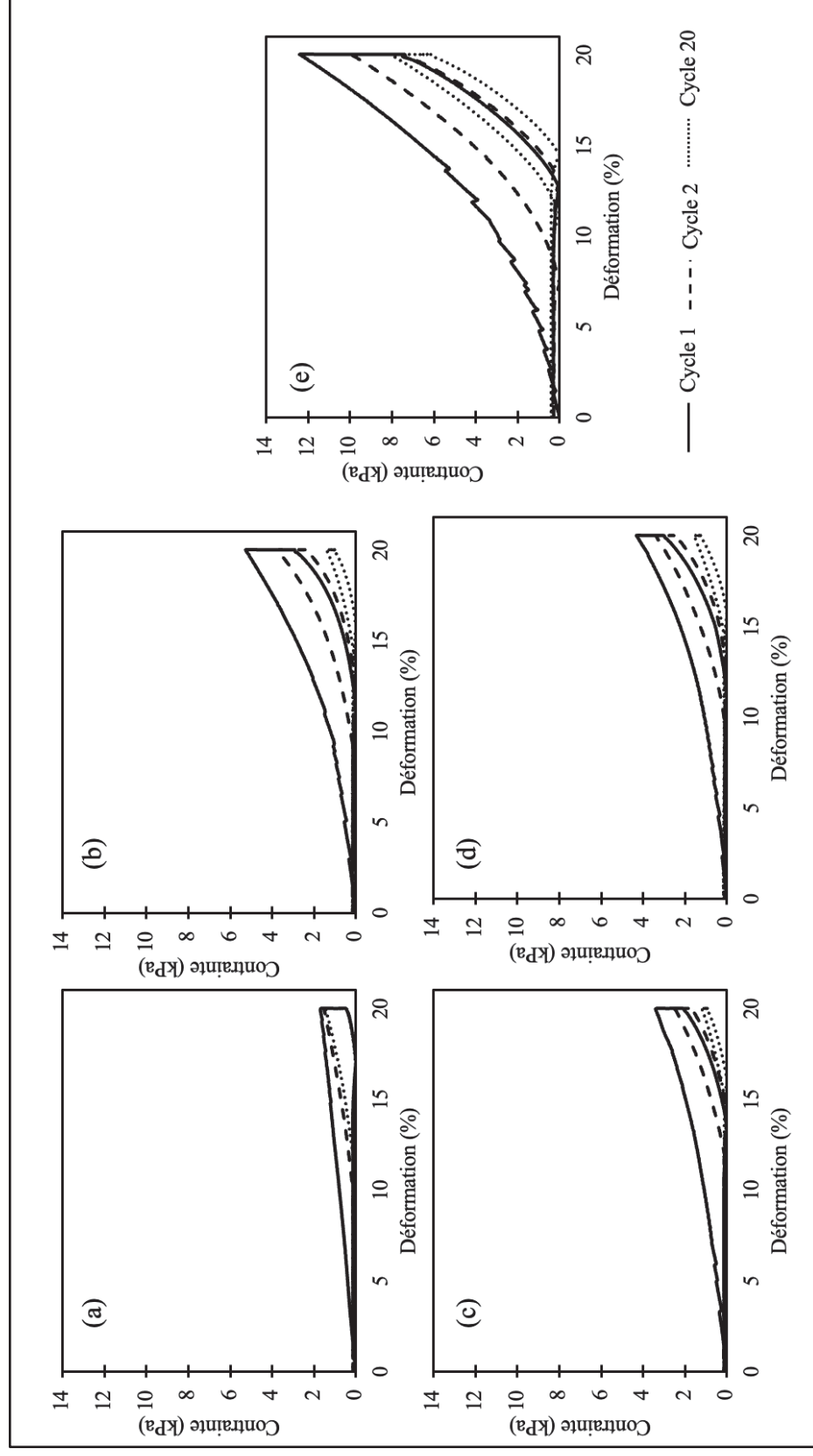


Figure 4.19. Courbes hystérésis des hydrogels de (a) 1,67%CH (b) 1,67%CH-2%Gélatine (c) 1,67%CH-2%GelMA DS40% (d) 1,67%CH-2%GelMA DS60% et (e) 1,67%CH-2%GelMA DS90% réticulés en présence d'agents gélifiants et/ou de photoinitiateur (LAP 0,05%_{w/v}, 405 nm, 10 min) puis testés en compression cyclique jusqu'à 20% de déformation, n=3
CH : chitosane

4.2.5 Étude de la stabilité des propriétés mécaniques après immersion

Comme observé dans les sections précédentes, les propriétés mécaniques des hydrogels de CH-2%GM dont le DS est de 40 ou 60% sont relativement proches. Ainsi, seule la stabilité après 7 jours d'immersion en milieu aqueux (PBS 1X ou milieu de culture DMEM complet) à 37°C des hydrogels de CH, CH-2%GM DS=0%, 60% et ~90% a été étudiée.

Les modules de compression des hydrogels de CH, CH-2%GM DS=0 ou 60% sont relativement stables après 7 jours d'immersion dans le PBS ou DMEM complet (Figure 4.20 a). Seule une augmentation significative des modules de compression (immersion : $p < 0,05$ et sans immersion : $p < 0,01$) et de la contrainte à la rupture (PBS : $p < 0,01$; DMEM : p proche de la significativité et sans immersion : $p < 0,05$) est observée pour le CH-2%GM DS90% par rapport au CH seul. Toutefois, une augmentation (n.s) du module est observée pour le CH-2%GM DS90% après immersion à 37°C. Comme vu à la section 4.2.1, les hydrogels de CH-2%GM DS90% présentent une certaine hydrophobicité. Le PBS 1X et le milieu de culture complet sont des solvants hydrophiles. Après une immersion prolongée dans ces solvants, il se peut que les chaînes du réseau de CH-2%GM DS90% subissent un réarrangement au cours du temps, densifiant davantage l'hydrogel et donc augmentant son module de compression : $90,3 \pm 36,7$ kPa (PBS 1X) ou $90,4 \pm 13,5$ kPa (DMEM complet) et sa contrainte à la rupture : $606,2 \pm 137,4$ kPa (PBS 1X) ou $465,2 \pm 144,0$ kPa (DMEM complet) (Figure 4.20 b).

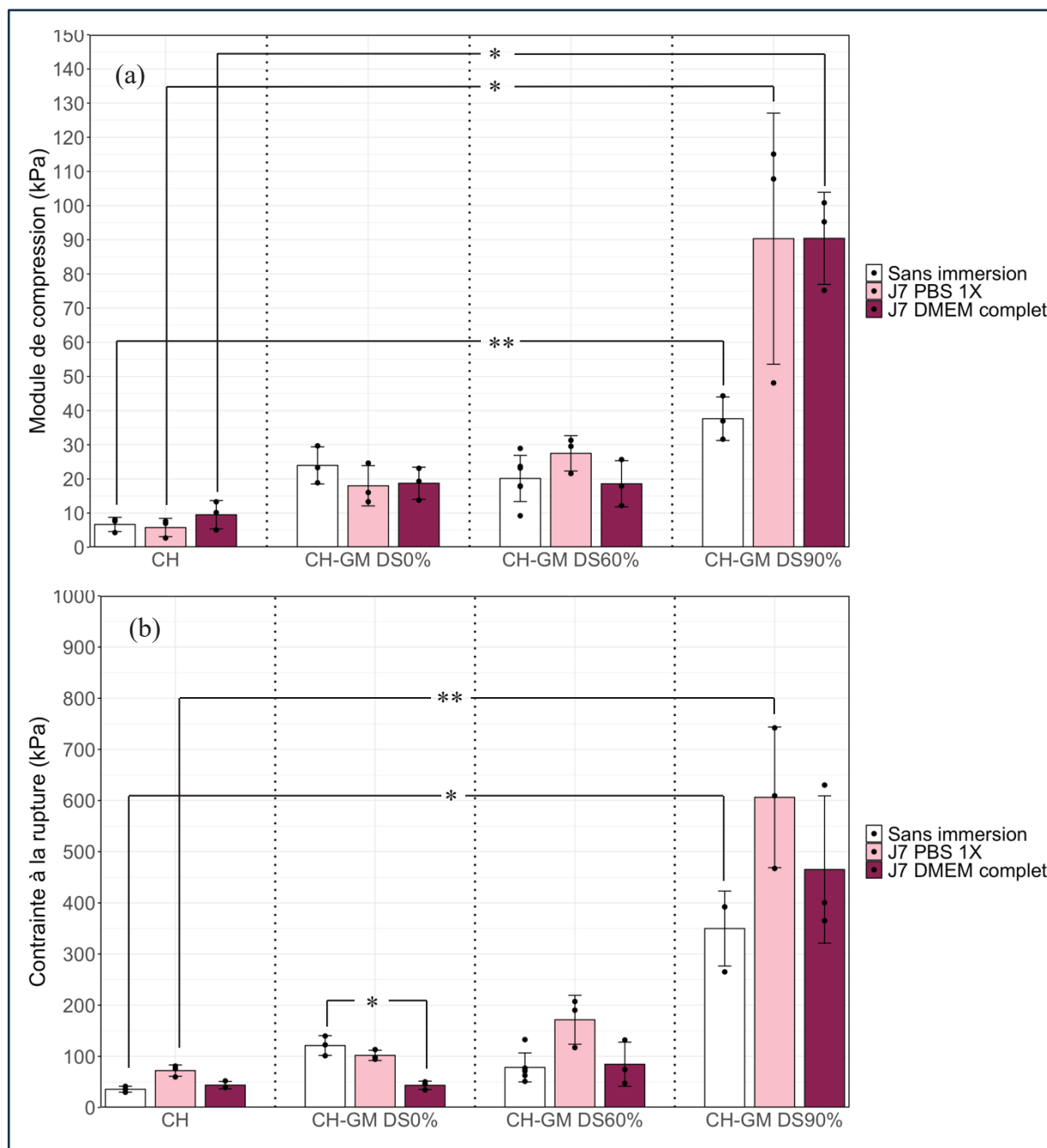


Figure 4.20. (a) Module sécant à 20% de déformation et (b) contrainte à la rupture des hydrogels de 1,67%chitosane HCl 0,12 M (CH), de 1,67%chitosane-2%gélatine (CH-GM DS0%), de 1,67%chitosane-2%GelMA DS60% (CH-GM DS60%) et de 1,67%chitosane-2%GelMA DS90% (CH-GM DS90%) lorsque non immergé en milieu aqueux et sept jours après immersion dans le PBS 1X ou milieu de culture DMEM complet, $n \geq 3$ (RStudio) Test de Kruskal-Wallis suivi du test post-hoc de Dunn (p-value ajustée par la correction de Bonferroni) : $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: *** et $p < 0,0001$: ****

4.2.6 Effet de la concentration en photoinitiateur et du temps d'exposition

Pour permettre l'encapsulation cellulaire, des tests de rhéologie supplémentaires ont été réalisés afin d'évaluer la possibilité de diminuer au moins par deux le temps d'exposition à la lumière bleue (405 nm) des hydrogels de CH-2%GM DS90% et sont présentés sur la Figure 4.21. Le module de stockage G' augmente avec l'augmentation de la concentration en photoinitiateur et/ou le temps d'exposition à la lumière. La photopolymérisation s'initie 2 min après activation de la lumière en présence de LAP à 0,1%_{w/v}. Au contraire, le temps de latence est deux fois plus élevé lorsque la concentration en LAP est divisée par deux. Aucune photopolymérisation n'est observée pour la condition LAP 0,05%_{w/v} et $t=5$ min. Ce résultat n'est pas surprenant puisque la photo-réticulation du CH-GM avec le LAP 0,05%_{w/v} s'initie quelques secondes avant d'éteindre la lumière. Ces résultats suggèrent qu'il est envisageable de diviser le temps d'exposition par deux en doublant la concentration en LAP, malgré un affaiblissement du module G' .

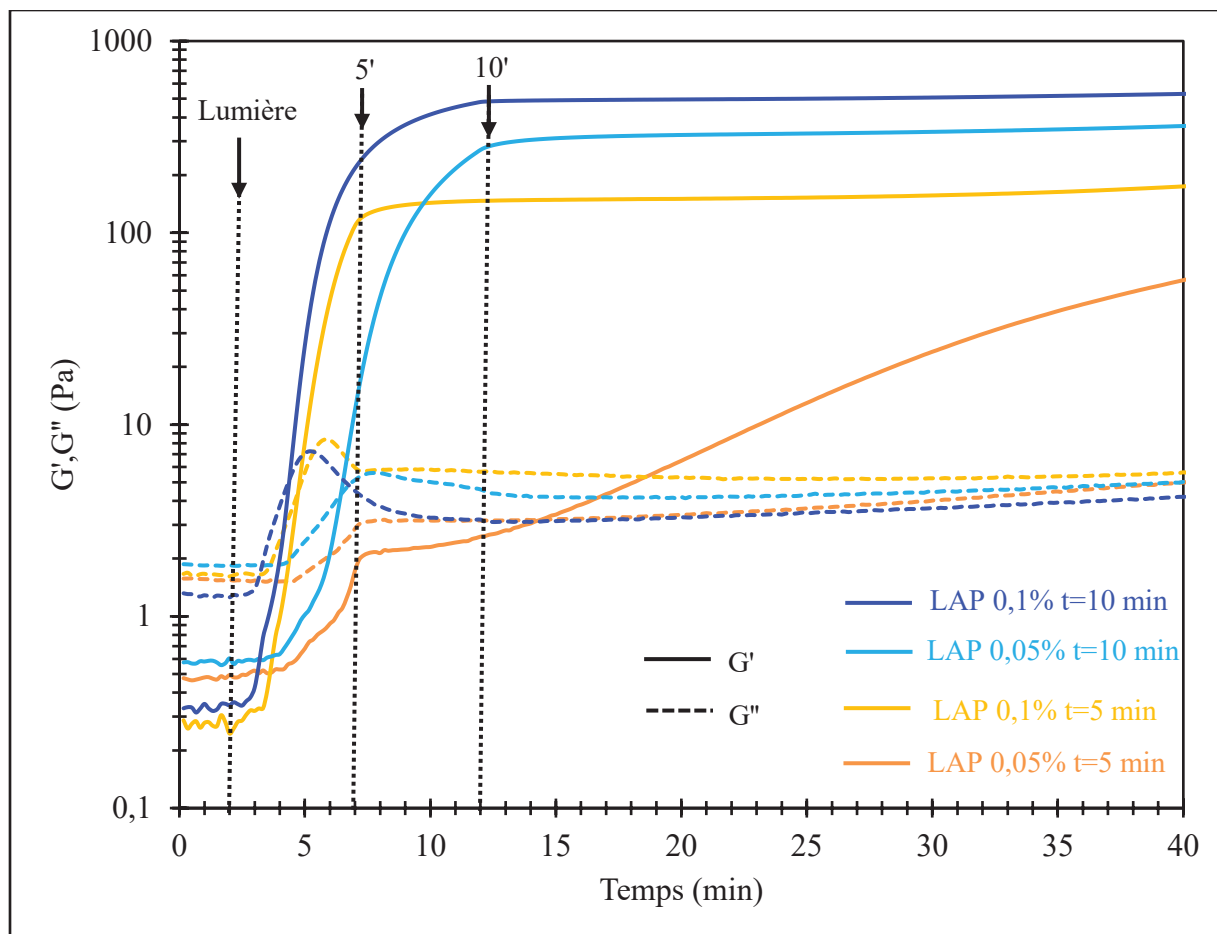


Figure 4.21. Cinétique de gélification des hydrogels de 1,67%Chitosane-2%GelMA DS90% (CH-2%GM DS90%) en fonction de la concentration du photoinitiateur LAP (0,05% ou 0,1%_{w/v}) et du temps d'exposition à la lumière bleue (5 ou 10 min), $n=3$, $T=37^{\circ}\text{C}$

Seuls les systèmes [concentration LAP/temps d'exposition] permettant la réticulation chimique du CH-2%GM DS90% ont été testés en compression. Ainsi d'après la Figure 4.22, les hydrogels exposés pendant 5 min en présence de LAP à 0,1%_{w/v} possèdent le plus faible module de compression (à 20% de déformation) tandis que les hydrogels exposés pendant 10 min pour la même concentration en LAP présentent le plus haut module de compression : 12 ± 3 kPa et 66 ± 15 kPa respectivement. La même tendance est observée pour la contrainte à la rupture : 162 ± 72 kPa (LAP 0,1%_{w/v}, $t=5$ min) ; 279 ± 59 kPa (LAP 0,05%_{w/v}, $t=10$ min) et 451 ± 49 kPa (LAP 0,1%_{w/v}, $t=10$ min). Ces résultats concordent avec ceux trouvés dans la littérature. En effet, plus la concentration en photoinitiateur est élevée ainsi que le temps

d'exposition, le réseau de GM forme davantage de liaisons covalentes tendant à densifier le réseau polymérique et accroître sa résistance mécanique (He et al., 2023). Ainsi, en vue de diviser le temps d'exposition par deux, il est envisageable de doubler la concentration en LAP, mais cela a un impact négatif sur les propriétés mécaniques.

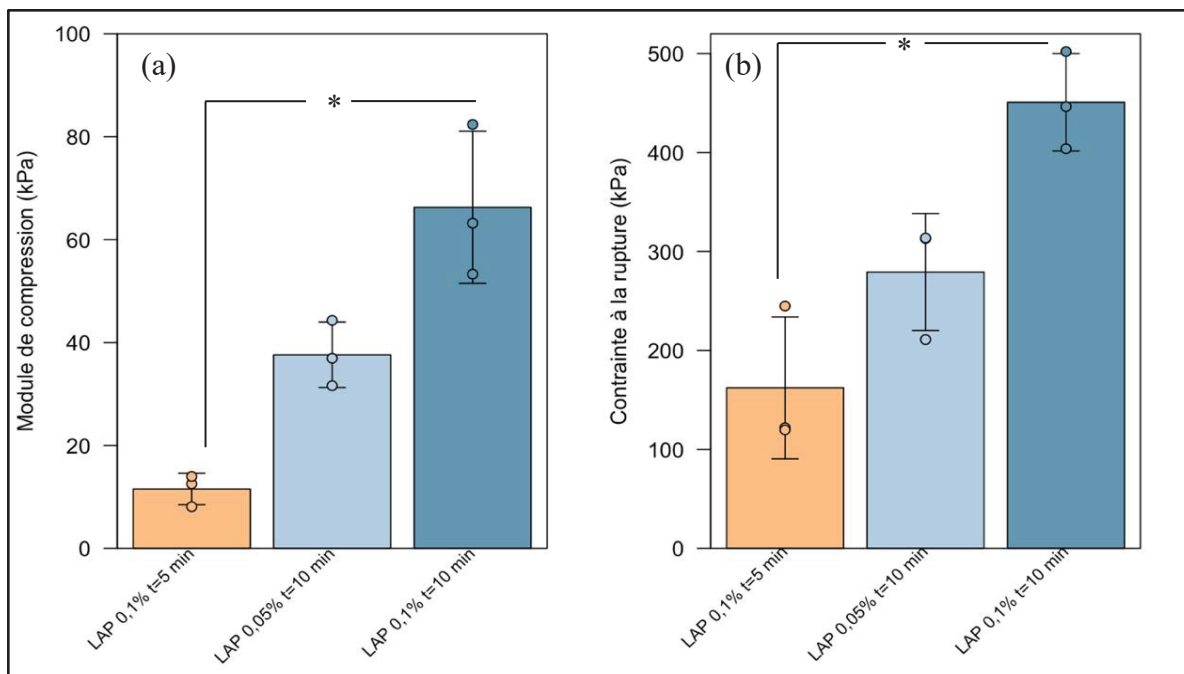


Figure 4.22. (a) Module sécant à 20% de déformation et (b) contrainte à la rupture des hydrogels de 1,67%Chitosane-2%GelMA DS90% (CH-2%GM DS90%) en fonction de la concentration du photoinitiateur LAP (0,05% ou 0,1%w/v) et du temps d'exposition à la lumière bleue (5 ou 10 min), n=3 (RStudio). Test de Kruskal-Wallis suivi du test post-hoc de Dunn (p-value ajustée par la correction de Bonferroni) : $p < 0,05$: *, $p < 0,01$: ** $p < 0,001$: *** et $p < 0,0001$: ****

4.3 Impression 3D des encres à base de chitosane-GelMA

Pour évaluer le potentiel de ces IPN pour la bio-impression, nous avons tout d'abord vérifié leurs propriétés rhéofluidifiantes.

4.3.1 Étude du comportement rhéofluidifiant des hydrogels

En vue d'utiliser les hydrogels de CH-GM en impression 3D par extrusion, il est primordial de s'assurer qu'ils peuvent s'écouler à travers l'aiguille d'impression lorsqu'un taux de cisaillement est appliqué. Afin de favoriser la survie des cellules encapsulées dans une bio-encre, il est préférable de maintenir la cartouche d'impression à 37°C. Cependant, les hydrogels à base de CH utilisés sont thermosensibles et gélifient plus rapidement à 37°C qu'à température pièce. Ainsi, les essais présentés dans la Figure 4.23 sont réalisés à 22°C, température choisie pour la cartouche d'impression.

Tout d'abord, la viscosité de toutes les formulations présentées dans la Figure 4.23 diminue avec l'augmentation du taux de cisaillement mettant donc en évidence leur comportement rhéofluidifiant à l'exception des hydrogels de CH-2%Gélatine et CH-2%GM DS40%. Ces derniers ont majoritairement un comportement newtonien lorsque le taux de cisaillement est supérieur à 1 s^{-1} . Le DS de la GM a un impact plus considérable sur la viscosité des hydrogels lorsque sa concentration est de 2%_{w/v} mais son effet diminue avec l'augmentation de la concentration en GM. De manière générale, la viscosité des hydrogels augmente avec l'augmentation du DS mais presque aucune différence n'est observée entre 40 et 60% lorsque la concentration en GM est de 3 ou 5%_{w/v}. À l'exception de l'hydrogel de CH-2%GM DS90%, la viscosité augmente avec l'augmentation de la concentration en GM. Enfin, tous les hydrogels présentent une viscosité supérieure au CH, ce qui peut être un avantage considérable pour l'impression 3D.

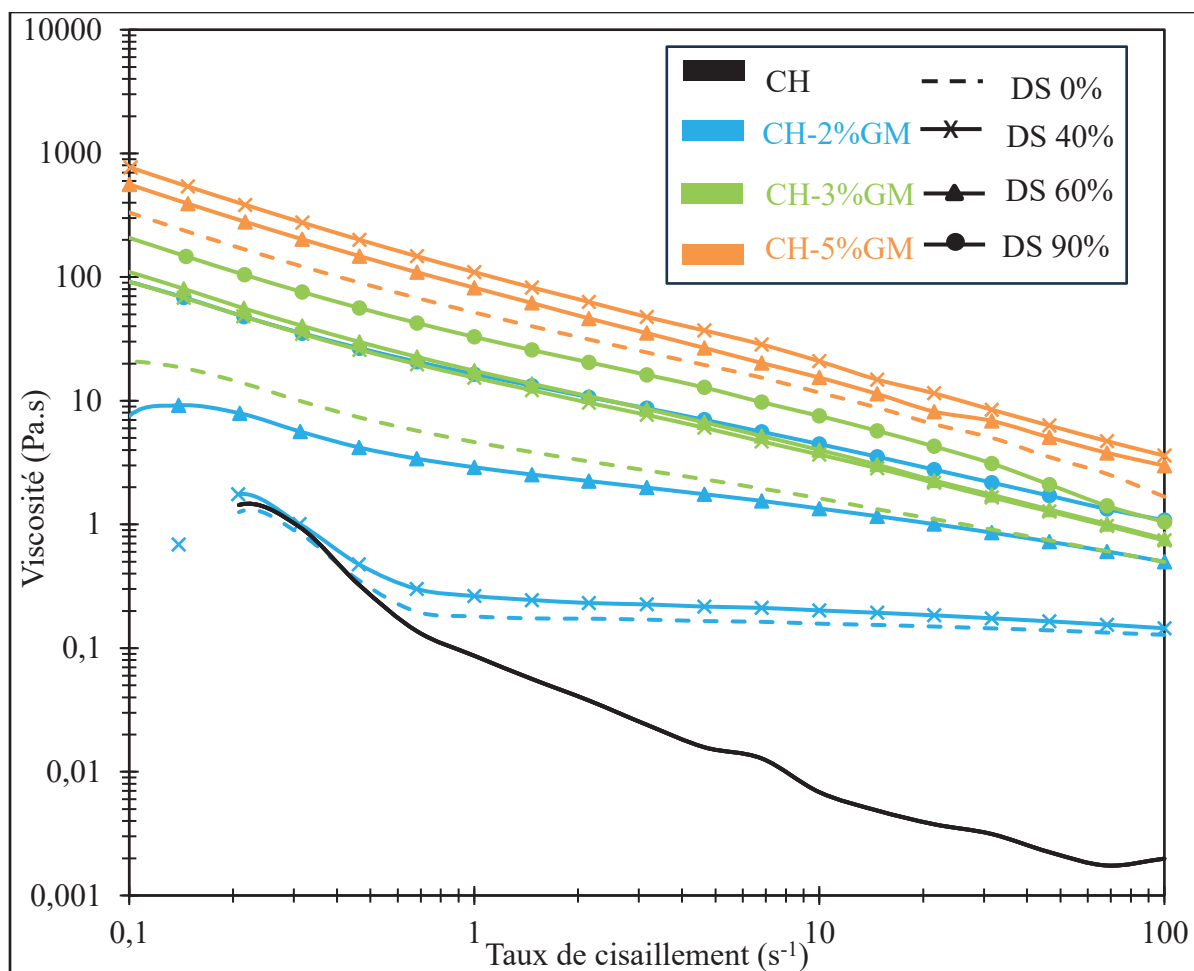


Figure 4.23. Évolution de la viscosité des hydrogels de CH-GM en fonction du taux de cisaillement pour différentes concentrations en GM et différents DS, T=22°C

4.3.2 Tests d'impression 3D

Puis, l'imprimabilité des encres de CH-GM a été étudiée lors de l'impression 3D de grilles de 20 mm par 20 mm (1 seule couche). Plusieurs essais ont été réalisés à l'aide d'une aiguille 25G (diamètre interne : 250 μ m, longueur : 1 pouce) afin de définir les paramètres d'impression optimaux tels que la vitesse de déplacement de l'aiguille et la pression d'extrusion pour les différentes formulations. La température de la cartouche d'impression (seringue contenant l'encre) a été maintenue à 22°C à l'aide d'un contrôleur de température supportant la seringue. Afin de tirer bénéfice de la gélification physique des hydrogels de gélatine et GM, le lit d'impression a été stabilisé à 4°C. Malgré leurs propriétés rhéofluidifiantes, les formulations

contenant 3 ou 5%_{w/v} de Gel ou GM ne sont pas imprimables. En effet, comme on peut le voir sur la Figure-A IV-5 en ANNEXE IV, p.113, le CH-3%Gel ne commence à s’écouler à travers une courte aiguille (1/2 pouce) de 25G et 22G qu’à partir d’une pression égale à 200 kPa. De plus, en raison de la viscosité élevée l’aiguille s’obstrue très rapidement et les filaments sont cassants, ce qui conduit à une très faible résolution d’impression (grilles discontinues). Lorsque le diamètre interne de l’aiguille est augmenté (i.e : 18G), l’encre s’écoule pour une pression de 60 kPa mais le filament obtenu est très irrégulier. Ainsi, pour la suite de l’étude, uniquement les formulations de concentration de 2%_{w/v} de Gel/GM sont analysés en termes d’imprimabilité (Pr) et d’étalement (Sp) (Figure 4.24). L’hydrogel de CH est extrêmement liquide et peut difficilement être imprimé. Du fait de sa très faible viscosité, le Sp est considérable et quelques pores sont obstrués. Même si la gélification du CH en présence des agents gélifiants (BGP/SHC) est plus rapide à 37°C, celle-ci s’initie déjà à température ambiante. Par conséquent, le CH gélifie progressivement au cours de l’impression, rendant cette dernière très instable au cours du temps et ce qui complexifie la reproductibilité d’impression. L’ajout de Gel/GM au CH ralentit la cinétique de gélification de l’hydrogel (cf. section 4.2.3), rendant l’encre plus stable à température ambiante au cours du temps. La viscosité des encres est également un peu plus élevée, justifiant une augmentation de la pression d’extrusion tout en restant dans des valeurs raisonnables pour la survie cellulaire (20 ou 40 kPa selon le DS).





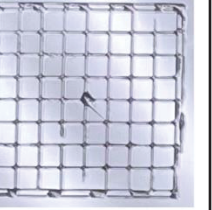
CH	CH-2%Gel	CH-2%GM DS40%	CH-2%GM DS60%	CH-2%GM DS90%
				
10 kPa – 9 mm/s	20 kPa – 15 mm/s	20 kPa – 12 mm/s	20 kPa – 12 mm/s	40 kPa – 20 mm/s
Pr = 0,89 ± 0,01	Pr = 1,05 ± 0,18	Pr = 0,98 ± 0,01	Pr = 0,91 ± 0,02	Pr = 0,95 ± 0,01
Sp = 2,28 ± 0,40	Sp = 1,14 ± 0,04	Sp = 1,34 ± 0,14	Sp = 1,26 ± 0,14	Sp = 1,21 ± 0,18

Figure 4.24. Indice d’imprimabilité (Pr) et taux d’écoulement (Sp) des différents hydrogels de chitosane-2%Gélatine/GelMA (CH-2%Gel/GM) pour différents degrés de substitution (DS) et paramètres optimaux d’impression définis. Grilles : 20 mm x 20 mm (1 couche)

Le taux d'étalement (Sp sur la Figure 4.24) est beaucoup moins important pour le CH-2%Gel/GM par rapport au CH. En raison de la viscosité plus élevée du CH-2%GM DS90% et de ses meilleures propriétés mécaniques, des tests supplémentaires ont uniquement été réalisés sur cette formulation. L'imprimante utilisée possède deux modes d'exposition à la lumière afin de réticuler les structures imprimées. Il est possible d'exposer la structure imprimée à la lumière bleue lorsque l'impression est terminée. Ou bien, il est également possible d'effectuer la photo réticulation après impression de chaque couche. Cette dernière méthode nécessite de choisir un temps d'exposition à la lumière permettant de suffisamment réticuler la GM tout en permettant une bonne adhérence des couches supérieures. Dans un premier temps, des tests d'impression ont été réalisés en exposant à la lumière pendant 2 min (durée maximale d'exposition permise par l'imprimante) la structure une fois l'impression terminée. Pour cela, des grilles de $20 \times 20 \times 1 \text{ mm}^3$ (4 couches) imprimées suivant différents paramètres d'impression (vitesse : 15 ou 20 mm/s ; pression : 40 ou 50 kPa) ont été comparées. La résolution d'impression diminue considérablement de la première à la dernière couche imprimée (Figure 4.25). En effet, le taux d'écoulement augmente et les pores s'obstruent. Ces résultats mettent en évidence que lorsque l'encre n'est pas réticulée entre chaque couche successive, celle-ci est trop liquide et s'étale notamment sous le poids des couches supérieures. Puisque la grille imprimée à 40 kPa et 20 mm/s possède le taux d'étalement le plus faible, des tests ont également été réalisés en exposant à la lumière entre les différentes couches. D'après la Figure 4.26, photo-réticuler entre chaque couche permet de légèrement améliorer l'indice Pr qui vaut $0,91 \pm 0,02$ au lieu de $0,86 \pm 0,03$. Par contre, dans ces conditions, le taux Sp augmente et passe de $1,49 \pm 0,29$ (lumière à la fin) à $2,37 \pm 0,28$ (lumière entre les couches). De plus, un étalement important est observé sur le bord supérieur droit de la grille imprimée et réticulée entre chaque couche. Cet étalement provient du fait qu'entre l'impression de chaque couche une goutte se forme au bout de l'aiguille. Ainsi, ces résultats suggèrent qu'il reste préférable de photopolymériser l'encre une fois l'impression terminée. Toutefois, il faut s'attendre à une diminution considérable de Pr et Sp en augmentant le nombre de couches imprimées, ce qui n'est pas optimal. Des tests supplémentaires sont requis afin d'optimiser l'impression 3D du CH-2%GM DS90%.

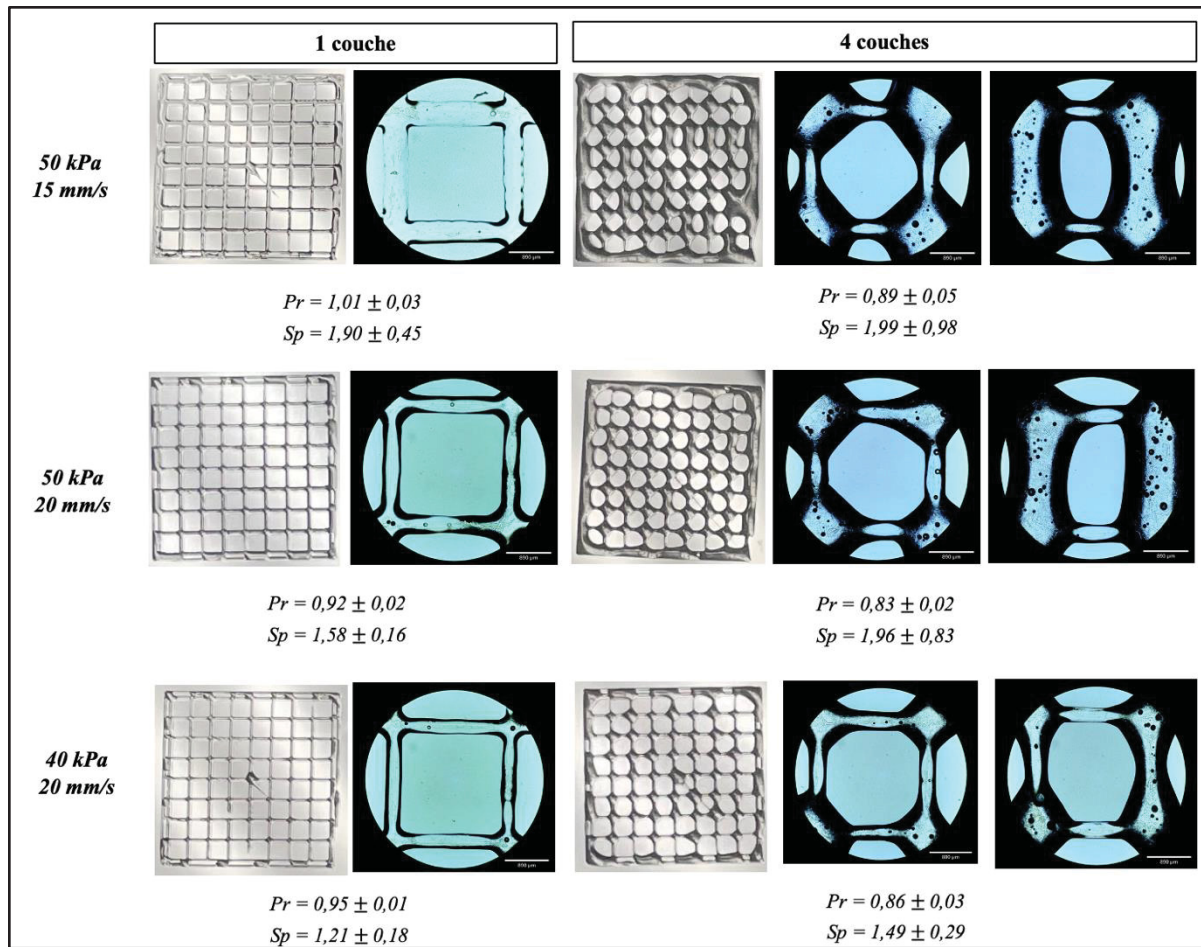


Figure 4.25. Comparaison de la résolution d'impression des premières et quatrièmes couches de grilles de $20 \times 20 \times 1 \text{ mm}^3$ à base de 1,67%Chitosane 2%GelMA DS90% (CH-2%GM DS90%) imprimées à une vitesse de 15 ou 20 mm/s et à une pression d'extrusion de 40 ou 50 kPa, puis photopolymérisées une fois l'impression terminée (2 min, 405 nm). Échelle des images prises au microscope optique (grossissement x4) : 890 μm . Pr : indice d'imprimabilité. Sp : taux d'étalement

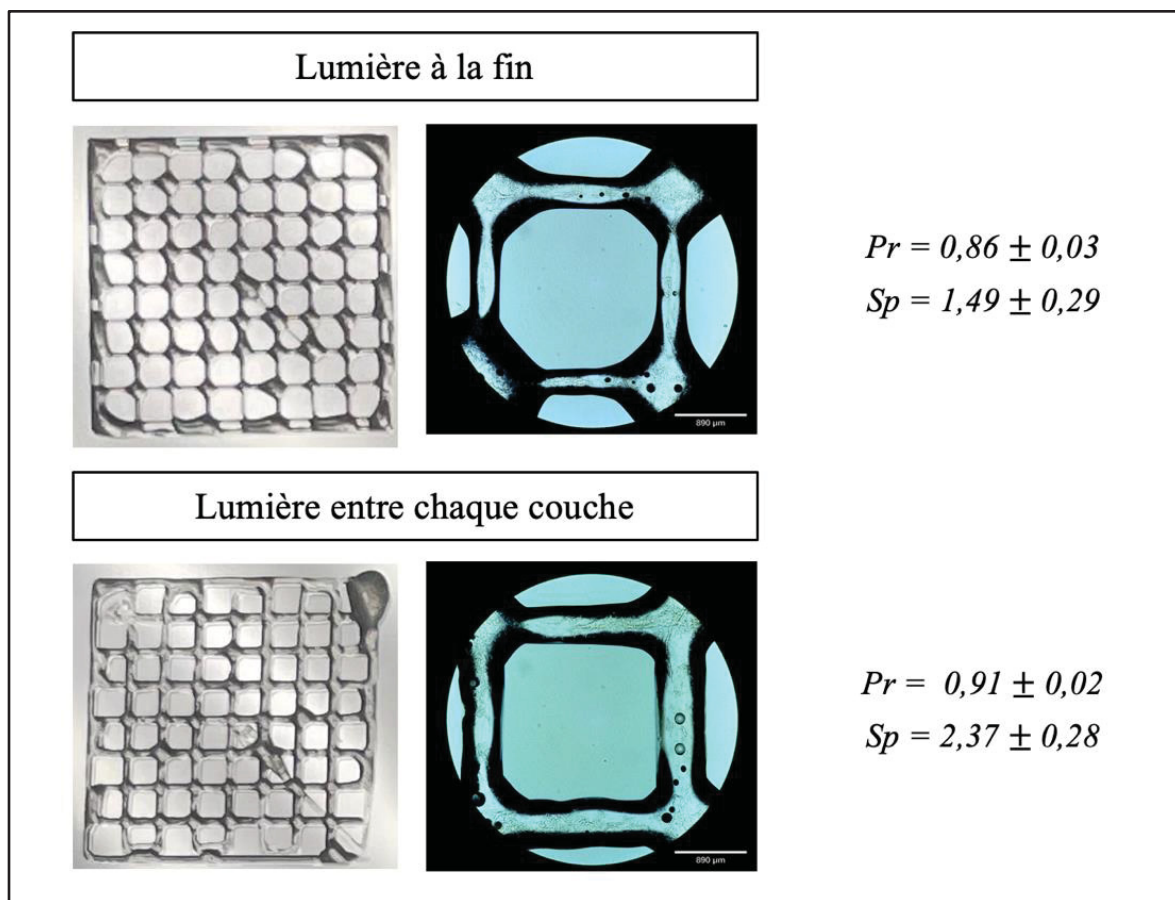


Figure 4.26. Comparaison de la résolution d'impression de grilles de $20 \times 20 \times 1 \text{ mm}^3$ à base de 1,67%Chitosane 2%GelMA DS90% (CH-2%GM DS90%) imprimées à une vitesse de 20 mm/s et une pression de 40 kPa lorsqu'exposées pendant 2 min à la lumière bleue (405 nm) à la fin de l'impression ou entre chaque couche. Échelle des images prises au microscope optique (grossissement x4) : 890 μm . Pr : indice d'imprimabilité. Sp : taux d'étalement

4.4 Biocompatibilité de l'encre sélectionnée à base de chitosane-GelMA

Afin d'évaluer la possibilité d'utiliser le CH-2%GM DS~90% comme bio-encre, la viabilité cellulaire ainsi que l'activité métabolique des fibroblastes encapsulés dans les hydrogels ont été évaluées.

Les fibroblastes L929 de passage 5 ou 6 ont été encapsulés dans les hydrogels thermosensibles de chitosane (CH), chitosane-2%gélatine (CH-Gel) et chitosane-2%GelMA DS90% (CH-GM) dont le pH est respectivement de 6,87 ; 6,77 et 6,91. De même leur osmolarité respective est de 457 ; 503 et 502 mOsm/kg. Leur viabilité cellulaire et prolifération ont été évaluées à l'aide de tests *live/dead* et de Bleu d'Alamar pendant une semaine.

Un jour après l'encapsulation deux zones distinctes sont observées pour les hydrogels de CH-GM. D'une part, le centre de l'hydrogel, où l'intensité lumineuse reçue par les cellules est plus importante, et qui contient peu de cellules vivantes. D'autre part, le contour de l'hydrogel contenant de nombreuses cellules dont la majorité sont vivantes (Figure 4.27). Trois jours après l'encapsulation, pratiquement aucune cellule morte n'est observée comme si elles avaient été éliminées de l'hydrogel lors des différents changements de milieu de culture (Figure 4.28). Les fibroblastes encapsulés dans les hydrogels de CH-Gel et CH-GM sont de forme arrondie même au jour 7, alors que dans le CH la majorité des cellules sont allongées.

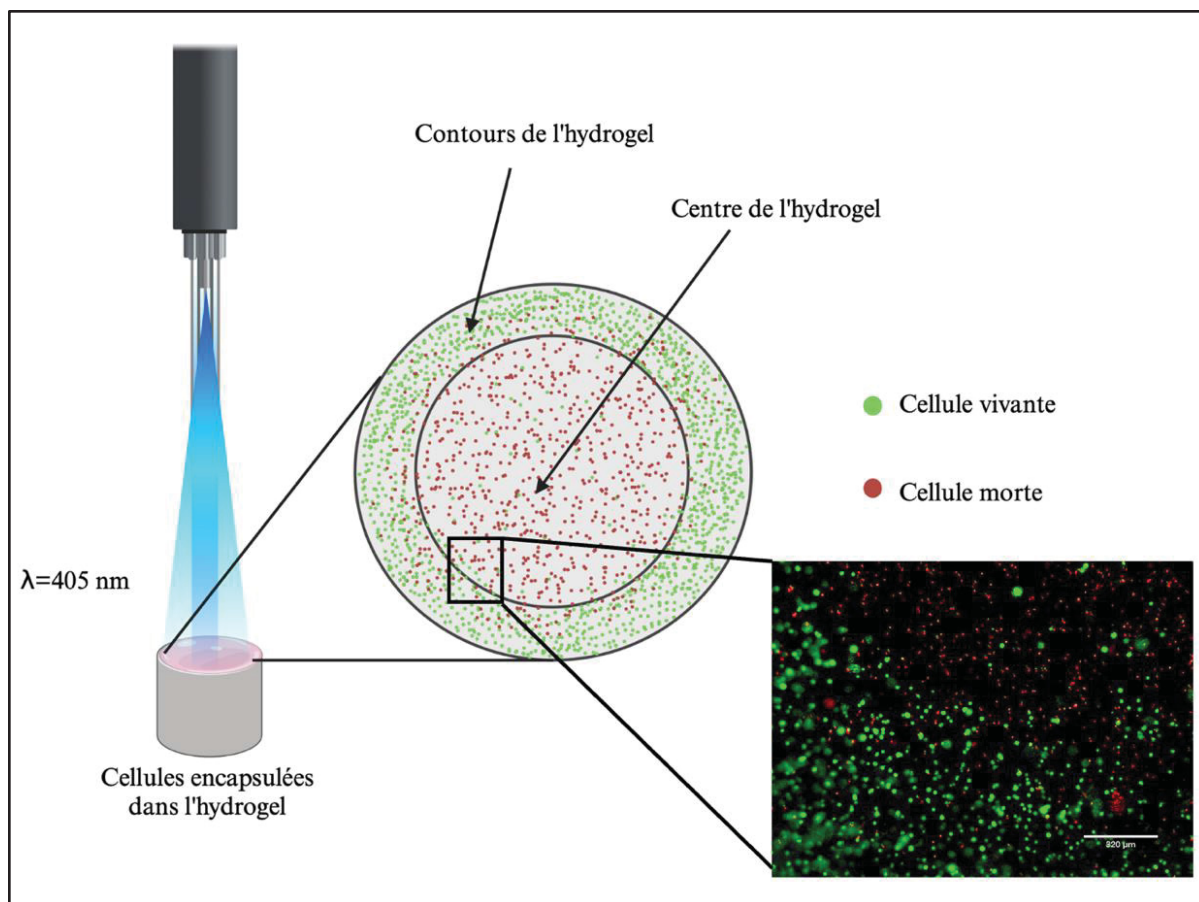


Figure 4.27. Effet de la photopolymérisation des hydrogels de 1,67%Chitosane-2%GelMA DS90% (CH-GM) en présence de LAP à 0,05%_{w/v} (t=10 min, 405 nm) sur la viabilité des fibroblastes L929 P5 encapsulés. Échelle image prise au microscope : 320 μm

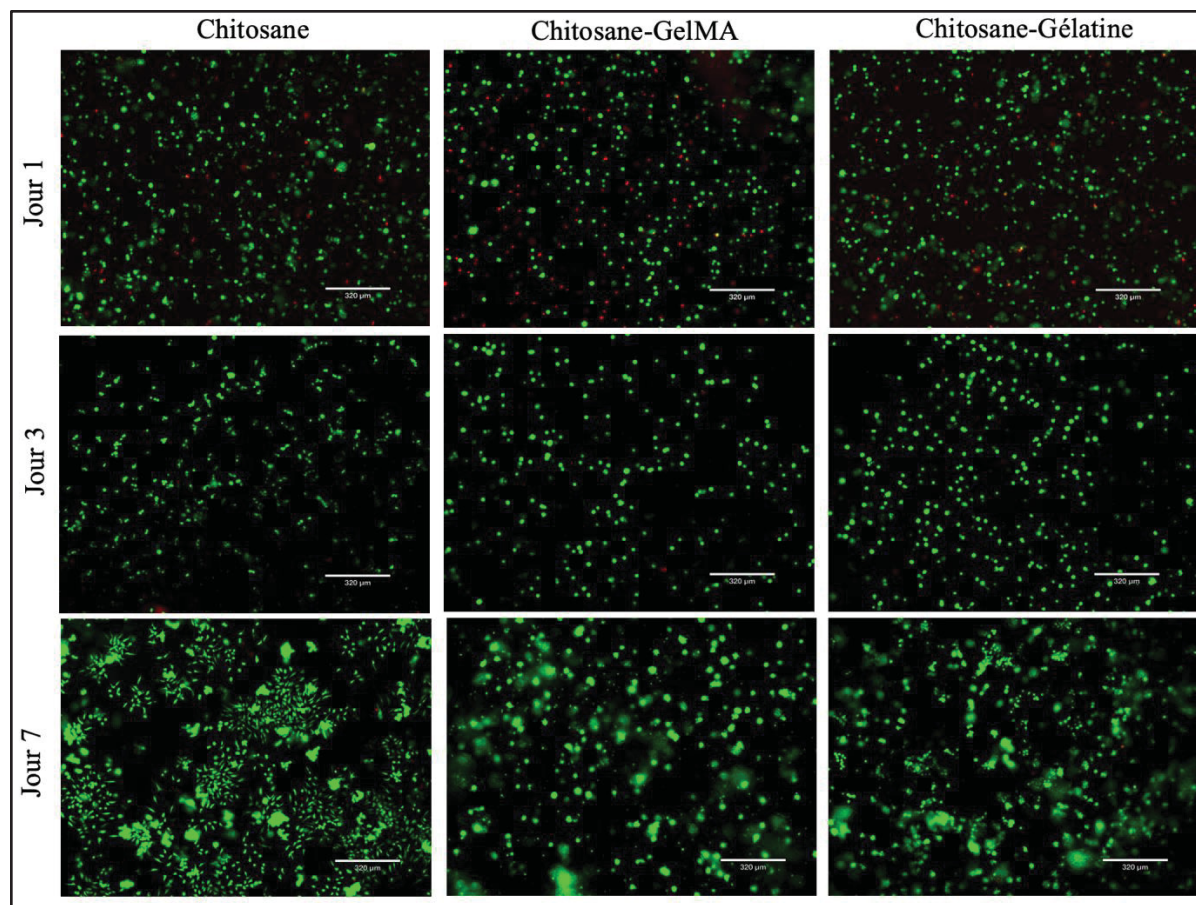


Figure 4.28. Images prises au microscope à fluorescence (grossissement x4) des fibroblastes P5 encapsulés dans les hydrogels de 1,67%Chitosane, 1,67%Chitosane-2%Gélatine et 1,67%Chitosane-2%GelMA DS90% réticulés en présence de lumière bleue ($t=10$ min photoinitiateur LAP 0,05%_{w/v}) et/ou réticulés thermiquement à 37°C en présence d'agents gélifiants. En vert : cellules vivantes. En rouge : cellules mortes. Échelle : 320 µm

L'activité métabolique des fibroblastes encapsulés dans les différents hydrogels a été mesurée au jour 1, 3 et 7 (Figure 4.29). L'activité métabolique des cellules encapsulées dans le CH-Gel ou CH-GM augmente jusqu'au jour 7 mettant en évidence une bonne prolifération. Au contraire, les cellules encapsulées dans le CH semblent cesser de proliférer après le jour 3. L'activité métabolique des cellules encapsulées dans le CH-GM est la plus faible mais reste relativement proche de celles encapsulées dans le CH-Gel. La meilleure activité métabolique des cellules dans l'hydrogel de CH peut s'expliquer du fait de la très faible viscosité de cet hydrogel en l'absence de gélatine ou GM, permettant une meilleure homogénéisation lors du mélange par la méthode trois seringues. Malgré l'effet néfaste du système de

photopolymérisation observé sur les images prises au microscope à fluorescence, les fibroblastes encapsulés dans le CH-GM semblent bien récupérer au jour 7 et recouvrir les différentes zones de l'hydrogel.

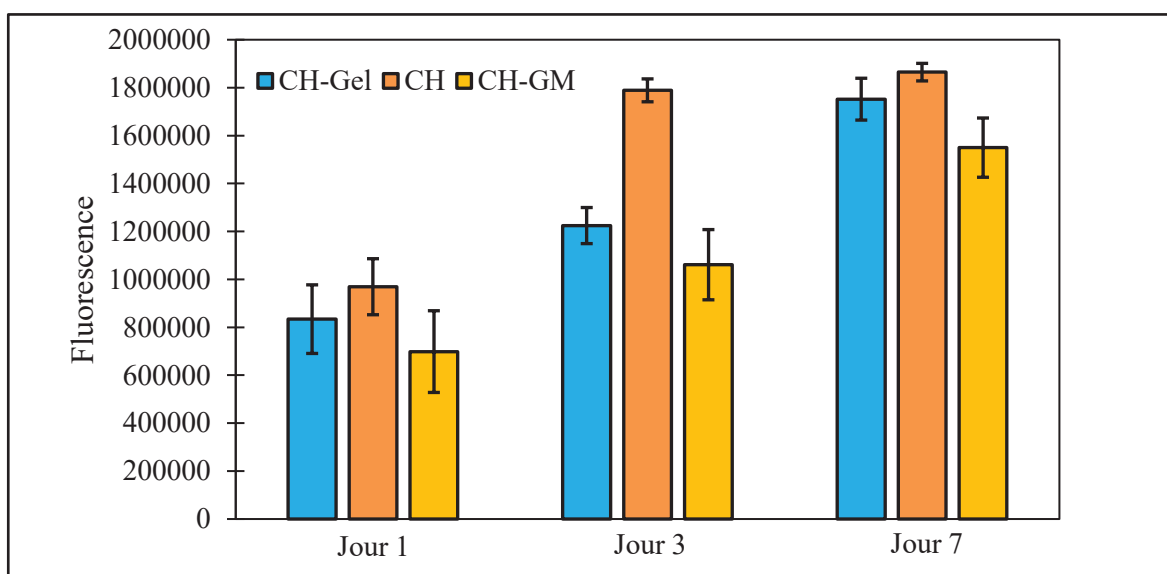


Figure 4.29. Activité métabolique des fibroblastes L929 P5 encapsulés dans les hydrogels de 1,67%Chitosane, 1,67%Chitosane-2%Gélatine et 1,67%Chitosane-2%GelMA DS90% réticulés en présence de lumière bleue ($t=10$ min, photoinitiateur LAP 0,05%_{w/v}) et/ou réticulés thermiquement à 37°C en présence d'agents gélifiants. Test de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$)

À la suite des résultats de la première encapsulation cellulaire, des tests complémentaires ont été réalisés afin de mieux comprendre l'effet du système de photopolymérisation sur la viabilité cellulaire au cours de la manipulation (Figure 4.30). Quelle que soit la condition (avec ou sans LAP), deux zones distinctes sont encore observées dans l'hydrogel de CH-GM, le contour contenant de nombreuses cellules vivantes mais pas le centre. Notons, qu'il n'y a pas de condition sans exposition. On peut noter qu'aucune cellule morte n'est observable pour la condition LAP 0,1%_{w/v} $t=5$ min. Il se peut que les cellules mortes aient été évacuées lors des changements de milieu de culture. Peut-être que les hydrogels réticulés en présence de LAP à 0,1%_{w/v} pendant 5 min sont moins densément réticulés et présentes donc une meilleure porosité facilitant la circulation et l'évacuation des déchets cellulaires.

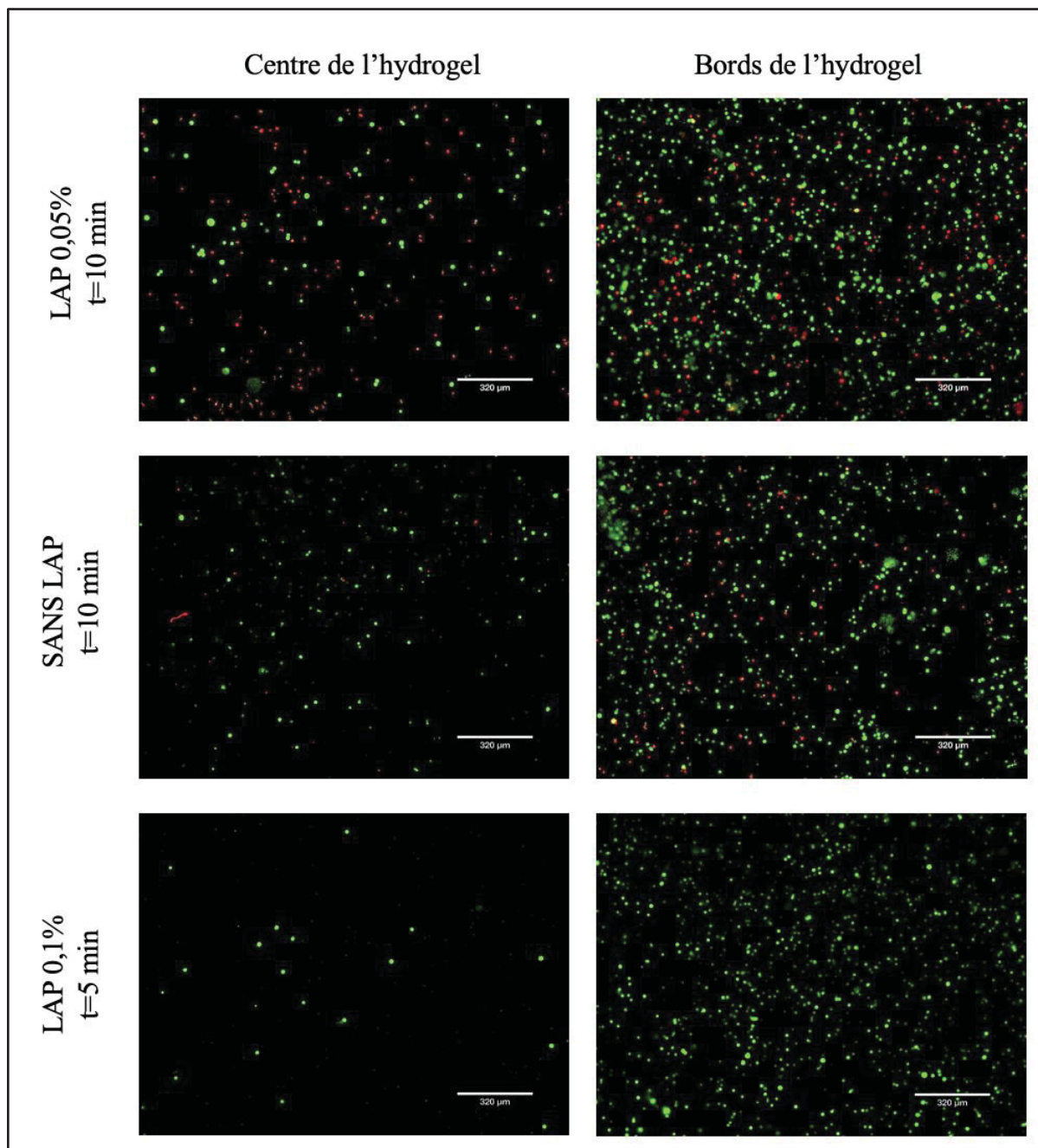


Figure 4.30. Images prises au microscope à fluorescence (grossissement x4) des fibroblastes P6 encapsulés dans les hydrogels de 1,67%Chitosane-2%GelMA DS90% réticulés en présence du photoinitiateur LAP à 0,05%_{w/v} pendant 10 min ou à 0,1%_{w/v} pendant 5 min ou simplement exposées pendant 10 min à la lumière bleue en l'absence de LAP
En rouge : cellules mortes. Échelle : 320 μm

L'activité métabolique au jour 1 des cellules encapsulées dans les hydrogels est similaire pour les deux conditions en présence du photoinitiateur (Figure 4.31). Toutefois, elle est plus élevée en l'absence de LAP. Le *live/dead* et le bleu d'Alamar montrent que la photo-réticulation a une certaine cytotoxicité sur les cellules encapsulées.

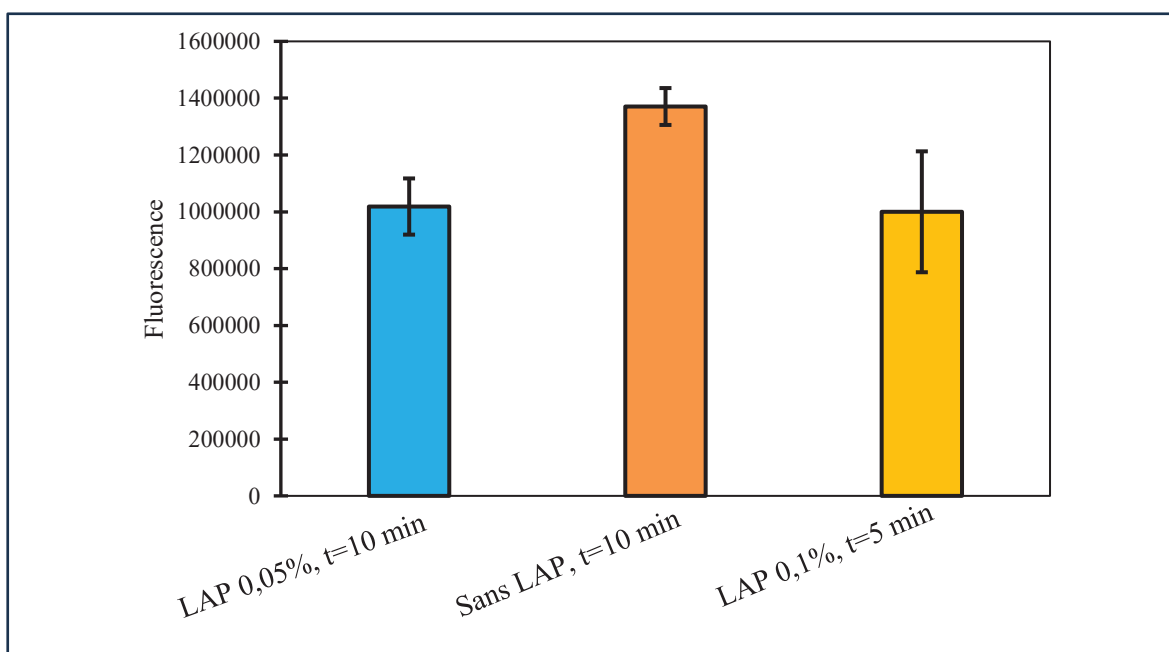


Figure 4.31. Activité métabolique des fibroblastes L929 P6 encapsulés dans les hydrogels de 1,67%Chitosane-2%GelMA DS90 réticulés en présence du photoinitiateur LAP à 0,05%_{w/v} pendant 10 min ou à 0,1%_{w/v} pendant 5 min, ou simplement exposés pendant 10 min à la lumière bleue en l'absence de LAP. Test de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$)

Ceci s'explique sans doute par l'intensité de la lumière bleue. Bien que l'épaisseur du gel photo-réticulé sur le rhéomètre ou dans la plaque de culture soit la même, sur le rhéomètre, la fibre optique est située à 4,2 cm de l'échantillon et est séparée de celui-ci par une plaque de verre, tandis que pour le gel contenant les cellules encapsulées, la lampe bleue était à 2 cm de l'échantillon et n'était pas séparée par une plaque de verre. La durée d'exposition a été la même, alors qu'il aurait fallu réduire la durée d'exposition lors des essais cellulaires. Il est donc probable que la mortalité cellulaire observée au jour 1 soit la conséquence d'une surexposition à la lumière bleue, générant de nombreux radicaux libres et tuant les cellules

(Nguyen et al., 2020). On pourrait s'attendre à une amélioration considérable des résultats en réajustant la durée d'exposition à la lumière lors de l'encapsulation cellulaire.

CHAPITRE 5

DISCUSSION

L'objectif principal de cette étude était de créer des IPN injectables à base de chitosane (CH) thermosensible et de GelMA (GM) permettant l'encapsulation cellulaire tout en démontrant de bonnes propriétés mécaniques pour mimer le cartilage. Par rapport aux études antérieures, nous avons utilisé une nouvelle méthode de préparation des hydrogels de chitosane-GelMA (CH-GM) qui permet de générer des IPN photo-réticulables et thermosensibles grâce à l'introduction des agents gélifiants. D'autres originalités consistent en l'évaluation de nouveaux ratios CH/GM ainsi que des essais préliminaires d'impression 3D.

5.1 Méthode de synthèse des IPN de chitosane-GelMA

La méthode de synthèse de la GM en une seule étape a fait ses preuves et suite à plusieurs efforts d'optimisation, a conduit à l'obtention de GM avec un degré de substitution (DS) d'environ 90% avec une très bonne reproductibilité et de GM avec un DS de 60% dont la variabilité est plus importante. Il a donc été possible de créer des hydrogels de CH-GM en faisant non seulement varier la concentration en GM mais en faisant également varier son DS (faible, moyen et élevé).

Nous avons ensuite mis au point la méthode de préparation des IPN, puis nous avons fixé la concentration finale en CH (1,67%_{w/v}) et fait varier la concentration en GM (2, 3 ou 5%_{w/v}) ainsi que son DS (40, 60 ou 90%). Maintenir une concentration en CH inférieure à 2%_{w/v} nous a semblé essentiel afin de favoriser la survie des cellules encapsulées. Certains ratios ont également été préparés dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 0,10 M et comparées à celles préparées dans du HCl à 0,12 M. Au total, treize formulations différentes ont été étudiées.

Les différences de résultats observées pour le 1%CH 10%GM DS90% avec ceux trouvés dans la littérature proviennent très certainement de la méthode de synthèse considérablement

différente. En effet, aucune étude n'a fabriqué des hydrogels de CH-GM en présence d'agents gélifiants tels que le β -glycérophosphate (BGP) et l'hydrogénocarbonate de sodium (SHC). Ainsi, le CH en très faible proportion dans cette formulation n'était pas suffisant pour former un gel physique convenable et affaiblissait le réseau de GM. Concernant les autres formulations étudiées, les essais de rhéologie et de compression ont permis de mettre en évidence un effet synergique de la température (réticulation du CH) et de la lumière (réticulation de la GM) démontrant la création d'IPN.

5.2 Tests de compression mécanique

Les différents tests de compression mécanique ont mis en évidence que les formulations les plus prometteuses étaient celles contenant 2%_{w/v} de GM, en particulier celle dont le DS est de 90%. Cette formulation possède un module de compression et une résistance à la compression drastiquement plus élevés que les autres formulations évaluées. Ces résultats peuvent s'expliquer par la haute teneur en groupes méthacrylate et méthacrylamide de la GM, qui sous l'effet de la lumière et en présence de photoinitiateur, forment un réseau covalent dense et fortement résistant. Tandis que la GM2% seule ne peut former un hydrogel photo-réticulé, sa combinaison avec le CH modifie sa structure et lui permet d'être photo-réticulable et d'atteindre des propriétés supérieures. Contrairement à nos attentes, augmenter la concentration de GM n'a pas apporté de bénéfice supplémentaire, sans doute à cause de la présence d'hétérogénéités dans le réseau.

Notons également que les tests de compression cyclique jusqu'à 20% de déformation simulent des conditions mécaniques plus sévères que ce que le cartilage peut subir au quotidien chez des personnes ne souffrant pas de pathologie articulaire ou n'étant pas des athlètes de haut niveau. En effet, la compression physiologique du cartilage est généralement de 5 à 10% de déformation (région élastique). Toutefois, tester les matériaux dans des conditions mécaniques sévères, bien au-delà des contraintes physiologiques habituelles, permet de s'assurer de leur robustesse. Si un matériau présente un bon comportement sous de telles conditions, cela en fait un excellent candidat pour mimer des tissus durs comme le cartilage par exemple.

5.3 Compatibilité avec l'encapsulation cellulaire

Le CH-2%GM DS90% (HCl 0,12M), se démarque également des autres formulations par son module de compression et sa contrainte à la rupture significativement plus élevés. Toutefois, les valeurs obtenues sont bien inférieures à celles trouvées dans la littérature : ~160 à 270 kPa (Paul, 2023) et ~230 kPa (Suo et al., 2018). Mais les méthodes de fabrication des hydrogels de CH-GM trouvées dans la littérature n'étaient pas compatibles avec l'encapsulation cellulaire. En effet, l'absence de basification du CH dans l'étude de Paul, (2023) conduisait à l'obtention d'un hydrogel acide (pH=5,5) ainsi qu'à une mortalité considérable des cellules encapsulées. Dans l'étude de Suo et al., (2018) la basification du CH par NaOH risque de considérablement compromettre la survie des cellules encapsulées et surtout empêcher son injectabilité. D'ailleurs, leurs IPN n'ont été testés que pour l'ensemencement de cellules sur la structure post-fabrication, montrant bien les limites de leur méthode pour encapsuler des cellules.

Notre méthode est compatible avec l'encapsulation cellulaire à condition d'adapter le système de photo-réticulation comme discuté dans la section 4.4.

On peut théoriquement déterminer le temps d'exposition à la lumière t_2 nécessaire pour que l'énergie reçue Q_2 par l'échantillon dans nos tests d'encapsulation cellulaire soit identique à celle reçue par l'échantillon dans les expériences de rhéologie (Q_1, t_1).

D'après la loi de l'inverse au carré de la distance (Brownson, 2014), l'intensité à la distance r vaut :

$$I(r) = \frac{P}{S(r)} \quad (5.1)$$

Avec :

- P la puissance de la source lumineuse (mW) ;
- et $S(r)$ la surface éclairée à la distance r (cm²).

On cherche à déterminer le temps d'exposition à la lumière t_2 tels que les échantillons en culture cellulaire et en rhéologie reçoivent la même énergie Q . Alors on peut poser la relation suivante :

$$Q_1 = Q_2 \Leftrightarrow I(r_1) \times t_1 = I(r_2) \times t_2 \Leftrightarrow \frac{P}{s(r_1)} \times t_1 = \frac{P}{s(r_2)} \times t_2 \quad (5.2)$$

Comme illustré sur la Figure 5.1, dans notre cas le faisceau de lumière est conique et possède un angle d'ouverture noté θ , donc l'équation devient :

$$\frac{P}{\pi \times r_1^2 \times \left(\tan\left(\frac{\theta}{2}\right)\right)^2} \times t_1 = \frac{P}{\pi \times r_2^2 \times \left(\tan\left(\frac{\theta}{2}\right)\right)^2} \times t_2 \quad (5.3)$$

Comme dans les deux cas il s'agit de la même fibre optique (même puissance et même angle d'ouverture), la relation devient après simplification :

$$\frac{1}{r_1^2} \times t_1 = \frac{1}{r_2^2} \times t_2 \Leftrightarrow t_2 = \frac{t_1 \times r_2^2}{r_1^2} \quad (5.4)$$

La distance r_1 entre la source lumineuse et l'échantillon dans le cas de la rhéologie est de 4,2 cm, la distance r_2 dans le cas de l'encapsulation cellulaire est de 2 cm et le temps d'exposition t_1 déterminé par rhéologie est de 10 min, donc :

$$t_2 = \frac{10 \times 2^2}{4,2^2} = 2 \text{ min } 27 \text{ s} \quad (5.5)$$

Ainsi 2 min 30 s suffirait à réticuler les gels lors des essais d'encapsulation cellulaire et permettrait de limiter les dommages causés aux cellules.

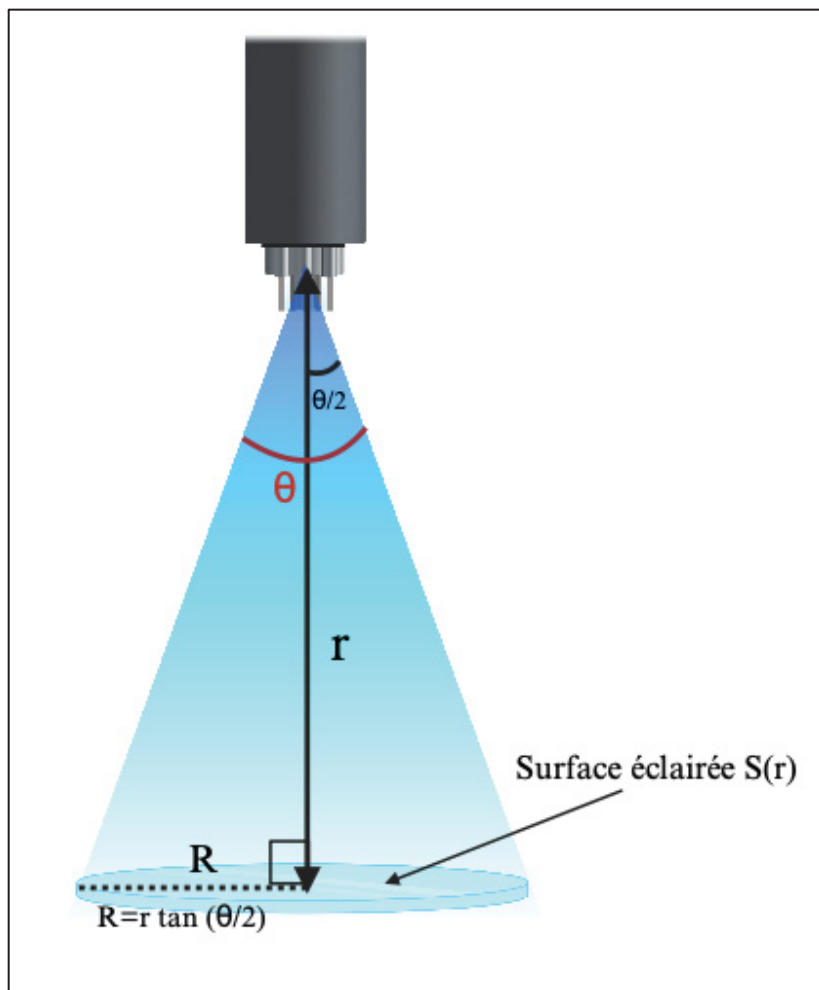


Figure 5.1. Représentation schématique du faisceau lumineux de notre lampe (BioRender)

Recommandation : il serait donc pertinent de refaire les tests d'encapsulation cellulaire en exposant les gels pendant environ 2 min 30 s afin d'éviter que la surexposition du gel à la lumière ne compromette la survie cellulaire. Si insuffisant pour permettre une bonne survie cellulaire, on pourrait remplacer le LAP par le photoinitiateur ruthénium/sodium persulfate (Ru/SPS). En effet, le coefficient d'extinction molaire du LAP à 405 nm n'est que de $25 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ tandis que celui du Ru/SPS est de $14\,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ à 450 nm (Lim et al., 2020). Cela signifie que le Ru/SPS absorbe davantage de lumière que le LAP à 450 nm, et nécessite donc une intensité lumineuse et un temps d'exposition moins élevés. Réduire l'intensité lumineuse ainsi que le temps d'exposition à la lumière permet de limiter les dommages cellulaires.

De tels IPN pourraient être utilisés comme biomatériaux injectables contenant des cellules pour la régénération des tissus comme le cartilage. Bien que les propriétés mécaniques soient encore bien inférieures à celles du cartilage $\sim 1,5$ MPa (Pahoff et al., 2019), l'IPN contenant des chondrocytes ou des cellules souches pourrait être injecté dans un défaut cartilagineux par laparoscopie puis réticulé sous lumière bleue avant de laisser finir de solidifier sous l'effet de la chaleur corporelle. Plusieurs couches pourraient ainsi être déposées successivement.

Ainsi nous avons réalisés des essais préliminaires de construction de bicouche à base de CH-hydroxyapatite (HAP) et de CH-GM pour mimer l'interface minéralisée et le cartilage non minéralisé et son interface minéralisée avec l'os (Figure 5.2). Le manque de cohésion observé entre les deux couches lors de cet essai préliminaire est sans doute dû à un délai trop important (6h) entre la première couche et avant l'ajout de la seconde. Il serait pertinent de poursuivre cette étude en incubant la première couche pendant une dizaine de minutes seulement avant d'ajouter la seconde couche. Ce qui serait d'ailleurs plus réaliste du point de vue clinique.

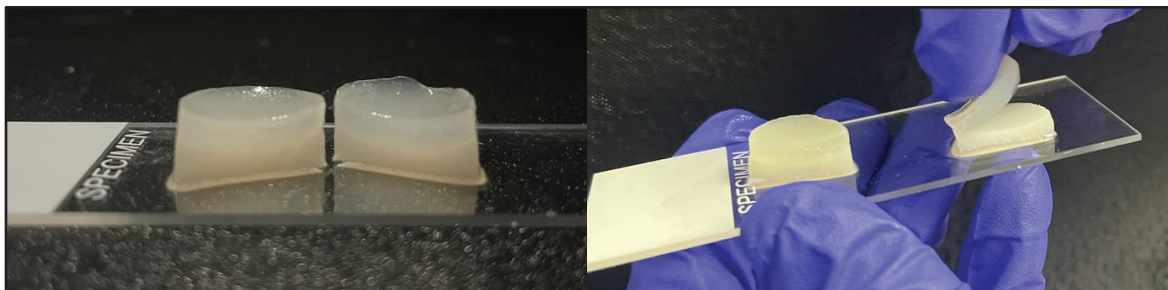


Figure 5.2. Structure bicouche à base de 2%chitosane (Acide Acétique 0,15 M) HAP et de 1,67%chitosane (HCl 0,12 M) 2%GelMA DS90%, HAP : hydroxyapatite

La contraction de l'hydrogel lors de sa gélification sous l'effet de la chaleur doit être étudiée davantage, car cela pourrait être problématique en cas d'implantation, puisque cela générerait un espace dans la cavité.

5.4 Impression 3D des encres de Chitosane-GelMA

Les IPN pourraient également servir pour former des modèles 3D vivants par bio-impression 3D, par exemple mimant le cartilage et son interface avec l'os. Ces modèles *in vitro* constituent des alternatives aux modèles sur animaux. Par exemple, créer un modèle de cartilage dégénéré afin d'y tester différentes molécules en vue de le régénérer et/ou de réduire l'inflammation. Des essais préliminaires d'impression 3D par extrusion sans bain de support du CH-2%GM DS90% ont été réalisés. Malgré le fait qu'une optimisation du système reste à faire, cette formulation s'avère présenter des qualités considérables en tant qu'encre par rapport au CH. En effet, le taux d'étalement est diminué, sa viscosité augmentée sans pour autant que la pression d'extrusion nécessaire soit excessive (~40 à 50 kPa) et sa stabilité au cours du temps est améliorée. Il reste primordial d'optimiser le système de photopolymérisation. En effet, de multiples choix d'exposition à la lumière existent sur les (bio)-imprimantes 3D. Tel qu'illustré à la section 4.3, il est possible d'exposer à la lumière la structure une fois l'impression 3D terminée. Cependant, cela nécessite d'utiliser une encre qui se maintienne suffisamment bien une fois extrudée afin de supporter les couches supérieures tout en ne présentant pas une viscosité trop élevée risquant de boucher l'aiguille. De plus, pour les structures épaisses, il résulte un gradient du degré de réticulation. En effet, les couches inférieures risquent d'être moins bien réticulées en raison de l'atténuation de la lumière avec la profondeur donnant lieu à une structure inhomogène. Il est également envisageable de photo-réticuler la structure couche après couche. Toutefois, un gradient du degré de réticulation existe également, mais cette fois-ci ce sont les couches inférieures qui risquent d'être surexposées à la lumière et de compromettre la viabilité cellulaire. D'autres études préconisent également d'exposer l'encre à la lumière avant l'extrusion. Cela nécessite de s'assurer que la réticulation n'est pas totale avant l'extrusion afin d'obtenir des filaments réguliers et permettre une bonne cohésion entre les couches (Knowlton, Yenilmez, Anand, & Tasoglu, 2017). Il est également possible de réaliser une photopolymérisation *in situ* à l'aide d'un capillaire transparent (Figure 5.3). Toutefois, il faut que la cinétique de réticulation soit relativement rapide et/ou que la vitesse de déplacement de l'aiguille soit lente (Lim et al., 2020). Cette dernière méthode pourrait potentiellement être envisageable en utilisant un autre photoinitiateur (par exemple : Ru/SPS)

comme discuté précédemment. Certaines bio-imprimantes 3D possèdent également un mode permettant d'exposer la structure durant tout le processus d'impression. Toutefois, intervient encore une fois le problème de surexposition à la lumière des premières couches imprimées (Knowlton et al., 2017). Puis une fois le choix du mode d'exposition à la lumière fait, se pose également la question du temps d'exposition à la lumière et du mode d'éclairage. En effet, il est possible d'utiliser un éclairage central ou bien de choisir un mode permettant à la lampe de se déplacer linéairement afin d'exposer uniformément toute la structure. Ce dernier mode sur la bio-imprimante utilisée dans notre étude est défini en nombre de scans (1 à 100 scans) et n'éclaire pas sur le retour, ce qui allonge considérablement le processus d'impression.

Recommandation : tester l'impression 3D du CH-GM en présence de Ru/SPS et d'un système de photopolymérisation *in situ*.

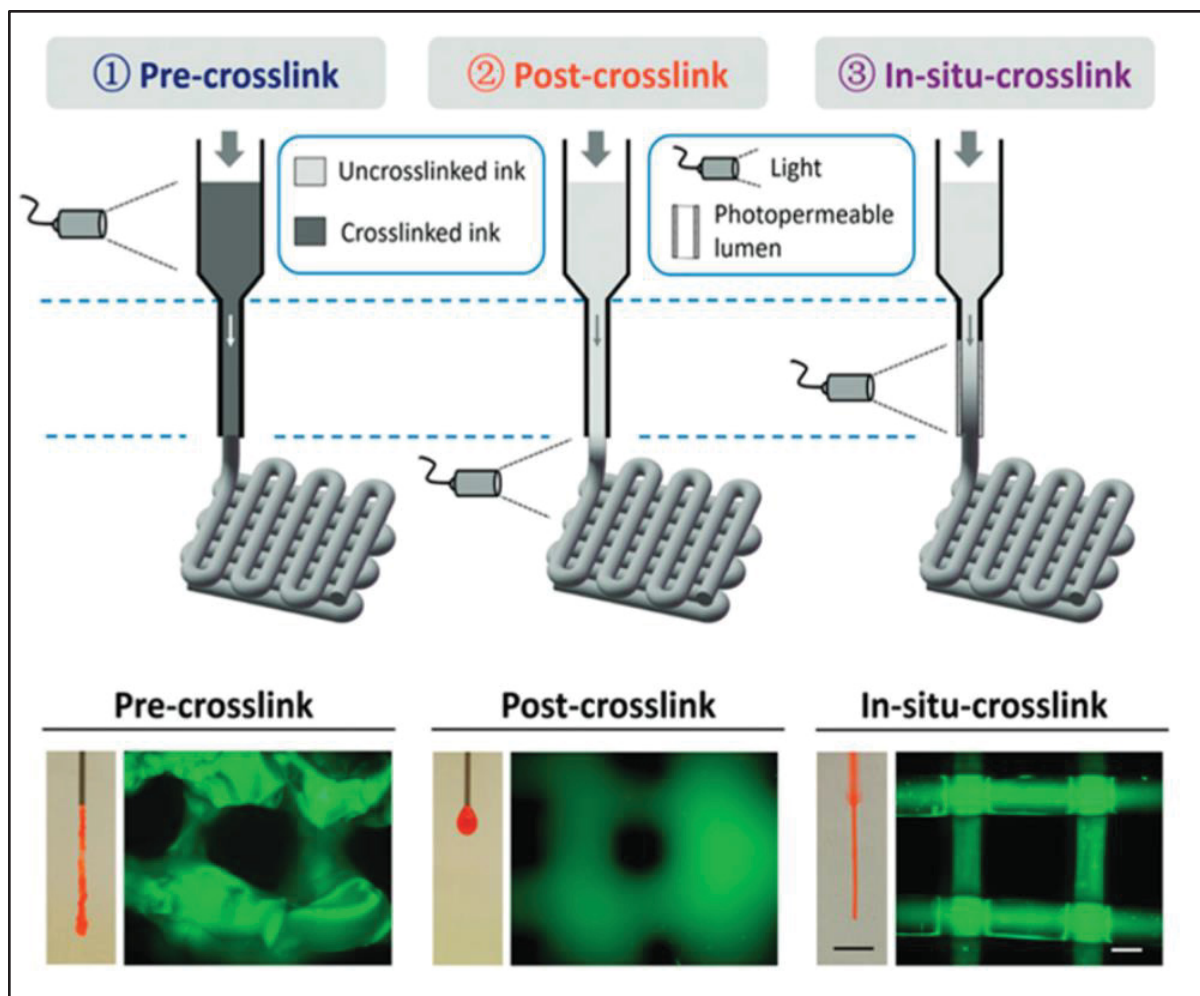


Figure 5.3. Différentes méthodes de photopolymérisation pouvant être utilisées en bio impression 3D

Image tirée de Lim et al., (2020)

5.5 Autres matrices injectables pour la régénération du cartilage hyalin

Tel que discuté précédemment, les IPN développés sont injectables, biodégradables et compatibles avec l'encapsulation cellulaire, mais ils restent encore loin des propriétés mécaniques du cartilage. D'autres chercheurs se sont intéressés aux hydrogels injectables pour régénérer le cartilage hyalin et présentent des résultats *in vitro* et/ou *in vivo* prometteurs. Par exemple, X. Li et al., (2021) ont mis en évidence le potentiel de l'encapsulation de cellules souches de tissus adipeux de rat dans un hydrogel injectable à base de sulfate de chondroïtine et de polyéthylène glycol (PEG) hyper ramifié pour régénérer le cartilage. La gélification de

l'hydrogel s'initie au bout de 3 min et atteint un module de Young proche du cartilage naturel (0,4 à 0,8 MPa). Les travaux de Y. Zhu et al., (2022) ont montré que les hydrogels granulaires injectables à base d'acide hyaluronique méthacrylé (HAMA), de PEG et de GelMA mélangé à des chondrocytes permettaient la reconstitution du cartilage chez le rat. Cependant ces deux études reposent sur l'utilisation du PEG qui n'est pas biodégradable et peut poser des problèmes de cytotoxicité à long terme. Pour pallier ce problème une autre étude récente a démontré la possibilité de combler un défaut cartilagineux chez le lapin en utilisant un PEG partiellement dégradable grâce à sa réticulation avec des peptides clivables par la métalloprotéase MMP-13, largement présente dans le cartilage dégénéré. De plus, le module de compression du matériau 12 semaines après l'injection est de 6,79 MPa, soit très proche des propriétés du tissu natif. Toutefois, cet hydrogel intelligent ne vise pas à encapsuler des cellules vivantes mais à stimuler la chondrogenèse des cellules du tissu natif environnant par la libération ciblée d'exosomes contenant la molécule bioactive kartogénine (KGN) (Tianyuan et al., 2023). Une des limitations principales de leur travaux est que cette libération d'exosomes reste incontrôlée. Ainsi comme on peut le constater, il n'existe malheureusement pas encore de solution parfaite à cette problématique clinique importante.

CONCLUSION

L'ingénierie tissulaire, conjuguant l'utilisation de matrices 3D et de cellules vivantes, est une voie d'avenir pour développer des traitements minimalement invasifs et restaurer les fonctions du tissu lésé. Cependant trouver des biomatériaux qui favoriseraient à la fois la survie cellulaire et présenteraient des propriétés mécaniques adéquates reste un défi majeur, en particulier lorsqu'il s'agit de mimer les tissus durs comme le cartilage ou l'os. Ce défi devient colossal lorsque le biomatériau doit pouvoir être bio imprimé en 3D. En effet, il doit non seulement posséder d'excellentes propriétés mécaniques et biologiques, mais doit également présenter les propriétés viscoélastiques adéquates et compatibles pour chaque étape du processus d'impression. L'objectif principal de ce projet de maîtrise était de créer des IPN et bio-encres à base de chitosane (CH) thermosensible et de GelMA (GM) permettant l'encapsulation cellulaire tout en ayant de bonnes propriétés mécaniques afin de mimer le cartilage.

La première partie de ce projet de maîtrise reposait sur l'optimisation de la synthèse de GM, hydrogel peu utilisé au sein de notre équipe. Ainsi, en nous basant sur la méthode en une seule étape développée par Shirahama et al., (2016), nous avons pu définir les paramètres de synthèse permettant d'obtenir de façon reproductible de la GM de type A avec un DS de 60 ou 90%. Nos résultats ont également montré un très faible impact de l'autoclave sur les propriétés mécaniques et rhéologiques de la GM (DS90%) et nous ont donc confirmés la possibilité de la stériliser par ce procédé.

Pour la suite du projet, il était essentiel de déterminer une méthode de fabrication d'hydrogels de CH-GM compatible avec l'encapsulation cellulaire. Pour cela nous avons opté pour l'ajout d'agents gélifiants biocompatibles permettant de neutraliser le CH acide (HCl) plutôt que l'utilisation d'une solution basique comme l'hydroxyde de sodium (NaOH). La méthode développée nous a ainsi permis de créer différents hydrogels à base de CH et GM à pH physiologique en y faisant varier la concentration en GM ainsi que son DS. Leur caractérisation par essais rhéologiques et mécaniques ont permis de montrer l'effet synergique de la gélification thermique du CH et de la photopolymérisation de la GM, démontrant l'obtention

d'IPN. Les résultats ont également mis en évidence que l'ajout de GM au CH était bénéfique jusqu'à une concentration de 2%_{w/v}. Au-delà de cette concentration, la GM entrave la gélification du CH, et affaiblit le réseau.

Aucune différence significative n'est observée lorsque le DS varie de 0 à 60%. En revanche, la formulation de 1,67%CH-2%GM DS90% se démarque considérablement des autres. Sa forte proportion en groupes méthacrylates et méthacrylamides forme un réseau densément réticulé après exposition à la lumière. La réticulation du CH se poursuit sous l'effet de la chaleur. Toutefois, il semblerait que le fort encombrement stérique nécessite un réarrangement conformationnel des chaînes polymériques créant un hydrogel relativement hydrophobe et contracté. Cet hydrogel dense et rigide possède une meilleure résistance mécanique que les hydrogels de CH, CH-gélatine et les autres CH-GM étudiés mais n'est pas suffisant pour mimer le cartilage. Il pourrait cependant servir pour remplir les défauts cartilagineux, ou pour la régénération de tissus mous.

L'ajout de GM au CH permet également de faciliter l'impression 3D sans bain de support. L'optimisation du système de photoréticulation de la bio-encre pourrait augmenter la résolution de la structure et conduire à l'impression de géométries plus complexes. L'utilisation du photoinitiateur Ru/SPS à la place du LAP pourrait également rendre possible la photo réticulation *in situ* requise au cours de l'impression 3D afin d'améliorer la résolution d'impression des structures à base de bio-encres thermosensibles de CH-GM, et constitue une voie à explorer.

Ainsi, même si l'objectif initial de ce projet de maîtrise n'est pas totalement atteint, l'étude met en lumière la possibilité de créer des bio-encres IPN à base de CH thermosensible et de GM ainsi que de nouvelles pistes à explorer pour son optimisation.

ANNEXE I

TEMPÉRATURE DE TRANSITION SOL-GEL ET GEL-SOL DE LA GELMA

Tableau-A I-1. Températures de transition sol-gel et gel-sol de la gélatine et de la GelMA type A et B

	Température de transition (°C)		
	Sol-gel	Gel-sol	Écart
Gélatine B	24	31	7
GelMA B DS~34%	21	27	6
GelMA B DS~49%	20	26	6
GelMA B DS~55%	24	29	5
GelMA B DS~58%	22	27	5
GelMA B DS~91%	21	27	6
Gélatine A	26	32	6
GelMA A DS~44%	22	28	6
GelMA A DS~49%	23	29	6
GelMA A DS~57%	23	27	4
GelMA A DS~65%	22	27	5
GelMA A DS~67%	23	28	5
GelMA A DS~83%	22	28	6
GelMA A DS~84%	22	28	6
GelMA A DS~91%	23	29	6
GelMA A DS~92%	22	28	6
GelMA A DS~96%	21	27	6

ANNEXE II

EFFET DE LA CONCENTRATION INITIALE EN HCL SUR LES IPN CH-GM

Nous avons également évalué l'impact d'une réduction de la concentration en HCl à 0,1 au lieu de 0,12M. Le CH préparé dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl) à 0,10 M gélifie plus rapidement que lorsqu'il est préparé dans du HCl à 0,12 M. En effet, plus le milieu est acide plus le pourcentage des groupements aminés du CH deviennent protonés (83,7 versus 69,8 % pour HCl=0,12M versus 0,10M selon les calculs théoriques). Le second est donc neutralisé plus rapidement en présence de la même quantité d'agents gélifiants (BGP/SHC). De manière générale, la viscosité initiale du CH-GM est plus élevée lorsque la concentration initiale en HCl est de 0,10 M. De plus, il devient de plus en plus complexe d'observer l'effet de la photopolymérisation de la GM.

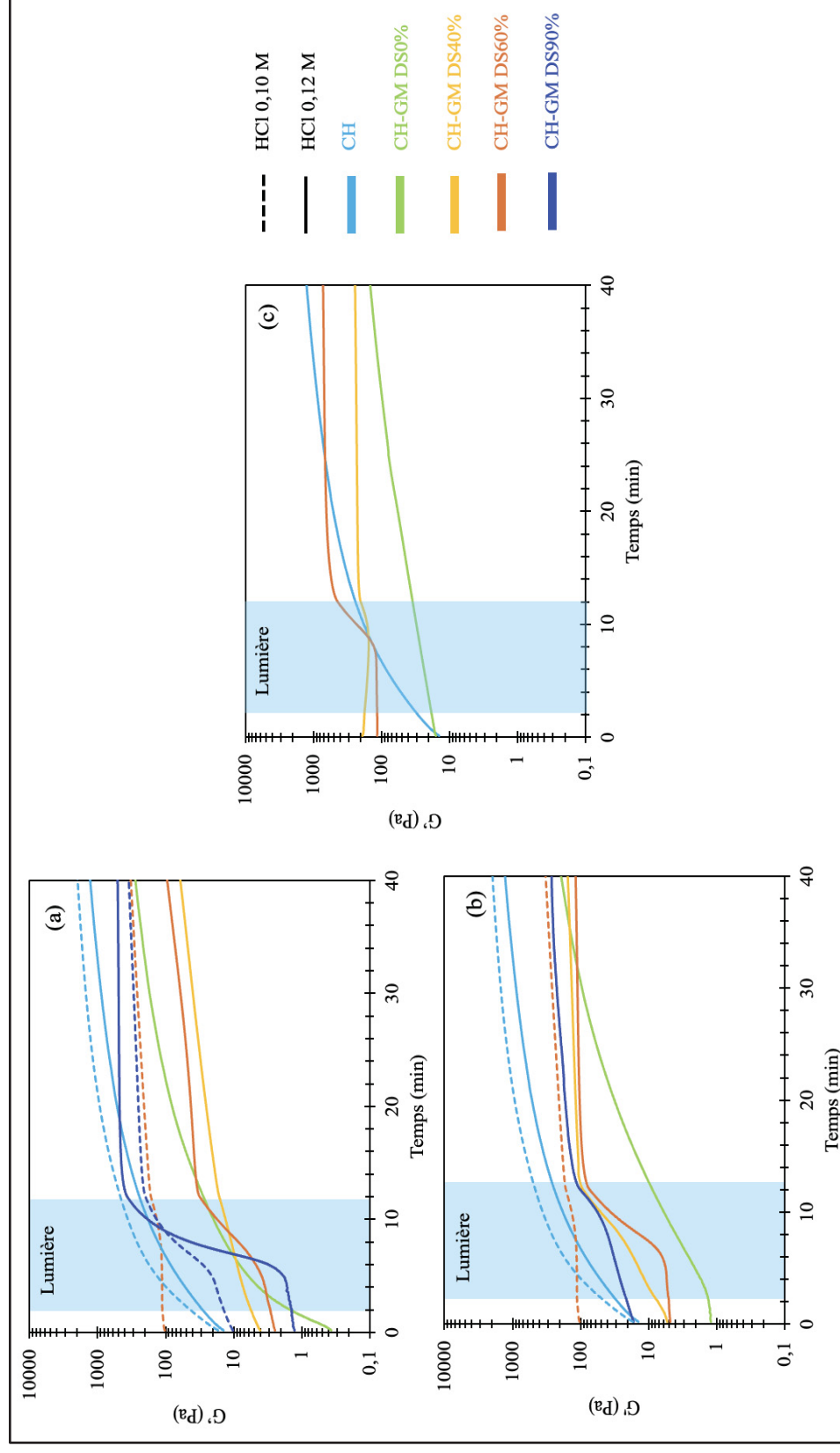


Figure A II-1. Effet du degré de substitution (DS) sur le module de stockage (G') des hydrogels de chitosane (CH), de chitosane-gélatine (CH-GM DS0%) et de chitosane-GelMA (CH-GM) à une concentration en gélatine/GelMA fixée à (a) 2%_{w/v}, (b) 3%_{w/v} ou (c) 5%_{w/v}. Hydrogels réticulés à 37°C en présence d'agents gélifiants et/ou photopolymérisés en présence du photoinitiateur LAP (0,05%_{w/v}, $t=10$ min), $n \geq 3$

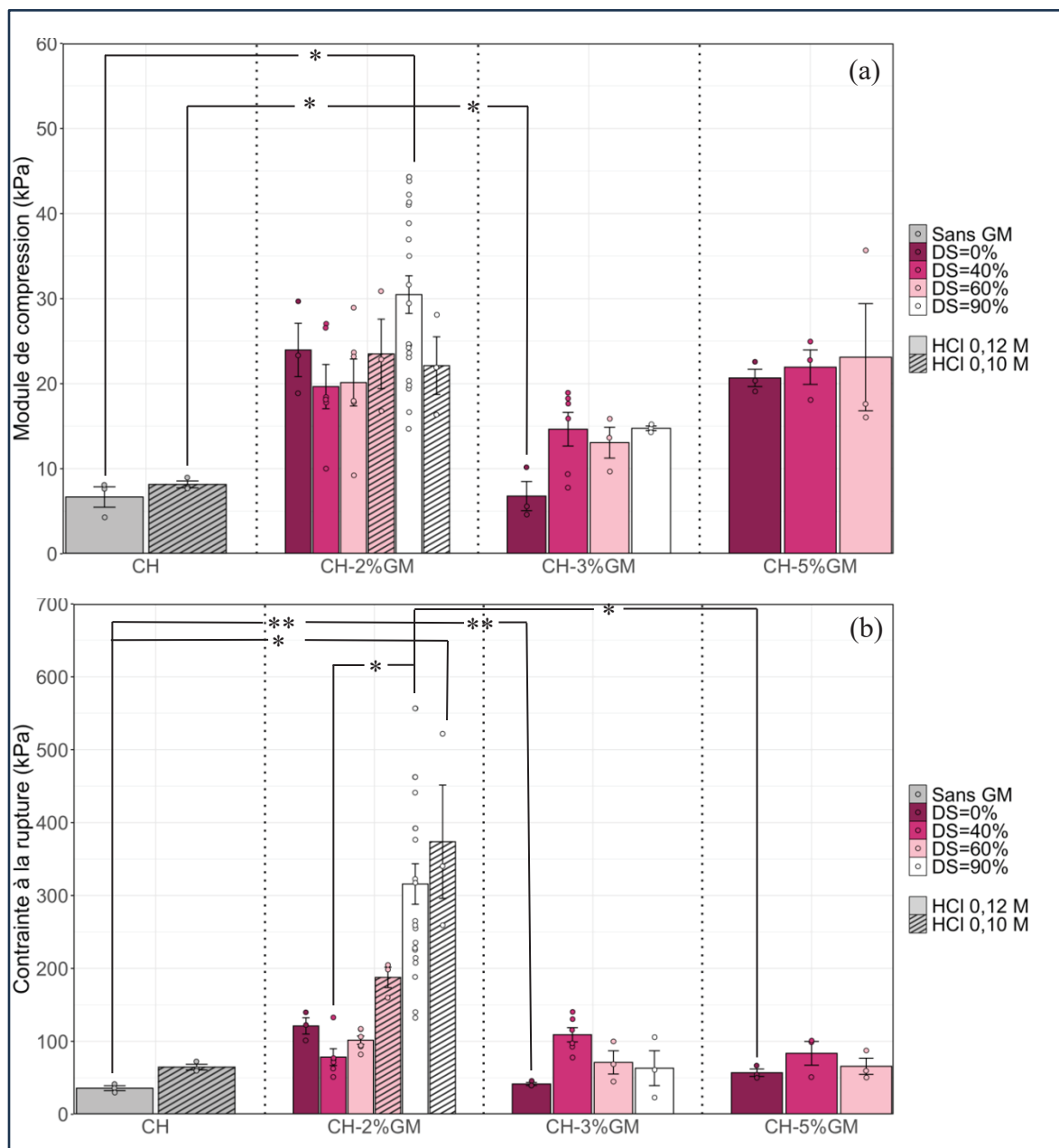


Figure-A II-2. Effet du degré de substitution (DS) sur (a) le module sécant à 20% de déformation, (b) la contrainte à la rupture et des hydrogels de chitosane-GelMA (CH-GM) pour différentes concentrations en GelMA (GM) (2%_{w/v}, 3%_{w/v} et 5%_{w/v}) et concentrations initiales en HCl (0,12 ou 0,10 M), $n \geq 3$ (RStudio). DS=0% : gélatine. Test de Kruskal-Wallis suivi du test post-hoc de Dunn – p-value ajustée (correction de Bonferroni) : $p < 0,05$: * $p < 0,01$: **, $p < 0,001$: *** et $p < 0,0001$: ****

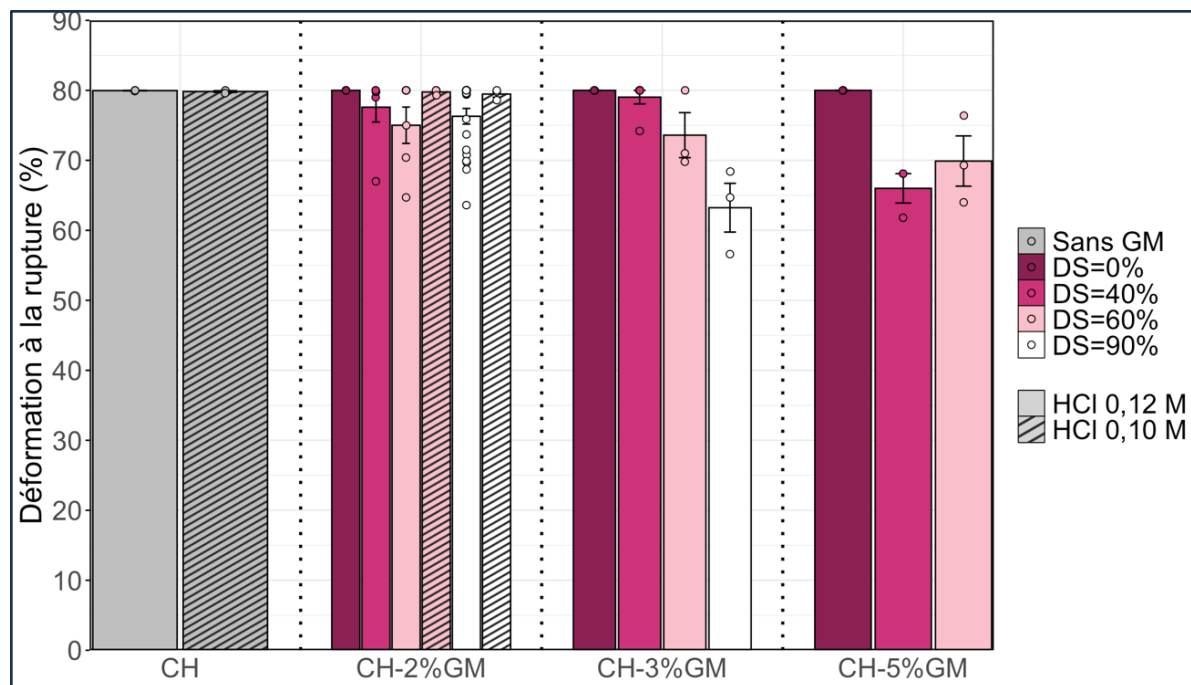


Figure-A II-3. Effet du degré de substitution (DS) sur déformation à la rupture des hydrogels de chitosane-GelMA (CH-GM) pour différentes concentrations en GelMA (GM) (2%_{w/v}, 3%_{w/v} et 5%_{w/v}) et concentrations initiales en HCl (0,12 ou 0,10 M), $n \geq 3$ (RStudio)

ANNEXE III

REPRODUCTIBILITÉ DES LOTS DE CH-2%GM DS90%

Nous avons tout d'abord vérifié la reproductibilité des gels, en utilisant les cinq lots de GelMA (GM) type A présentés à la section 4.1.1, ayant un degré de substitution (DS) en moyenne de $89,2 \pm 5,5\%$ (DS~90%). Les hydrogels de CH-2%GM DS90% fabriqués à partir des différents lots de GM ont été testés en compression unilatérale jusqu'à 80% de déformation. La Figure-A III-1 présente les résultats sous forme de médianes et quartiles des valeurs du module sécant à 20% de déformation. Dans l'ensemble, les propriétés mécaniques des hydrogels de CH-2%GM DS90% sont proches malgré quelques variabilités (non significatives), qui peuvent également s'expliquer par l'origine naturelle des polymères les constituant. Ainsi, pour la suite des résultats de compression, les cinq lots de CH-2%GM DS90% seront regroupés à l'exception des tests de compression cyclique et d'immersion puisqu'il s'agit d'expériences à part.

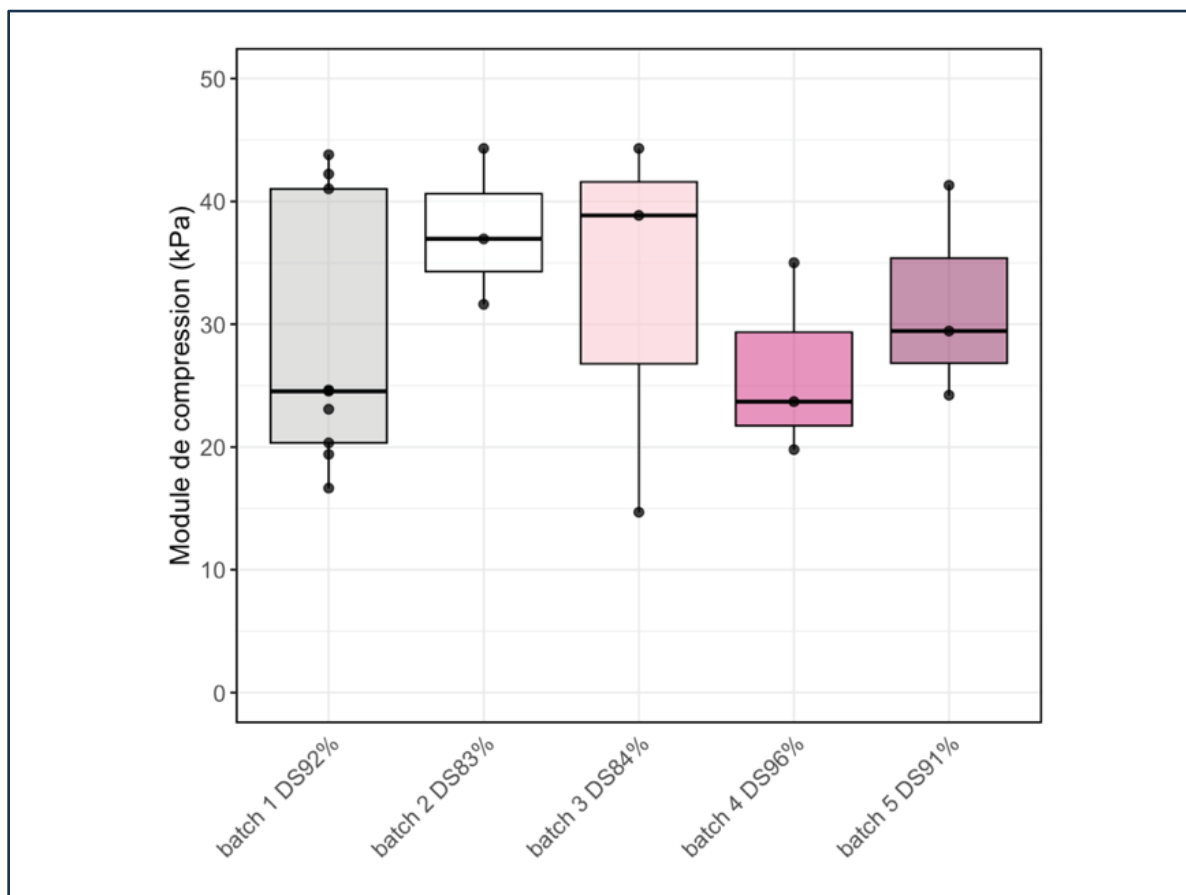


Figure-A III-1. Boîtes à moustache des modules sécants à 20% de déformation des hydrogels de 1,67%chitosane-2%GelMA synthétisés à partir de différentes GelMA (type A, DS~90%) lyophilisée, $n \geq 3$ (RStudio)

ANNEXE IV

TESTS D'EXTRUSION DU CH-3%GÉLATINE

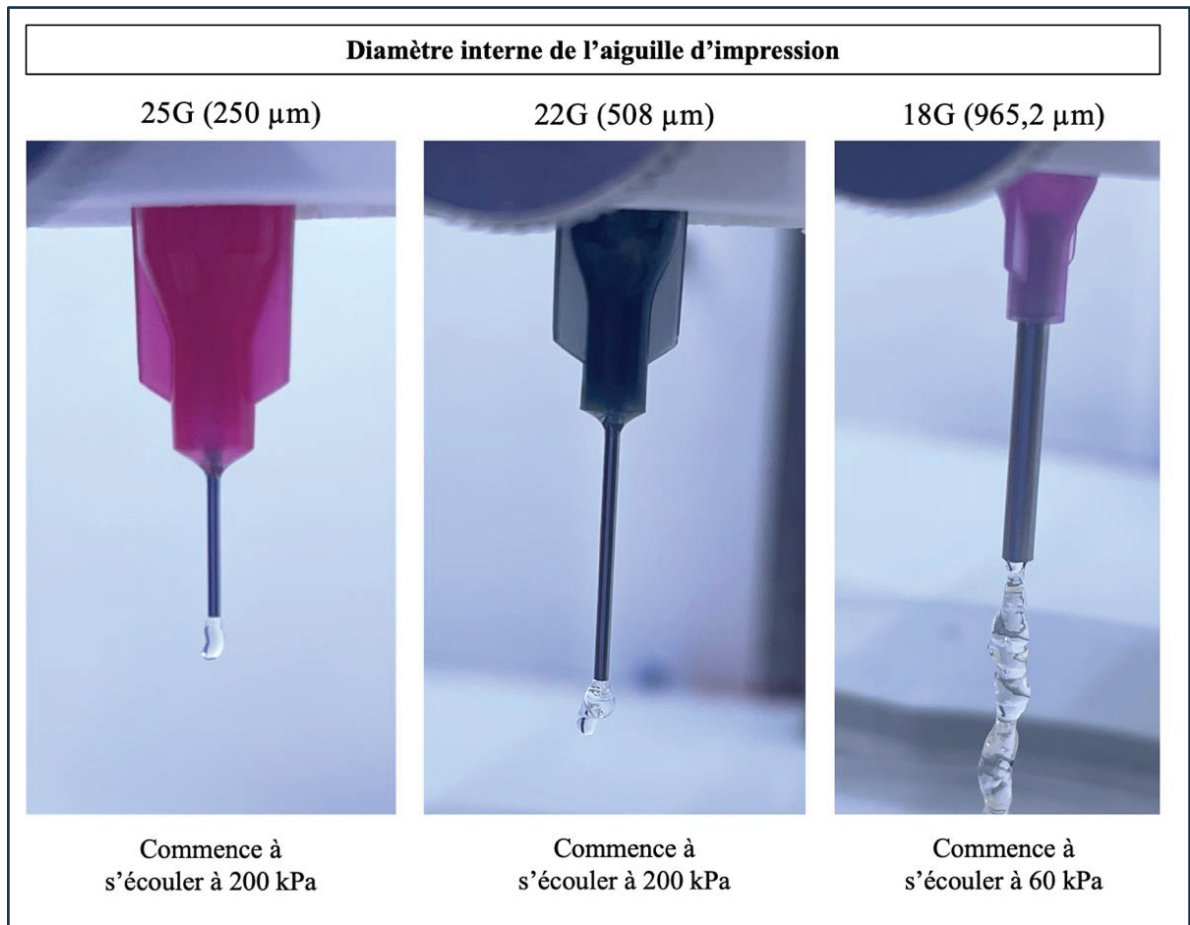


Figure-A IV-1. Tests d'extrusion de l'hydrogel de 1,67%CH 3%Gélatine (agents gélifiants : BGP/SHC) à travers des aiguilles d'impression de différents diamètres internes

LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adoungotchodo, A. (2022). *Conception et caractérisation d'un hydrogel bioactif pour la régénération du disque intervertébral*. École de Technologie Supérieure (ÉTS), Montréal, Canada.
- Ahmed, J. (2017). Rheological Properties of Gelatin and Advances in Measurement. Dans *Advances in Food Rheology and Its Applications* (pp. 377-404). (S.l.) : Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100431-9.00015-2>
- Aldana, A. A., Valente, F., Dilley, R., & Doyle, B. (2021). Development of 3D bioprinted GelMA-alginate hydrogels with tunable mechanical properties. *Bioprinting*, 21, e00105. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00105>
- Alinejad, Y., Adoungotchodo, A., Hui, E., Zehtabi, F., & Lerouge, S. (2018). An injectable chitosan/chondroitin sulfate hydrogel with tunable mechanical properties for cell therapy/tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 132-141. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.069>
- Aljaber, M. B., Verisqa, F., Keskin-Erdogan, Z., Patel, K. D., Chau, D. Y. S., & Knowles, J. C. (2023). Influence of Gelatin Source and Bloom Number on Gelatin Methacryloyl Hydrogels Mechanical and Biological Properties for Muscle Regeneration. *Biomolecules*, 13(5), 811. <https://doi.org/10.3390/biom13050811>
- Ashammakhi, N., GhavamiNejad, A., Tutar, R., Fricker, A., Roy, I., Chatzistavrou, X., ... Caterson, E. J. (2022). Highlights on Advancing Frontiers in Tissue Engineering. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 28(3), 633-664. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2021.0012>
- Assaad, E., Maire, M., & Lerouge, S. (2015). Injectable thermosensitive chitosan hydrogels with controlled gelation kinetics and enhanced mechanical resistance. *Carbohydrate Polymers*, 130, 87-96. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.04.063>
- Ben Messaoud, G., Aveic, S., Wachendoerfer, M., Fischer, H., & Richtering, W. (2023). 3D Printable Gelatin Methacryloyl (GelMA)-Dextran Aqueous Two-Phase System with Tunable Pores Structure and Size Enables Physiological Behavior of Embedded Cells In Vitro. *Small*, 19(44), 2208089. <https://doi.org/10.1002/smll.202208089>
- Blaeser, A., Duarte Campos, D. F., Puster, U., Richtering, W., Stevens, M. M., & Fischer, H. (2016). Controlling Shear Stress in 3D Bioprinting is a Key Factor to Balance Printing Resolution and Stem Cell Integrity. *Advanced Healthcare Materials*, 5(3), 326-333. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500677>

- Brownson, J. R. S. (2014). Laws of Light. Dans *Solar Energy Conversion Systems* (pp. 41-66). (S.l.) : Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397021-3.00003-X>
- Bryant, S. J., Nuttelman, C. R., & Anseth, K. S. (2000). Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 11(5), 439-457. <https://doi.org/10.1163/156856200743805>
- Ceccaldi, C., Assaad, E., Hui, E., Buccionyte, M., Adoungotchodo, A., & Lerouge, S. (2017). Optimization of Injectable Thermosensitive Scaffolds with Enhanced Mechanical Properties for Cell Therapy. *Macromolecular Bioscience*, 17(6), 1600435. <https://doi.org/10.1002/mabi.201600435>
- Chen, S., Wang, Y., Lai, J., Tan, S., & Wang, M. (2023). Structure and Properties of Gelatin Methacryloyl (GelMA) Synthesized in Different Reaction Systems. *Biomacromolecules*, 24(6), 2928-2941. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.3c00302>
- Chenite, A., Chaput, C., Wang, D., Combes, C., Buschmann, M. D., Hoemann, C. D., ... Selmani, A. (2000). Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials*, 21(21), 2155-2161. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00116-2)
- Claaßen, C., Claaßen, M. H., Truffault, V., Sewald, L., Tovar, G. E. M., Borchers, K., & Southan, A. (2018). Quantification of Substitution of Gelatin Methacryloyl: Best Practice and Current Pitfalls. *Biomacromolecules*, 19(1), 42-52. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01221>
- Crini, Grégorio, Guibal, Éric, Morcellet, Michel, Torri, Giangiacomo, & Badot, Pierre-Marie. (2009). Chitine et Chitosane – synthèse, propriétés et principales applications. Dans *Chitine et chitosane, du biopolymère à l'application* (Presses universitaires de France-Comté, pp. 19-54). Université de Franche-Comté, France : (s.n.).
- Dagenais, S., Caro, J., & Haldeman, S. (2008). A systematic review of low back pain cost of illness studies in the United States and internationally. *The Spine Journal*, 8(1), 8-20. <https://doi.org/10.1016/j.spinee.2007.10.005>
- Davern, J. W., Hipwood, L., Bray, L. J., Meinert, C., & Klein, T. J. (2024). Addition of Laponite to gelatin methacryloyl bioinks improves the rheological properties and printability to create mechanically tailorable cell culture matrices. *APL Bioengineering*, 8(1), 016101. <https://doi.org/10.1063/5.0166206>
- De Maeseneer, T., Van Damme, L., Aktan, M. K., Braem, A., Moldenaers, P., Van Vlierberghe, S., & Cardinaels, R. (2024). Powdered Cross-Linked Gelatin Methacryloyl as an Injectable Hydrogel for Adipose Tissue Engineering. *Gels*, 10(3), 167. <https://doi.org/10.3390/gels10030167>

- De Vries, R. B. M., Leenaars, M., Tra, J., Huijbregtse, R., Bongers, E., Jansen, J. A., ... Ritskes-Hoitinga, M. (2015). The potential of tissue engineering for developing alternatives to animal experiments: a systematic review: Tissue-engineered alternatives. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(7), 771-778. <https://doi.org/10.1002/term.1703>
- Di Muzio, L., Cienzo, F., Paolicelli, P., Petralito, S., Garzoli, S., Brandelli, C., ... Antonietta Casadei, M. (2021). A convenient strategy to synthesize highly tunable gelatin methacryloyl with very low gelation temperature. *European Polymer Journal*, 154, 110538. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2021.110538>
- Gaglio, C. G., Baruffaldi, D., Pirri, C. F., Napione, L., & Frascella, F. (2024). GelMA synthesis and sources comparison for 3D multimaterial bioprinting. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 12, 1383010. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1383010>
- Gerlach, G., & Arndt, K.-F. (Éds). (2010). *Hydrogel Sensors and Actuators: Engineering and Technology* (Vol. 6). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-75645-3>
- Gu, Z., Fu, J., Lin, H., & He, Y. (2020). Development of 3D bioprinting: From printing methods to biomedical applications. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 15(5), 529-557. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2019.11.003>
- He, J., Sun, Y., Gao, Q., He, C., Yao, K., Wang, T., ... He, Y. (2023). Gelatin Methacryloyl Hydrogel, from Standardization, Performance, to Biomedical Application. *Advanced Healthcare Materials*, 12(23), 2300395. <https://doi.org/10.1002/adhm.202300395>
- Ho, T.-C., Chang, C.-C., Chan, H.-P., Chung, T.-W., Shu, C.-W., Chuang, K.-P., ... Tyan, Y.-C. (2022). Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine. *Molecules*, 27(9), 2902. <https://doi.org/10.3390/molecules27092902>
- Iervolino, F., Belgio, B., Bonessa, A., Potere, F., Suriano, R., Boschetti, F., ... Levi, M. (2023). Versatile and non-cytotoxic GelMA-xanthan gum biomaterial ink for extrusion-based 3D bioprinting. *Bioprinting*, 31, e00269. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2023.e00269>
- Inamdar, A., Cherukattu, J., Anand, A., & Kandasubramanian, B. (2018). Thermoplastic-Toughened High-Temperature Cyanate Esters and Their Application in Advanced Composites. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 57(13), 4479-4504. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b05202>
- Jafari, M., Paknejad, Z., Rad, M. R., Motamedian, S. R., Eghbal, M. J., Nadjmi, N., & Khojasteh, A. (2017). Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 105(2), 431-459. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33547>

- Jongprasitkul, H., Turunen, S., Parihar, V. S., & Kellomäki, M. (2023). Sequential Cross-linking of Gallic Acid-Functionalized GelMA-Based Bioinks with Enhanced Printability for Extrusion-Based 3D Bioprinting. *Biomacromolecules*, 24(1), 502-514. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c01418>
- Joshi, P., Ahmed, M. S. U., Vig, K., Vega Erramuspe, I. B., & Auad, M. L. (2021). Synthesis and characterization of chemically crosslinked gelatin and chitosan to produce hydrogels for biomedical applications. *Polymers for Advanced Technologies*, 32(5), 2229-2239. <https://doi.org/10.1002/pat.5257>
- Knowlton, S., Yenilmez, B., Anand, S., & Tasoglu, S. (2017). Photocrosslinking-based bioprinting: Examining crosslinking schemes. *Bioprinting*, 5, 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2017.03.001>
- Kretlow, J. D., Klouda, L., & Mikos, A. G. (2007). Injectable matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(4-5), 263-273. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.013>
- Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J.P., & Atala, A. (2020). Principles of tissue engineering. (S.l.) : (s.n.).
- Lee, B. H., Shirahama, H., Cho, N.-J., & Tan, L. P. (2015). Efficient and controllable synthesis of highly substituted gelatin methacrylamide for mechanically stiff hydrogels. *RSC Advances*, 5(128), 106094-106097. <https://doi.org/10.1039/C5RA22028A>
- Lee, B., Lum, N., Seow, L., Lim, P., & Tan, L. (2016). Synthesis and Characterization of Types A and B Gelatin Methacryloyl for Bioink Applications. *Materials*, 9(10), 797. <https://doi.org/10.3390/ma9100797>
- Leu Alexa, R., Iovu, H., Ghitman, J., Serafim, A., Stavarache, C., Marin, M.-M., & Ianchis, R. (2021). 3D-Printed Gelatin Methacryloyl-Based Scaffolds with Potential Application in Tissue Engineering. *Polymers*, 13(5), 727. <https://doi.org/10.3390/polym13050727>
- Leucht, A., Volz, A.-C., Rogal, J., Borchers, K., & Kluger, P. J. (2020). Advanced gelatin-based vascularization bioinks for extrusion-based bioprinting of vascularized bone equivalents. *Scientific Reports*, 10(1), 5330. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62166-w>
- Levato, R., Visser, J., Planell, J. A., Engel, E., Malda, J., & Mateos-Timoneda, M. A. (2014). Biofabrication of tissue constructs by 3D bioprinting of cell-laden microcarriers. *Biofabrication*, 6(3), 035020. <https://doi.org/10.1088/1758-5082/6/3/035020>

- Li, J., Moeinzadeh, S., Kim, C., Pan, C.-C., Weale, G., Kim, S., ... Yang, Y. P. (2023). Development and systematic characterization of GelMA/alginate/PEGDMA/xanthan gum hydrogel bioink system for extrusion bioprinting. *Biomaterials*, 293, 121969. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121969>
- Li, X., Xu, Q., Johnson, M., Wang, X., Lyu, J., Li, Y., ... Wang, W. (2021). A chondroitin sulfate based injectable hydrogel for delivery of stem cells in cartilage regeneration. *Biomaterials Science*, 9(11), 4139-4148. <https://doi.org/10.1039/D1BM00482D>
- Lim, K. S., Galarraga, J. H., Cui, X., Lindberg, G. C. J., Burdick, J. A., & Woodfield, T. B. F. (2020). Fundamentals and Applications of Photo-Cross-Linking in Bioprinting. *Chemical Reviews*, 120(19), 10662-10694. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00812>
- Lim, K. S., Klotz, B. J., Lindberg, G. C. J., Melchels, F. P. W., Hooper, G. J., Malda, J., ... Woodfield, T. B. F. (2019). Visible Light Cross-Linking of Gelatin Hydrogels Offers an Enhanced Cell Microenvironment with Improved Light Penetration Depth. *Macromolecular Bioscience*, 19(6), 1900098. <https://doi.org/10.1002/mabi.201900098>
- Long, R. G., Torre, O. M., Hom, W. W., Assael, D. J., & Iatridis, J. C. (2016). Design Requirements for Annulus Fibrosus Repair: Review of Forces, Displacements, and Material Properties of the Intervertebral Disk and a Summary of Candidate Hydrogels for Repair. *Journal of Biomechanical Engineering*, 138(2), 021007. <https://doi.org/10.1115/1.4032353>
- Mobaraki, M., Ghaffari, M., Yazdanpanah, A., Luo, Y., & Mills, D. K. (2020). Bioinks and bioprinting: A focused review. *Bioprinting*, 18, e00080. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2020.e00080>
- Monteiro, N., Thrivikraman, G., Athirasala, A., Tahayeri, A., França, C. M., Ferracane, J. L., & Bertassoni, L. E. (2018). Photopolymerization of cell-laden gelatin methacryloyl hydrogels using a dental curing light for regenerative dentistry. *Dental Materials*, 34(3), 389-399. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2017.11.020>
- Mouser, V. H. M., Melchels, F. P. W., Visser, J., Dhert, W. J. A., 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. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/8/3/035003>
- Nguyen, A. K., Goering, P. L., Elespuru, R. K., Sarkar Das, S., & Narayan, R. J. (2020). The Photoinitiator Lithium Phenyl (2,4,6-Trimethylbenzoyl) Phosphinate with Exposure to 405 nm Light Is Cytotoxic to Mammalian Cells but Not Mutagenic in Bacterial Reverse Mutation Assays. *Polymers*, 12(7), 1489. <https://doi.org/10.3390/polym12071489>

- Nikolova, M. P., & Chavali, M. S. (2019). Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. *Bioactive Materials*, 4, 271-292. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.10.005>
- O'Connell, C. D., Zhang, B., Onofrillo, C., Duchi, S., Blanchard, R., Quigley, A., ... Wallace, G. G. (2018). Tailoring the mechanical properties of gelatin methacryloyl hydrogels through manipulation of the photocrosslinking conditions. *Soft Matter*, 14(11), 2142-2151. <https://doi.org/10.1039/C7SM02187A>
- Pahoff, S., Meinert, C., Bas, O., Nguyen, L., Klein, T. J., & Hutmacher, D. W. (2019). Effect of gelatin source and photoinitiator type on chondrocyte redifferentiation in gelatin methacryloyl-based tissue-engineered cartilage constructs. *Journal of Materials Chemistry B*, 7(10), 1761-1772. <https://doi.org/10.1039/C8TB02607F>
- Pal, K., Sarkar, P., Anis, A., Wiszumirska, K., & Jarzębski, M. (2021). Polysaccharide-Based Nanocomposites for Food Packaging Applications. *Materials*, 14(19), 5549. <https://doi.org/10.3390/ma14195549>
- Paul, S. (2023). *Gelatin-Methacryloyl-Chitosan (GelMA-CS) Hydrogel: a Novel Orthopaedic Bioadhesive*. Queensland University of Technology.
- Paul, S., Schrobback, K., Tran, P. A., Meinert, C., Davern, J. W., Weekes, A., & Klein, T. J. (2023). Photo-Cross-Linkable, Injectable, and Highly Adhesive GelMA-Glycol Chitosan Hydrogels for Cartilage Repair. *Advanced Healthcare Materials*, 12(32), 2302078. <https://doi.org/10.1002/adhm.202302078>
- Pepelanova, I., Kruppa, K., Scheper, T., & Lavrentieva, A. (2018). Gelatin-Methacryloyl (GelMA) Hydrogels with Defined Degree of Functionalization as a Versatile Toolkit for 3D Cell Culture and Extrusion Bioprinting. *Bioengineering*, 5(3), 55. <https://doi.org/10.3390/bioengineering5030055>
- Perera, K., Ivone, R., Natekin, E., Wilga, Cheryl. A., Shen, J., & Menon, J. U. (2021). 3D Bioprinted Implants for Cartilage Repair in Intervertebral Discs and Knee Menisci. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 754113. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.754113>
- Peyret, C., Elkhoury, K., Bouguet-Bonnet, S., Poinsignon, S., Boulogne, C., Giraud, T., ... Arab-Tehrany, E. (2023). Gelatin Methacryloyl (GelMA) Hydrogel Scaffolds: Predicting Physical Properties Using an Experimental Design Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(17), 13359. <https://doi.org/10.3390/ijms241713359>
- Rahimnejad, M. (2022). Thermosensitive Chitosan-based Hydrogels for Extrusion-based Bioprinting and Injectable Scaffold for Articular Tissue Engineering.

- Rahimnejad, M., Adoungotchodo, A., Demarquette, N. R., & Lerouge, S. (2022). FRESH bioprinting of biodegradable chitosan thermosensitive hydrogels. *Bioprinting*, 27, e00209. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2022.e00209>
- Rahimnejad, M., Labonté-Dupuis, T., Demarquette, N. R., & Lerouge, S. (2021). A rheological approach to assess the printability of thermosensitive chitosan-based biomaterial inks. *Biomedical Materials*, 16(1), 015003. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/abb2d8>
- Ramesh, S., & Ramalingam, M. (2021). Aqueous-Mediated Synthesis and Characterization of Gelatin Methacryloyl for Biomedical Applications. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(5), 6269-6279. <https://doi.org/10.33263/BRIAC125.62696279>
- Rastin, H., Ormsby, R. T., Atkins, G. J., & Losic, D. (2020). 3D Bioprinting of Methylcellulose/Gelatin-Methacryloyl (MC/GelMA) Bioink with High Shape Integrity. *ACS Applied Bio Materials*, 3(3), 1815-1826. <https://doi.org/10.1021/acsabm.0c00169>
- Rizwan, M., Chan, S. W., Comeau, P. A., Willett, T. L., & Yim, E. K. F. (2020). Effect of sterilization treatment on mechanical properties, biodegradation, bioactivity and printability of GelMA hydrogels. *Biomedical Materials*, 15(6), 065017. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aba40c>
- Sajkiewicz, P., & Kołbuk, D. (2014). Electrospinning of gelatin for tissue engineering – molecular conformation as one of the overlooked problems. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 25(18), 2009-2022. <https://doi.org/10.1080/09205063.2014.975392>
- Saravanan, S., Vimalraj, S., Thanikaivelan, P., Banudevi, S., & Manivasagam, G. (2019). A review on injectable chitosan/beta glycerophosphate hydrogels for bone tissue regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*, 121, 38-54. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.014>
- Sewald, L., Claßen, C., Götz, T., Claßen, M. H., Truffault, V., Tovar, G. E. M., ... Borchers, K. (2018). Beyond the Modification Degree: Impact of Raw Material on Physicochemical Properties of Gelatin Type A and Type B Methacryloyls. *Macromolecular Bioscience*, 18(12), 1800168. <https://doi.org/10.1002/mabi.201800168>
- Seymour, A. J., Shin, S., & Heilshorn, S. C. (2021). 3D Printing of Microgel Scaffolds with Tunable Void Fraction to Promote Cell Infiltration.
- Shen, J., Song, W., Liu, J., Peng, X., Tan, Z., Xu, Y., ... Ren, L. (2024). 3D bioprinting by reinforced bioink based on photocurable interpenetrating networks for cartilage tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, 254, 127671. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127671>

- Shirahama, H., Lee, B. H., Tan, L. P., & Cho, N.-J. (2016). Precise Tuning of Facile One-Pot Gelatin Methacryloyl (GelMA) Synthesis. *Scientific Reports*, 6(1), 31036. <https://doi.org/10.1038/srep31036>
- Shukla, P., Mitruka, M., & Pati, F. (2022). The effect of the synthetic route on the biophysiochemical properties of methacrylated gelatin (GelMA) based hydrogel for development of GelMA-based bioinks for 3D bioprinting applications. *Materialia*, 25, 101542. <https://doi.org/10.1016/j.mtla.2022.101542>
- Shyam, R., & Palaniappan, A. (2023). Effect of sterilization techniques on biomaterial inks' properties and 3D bioprinting parameters. *Bioprinting*, 33, e00294. <https://doi.org/10.1016/j.bprint.2023.e00294>
- Silverstein, M. S. (2020). Interpenetrating polymer networks: So happy together? *Polymer*, 207, 122929. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2020.122929>
- Sultana, S., Ali, Md. E., & Ahamad, M. N. U. (2018). Gelatine, collagen, and single cell proteins as a natural and newly emerging food ingredients. Dans *Preparation and Processing of Religious and Cultural Foods* (pp. 215-239). (S.I.): Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101892-7.00011-0>
- Suo, H., Zhang, D., Yin, J., Qian, J., Wu, Z. L., & Fu, J. (2018). Interpenetrating polymer network hydrogels composed of chitosan and photocrosslinkable gelatin with enhanced mechanical properties for tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*, 92, 612-620. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.07.016>
- Terzopoulou, Z., Zamboulis, A., Koumentakou, I., Michailidou, G., Noordam, M. J., & Bikiaris, D. N. (2022). Biocompatible Synthetic Polymers for Tissue Engineering Purposes. *Biomacromolecules*, 23(5), 1841-1863. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.2c00047>
- Tianyuan, Z., Haoyuan, D., Jianwei, L., Songlin, H., Xu, L., Hao, L., ... Shuyun, L. (2023). A Smart MMP13-Responsive Injectable Hydrogel with Inflammatory Diagnostic Logic and Multiphase Therapeutic Ability to Orchestrate Cartilage Regeneration. *Advanced Functional Materials*, 33(16), 2213019. <https://doi.org/10.1002/adfm.202213019>
- Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z., & Akil, H. Md. (2015). Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 57, 414-433. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.053>
- Urushibara, A., Kodama, S., & Yokoya, A. (2014). Induction of genetic instability by transfer of a UV-A-irradiated chromosome. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 766, 29-34. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.02.005>

- Van Den Bulcke, A. I., Bogdanov, B., De Rooze, N., Schacht, E. H., Cornelissen, M., & Berghmans, H. (2000). Structural and Rheological Properties of Methacrylamide Modified Gelatin Hydrogels. *Biomacromolecules*, 1(1), 31-38. <https://doi.org/10.1021/bm990017d>
- Wang, L., Cao, Y., Shen, Z., Li, M., Zhang, W., Liu, Y., ... Sang, S. (2023). 3D printed GelMA/carboxymethyl chitosan composite scaffolds for vasculogenesis. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 72(7), 524-536. <https://doi.org/10.1080/00914037.2022.2032702>
- Wang, X., Jiang, J., Yuan, C., Gu, L., Zhang, X., Yao, Y., & Shao, L. (2024). 3D bioprinting of GelMA with enhanced extrusion printability through coupling sacrificial carrageenan. *Biomaterials Science*, 12(3), 738-747. <https://doi.org/10.1039/D3BM01489D>
- Xu, P., Guan, J., Chen, Y., Xiao, H., Yang, T., Sun, H., ... Mao, Y. (2021). Stiffness of photocrosslinkable gelatin hydrogel influences nucleus pulposus cell properties *in vitro*. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 25(2), 880-891. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16141>
- Yang, T. (2012). *Mechanical and swelling properties of hydrogels*. Stockholm : Chemical Science and Engineering, KTH Royal Institute of Technology.
- Yin, J., Yan, M., Wang, Y., Fu, J., & Suo, H. (2018). 3D Bioprinting of Low-Concentration Cell-Laden Gelatin Methacrylate (GelMA) Bioinks with a Two-Step Cross-linking Strategy. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(8), 6849-6857. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b16059>
- Yogeshwaran, S., Goodarzi Hosseinabadi, H., Gendy, D. E., & Miri, A. K. (2024). Design considerations and biomaterials selection in embedded extrusion 3D bioprinting. *Biomaterials Science*, 12(18), 4506-4518. <https://doi.org/10.1039/D4BM00550C>
- Young, A. T., White, O. C., & Daniele, M. A. (2020). Rheological Properties of Coordinated Physical Gelation and Chemical Crosslinking in Gelatin Methacryloyl (GelMA) Hydrogels. *Macromolecular Bioscience*, 20(12), 2000183. <https://doi.org/10.1002/mabi.202000183>
- Yue, K., Li, X., Schrobback, K., Sheikhi, A., Annabi, N., Leijten, J., ... Khademhosseini, A. (2017). Structural analysis of photocrosslinkable methacryloyl-modified protein derivatives. *Biomaterials*, 139, 163-171. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.04.050>
- Zargar, V., Asghari, M., & Dashti, A. (2015). A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications.

- Zhang, F., Scull, G., Gluck, J. M., Brown, A. C., & King, M. W. (2023). Effects of sterilization methods on gelatin methacryloyl hydrogel properties and macrophage gene expression in vitro. *Biomedical Materials*, 18(1), 015015. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aca4b2>
- Zhang, Q., Lu, H., Kawazoe, N., & Chen, G. (2014). Pore size effect of collagen scaffolds on cartilage regeneration. *Acta Biomaterialia*, 10(5), 2005-2013. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.042>
- Zhao, J., Griffin, M., Cai, J., Li, S., Bulter, P. E. M., & Kalaskar, D. M. (2016). Bioreactors for tissue engineering: An update. *Biochemical Engineering Journal*, 109, 268-281. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.01.018>
- Zhao, X., Shah, D., Gandhi, K., Wei, W., Dwibedi, N., Webster, L., & Sambamoorthi, U. (2019). Clinical, humanistic, and economic burden of osteoarthritis among noninstitutionalized adults in the United States. *Osteoarthritis and Cartilage*, 27(11), 1618-1626. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.07.002>
- Zheng, J., Zhu, M., Ferracci, G., Cho, N., & Lee, B. H. (2018). Hydrolytic Stability of Methacrylamide and Methacrylate in Gelatin Methacryloyl and Decoupling of Gelatin Methacrylamide from Gelatin Methacryloyl through Hydrolysis. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 219(18), 1800266. <https://doi.org/10.1002/macp.201800266>
- Zhou, M., Lee, B. H., Tan, Y. J., & Tan, L. P. (2019). Microbial transglutaminase induced controlled crosslinking of gelatin methacryloyl to tailor rheological properties for 3D printing. *Biofabrication*, 11(2), 025011. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab063f>
- Zhou, X., Zhu, W., Nowicki, M., Miao, S., Cui, H., Holmes, B., ... Zhang, L. G. (2016). 3D Bioprinting a Cell-Laden Bone Matrix for Breast Cancer Metastasis Study. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(44), 30017-30026. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b10673>
- Zhu, M., Wang, Y., Ferracci, G., Zheng, J., Cho, N.-J., & Lee, B. H. (2019). Gelatin methacryloyl and its hydrogels with an exceptional degree of controllability and batch-to-batch consistency. *Scientific Reports*, 9(1), 6863. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42186-x>
- Zhu, Y., Sun, Y., Rui, B., Lin, J., Shen, J., Xiao, H., ... Yang, Y. (2022). A Photoannealed Granular Hydrogel Facilitating Hyaline Cartilage Regeneration via Improving Chondrogenic Phenotype. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(36), 40674-40687. <https://doi.org/10.1021/acsami.2c11956>