

UNIVERSITE DE NANTES  
UNITE DE FORMATION ET DE RECHERCHE D'ODONTOLOGIE

Année 2019  
N° 3548

**LES HYDROGELS UTILISES EN 3D-BIOPRINTING EN  
VUE D'UNE REGENERATION OSSEUSE**

THESE POUR LE DIPLÔME D'ETAT DE  
DOCTEUR EN CHIRURGIE DENTAIRE

*présentée  
et soutenue publiquement par*

**Jérémy GLOMET**  
Né le 19/06/1993

*Le 12 Juin 2019 devant le jury ci-dessous :*

Président : Monsieur le Professeur Pierre WEISS

Assesseur : Monsieur le Professeur Zahi BADRAN

Assesseur : Monsieur le Docteur Saïd KIMAKHE

Directeur de Thèse : Monsieur le Docteur Gildas RETHORE

Co-Directeur de Thèse : Monsieur le Docteur Xavier STRUILLLOU

**UNIVERSITE DE NANTES**

Président  
Pr LABOUX Olivier

**FACULTE DE CHIRURGIE DENTAIRE**

Doyen  
Pr GIUMELLI Bernard

Assesseurs  
Dr RENAUDIN Stéphane  
Pr SOUEIDAN Assem  
Pr WEISS Pierre


**PROFESSEURS DES UNIVERSITES  
PRATICIENS HOSPITALIERS DES C.S.E.R.D.**

Mme ALLIOT-LICHT Brigitte  
M. AMOURIQ Yves  
M. BADRAN Zahi  
M. GIUMELLI Bernard  
M. LE GUEHENNEC Laurent

M. LESCLOUS Philippe  
Mme PEREZ Fabienne  
M. SOUEIDAN Assem  
M. WEISS Pierre

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES**

M. BOULER Jean-Michel

**MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES**

Mme VINATIER Claire

**PROFESSEURS EMERITES**

M. BOHNE Wolf

M. JEAN Alain

**PRATICIENS HOSPITALIERS**

Mme DUPAS Cécile (Praticien Hospitalier)

Mme QUINSAT Victoire (Praticien Hospitalier)

Mme HYON Isabelle (Praticien Hospitalier Contractuel)

Mme RICHARD Catherine (Praticien Attaché)

Mme LEROUXEL Emmanuelle (Praticien Hospitalier)

**MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES  
PRATICIENS HOSPITALIER DES C.S.E.R.D.**

M. AMADOR DEL VALLE Gilles  
Mme ARMENGOL Valérie  
Mme BLERY Pauline  
M. BODIC François  
Mme CLOITRE Alexandra  
Mme DAJEAN-TRUTAUD Sylvie  
Mme ENKEL Bénédicte  
M. GAUDIN Alexis  
M. HOORNAERT Alain  
Mme HOUCHMAND-CUNY Madline  
Mme JORDANA Fabienne  
M. KIMAKHE Saïd  
M. LE BARS Pierre  
Mme LOPEZ-CAZAUX Serena  
M. NIVET Marc-Henri  
Mme RENARD Emmanuelle  
M. RENAUDIN Stéphane  
Mme ROY Elisabeth  
M. STRUILLOU Xavier  
M. VERNER Christian

**ASSISTANTS HOSPITALIERS UNIVERSITAIRES DES  
C.S.E.R.D.**

M. ALLIOT Charles  
M. AUBEUX Davy  
Mme BARON Charlotte  
Mme BEAURAIN-ASQUIER Mathilde  
M. BOUCHET Xavier  
Mme BRAY Estelle  
M. GUIAS Charles  
M. HUGUET Grégoire  
M. KERIBIN Pierre  
Mme LE LAUSQUE Julie  
Mme LEMOINE Sarah  
M. NEMIROVSKY Hervé  
M. OUVRARD Pierre  
M. RETHORE Gildas  
M. SARKISSIAN Louis-Emmanuel  
Mme WOJTIUK Fabienne

**ENSEIGNANTS ASSOCIES**

M. GUIHARD Pierre (Professeur Associé)

Mme LOLAH Aoula (Assistant Associé)

Mme MERAMETDJIAN Laure (Maître de Conférences Associé)

Mise à jour le 27/03/2019

Par délibération, en date du 6 Décembre 1972, le Conseil de la Faculté de Chirurgie Dentaire de Nantes a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui seront présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'il n'entend leur donner aucune approbation, ni improbation.

## **REMERCIEMENTS,**

***A Monsieur le Professeur Pierre WEISS***

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier des Centres de Soins d'Enseignement et de Recherches Dentaires

Docteur de l'Université de Nantes

Habilité à Diriger les Recherches

Chef du Département de Sciences Anatomiques et Physiologiques, Occlusodontiques

Biomatériaux – Biophysique – Radiologie

Vice-Doyen, chargé de la Recherche, UFR d'Odontologie de Nantes

**- NANTES -**

*Pour m'avoir fait l'honneur de présider ce jury,*

*Pour votre soutien dans mes projets de recherche,*

*Pour vos conseils au laboratoire RMeS,*

*Veillez trouver ici l'expression de mon plus grand respect ainsi que tous mes remerciements.*

***A Monsieur le Docteur Gildas RETHORE***

Assistant Hospitalier Universitaire des Centres de Soins d'Enseignement et de  
Recherches Dentaires

Docteur de l'Université de Rennes 1

Département de Sciences Anatomiques et Physiologiques, Occlusodontiques

Biomatériaux – Biophysique – Radiologie

**- NANTES -**

*Pour avoir accepté de diriger cette thèse,*

*Pour vos conseils et votre disponibilité,*

*Pour votre aide et votre motivation,*

*Veillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance et de mon grand respect.*

***A Monsieur le Docteur Xavier STRUILLOU***

Maître de Conférence des Universités

Praticien Hospitalier des Centres de Soins d'Enseignement et de Recherches  
Dentaires

Docteur de l'Université de Nantes

Département de Parodontologie

**- NANTES -**

*Pour avoir accepté de siéger dans ce jury,*

*Pour votre disponibilité et vos conseils avisés,*

*Pour le rôle majeur que vous avez joué dans mon orientation en  
parodontologie,*

*Pour votre regard critique mais toujours encourageant,*

*Veillez trouver ici l'expression de mon plus profond respect et de mes sincères  
remerciements.*

***A Monsieur le Professeur Zahi BADRAN***

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier des Centres de Soins d'Enseignement et de Recherches  
Dentaires

Docteur de l'Université de Nantes

Habilité à Diriger les Recherches

Département de Parodontologie

**- NANTES -**

*Pour avoir accepté de siéger dans ce jury,*

*Pour votre disponibilité et votre bienveillance auprès de tous les étudiants de  
cet UFR,*

*Pour votre volonté de faire partager votre expérience,*

*Pour m'avoir soutenu dans mes projets,*

*Pour votre écoute et vos conseils,*

*Veillez trouver ici l'expression de toute mon amitié et de ma sincère gratitude.*



***A Monsieur le Docteur Saïd KIMAKHE***

Maître de Conférence des Universités

Praticien Hospitalier des Centres de Soins d'Enseignement et de Recherches  
Dentaires

Docteur de l'Université de Nantes

Département de Chirurgie Buccal – Pathologie et Thérapeutique –  
Anesthésiologie et Réanimation

**- NANTES -**

*Pour m'avoir fait l'honneur de siéger dans ce jury,*

*Pour votre disponibilité et votre sincère inquiétude vis-à-vis de vos étudiants,*

*Pour m'avoir donné goût à la chirurgie,*

*Pour votre volonté à partager votre savoir,*

*Veillez trouver ici l'expression de mon plus grand respect et mon immense  
reconnaissance.*

# TABLE DES MATIERES :

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>p12</b>
<b>BIBLIOMETRIE.....</b>	<b>p15</b>
<b><u>PARTIE I : LE 3D-BIOPRINTING.....</u></b>	<b>p19</b>
<b>1) Introduction.....</b>	<b>p19</b>
<b>2) Définitions et principes.....</b>	<b>p20</b>
<b>3) Les procédés de 3D-bioprinting.....</b>	<b>p22</b>
a. L'impression par jet d'encre.....	p22
b. L'impression par extrusion.....	p24
c. L'impression laser.....	p26
d. Les autres procédés : La stéréolithographie.....	p28
<b><u>PARTIE II : LES HYDROGELS UTILISES EN 3D-BIOPRINTING EN VUE D'UNE REGENERATION OSSEUSE.....</u></b>	<b>p30</b>
<b>1) Les Hydrogels.....</b>	<b>p30</b>
a. Généralités.....	p30
b. Les Gels Physiques.....	p31
c. Les Gels Chimiques.....	p32
d. Propriétés pour la régénération osseuse.....	p34
e. Propriétés pour la bio-impression 3D.....	p35
<b>2) Les Hydrogels d'origine naturelles.....</b>	<b>p36</b>
a. Introduction.....	p36
b. Hydrogels dérivés d'algues.....	p36
I- Hydrogels d'agarose.....	p36
II- Hydrogels d'alginate.....	p38
c. Hydrogels de chitosan.....	p41
<b>3) Les Hydrogels d'origines synthétiques.....</b>	<b>p43</b>
a. Introduction.....	p43
b. Hydrogels de Polyéthylène Glycol.....	p43
c. Hydrogels de Poly-Caprolactone.....	p45
<b>4) Les Hydrogels hybrides.....</b>	<b>p48</b>
a. Introduction.....	p48
b. Hydrogels de GelMA.....	p48
<b><u>PARTIE III : MISE AU POINT D'UN NOUVEL HYDROGEL.....</u></b>	<b>p57</b>
<b>1) Introduction.....</b>	<b>p57</b>
a. Contexte.....	p57
b. Objectif de la recherche.....	p59
<b>2) Matériels et Méthodes.....</b>	<b>p60</b>
a. Matériel.....	p60
b. Fonctionnalisation des molécules .....	p60
c. Le protocole de Mélange.....	p61
d. Viscosité.....	p61
e. Détermination du point de gel.....	p61

f. Mesure du module de Young.....	p62
<b>3) Résultats.....</b>	<b>p62</b>
a. Viscosité.....	p62
b. Point de gel.....	p62
c. Module de Young.....	p63
<b>4) Discussion.....</b>	<b>p64</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>p65</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>p66</b>

# INTRODUCTION

Le tissu osseux est un tissu conjonctif spécialisé d'origine mésenchymateuse, de constitution membranaire lorsque le mésenchyme se forme directement en tissu osseux, ou bien d'origine chondrale quand ce tissu dérive de cartilage hyalin(1).

Il est composé de cellules bordantes appelées ostéoblastes (5 à 6% des cellules du tissu) dont le rôle est de synthétiser la matrice osseuse et de la minéraliser, ainsi que d'ostéocytes (90 à 95% des cellules du tissu), cellules emprisonnées dans la matrice et agissant en tant que mécanosenseurs. On trouve également des ostéoclastes qui sont responsable de la régulation de l'homéostasie du phosphate ainsi que du remodelage osseux.

Ces cellules sont associées à une matrice extra-cellulaire composée de fibres de collagène de type I, de lipides, de protéines non collagéniques de type protéoglycanes ainsi que d'une phase minérale constitué de cristaux d'hydroxyapatite de calcium ( $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$ ), le groupe (OH-) pouvant être poly substitué par des ions carbonate, magnésium, phosphate ou encore fluor.

Ce tissu osseux est un tissu essentiel puisqu'il compose la charpente du corps par son rôle d'échafaudage. Mais aussi par son action dans l'homéostasie de l'organisme, avec la régulation du métabolisme du phosphate et la protection qu'il apporte à la moelle osseuse, permettant ainsi l'hématopoïèse.

C'est un tissu soumis à de nombreuses sollicitations subissant régulièrement des traumatismes. Grâce à sa capacité d'apposition osseuse médiée par les ostéoblastes, la plupart du temps il est capable de se régénérer lui-même par la formation d'un cône.

Néanmoins dans un certain nombre de traumatismes importants, la perte de substance sera trop conséquente pour que la cicatrisation puisse se faire naturellement. De plus, plusieurs pathologies (certains processus tumoraux, les fentes labio-palatines, etc) induisent des pertes de tissu osseux associées à des modifications des conditions physiologiques locales défavorables à une cicatrisation du site atteint (hypo vascularisation, hypo cellularisation, ...). Ces défauts osseux, généralement de grande étendue, entraîneront une altération de l'état de nos patients consécutif à des troubles mécaniques, fonctionnels ou esthétiques.

Afin de traiter ces lésions osseuses, un certain nombre de traitements et de stratégies existent en pratique courante, essentiellement basés sur le principe de comblement de ces défauts par du matériau de substitution naturel ou non.

L'autogreffe est aujourd'hui le gold-standard des procédures de reconstruction et de greffes osseuses car elle présente une capacité ostéogénique plus élevée(2). Ce procédé consiste en un prélèvement effectué sur le patient lui-même pour combler le défaut osseux avec son propre tissu provenant d'un autre site dit donneur.

L'avantage d'une telle technique est double : elle permet de conserver la vitalité du tissu implanté contrairement aux autres techniques et le risque de rejet de la greffe reste extrêmement marginale(2-4).

Néanmoins ses inconvénients sont là aussi doubles : Tout d'abord la quantité de tissu prélevable sur le patient lui-même reste limitée. Un défaut trop important à combler nécessite

de grande quantité de tissu, or, ce tissu prélevé à un endroit fragilisera la structure donneuse avec des risques de complications pouvant aller jusqu'à la fracture du site de prélèvement. La morbidité du site donneur est aussi un inconvénient important de ce procédé. En effet un second site d'intervention entraîne deux fois plus de risques de complications qu'elles soient infectieuses, hémorragiques ou bien même algiques(3).

La première alternative à l'autogreffe proposée fut l'allogreffe. Ce procédé est défini comme l'implantation d'un matériau osseux provenant d'un autre être humain. Un dérivé de cette technique fut la xélogreffe où le tissu prélevé provient d'une autre espèce animale.

Le tissu osseux est prélevé sur le donneur, stérilisé puis congelé afin d'être conservé dans une banque de tissus(4). Le but est d'obtenir des blocs d'hydroxyapatites qui sont très lentement ou peu résorbable, formant ainsi une structure solide pour combler le défaut.

Cette technique permet d'avoir à disposition une quantité importante de tissu pour l'implantation chez un patient présentant des défauts osseux conséquents.

Cependant les processus de stérilisation et de congélation détruisent les cellules vivantes du tissu et affaiblissent les propriétés mécaniques du tissu traité(4). Il faut noter également que les risques d'infections par le HIV, le HBV, le HCV ou le *Clostridium difficile* ont été rapporté avec des allogreffes(5,6).

Pour tenter de palier aux inconvénients des techniques d'autogreffe et d'allogreffe, il fallait trouver un matériau permettant de récupérer les propriétés mécaniques du tissu osseux, une revascularisation et ayant un potentiel ostéogène, d'ostéconduction et d'ostéoinduction(4).

A la fin des années 70 apparait le terme d'ingénierie tissulaire. C'est un champs interdisciplinaire consistant en la mise en commun des principes, des connaissances et des méthodes de l'ingénierie, de la biologie et du génie des matériaux dans le but de développer des substituts biologiques capables de remplacer un tissu manquant, afin de rétablir sa fonction(7).

Elle est souvent basée sur la mise au point de biomatériaux présentés sous forme « d'échaffaudages » poreux ou « scaffolds » en anglais afin de servir de support pour la colonisation et le développement cellulaire.

Ce procédé est utilisé à la fois pour l'implantation chez un patient afin de remplacer un tissu endommagé, mais aussi pour créer artificiellement des organes *in vitro* pour les étudier ou remplacer chez un patient un organe défectueux(8).

Dans le cadre de la régénération du tissu osseux, de multiples matériaux ont été développés : des poudres de phosphates tricalciques ( $\beta$ TCP) qui sont résorbables, d'hydroxyapatites non résorbables ou un mixe des deux sous la forme de matériaux bi-phasiques(9). On retrouve également des ciments, par exemple le MBCP qui est une suspension phosphate de calcium dans une solution liquide d'HPMC(10). Enfin il existe des hydrogels à base de composés naturels (alginate, acide hyaluronique, chitosan) ou synthétique (Polyéthylène glycol)(11). Les différents matériaux peuvent être associés ou non à des cellules vivantes. Ces matériaux sont implantés directement dans le site à combler afin de remplacer le tissu perdu.

Ces matériaux présentent l'avantage d'être modulables. Ce sont des matériaux créés en laboratoire, qui peuvent être adaptés à différentes situations. Nous pourrions avoir des matériaux plus ou moins résorbables, avec des propriétés mécaniques différentes suivant le lieu d'implantation et en quantité non limitée(2,3,12).

Les hydrogels mis au point avec ce procédé d'ingénierie tissulaire présentent des caractéristiques mimant au plus près l'environnement physiologique. En effet, leur structure tridimensionnelle, leur capacité à se charger en eau ainsi que leurs propriétés mécaniques et physiques en font un matériau mimant au plus près la structure et les propriétés de la matrice extra-cellulaire(13). De plus cette ressemblance avec la matrice-extracellulaire, va par essence favoriser le développement et la colonisation de cellules après implantation, mais peu aussi permettre la mise en place de cellules vivante avant d'implanter le matériau dans l'organisme hôte.

Il faut noter aussi que ces hydrogels doivent répondre à un certain nombre de critères biologiques, chimiques et mécaniques. Ils doivent être des polymères dégradables dans le temps, afin de favoriser leur intégration et leur remplacement par un tissu osseux natif permettant l'obtention d'une régénération.

Depuis le début des années 2000 et l'essor de l'impression en trois dimensions, une nouvelle méthode d'élaboration des matériaux et de mise en place de ceux-ci a vu le jour : La bio-impression.

Cette méthode basée sur les principes d'impression 3D couplée à l'incorporation de cellules vivantes au sein même de la structure des biomatériaux, permettrait d'adapter la structure dimensionnelle du substitut osseux mais aussi la distribution des cellules au sein du matériau pour obtenir une régénération optimale(14).

Dans ce travail de mémoire de thèse nous avons décidé d'analyser l'utilisation des hydrogels avec la technologie de 3D-bioprinting.

Pour cela nous allons tout d'abord définir le 3D-bioprinting ainsi que les différents procédés utilisables. Puis nous analyserons l'utilisation spécifiquement des hydrogels avec cette technologie. Enfin nous ouvrirons notre réflexion sur une recherche originale, menée au sein du laboratoire UMR1229 RMeS, basée sur le développement d'un nouvel hydrogel utilisable en 3D-bioprinting.

# BIBLIOMETRIE

## Recueil des données :

La recherche Bibliographique a été menée de façon électronique sur la base Medline-PubMed, Cochrane Library ainsi que ACS Publications (**Tableau 1**), puis complétée manuellement à partir des références bibliographiques trouvées dans ces articles.

Recherches électroniques	
Bases de données	Termes utilisés
Medline-Pubmed	« 3D-bioprinting AND hydrogel AND bone »
ACS Publications	« 3D-bioprinting AND hydrogel AND bone »
Cochrane Library	« 3D-printing AND bone »

*Tableau 1 : Mots-clés utilisés sur les différentes bases de données*

Grâce à ces bases de données électroniques ainsi que à la recherche manuelle nous avons pu extraire **172 articles**.

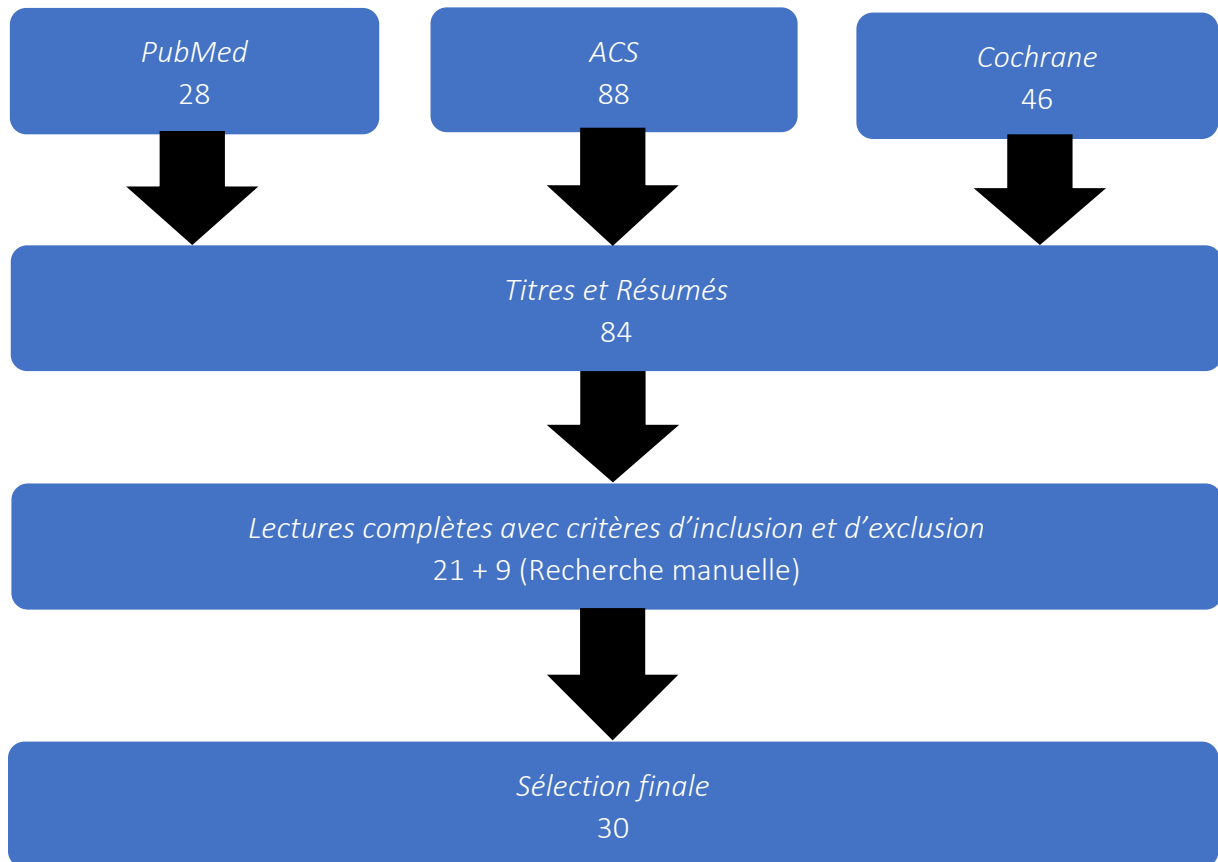
## Sélection des Articles :

A partir de ces recherches, nous avons effectué une sélection des articles pour ne retenir que les plus pertinents vis-à-vis de notre thématique. Pour ce faire, des critères d'inclusion et de non-inclusion ont été définis (**Tableau 2**) :

Critères d'inclusion	Critères de non-inclusion
<ul style="list-style-type: none"><li>- <b>Articles en Anglais</b></li><li>- <b>Articles liant hydrogel et 3D-printing</b></li><li>- <b>Etudes mécaniques</b></li><li>- <b>Etudes Animales</b></li><li>- <b>Articles traitant de la régénération osseuse</b></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- <b>Articles traitant de régénération des tissus mous ou cartilagineux</b></li><li>- <b>Articles traitant d'hydrogel sans 3D-printing</b></li><li>- <b>Articles traitant uniquement de screening par 3D-printing</b></li></ul>

*Tableau 2 : Critères d'inclusion et de non-inclusion des articles sur le sujet*

Nous avons suivi le schéma de sélection suivant après prise en compte de ces critères :



**Figure 1 : Matrice de sélection des articles avec application des critères d'inclusion et de non-inclusion**



## Evaluation Qualitative des Articles :

Pour analyser au mieux les articles sélectionnés, il est nécessaire d'analyser leur qualité et leur pertinence scientifique. Pour cela nous avons étudié les articles grâce à la classification donnée par l'HAS, définissant le grade de recommandation de chaque type d'étude :

Grade des Recommandations	Niveau de preuve scientifique fourni par la littérature
A  Preuve Scientifique établie	Niveau 1  <ul style="list-style-type: none"> <li>- Essais comparatifs randomisés de forte puissance</li> <li>- Méta-analyse d'essais comparatifs randomisés</li> <li>- Analyse de décision fondée sur des études bien menées</li> </ul>
B  Présomption Scientifique	Niveau 2  <ul style="list-style-type: none"> <li>- Essais comparatifs randomisés de faible puissance</li> <li>- Etudes comparatives non randomisées bien menées</li> <li>- Etudes de cohortes</li> </ul>
C  Faible Niveau de preuve Scientifique	Niveau 3  <ul style="list-style-type: none"> <li>- Etudes cas-témoins</li> </ul> Niveau 4  <ul style="list-style-type: none"> <li>- Etudes comparatives comportant des biais importants</li> <li>- Etudes rétrospectives</li> <li>- Séries de cas</li> <li>- Etudes épidémiologiques descriptives (transversales, longitudinales)</li> </ul>

**Tableau 3 : Tableau de classification de recommandation des articles scientifique selon la HAS**

**26 articles** sélectionnés sont des études originales, publiés dans des revues à comité de lecture. Elles doivent donc faire preuve de leur intérêt et citer des preuves scientifiques établis. Par extension nous pouvons donc affirmer que ces articles apportent des preuves scientifiques établies, et nous pouvons estimer qu'ils correspondent à des recommandations de **grade A** suivant la classification de la HAS.

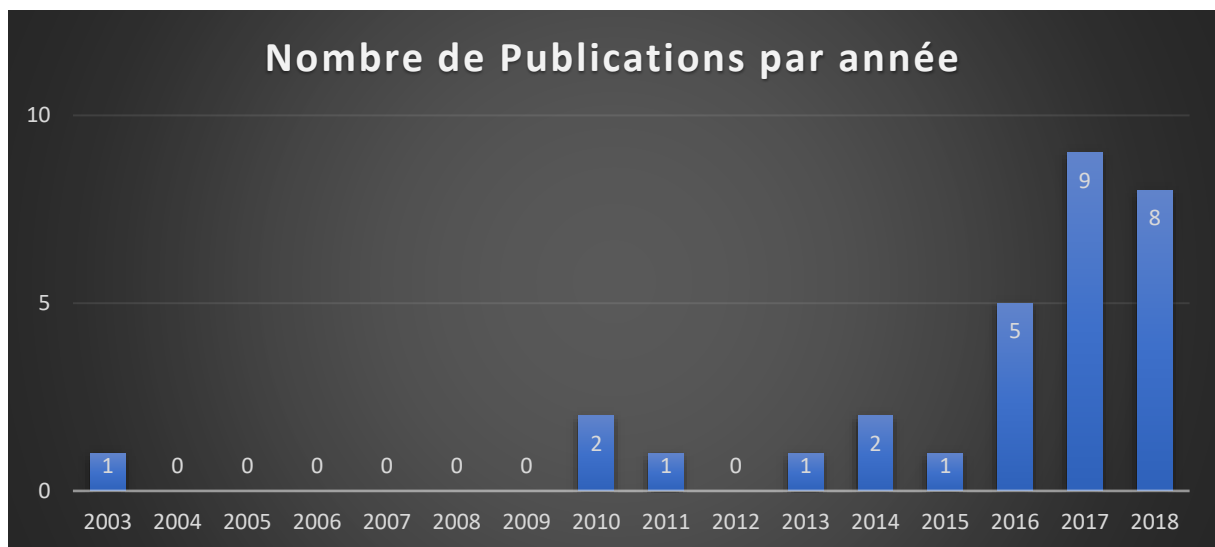
En ce qui concerne les **3 articles** restants, nous pouvons les classer selon leur grade de recommandation de la façon suivante :

Type d'étude	Nombres d'études	Niveau de preuve	Grade de recommandation
<b>Etudes originales</b>	(26)	1	<b>A</b>
<b>Revue systématiques de la littérature</b>	(3)	1	<b>A</b>

**Tableau 4 : Classement des articles sélectionnés suivant leurs grades de recommandation**

On peut observer que le grade de recommandation sur les études menées sur les hydrogels utilisés en 3D-bioprinting en vue d'une régénération osseuse sont très élevés.

De plus, nous pouvons noter les années de publications des articles et analyser l'évolution du nombre de publication sur le sujet de la façon suivante :



**Figure 2 : Répartition des articles suivant les années de publication**

Ainsi, nous pouvons remarquer qu'avant 2016 peu d'articles évoquaient les hydrogels utilisés en 3D-bioprinting dans le but de régénérer l'os et que l'intérêt pour ce sujet n'est apparu que à partir 2016 où la thématique semble réellement commencer à prendre son essor, avec un pique de publications ces 2 dernières années.

# **PARTIE I : LE 3D-BIOPRINTING**

## **1) Introduction :**

L'impression en trois dimensions est un concept assez récent puisque son origine remonte à la deuxième partie du XXème siècle.

Contrairement aux méthodes d'usinages qui sont des procédés en trois dimensions par soustraction de matière, l'impression 3D est un processus de fabrication additif qui consiste en un dépôt de matériaux couche par couche aidé par une modélisation informatique(15,16).

C'est en 1984 que le premier brevet concernant l'impression 3D est déposé par 3 français : Jean-Claude André, Olivier De Witte et Alain Le Méhauté travaillant tous trois pour la société CILAS ALCATEL. Ils sont suivis de près par Chuck Hull, un américain, qui déposera un brevet pour une technique de stéréolithographie qu'il nomme SLA (Stéréolithographie Apparatus) et qui existe toujours à ce jour(16,17).

Afin d'imprimer l'objet concerné, une modélisation informatique de la pièce est indispensable. L'information numérique est codé en fichier .STL en rapport avec la stéréolithographie, le procédé original d'impression 3D. La modélisation peut être effectuée soit de façon manuelle, soit de façon automatisée par des procédés de CAD-CAM adaptés.

De nombreux matériaux peuvent être utilisés dans ce procédé d'impression, qu'ils soient rigides, souples, conducteurs, colorés, abrasifs, etc. Il suffit d'adapter la technique au matériau et aux contraintes du matériel final. Cela ouvre un champ de possibilités quasiment infini dans l'utilisation de cette méthode, comme l'aéronautique(18), la construction de bâtiment(19), ou bien la médecine(20).

La possibilité de créer des dispositifs sur-mesure en trois dimensions, comme des prothèses, a tout de suite interpellé le monde médical, qui très vite s'est approprié le concept.

Grâce à ce processus, il est possible de fabriquer à la demande une prothèse (de hanche, par exemple), avec un matériau métallique afin qu'il corresponde à la morphologie du patient, à son utilisation et de prendre en compte ses paramètres personnels. La création d'une charpente métallique pour la reconstruction faciale(21) afin de s'approcher au plus près de la morphologie du patient avant un accident est une avancée majeure de cette technique.

Cependant, les prothèses créées par cette méthode, ne sont que des structures inertes, des échafaudages servant à remplacer la structure solide d'une perte tissulaire et surtout la perte d'un tissu dur. Elles n'ont aucunes propriétés de guérison ou de régénération.

Avec l'émergence de la médecine régénératrice et de l'ingénierie tissulaire, les chercheurs ont mis au point un nouveau principe permettant de créer un dispositif sur-mesure adapté aux besoins du patient, avec la faculté d'induire une régénération du tissu cible : c'est la bio-impression.

## **2) Définitions et Principes :**

La bio-impression peut être définie comme la modélisation et l'assemblage de matériel vivant et non-vivant en 2 ou 3 dimensions à l'aide d'un ordinateur dans le but de produire des bio-structures utilisables en médecine régénératrice, pharmacocinétique et dans l'étude de la biologie cellulaire(22).

Contrairement à la simple impression en trois dimensions qui n'imprime qu'une charpente temporairement sans cellule que l'on souhaite être colonisée ou non par elles et donc accepté par l'organisme. La bio-impression demande une approche différente. Elle nécessite la mise au point en première intention, un matériau qui fasse office de charpente et qui comporte dans sa structure des cellules vivantes afin d'être assimilé par l'organisme(14). Pour cela, l'utilisation d'un matériau biocompatible est essentielle afin de permettre la survie des cellules dans la structure avant implantation mais aussi son contact prolongé dans l'organisme sans engendrer de complications. Ce matériau est généralement un hydrogel ou pré-hydrogel auquel on donne le nom de bio-encre quand il est utilisé dans ce processus.

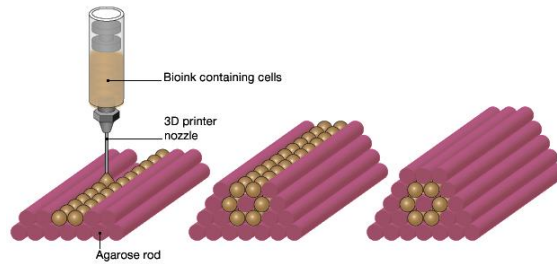
L'avantage de ce procédé est qu'il permet de contrôler la précision de l'ensemencement des cellules au sein du matériau et la distribution des cellules dans la structure néoformée(23).

Un processus précis de création est utilisé afin de parvenir à imprimer l'objet voulu. Il faut tout d'abord dessiner l'architecture 3D de l'objet et vérifier sa faisabilité. Ensuite l'opérateur va sélectionner le type de matériau désiré ainsi que les cellules à ensemercer. Puis, le programme d'impression est sélectionné et l'impression lancée. Une fois la structure imprimée, elle est analysée au microscope puis placée dans un incubateur pour la culture cellulaire(14).

Mais ce processus manuel de création et de contrôle de qualité impacte le procédé d'impression. La multiplication des étapes de processus et la supervision par l'homme ralentissent la cadence de production et multiplient le nombre d'erreurs et d'approximations possibles.

C'est pourquoi de nombreux chercheurs ont travaillé sur le développement des concepts de modélisation assistée par ordinateur (Computer-Aided Design ou CAD en anglais) et construction assistée par ordinateur (Computer-Aided Manufacturing ou CAM en anglais). Cet outil permet d'automatiser et d'accélérer la conception du modèle à imprimer, ainsi que de rendre le processus reproductible.

A partir d'images tirées de modélisations pré-enregistrées, d'images obtenues par Scanner ou IRM, le logiciel va découper la représentation en lamelle de 100 à 500µm(24). Chaque lamelle va ensuite être imprimée les unes sur les autres pour fabriquer l'architecture désirée, comme le veut le processus d'impression 3D (**Figure 3**).



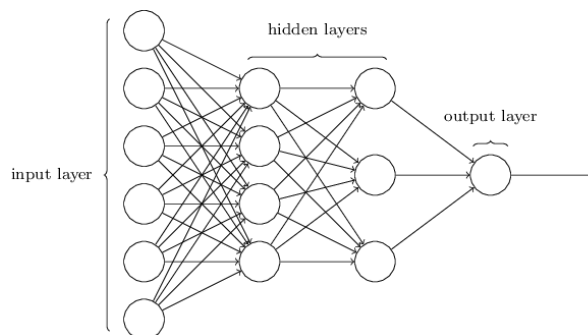
**Figure 3 : Représentation schématique de l'impression lamelle par lamelle, Modern Meadow(25)**

Grâce au CAD-CAM, les impressions en trois dimensions ont pu devenir plus prédictibles, car en s'affranchissant du paramètre humain par le chargement de programmes informatiques on s'affranchit du côté imprévisible de la conception.

Afin d'automatiser toujours plus le processus de modélisation tout en gardant une personnalisation de la structure à imprimer, des Intelligences Artificielles (AI) ont été mises au point. En rentrant les paramètres que nous souhaitons obtenir et à l'aide d'une banque d'images, l'ordinateur va modéliser la structure en 3 dimensions et sélectionner le mode d'impression, le matériau et la géométrie les plus adaptés sans intervention humaine pendant le processus(14).

Ces AI sont de plus en plus conçues avec la capacité qu'on nomme deep-learning. Le deep learning ou apprentissage profond est fondé sur une projection d'un système neuronal. L'information première est envoyée et un réseau de couches de « neurones » successifs va analyser, trier, modéliser une partie de l'image et envoyer leurs conclusions à la couches neuronale suivante. Ainsi l'information est décortiquée par des « neurones » prédisposés à une tâche unique pour ensuite être assemblée et parvenir à une information de sortie (**Figure 4**).

A partir des informations traitées, l'intelligence artificielle sous deep learning va avoir une capacité d'apprentissage. Chaque image et structure analysées viendront ensuite enrichir la base de données pour avoir des modélisations de plus en plus précises et de plus en plus variées(26).



**Figure 4 : Schématisation du processus de Deep Learning associant plusieurs couches neuronales croisant et mettant en commun les informations pour aboutir à une modélisation finale, Schmidhuber et al.(26)**

### 3) Les procédés de 3D-bioprinting :

Au cours des années de recherche sur cette thématique, un certain nombre de procédés ont vu le jour, à savoir : l'impression par jet d'encre, l'impression par extrusion et l'impression laser. Les différents procédés présentent des propriétés, des avantages et des inconvénients bien distincts.

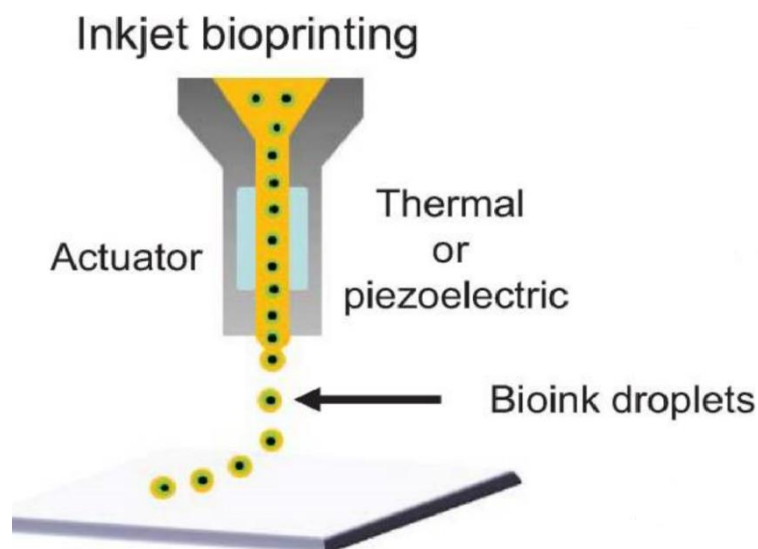
#### a. L'impression par jet d'encre

La bio-impression par jet d'encre est la première technique mise au point dans les années 2000 par Tuan *et al.*(27). Son principe est basé sur une transcription de l'impression 2D par jet d'encre utilisée dans n'importe quelle imprimante personnelle.

Des cellules sont encapsulées dans un pré-hydrogel qui est lui-même stocké dans des cartouches remplaçant ainsi l'encre. Ces cartouches sont insérées dans une imprimante à jet d'encre classique. Le premier modèle utilisé était une imprimante commerciale HP 26(14,18).

Au cours du processus, la tête d'impression va être déformée par la chaleur ou par piézoélectricité. La déformation consécutive à cette action va réduire l'ouverture de la chambre de façon sinusoïdale. Cette déformation va entraîner une onde de déformation, créant des gouttelettes qui sous l'effet de la gravité vont se déposer sur une surface substrat placée sur un plateau (**Figure 5**) contrôlé électroniquement afin de varier en hauteur le dépôt de gouttelettes et créer ainsi une architecture en trois dimensions(14,18,28).

La taille et le dépôt des gouttelettes de matériau seront contrôlés par ordinateur mais seront également fonction de la masse moléculaire du polymère et de sa viscosité, qui vont déterminer le volume des gouttelettes éjectées(28).



**Figure 5 : Processus d'impression par jet d'encre, Mandrycky et al(14)**

Les techniques utilisant la chaleur présentent l'avantage d'être peu coûteuse car elle utilise des imprimantes commerciales disponible à des prix abordables. La vitesse d'impression est assez rapide (de l'ordre de 1000 à 10000 gouttelettes déposées par seconde).

Elle permet une haute viabilité des cellules déposées (entre 80 et 90% des cellules survivent au processus). En effet, malgré l'élévation de la température aux alentours de 200 à 300°C pour déformer la tête d'impression, la durée de l'échauffement permettant la déformation est rapide (2µs) n'entraînant qu'une température de l'ordre de 4 à 10° dans la tête elle-même. Cela n'a aucun impact sur la structure des cellules et notamment sur leur ADN ce qui explique le taux de survie élevé(14,18,29).

Certaines imprimantes utilisent la technologie piézoélectrique plutôt que la chaleur pour déformer la tête d'impression. En contrôlant l'amplitude, la durée et la pulsation de l'onde, il est possible de créer des gouttelettes uniformes et de mieux diriger la direction d'éjection(18).

Néanmoins les matériaux utilisés pour l'impression par jet d'encre ne peuvent pas être trop visqueux (une viscosité inférieure à 15mPa/s) afin de pouvoir circuler jusqu'à la tête d'impression. La densité cellulaire doit être aussi réduite (inférieure à 10<sup>6</sup> cellules/mL) sous peine d'augmenter la viscosité du mélange et d'emboliser le circuit de distribution(18,30).

Les cartouches dans lesquelles sont stockés les matériaux, ont un volume assez réduit ce qui ne permet d'imprimer qu'un volume limité.

Enfin de nouvelles études ont établis l'existence du « settling effect » : Quand la cartouche est neuve, il y a une répartition homogène des cellules dans le matériau, mais au fur et à mesure de l'impression, les cellules s'agglutinent dans la cartouche, augmentant de ce fait la viscosité et la densité cellulaire de l'hydrogel, ce qui entraîne la saturation de la tête d'impression(31,32).

Un récapitulatif des avantages et inconvénients de ce procédé est établis dans le tableau suivant (**Tableau 5**) :

Avantages	Inconvénients
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Coût réduit</b></li> <li>- <b>Vitesse d'impression rapide</b></li> <li>- <b>Viabilité élevée des cellules</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Matériaux peu visqueux</b></li> <li>- <b>Densité cellulaire réduite</b></li> <li>- <b>Volume disponible faible</b></li> <li>- <b>Settling effect</b></li> </ul>

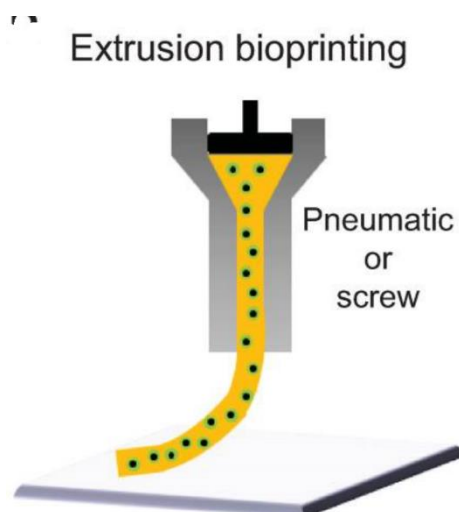
**Tableau 5 : Récapitulatif Avantages/Inconvénients de l'impression par jet d'encre**

## b. L'impression par extrusion

L'extrusion est un dérivé de l'impression par jet d'encre. Les machines sont plus sophistiquées et sont dédiées uniquement à la bio-impression.

Comme précédemment, des cellules sont enchassées dans un pré-hydrogel qui sera stocké dans des cartouches.

Il sera alors appliqué une poussée à l'aide d'un piston activé par une pompe à air ou un pousse seringue mécanique. Cette force mécanique appliquée en continue va permettre l'impression d'un cylindre ininterrompu de matériau suivant le schéma de tracé prédéfini par ordinateur (**Figure 6**). Après l'impression et le dépôt d'une première couche de cellule, la plaque mécanique effectuera un mouvement vertical pour permettre à la tête d'impression de réimprimer sur la première couche dans le but de créer une structure tridimensionnelle.



**Figure 6 : Processus d'impression par extrusion, Mandrycky et al(14)**

Grâce à cette force appliquée qui peut être paramétrée, tout type de matériau est potentiellement utilisable. Cela permet de s'affranchir de la problématique de la viscosité du pré-hydrogel. En effet des viscosités comprises entre 30mPa/s et  $6 \times 10^7$  mPa/s sont tolérées par ce système(18). Une plus grande viscosité permettra également une meilleure tenue du polymère imprimé.

De plus, il est aussi possible d'y adjoindre une plus grande densité de cellules que pour le procédé de jet d'encre(14,18). Cela s'explique à la fois par l'affranchissement du settling effect de la précédente technique, mais aussi par l'augmentation de la viscosité, donnant un environnement en trois dimensions plus proches d'une structure naturelle et donc plus viable pour les cellules.

En revanche, l'application continue d'une force sur le polymère, va entraîner des forces de compression et de cisaillement qui seront délétères pour les cellules encapsulées. Ce stress appliqué va diminuer considérablement la viabilité des cellules imprimées (de l'ordre de 50%)(18). Il est toutefois possible de diminuer les forces appliquées sur les cellules ainsi que d'augmenter par conséquent la viabilité cellulaire. Pour cela une augmentation du diamètre



de la tête d'impression peut être possible tout en réduisant la pression utilisée. Ce changement augmentera le taux de survie des cellules mais diminuera par la même occasion la vitesse d'impression et la précision de l'impression(33).

Enfin, malgré son coût qui reste plus élevé que l'impression par jet d'encre, l'impression par extrusion reste assez abordable du fait de sa technologie relativement simple.

Un récapitulatif des avantages et inconvénients de ce procédé est établis dans le tableau suivant (**Tableau 6**) :

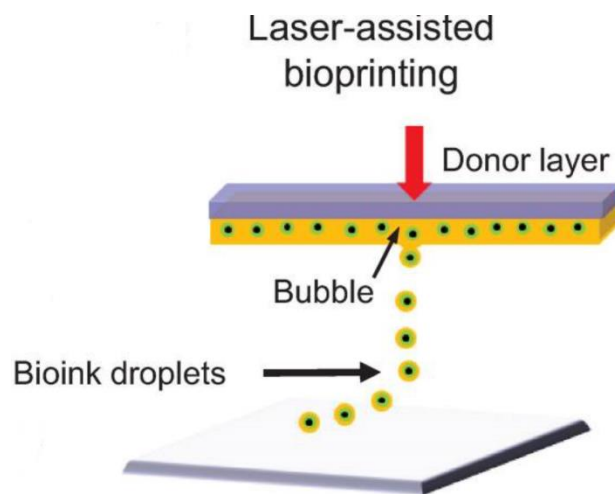
<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- <b>Coût modéré</b></li><li>- <b>Une bonne tenue de la structure 3D</b></li><li>- <b>Viscosité élevée possible</b></li><li>- <b>Grande densité de cellules possible</b></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- <b>Lenteur de l'impression</b></li><li>- <b>Faible viabilité cellulaire</b></li><li>- <b>Faible résolution</b></li></ul>

*Tableau 6 : Récapitulatif Avantages/Inconvénients de l'impression par extrusion*

### c. L'impression laser

L'impression laser est basée sur les principes décrits par Bohandy *et al.*(34) et Duocastella *et al.*(35) du phénomène qu'on pourrait appeler transfert d'énergie induit par laser.

Typiquement, un ruban comportant 2 couches, l'une avec un recouvrement absorbant l'énergie du laser (comme du titane ou de l'or) et une couche recouverte du biomatériau à utiliser, est bombardé par une lumière concentrée de type laser. Cette impulsion va venir heurter une petite zone de la couche absorbante afin de la stimuler. Cette stimulation va entraîner la formation d'une bulle sous haute pression à l'interface avec la bio-encre (**Figure 7**). Cette bulle par effet de gravité va être déposée sur une plateforme recouverte de substrat formant ainsi la matrice de la structure(14,18).



**Figure 7 : Processus d'impression par laser, Mandrycky et al(14)**

Ce procédé est encore en pleine phase de recherche. En effet, certains paramètres encore non explorés, devraient permettre de contrôler la taille des gouttelettes déposées ainsi que leur qualité. En revanche, les effets collatéraux du laser sur les cellules exposées ne sont pas encore connus(14), l'évaluation du transfert de métal lors du bombardement laser à l'intérieur du matériau sera primordial afin de s'assurer de la bonne survie des cellules dans le temps(18).

Malgré tout, de nombreux auteurs ont montré une haute viabilité des cellules déposées (de l'ordre de 95% de taux de survie). Cela peut s'expliquer par l'absence totale de stress mécanique lors du processus de formation des gouttelettes(36).

La résolution d'impression par laser sera déterminée par de nombreux paramètres : l'intensité lumineuse par unité d'aire (fluence), l'espace entre la bande de matériau et la surface de dépose, la viscosité du matériau. La capacité de résolution moyenne pour l'impression laser reste élevée puisqu'il est possible d'obtenir jusqu'à une seule cellule par gouttelette(14,18,36).

Cette technique présente l'avantage d'être compatible avec des matériaux extrêmement visqueux (1 à 300mPa/s) et à haute densité cellulaire pouvant aller jusqu'à  $10^8$  cellules/mL(22,36). En effet contrairement aux techniques précédentes présentant des buses

d'impression, il n'y a là aucun artifice risquant de s'emboliser durant le processus d'impression.

Néanmoins, les bio-imprimeurs laser présentent des coûts extrêmement élevés rendant leur utilisation pour la recherche mais aussi pour leur application difficile.

De plus, il faudra aussi des matériaux très spécifique. En effet, pour obtenir une structure viable en trois dimensions, en concordance avec la rapidité d'impression, le matériau utilisé devra posséder une haute thixotropie et donc gélifier rapidement une fois déposé(18).

Un récapitulatif des avantages et inconvénients de ce procédé est établis dans le tableau suivant (**Tableau 7**) :

<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- <b>Haute viabilité des cellules</b></li><li>- <b>Une bonne tenue de la structure 3D</b></li><li>- <b>Viscosité élevée possible</b></li><li>- <b>Grande densité de cellules possible</b></li><li>- <b>Vitesse d'impression rapide</b></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- <b>Coût élevé</b></li><li>- <b>Paramètres à étudier</b></li><li>- <b>Matériaux spécifiques</b></li></ul>

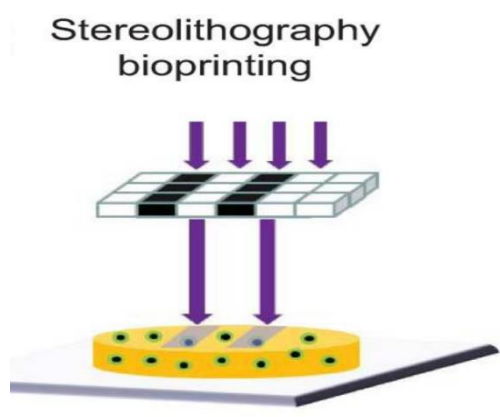
*Tableau 7 : Récapitulatif des avantages/inconvénients de l'impression par laser*

#### d. Les autres procédés : la stéréolithographie

Malgré le fait d'être la première technique utilisée en impression 3D, la stéréolithographie n'est pas le procédé le plus commun utilisé pour la bio-impression. Mais en 2012, Gauvin *et al* modifient cette technique pour l'adapter à la bio-impression(37).

Son principe est basé sur la réaction du matériau à une onde lumineuse tout comme l'impression laser. La lumière dans ce cas, sera une lumière de type UV.

Le matériau est posé directement sur une plateforme et va être bombardé couche par couche pendant 20s par une lumière UV d'une puissance de  $50\text{mW}/\text{cm}^2$ . Ce bombardement va polymériser le matériau sur une couche de façon sélective suivant la longueur d'onde utilisée (**Figure 8**). Une fois la polymérisation de la première couche terminée, la plateforme sur lequel repose le biomatériau va descendre pour permettre la polymérisation de la couche au-dessus et ainsi de suite jusqu'à obtenir l'architecture recherchée(14,37,38).



**Figure 8 : Procédé de stéréolithographie, Mandrycky et al(14)**

Ce système simplifie considérablement l'impression, puisque on s'affranchit du mouvement de la tête d'impression pour déposer le matériau, seul un mouvement vertical sera effectué. Cela présente l'avantage d'augmenter la résolution de l'impression aux alentours de  $100\mu\text{m}$  et bien entendu sa rapidité (une impression complète peut durer moins d'une heure)(14).

N'importe quelle viscosité de matériau peut être utilisée ainsi qu'une haute teneur en cellules car il n'y a aucune sortie d'impression tout est déjà sur la plateforme. On aura donc aucune limitation vis-à-vis du matériau utilisable.

On obtient un taux de survie des cellules extrêmement élevé de l'ordre de 90% à 95% similaire à l'impression laser, car tout comme elle, aucun stress mécanique n'est appliqué sur les cellules(38).

Enfin son coût reste très modéré car ce n'est qu'une modification d'une technologie de plus en plus populaire et déjà ancienne.

Un récapitulatif des avantages et inconvénients de ce procédé est établis dans le tableau suivant (**Tableau 8**) :

<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>- <b>Haute viabilité des cellules</b></li><li>- <b>Une bonne tenue de la structure 3D</b></li><li>- <b>Aucune limitation de matériau</b></li><li>- <b>Aucune limitation du taux de cellules</b></li><li>- <b>Vitesse d'impression rapide</b></li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- <b>Très peu utilisé donc peu de recul en bio-impression</b></li></ul>

*Tableau 8 : Récapitulatif des avantages/inconvénients de l'impression par stéréolithographie*

# **PARTIE II : LES HYDROGELS UTILISES EN 3D-BIOPRINTING POUR LA REGENERATION OSSEUSE**

## **1) Les Hydrogels :**

### **a. Généralités**

Les hydrogels sont l'aboutissement des travaux de Witcherle et Lím dans les années 60(39).

Ils sont définis comme des structures de polymères en trois dimensions, formés en réseau par réticulation, c'est-à-dire par la formation de nœuds chimiques ou physiques entre les chaînes de polymères.

Ils sont caractérisés par un module de conservation ( $G'$ ) supérieur à leur module de perte ( $G''$ ). Cela se traduit physiquement par une capacité du matériau à stocker l'énergie en se déformant (c'est la phase élastique du matériau) et une portion de libération correspondant à la phase visqueuse du matériau plus faible mais les dotant d'une rigidité partielle(40,41).

Ce sont des structures insolubles dans l'eau. Cependant la présence de groupement hydrophiles tels que des groupements -OH, -CONH ou bien -SO<sub>3</sub>H forment des domaines d'interaction avec les molécules d'H<sub>2</sub>O, ce qui permet au matériau de s'hydrater et de gonfler en milieu aqueux. La variation d'hydratation du matériau va déterminer ses propriétés physico-chimiques. En effet, cela leur confère des propriétés élastiques, d'adaptation, de biocompatibilité et une structure similaire à la matrice extra-cellulaire(42).

Des modifications chimiques peuvent être facilement apportées aux hydrogels. Ils présentent des profils de dégradation, et des propriétés mécaniques très variables. Ces propriétés sont intéressantes pour permettre l'association de facteurs de croissances, de médicaments, ou de cellules à ces matériaux.

Ces propriétés associées à leur architecture 3D poreuse, il est reconnu que ce sont des matériaux idéaux pour l'infiltration cellulaire, afin d'entraîner leur prolifération, leur migration et leur différenciation par une régulation des échanges nutritifs, la vascularisation et la communication inter-cellulaire à travers le matériau(13,42).

Afin de former une structure en trois dimensions et de créer une gélification, les chaînes de polymères sont liées entre elles par des nœuds. On nomme cette réaction une réticulation.

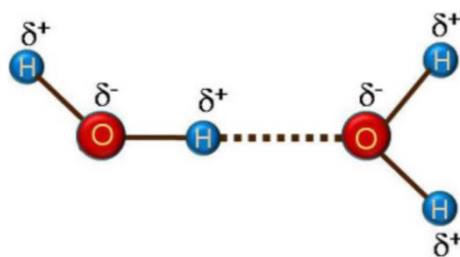
Deux grands types de réticulations existent :

- une réticulation physique
- une réticulation chimique

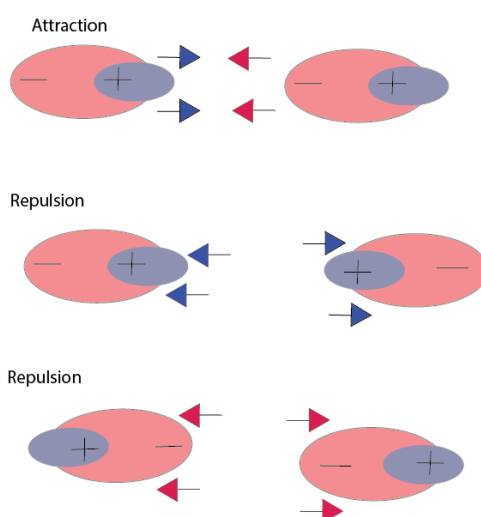
## b. Les Gels Physiques

Les gels physiques, comme leur nom l'indique sont des hydrogels dont les nœuds de liaisons entre les chaînes de polymères sont des liaisons physiques. Ces liaisons sont dites faibles et réversible. Cela entraîne des liaisons non permanentes.

Ces liaisons peuvent être de différentes formes : coulombiennes, Van Der Waals, hydrogènes et électrostatiques(43–45).



**Figure 9 : Liaisons hydrogènes**



**Figure 10 : Liaisons électrostatiques et leur réversibilité**

Le nombre et la force des nœuds vont dépendre de l'état thermodynamique du gel. De nombreux paramètres (pH, températures ...) vont influencer la formation et la destruction des liaisons : les liaisons se font et se défont continuellement.

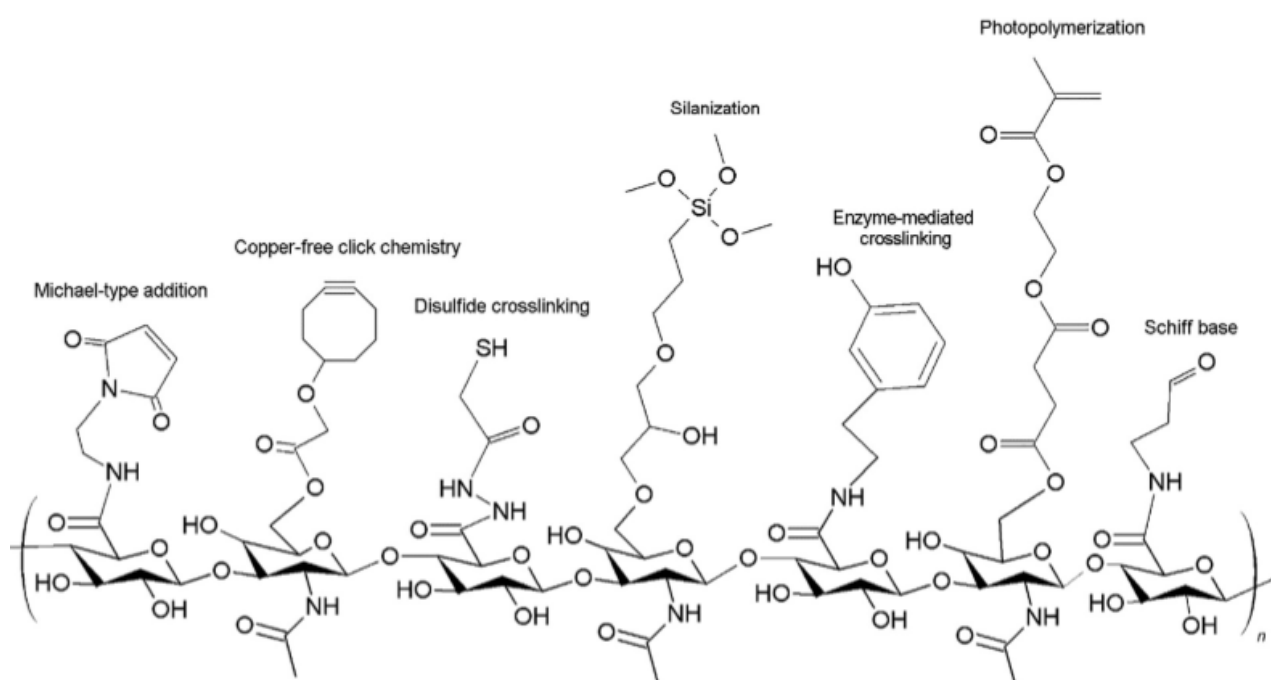
L'avantage des gels physiques est qu'ils ne nécessitent aucune réaction chimique. Cette absence de réaction permet d'éviter les déchets de réactions qui pourraient altérer le gel ou être toxique pour le tissu cible. Cela permet également de s'affranchir de la présence de molécules de liaisons et donc permet de diminuer les étapes de gélification(13).

### c. Les Gels Chimiques

Les gels chimiques sont des gels dit irréversibles. Grâce à leurs liaisons covalentes qui sont des liaisons fortes, les nœuds formés entre les chaînes de polymère sont permanents. Ce sont des gels qui seront indépendant des conditions externes tel que le pH, la température ou la déformation.

Les liaisons covalentes s'effectueront entre des groupements réactifs, greffés préalablement sur les polymères d'intérêts.

De nombreuses stratégies de liaisons ont été mises au point ces dernières années pour permettre de lier de façon covalente les polymères et permettre la réticulation des hydrogels chimiques. Ces stratégies sont résumées dans la **(figure 11)**.



**Figure 11 : Les différentes stratégies de polymérisation chimiques, Flégeau et al.(13)**

Les réactions les plus communes comportent, soit une liaison par photopolymérisation, soit une réaction Schiffbase ou bien la liaison par un agent de liaison. Ces différentes réactions vont avoir chacune leurs caractéristiques que cela soit dans la chimie de la liaison elle-même ou dans le temps de polymérisation.

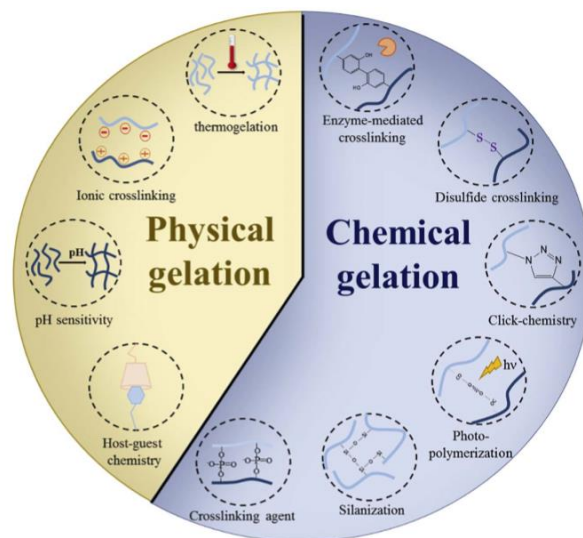
Tout d'abord, on peut citer la préparation de gels chimiques par ajout d'un agent de liaison. Cette réaction ne nécessitera pas une modification du polymère d'origine. Elle consiste en l'incorporation dans la solution de polymère, d'un agent de liaison qui va réagir avec les molécules d'intérêt pour les lier entre elles dans certaines conditions de pH ou de température. Ces molécules peuvent être des sodium trimetaphosphates ou des sodium tripolyphosphates qui vont agir sur l'hydroxyle terminal du polymère.



Ensuite, la photopolymérisation est un procédé extrêmement utilisé notamment dans les matériaux dentaires tels que les composites de reconstitution. Le principe consiste en la liaison d'un groupement fonctionnel au sein du polymère et l'ajout d'un agent photoinitiateur. Ce photoinitiateur va réagir avec la lumière ou les UV pour créer des radicaux libres très réactifs avec les groupements réactifs liés aux polymères. Les radicaux vont aller se propager de polymère en polymère. Ce procédé est extrêmement rapide. La plupart du temps ce sont des dérivés de méthacrylate qui sont utilisés dans ce type de procédé en raison de leur bonne réactivité et de leur bonne stabilité durant la polymérisation. Ce procédé présente toutefois une limite, le volume de polymère. En effet, il est nécessaire que la lumière puisse atteindre le photoinitiateur pour initier la polymérisation. S'il y a un volume trop conséquent de polymère, la lumière peut ne pas atteindre les couches les plus profondes et la polymérisation ne se fera pas ou bien seulement en partie.

Enfin, la réaction dite Schiffbase, est une réaction très commune dans la polymérisation des hydrogels. Cette réaction met en relation une amine et un aldéhyde pour former une liaison imine appelée aussi Schiffbase. Cette polymérisation est assez lente mais permet d'obtenir une bonne rigidité de l'hydrogel. Il est généralement utilisé avec des polysaccharides tels que l'acide hyaluronique, le chitosan ou bien les chondroïtines sulfates.

Il existe d'autres types de stratégies de polymérisation pour obtenir des gels qui sont utilisés de façon plus marginale (**Figure 12**).



**Figure 12 : Récapitulatif des différents types de réticulations, Flégeau et al(13)**

#### d. Propriétés des hydrogels pour la régénération osseuse

Les hydrogels dont le but est d'être utilisé en régénération osseuse vont remplacer le tissu osseux défaillant. Pour cela ils vont remplacer la matrice extracellulaire du tissu d'origine. Il nous faudra donc, pour mettre au point des hydrogels biologiquement actifs, mimer la matrice extra-cellulaire de l'os.

La matrice extra-cellulaire est un complexe à l'architecture unique. Son rôle est de structurer, supporter les stress mécaniques, permettre le mouvement cellulaire et guider les cellules vers leurs différenciations. Toutes ces actions sont permises grâce à la capacité de la matrice extra-cellulaire à emprisonner et capter des facteurs de croissance ainsi que de les relarguer pour interagir avec les cellules.

La composition de la matrice extra-cellulaire varie d'un tissu à l'autre suivant les facteurs d'intérêts, le type de fibres de collagènes, etc. Elle sera en constant remodelage pour répondre aux variations du cycle cellulaire.

Afin de mimer au mieux la matrice extra-cellulaire, les hydrogels doivent être biocompatibles. Cette propriété est définie comme l'habilité du matériau à réagir avec l'hôte dans une situation spécifique. *In vitro*, le matériau n'empêche pas les cellules de s'attacher et de proliférer. *In vivo*, on dit que c'est la capacité du matériau à se dégrader et s'intégrer dans la matrice-extracellulaire sans générer de déchets toxiques tout en ayant aucune interaction négative avec les cellules(13,14,46,47).

Un matériau peut être biocompatible pour une utilisation donnée mais toxique pour une autre. Il faudra donc bien évaluer cette propriété en se référant à la norme ISO 10993-5 de l'Organisation Mondiale de Standardisation(48).

Lors de l'implantation d'un corps étranger dans l'organisme, il y a un relargage de cytokines pro-inflammatoires, aboutissant au recrutement de cellules immunitaires de type macrophage et lymphocyte qui sont responsable du rejet du greffon(49,50). Cela se traduit par des douleurs, de l'inflammation excessive voir une destruction du tissu environnant le greffon.

L'inflammation aiguë qui est consécutive à l'implantation d'un matériau est nécessaire, c'est la première étape de la cicatrisation du tissu. Néanmoins, il est important d'éviter l'inflammation chronique qui est néfaste.

Le but est d'obtenir une réponse plus mitigée de la réponse inflammatoire en modifiant l'hydrogel lui-même (en choisissant le bon type de polymère, le bon poids moléculaire, la taille des chaînes, ...) pour qu'elle n'entre pas dans un processus chronique. Ces modifications réduisent l'adsorption des protéines à la surface du greffon et par conséquent le recrutement des cellules immunitaires responsable de la réponse de l'hôte contre un corps étranger.

Tout comme l'architecture de la matrice extra-cellulaire et sa réponse aux sollicitations mécaniques guident la différenciation cellulaire, l'hydrogel devra pouvoir proposer des caractéristiques similaires.

L'enjeu sera de créer artificiellement des micro et nanopores au sein même de la structure du matériau. Les micropores permettront aux cellules de migrer à l'intérieur de cette néo-matrice

et d'interagir entre elles. Alors que les nanopores vont permettre d'emprisonner les facteurs biochimiques à l'image de la matrice extra-cellulaire.

Les Propriétés mécaniques des tissus sont différentes d'un tissu à l'autre. Ces propriétés mécaniques dépendent de la localisation mais aussi de la fonction du tissu cible. Elles sont primordiales dans la transmission des informations aux cellules leur permettant d'adhérer, de proliférer et de se différencier.

Il a été démontré que le module de Young du matériau va lui aussi altérer le phénotype des cellules déposée à la surface et orienter leur différenciation. De ce fait un module de Young où  $E = 0,1-1\text{kPa}$  facilitera une différenciation en cellule du cerveau, un  $E = 8-17\text{kPa}$  favorisera une différenciation musculaire et un  $E = 25-40\text{kPa}$  permettra une différenciation en cellules osseuses. Une relaxation rapide du matériau a aussi un rôle à jouer, car les sollicitations contractiles vont permettre sa modification et stimuler l'ostéogenèse(51,52).

Enfin, la biodégradabilité du matériau est un facteur très important notamment pour le tissu osseux. En effet, l'os natif est en perpétuelle reconstruction par une succession de dégradation et d'apposition médiées respectivement par les ostéoclastes et les ostéoblastes. La possibilité de dégradation de l'hydrogel par les métalloprotéinases sécrétées par les ostéoclastes et la vitesse de sa dégradation par celles-ci doivent être cohérente avec la cinétique de dégradation et d'apposition de l'os natif afin de permettre le remodelage de notre matériau pour qu'il soit remplacé par du tissu osseux et permettre la différenciation cellulaire(18,53).

### e. Propriétés de hydrogels pour la bio-impression 3D

Initialement, l'impression en trois dimensions n'avait pas un but d'application biologique. Il fallait une haute température pour permettre le dépôt de matériau, l'utilisation d'agents chimiques, etc, qui rendaient théoriquement son utilisation incompatible avec des cellules vivantes(18).

La mise au point de nouveaux matériaux biocompatibles et biodégradables a permis l'incorporation de cellules vivantes. Néanmoins certaines propriétés bien particulières doivent être respectées pour que les hydrogels puissent être utilisés avec les différentes techniques de bio-impression.

Tout d'abord, il faut s'assurer que le matériau est imprimable. Cette propriété va dépendre de la tension superficielle du matériau une fois déposé. Cette force est définie comme la capacité d'un matériau à s'étaler sur une surface. Elle résulte de la variation d'énergie à l'interface entre deux surfaces qui va tendre vers un état d'équilibre correspondant à la plus basse énergie. Plus cette force est élevée plus le matériau va s'étaler sur la surface.

Elle est déterminée par la mesure de l'angle entre la surface de repos et la tangente au bord de la goutte du matériau.

Le polymère idéal pour l'impression en trois dimensions ne devra pas trop s'étaler sur la surface d'impression. Pour cela on cherchera à obtenir une tension verticale élevée et un angle de contact le plus grand possible(14).

Cette tension permettra aux gouttelettes de matériau, une fois déposées de garder une structure volumineuse le temps de la réticulation. Cela sera d'autant plus important que le développement des cellules et leur cohésion avec le matériau seront dépendantes de la tension superficielle(54).

La vitesse de réticulation du matériau sera aussi un facteur déterminant. La réticulation du matériau doit être rapide pour permettre d'obtenir une couche rigide pouvant recevoir une couche supplémentaire par-dessus. Cette réticulation rapide permet également d'obtenir immédiatement une structure en trois dimensions dans laquelle les cellules peuvent proliférer(14).

Enfin, les hydrogels imprimés doivent maintenir des propriétés mécaniques suffisantes. La rigidité du matériau sera importante pour permettre à la fois aux cellules de se fixer au matériau mais aussi pour les guider vers un certain type de différenciation(14).

## **2) Les Hydrogels d'origine naturelle :**

### **a. Introduction**

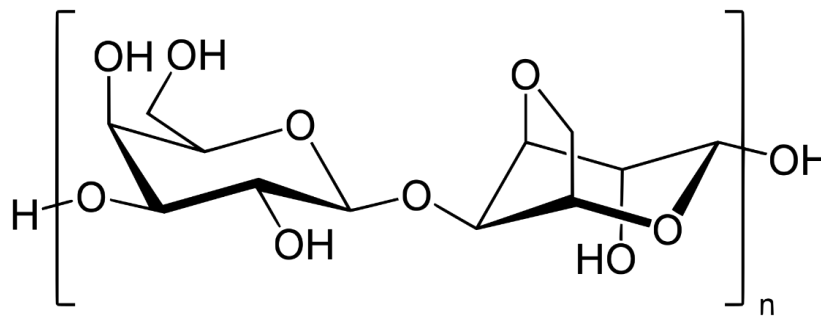
Les hydrogels d'origine naturelle sont des hydrogels dont les polymères qui les composent sont extraits de la nature. Ils sont sélectionnés et utilisés pour leurs propriétés de dégradabilité, de biocompatibilité et leur structure naturelle similaire à la structure des tissus naturels du corps humain(13).

### **b. Les hydrogels dérivés d'algues**

2 polymères permettant la synthèse d'hydrogels sont extraits à partir d'algues : l'agarose et l'alginate.

#### **I – Hydrogels d'agarose :**

L'agarose ou agar-agar (**Figure 13**) est un polymère galactosidique obtenu par le chauffage puis la filtration d'algues de la famille des Gélidiacées ou des Graciliariacées qui sont ensuite lyophilisées et broyées.



**Figure 13 : Unité disaccharidique de galactose constituant l'agar-agar**

C'est un polymère soluble dans l'eau, thermoréversible, capable à la fois de se liquéfier et de se solidifier avec les variations de températures. Sa température de gélification se situe aux environs de 30°C et sa température de fusion à 80°C. Il est utilisé comme milieu de culture cellulaire et bactérienne car il permet une bonne adhésion des cellules et des bactéries en fournissant un environnement nutritif notamment pour les cellules mésenchymateuses.

Duarte Campos *et al.* ont publié en 2016, la caractérisation d'un hydrogel d'agarose couplé à du collagène utilisable en 3D-bioprinting. Au cours de cette étude, les auteurs ont utilisé des cellules mésenchymateuses, pour leur capacités de différenciation en ostéoblastes(23). En raison des caractéristiques thermosensibles du matériau, les auteurs ont décidé d'utiliser le procédé d'impression par jet d'encre(55).

L'agarose est utilisé pour ses propriétés de gélification dans le but d'obtenir un matériau permettant la culture de cellules mésenchymateuses. Cela va permettre leur différenciation en ostéoblastes tout comme le collagène permet l'adhésion et la différenciation cellulaire. Cette gélification va permettre d'obtenir une structure solide pour créer un échafaudage comme le ferai des phosphates de calcium(56–58).

Duarte Campos *et al.* montrent que l'utilisation d'agarose, avec ou sans collagène va permettre l'impression de tube de matériau et de façonner une structure qui gélifie pendant l'impression par ses propriétés thermosensibles. De plus l'ajout de collagène à de l'agarose va diminuer sensiblement sa viscosité, on va passer de 26,7 mPa/s pour un gel d'agarose à 1%, à 12,5 mPa/s pour un gel d'agarose à 1% associé à 0,10% de collagène.

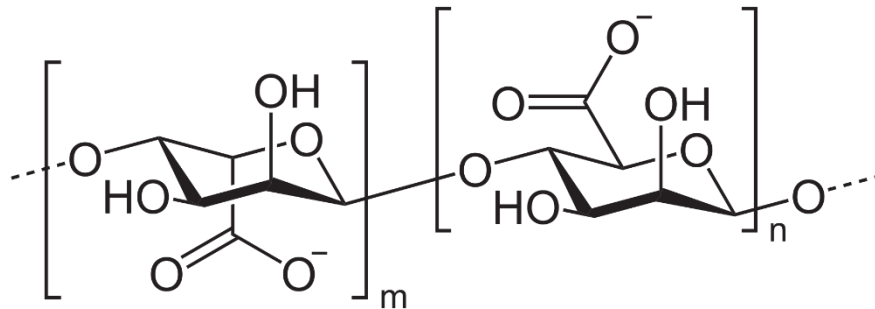
Ils démontrent également que l'association d'agarose et de collagène augmente la rigidité du matériau. En effet, le module de compression de l'agarose seul à 1% est de 17 kPa alors que l'ajout de 0,10% de collagène augmente le module jusqu'à 53 kPa. Le module maximal testé atteint 89 kPa lors de l'utilisation d'un matériau chargé à 2% d'agarose et 0,5% de collagène.

L'impression ne semble pas altérer la viabilité des cellules au cours du processus et cela peu importe la concentration en agarose et en collagène. Cependant la diffusion des cellules et leur capacité à adhérer et s'étaler pour faire des branches et communiquer entre elles est supérieur avec la diminution de la rigidité du matériau. Les matériaux moins chargés en agaroses présentent une adhésion cellulaire plus importante.

Enfin, l'utilisation d'agarose permet la différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes. Cela est prouvé par la présence dans ces cellules imprimées d'une activité de phosphatase alcaline et de la présence d'une haute concentration en calcium.

## II- Hydrogels d'alginate :

D'un autre côté, l'alginate est un polymère composé d'unités disaccharidiques d'acide guluronique et d'acide mannuronique (**Figure 14**), extrait de la membrane de certaines algues brunes par dissolution dans une solution alcaline avant d'être précipité et récupéré(59).



**Figure 14 : Unité disaccharidique constituant l'alginate**

C'est un composé biocompatible, non toxique, biodégradable, de haute viscosité, sa production présente un coût peu élevé et une capacité à gélifier de façon rapide dans les conditions physiologiques(59,60).

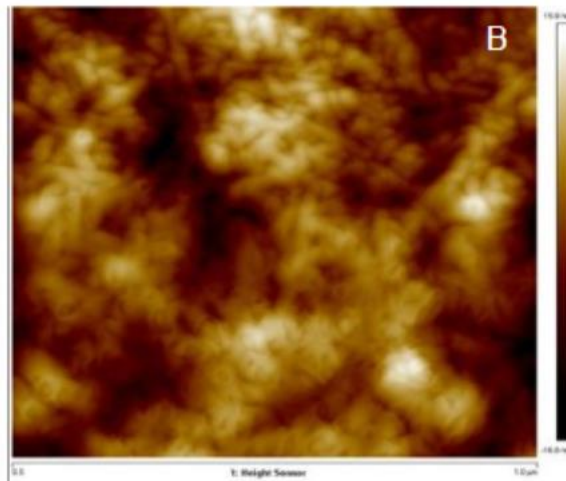
L'ajout d'ions Calcium à une solution d'alginate aboutit à la formation de liaisons électrostatiques, formant une structure 3D sous forme de gel qu'on dit en « boîte d'œuf » et non-thermoréversible. C'est pourquoi dans toutes les études effectuées sur des matériaux à base d'alginate, une fois imprimé l'échafaudage est immergé pendant quelques minutes dans une solution comprenant des ions Calcium afin de lier les différentes couches entre elles(23,61,62).

Ses multiples propriétés lui permettent d'être utilisé dans tous les types d'impression que ce soit en jet d'encre(62), en extrusion(23), ou encore en impression laser(63).

En utilisation pour le 3D-bioprinting l'alginate ne sera jamais utilisé seul. Son intérêt est d'être utilisé comme structure « solide » permettant de palier aux défauts des matériaux d'intérêts (cellulose, fibroïne, gélatine) pour le maintien dans le temps de la structure en trois dimensions, ou bien pour permettre l'impression du matériau d'intérêt.

Compaan *et al.* ont publiés dans une étude l'utilisation d'alginate comme un agent sacrificiel. Il est utilisé comme un protecteur de la fibroïne qui est dégradé lors de son passage dans le processus d'impression. L'ajout d'alginate permet également d'obtenir une structure 3D rapidement dès son dépôt, ce qui n'est pas le cas de la fibroïne qui nécessite plusieurs minutes voire plusieurs heures de gélification. L'alginate est ensuite éliminé par un agent chélatant pour ne garder que la structure de fibroïne(62).

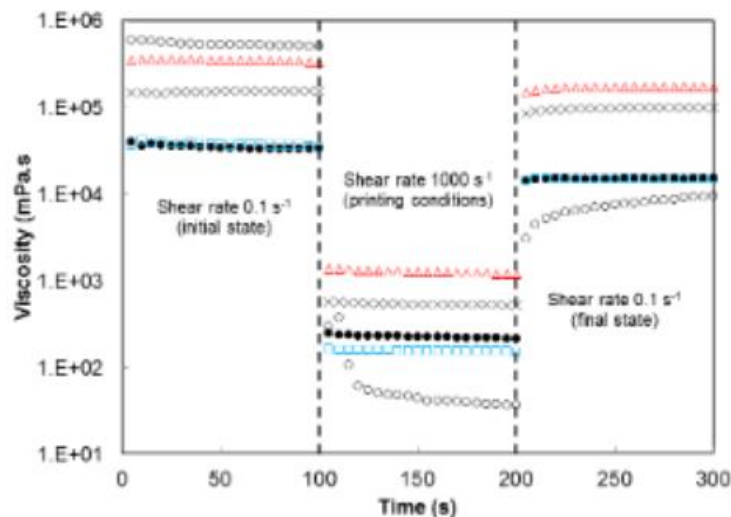
Abouzeid *et al.* ont étudié les propriétés d'un mélange d'alginate et de cellulose en différentes proportions(61). La cellulose est un polysaccharide extrait de plantes et constitué de D-anhydroglucopyranose liés entre eux par des liaisons  $\beta$ 1-4. Il est hydrophile mais insoluble dans l'eau et les solvants organiques. Cela s'explique par la présence d'un grand nombre de pont hydrogènes intra et intermoléculaires. C'est un composé biodégradable, biocompatible et très facilement disponible(61,64).



**Figure 15 : Vue en microscopie du mélange Alginate-Cellulose, Abouzeid et al.(61)**

L'hydrogel obtenu à partir d'alginate et de fibrille de cellulose est homogène, on a aucune séparation de phase entre les deux molécules une fois mélangées (**Figure 15**), cela montre une bonne compatibilité des deux matériaux.

De plus, l'hydrogel obtenu à une grande thixotropie, c'est-à-dire que la viscosité du matériau diminue dans le temps avec l'application d'une contrainte et remonte une fois la force arrêtée. En effet, le mélange à 2% d'alginate et 2% de cellulose présente une viscosité de l'ordre de  $1,49 \times 10^5$  mPa.s au repos, elle descend à 75,9 mPa.s durant l'application de la force et remonte à  $0,95 \times 10^5$  mPa.s soit 66% de la viscosité récupérée. Cette propriété est très intéressante pour l'utilisation du matériau en impression par extrusion (**Figure 16**).



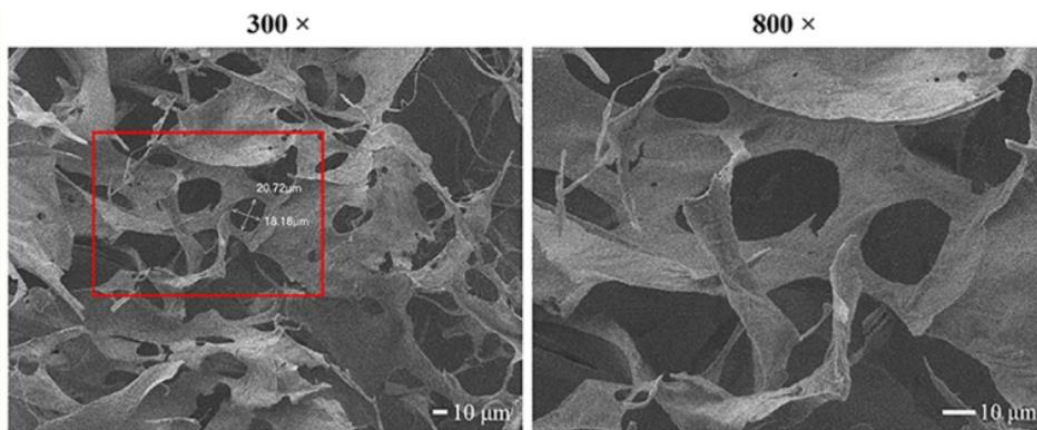
**Figure 16 : Courbe de thixotropie des matériaux mixtes d'alginate et de cellulose, Abouzeid et al.(61)**

Le module de compression du mélange varie entre 1000 et 1200 MPa ce qui est beaucoup plus élevé que le module de la cellulose seule (135 MPa) mais légèrement inférieur au module de l'alginate (1511 MPa).

Wang *et al.* ont mis au point un gel à base de 8% d'alginate et 2% de gélatine dissout dans une solution de NaCl pour aboutir à un hydrogel chargé à 10% en polymère(23).

Lors de l'impression par extrusion leur gel a une concentration en cellules de l'ordre de  $3 \times 10^6$  cellules/mL distribuée de façon uniforme. La viabilité des cellules imprimé est de l'ordre de 90% ce qui démontre une bonne protection des cellules et une bonne cytocompatibilité.

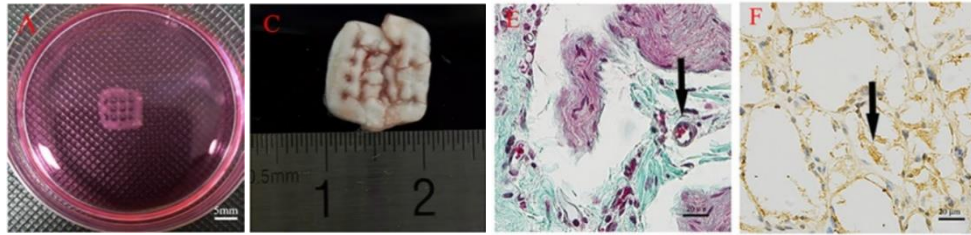
Le matériau est analysé au microscope électronique à balayage afin d'évaluer la porosité du matériau (**Figure 17**). En effet, la possibilité doit être donné aux cellules de coloniser le matériau, de communiquer entre elles, de permettre la diffusion des nutriments, des protéines et le passage de l'oxygène. La porosité représente 24% de la surface du matériau obtenu, avec des pores en moyenne de  $28,4 \mu\text{m}$  de diamètre, ce qui est en adéquation avec la mobilité cellulaire.



**Figure 17 : Analyse de la porosité au microscope électronique à balayage, Wang et al.(23)**

Une fois la structure en trois dimensions imprimée et sa mise en culture pendant 7 jours, la pièce est implantée dans des souris en sous-cutané pour évaluer la formation d'os sur l'hydrogel. Après 8 semaines, les souris sont sacrifiées et on peut observer la formation de néo-tissu osseux tout autour de l'implant. Cela est confirmé par une coupe en microscopie optique présentant la présence de vaisseaux sanguin au sein du matériau et d'ostéocalcine (**Figure16**).





**Figure 18 : Structure imprimée en 3D en culture (A), l'échantillon retiré après sacrifice avec du tissu osseux (C), coupe en microscopie photonique avec la présence de néo-vaisseaux (E), coupe en microscopie photonique avec marquage d'ostéocalcine (F), Wang et al.(23)**

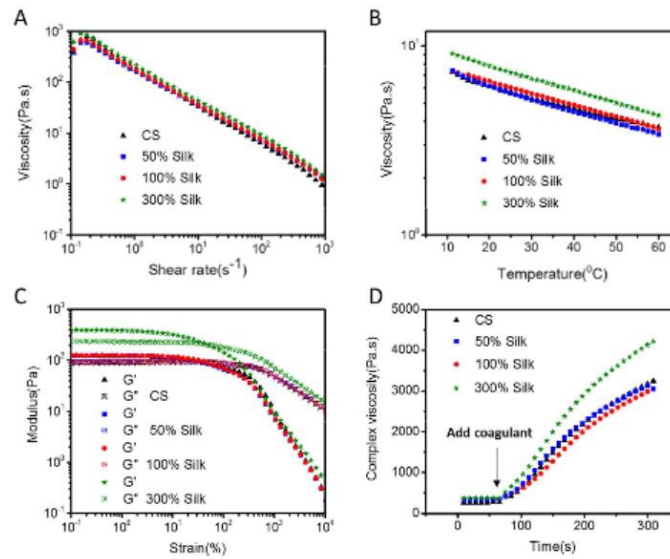
Poldervaart *et al.* ont montré que la présence de BMP-2 dans l'hydrogel d'alginate, permet de guider les cellules mésenchymateuses présentes dans le matériau vers une différenciation en ostéoblastes et de s'affranchir du temps de culture préalable à l'implantation(65).

### c. Hydrogels de chitosan

Le chitosan est le polymère naturel dérivé de la chitine qui est le polymère le plus abondant après la cellulose. C'est un polysaccharide issu de l'extraction de la carapace de crevettes ou de crustacés.

Ce polymère est cytotocompatible, biodégradable et soluble dans les solutions acides, avec une capacité de gélification pour un pH supérieur à 6(66). Malgré son excellente capacité à être imprimé et sa capacité à former un gel, la faible rigidité et sa faible résistance à la compression rendent les gels constitués uniquement de chitosan peu stable, ce qui pose un problème de stabilité de la structure après impression(66,67).

Zhang *et al.* ont publié une étude au cours de laquelle ils ont mélangé des fibres de soie à une solution de chitosan, afin de compenser les inconvénients du chitosan. A partir d'études préalables, ils ont déterminé que le taux adéquat de chitosan est de 4%(66). Ils ont ajouté des fibres de soies à raison de 50%, 100% et 300% de la dose de chitosan. L'ajout de 50 ou 100% de fibres de soie n'a aucune incidence sur la viscosité, le module de conservation ( $G'$ ) et le module de perte ( $G''$ ) du matériau. Cependant l'ajout de 300% de fibres de soie augmente légèrement la viscosité du mélange par rapport au chitosan natif. Les modules  $G'$  et  $G''$  sont augmentés par 2 ou 3 fois et la vitesse de gélification également. D'après ces informations le matériau devrait mieux se maintenir en post-impression (**Figure 19**).



**Figure 19 : Courbes des analyses de viscosité (en haut) et mécanique (en bas), ZHANG et al.(66)**

L'ajout de fibres de soie augmente la rugosité de la surface de l'hydrogel. Cette rugosité permet aux cellules de plus adhérer au matériau, de s'étaler et ainsi d'éviter de s'organiser sous forme d'amas cellulaire (cluster).

Dans une autre étude, Demirtas *et al.* étudient l'ajout d'hydroxyapatite au sein d'un hydrogel de chitosan(67).

L'ajout d'hydroxyapatite augmente la viscosité de 149 Pa/s à 230,95 Pa/s. Le module d'élasticité est augmenté de 3 fois de 4,6 kPa à 14,97 kPa. Le module de conservation reste supérieur au module de perte ce qui nous permet d'établir que l'hydrogel obtenu est un gel viscoélastique.

Les hydrogels de chitosan natif sont poreux et forment des pores d'environ 200µm. La taille de ces pores diminue à environ 100µm de diamètres lors de l'ajout d'hydroxyapatite au sein de l'hydrogel. Les cellules déposées dans l'hydrogel sont dispersées de façon homogène et sont plus étalées dans le gel avec de l'hydroxyapatite du fait de l'augmentation de la rugosité de la surface du matériau.

Les cellules au sein de l'hydrogel chargé en hydroxyapatite produisent de la matrice extracellulaire et sécrètent des ostéocalcines.

En conclusion on peut observer que les molécules naturelles semblent présenter des avantages biologiques pour mettre au point des hydrogels pour la régénération osseuse. Néanmoins leurs propriétés mécaniques une fois gélifiés sont limités que cela soit pour l'impression ou pour le maintien de la structure en post-impression. L'ajout d'une molécule supplémentaire pour compenser leurs propriétés mécaniques, d'adhésion, ou d'ostéoconduction semblent être indispensable pour pouvoir utiliser ces molécules en 3D-bioprinting pour régénérer du tissu osseux.

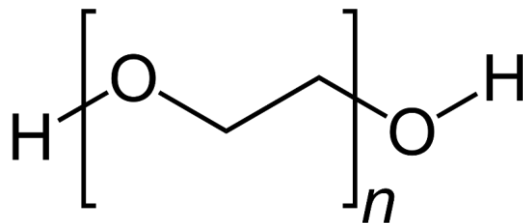
### 3) Les Hydrogels d'origines synthétiques :

#### a. Introduction

Les hydrogels d'origine synthétique sont basés sur des polymères synthétisés en laboratoire. De par leurs paramètres synthétiques contrôlables, ils sont très facilement adaptables chimiquement avec une très bonne reproductibilité. Ils peuvent être biologiquement inertes, ils vont servir de d'architecture pour la mise en place des facteurs chimiques ou des cellules dans les conditions que à déterminer.

#### b. Hydrogels de Polyéthylène Glycol

Le poly éthylène glycol (PEG) est un polyéther fabriqué par la réticulation de monomères d'éthylène glycol (**Figure 20**). C'est une molécule hydrophile, soluble dans l'eau et dans la plupart des solvants organiques, il est biocompatible, non toxique, stimulant le système immunitaire(68).

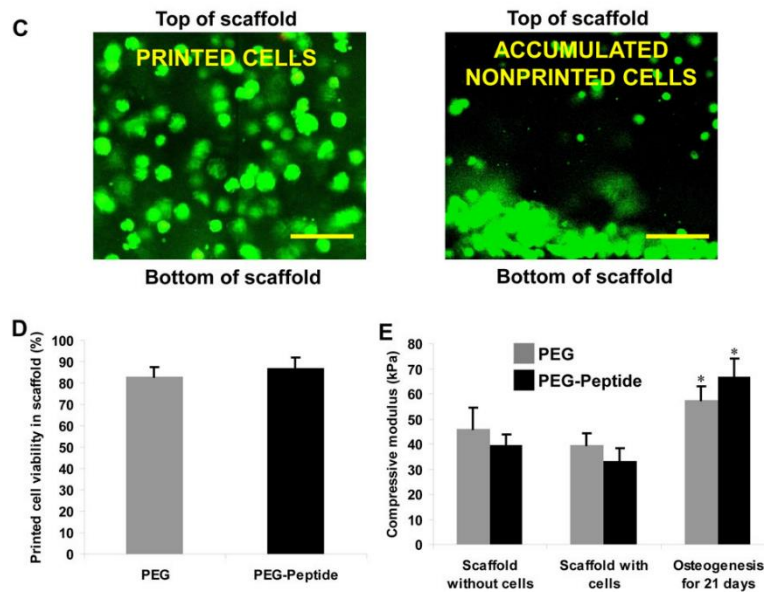


**Figure 20 : Motif répétitif de Poly éthylène glycol**

Gao *et al.* utilisent le poly éthylène glycol méthacrylé afin de solidifier l'hydrogel. Ils comparent un hydrogel de PEG seul ou associé à des peptides (RGD). De façon native, un hydrogel de PEG possède un module de compression de 500kPa, ce qui est supérieur aux hydrogels d'origine naturelle. Ces hydrogels, imprimés par jet d'encre, sont associés à des cellules mésenchymateuses qui sont facilement prélevable et pouvant se différencier en ostéoblastes(69).

Une fois les gouttelettes de matériaux imprimés, elles sont photopolymérisées instantanément pour lier les couches entre elles et solidifier la structure en trois-dimensions

Les cellules sont mieux réparties dans l'hydrogel lorsqu'il y a une photopolymérisation, cela les fige dans la structure, car elles ont tendances à sédimenter. Une bonne viabilité des cellules à 24h est obtenue (**Figure 21**).

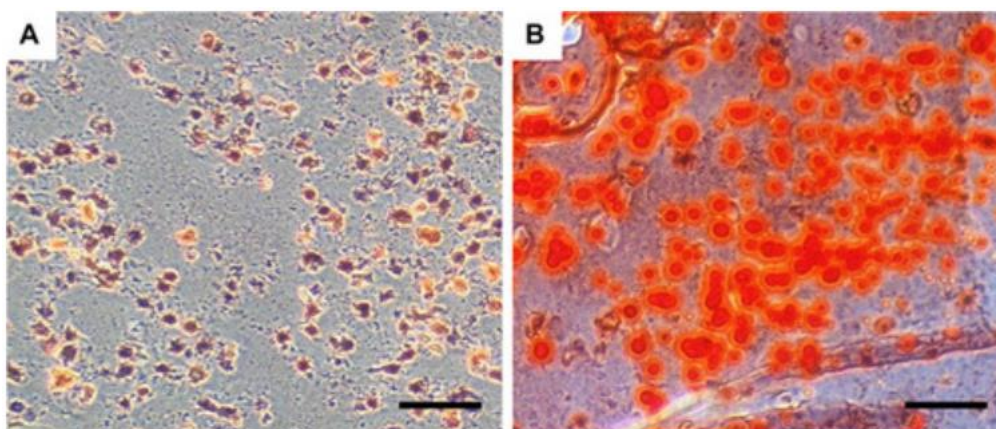


**Figure 21 : Vue en fluorescence de la répartition cellulaire dans le matériau (en haut), le taux de viabilité cellulaire (en bas à gauche), mesure du module de compression (en bas à droite), Gao et al.(69)**

La viscosité du mélange de PEG et des cellules a tendance à augmenter. En effet, on passe d'une viscosité de 1,85 Pa/s à 2,07 Pa/s, ce qui est une viscosité permettant d'imprimer en jet d'encre facilement.

Néanmoins, le module de conservation en compression va avoir tendance à diminuer avec la présence de cellules. Ce module et la rigidité du matériau vont à l'inverse réaugmenter une fois l'ostéogenèse démarrée.

Cette ostéogenèse est supérieure quand le PEG est lié à des peptides RGD. On peut observer une production accrue de collagène et l'activité de phosphatase alcaline des cellules est triplé. Après coloration au rouge d'Alizarin et analyse au microscope, il est observé une fixation supérieure du calcium dans le matériau comportant des peptides (**Figure 22**).



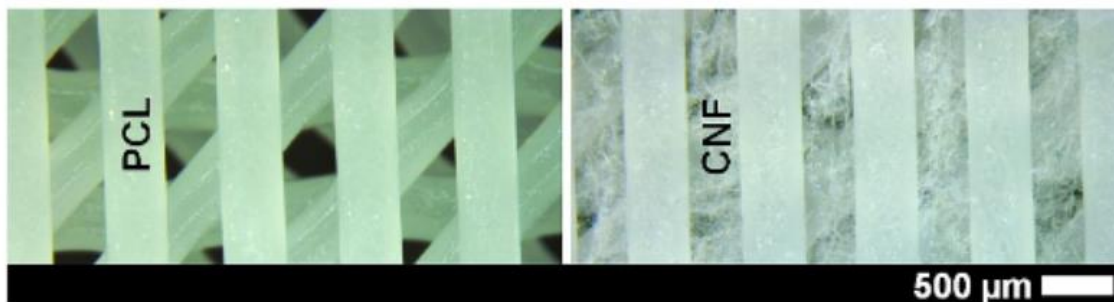
**Figure 22 : Coloration au rouge d'Alizarin fixant le calcium, à gauche PEG sans peptides et à droite PEG avec peptides, Gao et al.(69)**

### c. Les hydrogels de Poly-caprolactone

Le Polycaprolactone (PCL) est un polymère synthétique biocompatible, lentement biodégradable hydrophobe présentant un point de fusion bas (60°C) rendant ce polymère thermoplastique et peu coûteux. Il est synthétisé par l'ouverture de cycle d'un monomère : le caprolactone. Les matériaux à base de polycaprolactone ont montré qu'ils possèdent une bonne résistance et permettent et promeuvent la minéralisation par les cellules associées.

Rashad *et al.* dans leur étude utilisent le PLC afin de produire un hydrogel utilisable en extrusion. L'utilisation de NaOH sur un hydrogel de PLC altère sa surface par hydrolyse alcaline. Cela aboutit à l'augmentation de l'hydrophilie du matériau ainsi que l'activité des cellules à sa surface. C'est pourquoi, ils décident d'utiliser ces propriétés et de coupler cela avec l'ajout d'un faible pourcentage de microfibrilles de cellulose dans le but de stimuler l'activité cellulaire(70).

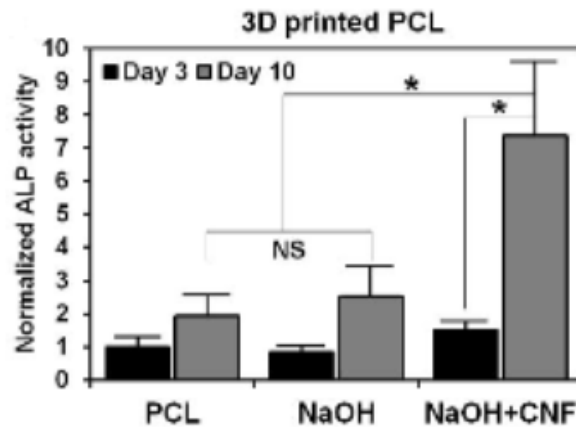
Au micro-scanner, on observe une structure interne de géométrie polygonale complexe présentant des pores interconnectés. Lors de l'ajout de cellulose, les fibrilles se placent au niveau des pores et entre les différentes lamelles imprimées. La porosité du matériau augmente avec les différents traitements de 37,6% pour le PCL seul à 40,7% pour un matériau de PCL associé à un traitement de NaOH et de l'ajout de cellulose. Cela s'explique par la multiplication des micro-pores issus de l'interconnexion des fibrilles de cellulose (**Figure 23**).



**Figure 23 : Vu du matériau de PCL seul ou avec de la cellulose au microscope, Rashad et al.(70)**

D'un point de vue cytocompatibilité le matériau associé à de la cellulose présente des cellules qui augmentent leur prolifération à 10 jours ainsi qu'un pourcentage d'ensemencement supérieur au PCL seul. Ces cellules sont aussi plus étalées sur la surface du matériau traité et lié à de la cellulose.

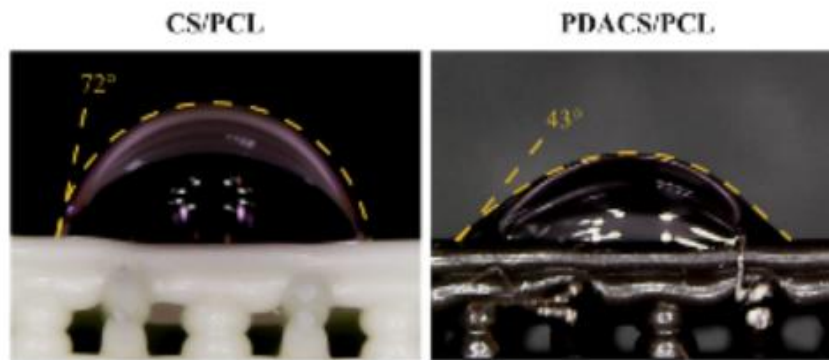
Enfin, d'un point de vue moléculaire, la présence de cellulose dans le matériau augmente la production de phosphatase alcaline par les cellules ensemencées ainsi qu'une minéralisation plus importante (**Figure 24**).



**Figure 24 : Activité de la phosphatase alcaline, Rashad et al.(70)**

Chen *et al.* font le constat que les céramique à base de phosphates de calcium ou de silicate de calcium présentent des bons résultats dans le remplacement des défauts osseux ainsi que des propriétés d'ostéoconduction. Néanmoins ce sont des matériaux non imprimables sauf s'ils sont mélangés avec d'autres matériaux pouvant former une structure solide, poreuse et imprimable. Le choix fut donc fait de mettre au point un mélange de Silicate de calcium et de poly-caprolactone liés par une polydopamine pour l'imprimer par extrusion. Des cellules mésenchymateuses sont ensuite déposées sur la surface du matériau à chaque couche imprimée. Dans le processus d'ossification, les cellules endothéliales d'origines ombilicales jouent un rôle prédominant par la sécrétion de certaines molécules tel que l'ostéoprotégérine ou les facteurs de croissances endothéliales favorisant la différenciation des cellules mésenchymateuses. C'est pourquoi les auteurs ont décidés d'évaluer la possibilité d'ajouter ce type de cellules dans un mélange d'alginate et de gélatine au matériau de PCL modifié pour stimuler le processus(71).

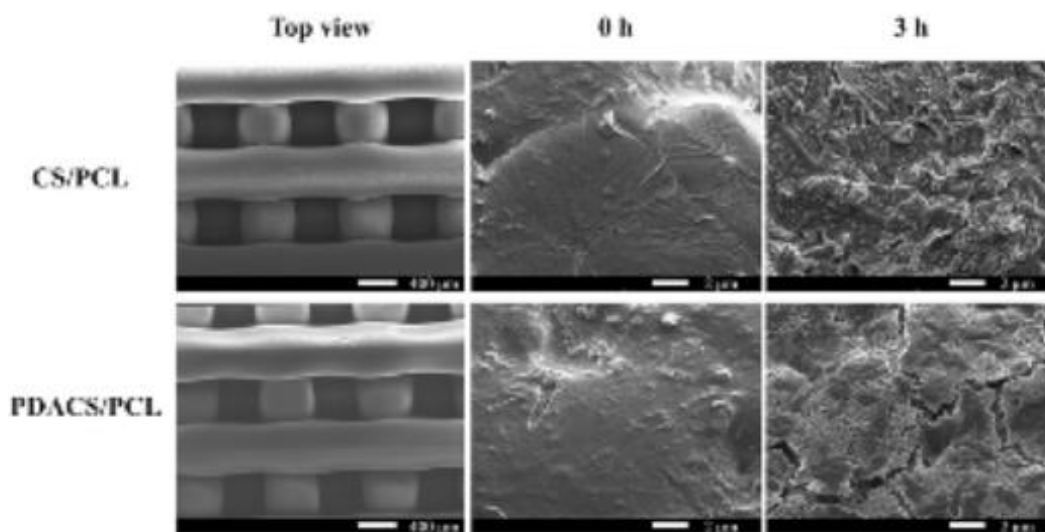
En comparant le matériau de céramique/PCL et le matériau de PCL lié à la céramique par polydopamine, il est observé un angle de contact inférieur de 72° et 43° respectivement (**Figure 25**). Cela montre une meilleure hydrophilie du matériau avec de la polydopamine ce qui doit augmenter l'attachement des cellules.



**Figure 25 : Comparaison des angles de contact avec ou sans polydopamine, Chen et al.(71)**

Le module de compression augmente avec l'utilisation de polydopamine de 1,9MPa à 5,2MPa, ce qui peut s'expliquer par l'augmentation des liaisons hydrogènes engendrées par l'ajout d'un produit liant.

En analysant les matériaux au microscope électronique à balayage ainsi qu'au microscope à fluorescence, on s'aperçoit qu'au bout de 3h le nombre de cellules à la surface du matériau lié par polydopamine ainsi que le nombres de cristaux d'hydroxyapatites sont plus élevés (**Figure 26**).



**Figure 26 : Vu au microscope électronique à balayage de l'état de surface des cristaux d'hydroxyapatite, Chen et al.(71)**

La présence de cellules endothéliales d'origine ombilicale, présente un effet sur la prolifération cellulaire. En effet, on peut remarquer que la prolifération cellulaire est plus importante sur les matériaux présentant ce type de cellules. De plus, on peut assister à la mise en place au bout de 7 jours d'une organisation des cellules qui se lient entre elles mimant ainsi le début de la mise en place d'un système vasculaire.

Il est démontré dans cette étude que l'incorporation de cellules endothéliales au matériau semble favoriser la sécrétion de protéines de la physiologie osseuse telle que l'ostéoprotégérine qui est secrétée en grande quantité. Les cellules endothéliales seules n'ayant pas la capacité de guider vers une différenciation des cellules mésenchymateuses, ils concluent donc que le matériau de Poly-caprolactone joue un rôle dans la différenciation.

En conclusion on peut observer que les hydrogels mis au point à partir de molécules synthétiques ne semblent pas posséder de propriétés biologiques propres. Seules les modifications chimiques ou les mélanges de molécules ou l'incorporation de différentes lignées cellulaires vont permettre de mettre au point des hydrogels intéressants pour l'utilisation en 3D-bioprinting. Ils semblent donc que leur association à des matériaux naturels pourraient potentialiser leurs propriétés.

#### **4) Les Hydrogels hybrides :**

##### **a. Introduction**

Les hydrogels hybrides, sont les hydrogels formés à la fois de molécules synthétiques et de molécules naturelles. Le but de la création de ces hydrogels est de potentialiser l'effet des propriétés biologiques des molécules naturelles et la flexibilité des molécules synthétiques afin d'obtenir des matériaux optimaux pour le 3D-bioprinting en vue de régénérer le tissu osseux. L'hybridation la plus utilisée est l'utilisation d'une molécule d'origine naturelle à laquelle est lié du méthacrylate. Le méthacrylate est très réactif avec les radicaux libres consécutifs à l'exposition d'un photoinitiateur par des UV, ce qui permettra une gélification rapide de la structure.

##### **b. Les hydrogels de Gélatine/Méthacrylate**

La gélatine est un polymère issu de la dénaturation du collagène issu de la matrice extracellulaire. Sa structure est en triple hélice formant un gel en conformation tertiaire par la mise en place de liaisons électrostatiques à 37°C. C'est un matériau biocompatible et biodégradable.

Afin de s'affranchir de la dépendance à la température pour former un gel, ou le défaire, les chercheurs ont lié cette gélatine à du méthacrylate. Ce nouveau polymère ainsi formé (GelMA) formera des gels chimiques avec des liaisons covalentes par photopolymérisation après extrusion.

Irmak *et al.* dans leur étude étudie l'influence de la méthode pour lier la gélatine et le méthacrylate sur les paramètres physiques, ou biologiques du matériau. Deux types de liaisons sont ainsi proposées : l'une conventionnelle par mélange chimique et le deuxième par



utilisation de micro-ondes à différentes puissances permettant théoriquement un taux de liaison plus élevé(72).

La dégradation du matériau de GelMA en présence de collagénase est plus lente lorsque la proportion de méthacrylate liés est supérieur ainsi que lors de l'augmentation du pourcentage de gélatine. En effet, à 5 jours 94% du matériau de GelMA à 4% de gélatine lié par technique conventionnelle est dégradé. Alors que, si l'on observe les autres matériaux la dégradation est de l'ordre de 50% à 35 jours pour le matériau chargé à 8% en gélatine et lié par méthode conventionnelle, et de l'ordre de 30% à 35 jours pour les matériaux liés par micro-ondes (Figure 27).

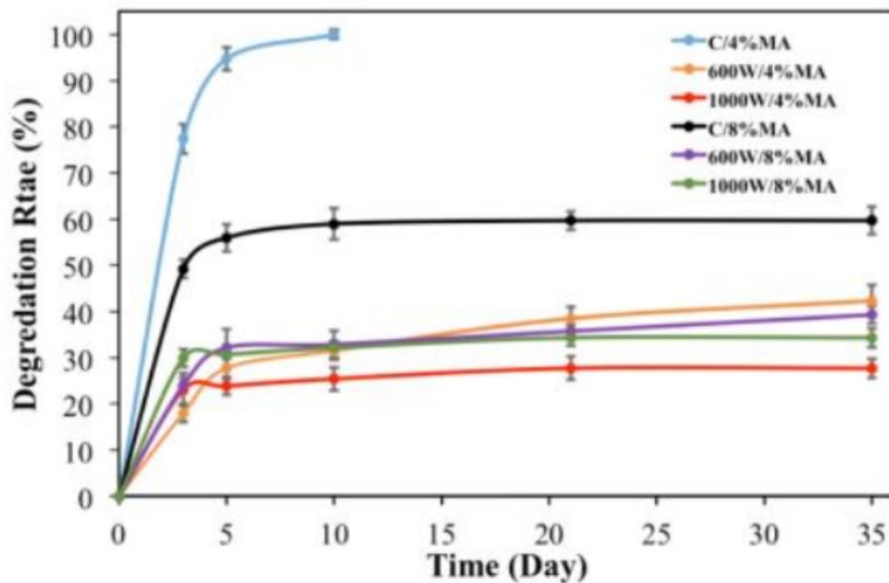
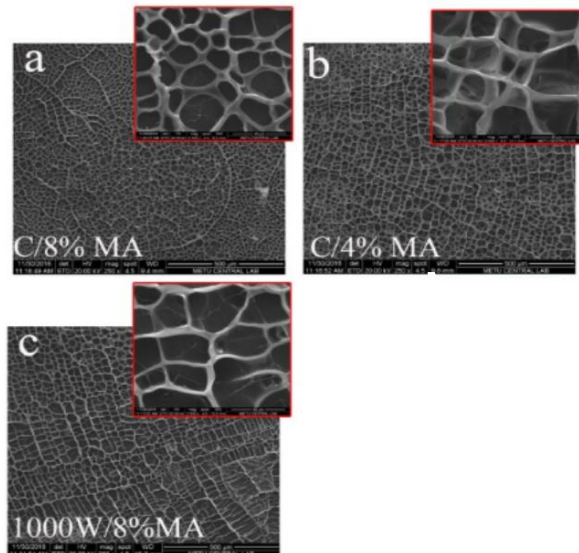


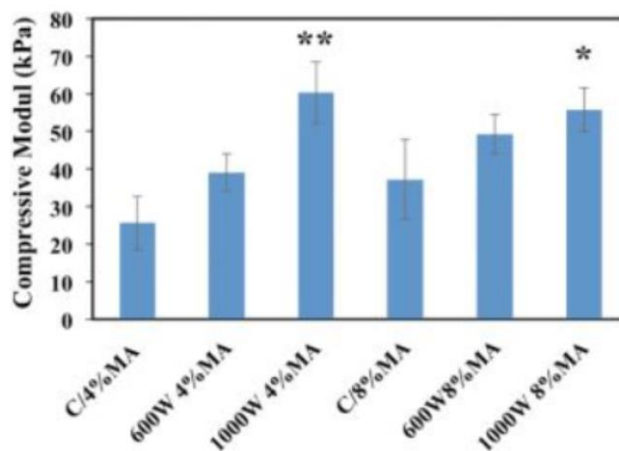
Figure 27 : Dégradation des matériaux de GelMA à 35 jours, Irmak et al.(72)

Les matériaux obtenus sont poreux permettant ainsi la communication cellulaire. Cette porosité n'est pas modifiée avec l'augmentation de la concentration en gélatine ou avec la méthode de liaison. Les pores ainsi observés sont de l'ordre de 50 à 80 $\mu$ m (Figure 28).



**Figure 28 : Observation au microscope électronique à balayage de la porosité, IrMAk et al.(72)**

Le module de Young est aussi dépendant de la concentration en gélatine et le type de liaison. Il est de 30kPa pour un matériau concentré à 4% en gélatine et lié au méthacrylate de façon conventionnelle. Alors qu'il est de 80kPa pour un matériau à 8% de gélatine et lié par micro-onde (Figure 29).



**Figure 29 : Module de Young des différents matériaux de GelMA, IrMAk et al.(72)**

Enfin d'un point de vue cellulaire, la viabilité des cellules dans le matériau une fois imprimé et photopolymérisé est de 80 à 95% à 21 jours. Ces cellules expriment une forte quantité de phosphatase alcaline dès 7 jours et diminue progressivement jusqu'à 21 jours. A partir de 14 jours les ostéocalcines et ostéoprotégérine sont de plus en plus sécrétés, ce qui montre une activité ostéogène. Pour terminer, ils font le constat d'une augmentation significative de la fixation du calcium à l'hydrogel entre le 14<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour.

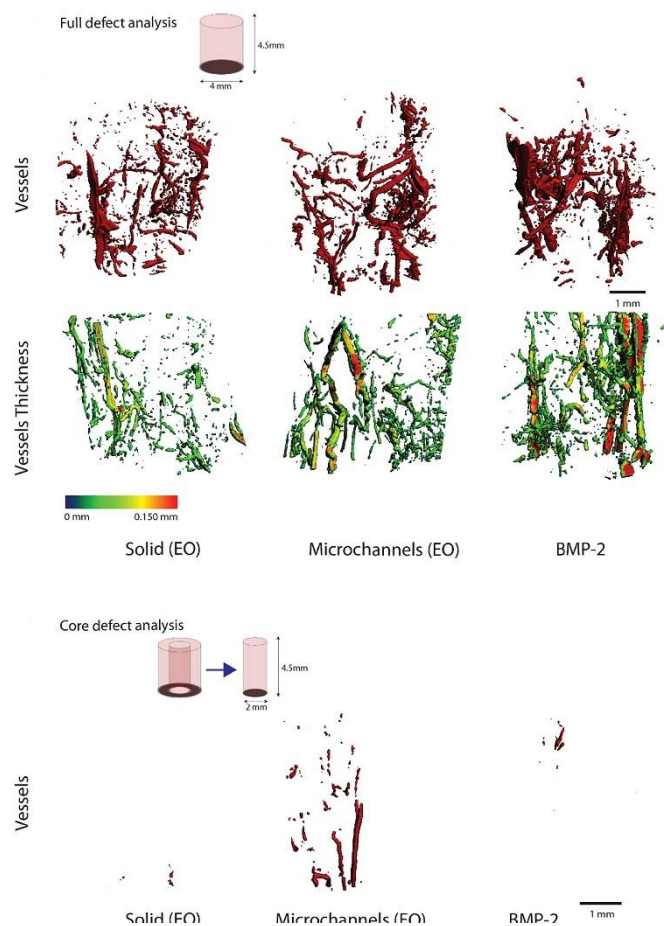
Daly *et al.* étudient l'intérêt de l'ajout de BMP2 aux gels de GelMA par rapport à des hydrogels simple, ainsi que l'intérêt de mettre en place des perforations à l'intérieur de la structure 3D

de leur matériau. Leur but est de façonner un matériau capable d'induire une ossification endochondrale(73).

*In vivo*, les hydrogels présentent un module de Young de 76kPa sans distinction entre les différents hydrogels. A 24h les matériaux présentent une viabilité cellulaire de l'ordre de 90%. Une fois extrudé et photopolymérisé, les différents matériaux sont mis en culture pendant 4 semaines. A la fin de cette étape de culture cellulaire, l'analyse biochimique des matériaux présentent une production de collagène de type II et de type X.

Un fois la culture cellulaire de 4 semaines effectuée, les matériaux sont implantés dans des défauts osseux de tailles critiques de 5mm de diamètre dans des têtes fémorales de rats. Après 4 semaines d'implantation, les rats sont sacrifiés et les matériaux récupérés.

Une analyse par microscanner et angioscopie sont effectués. La vascularisation semble plus importante dans les matériaux présentant de la BMP2 que dans les autres. Néanmoins il est observé une plus grande vascularisation du centre du matériau dans les matériaux percés (**Figure 30**).

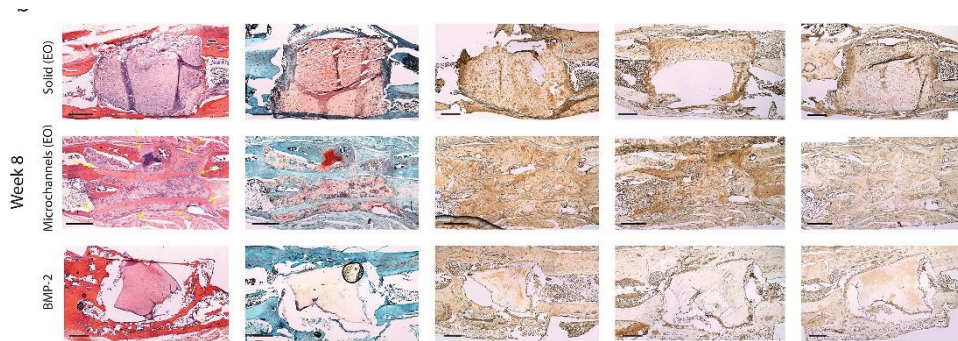


**Figure 30 : Représentation de la vascularisation, Daly et al.(73)**

L'évaluation du volume osseux montre qu'il y a un plus grand volume osseux dans les matériaux de BMP2 ou non-percés que dans les percés. Les matériaux de BMP2 présentent

également une ossification périphérique au matériau plus grande que dans les autres types de matériaux.

Enfin, il est observé macroscopiquement une dégradation beaucoup plus importante des matériaux percés, alors que les matériaux non-percés ou liés à de la BMP2 semblent peu dégradés (**Figure 31**).

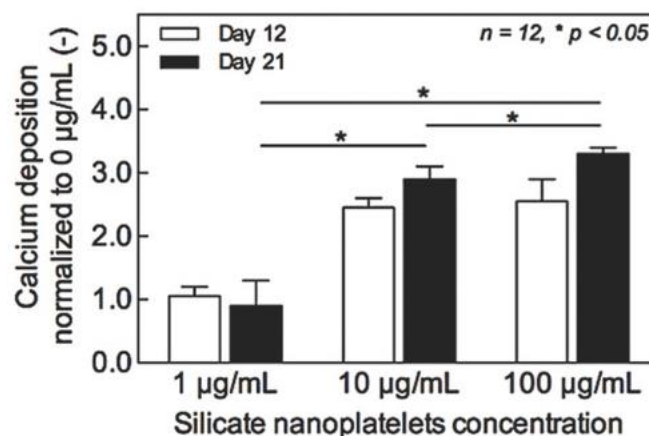


**Figure 31 : Coupes histologiques du matériau et de son tissu environnant à 8 semaines, Daly et al.(73)**

Byambaa *et al.* étudient l'association de différents GelMA (l'un natif et l'autre chargé en grains de silicates) dans une architecture mimant la structure de l'os. Pour cela, plusieurs tubes de matériaux vont être imprimés pour former une pyramide avec en son centre un tube de GelMA natif voué à être dégradé pour créer une perfusion (telle la moelle au centre de l'os long). Ce tube de GelMA simple est entouré de GelMA chargé en grains de silicates pour renforcer la rigidité et stimuler la différenciation en ostéoblastes des cellules mésenchymateuses et endothéliales associées. Des facteurs de croissance de type VEGF sont incorporés aux matériaux(74).

La viabilité cellulaire est basse les trois premiers jours après extrusion, probablement à cause du stress mécanique imposé aux cellules pendant l'impression. Cependant le nombre de cellules augmente à 7 jours, montrant une prolifération cellulaire.

Il est observé un dépôt de calcium et une ossification en contact du matériau chargé en silicates. Plus la concentration en silicates est élevée, plus la minéralisation est importante et se fait rapidement (**Figure 32**).



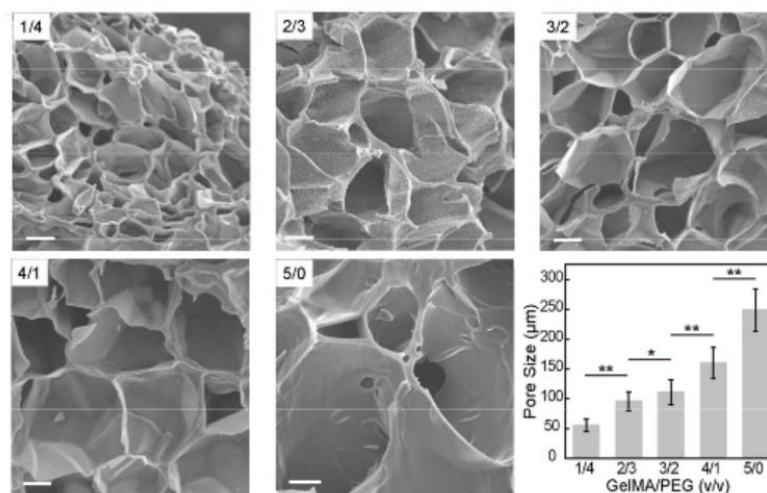
**Figure 32 : Mesure du dépôt de calcium en fonction de la concentration en silicates, Byambaa et al.(74)**

Enfin, le centre de la structure n'étant pas chargé en silicate et avec une concentration en GelMA moins importante, il est observé une meilleure formation de capillaires. Cette vascularisation entraîne une dégradation facilitée du centre de la structure. Cette structure une fois dégradé agit comme une perfusion sur le reste du GelMA non dégradé, stimulant ainsi les cellules qui sécrète alors des facteurs de l'ostéogenèse (Ostéocalcine, ostéoprotégérines).

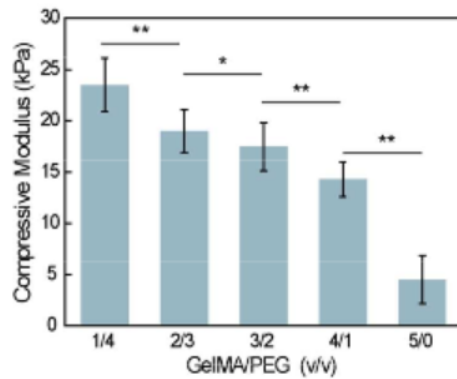
Ma *et al.* lient à leur matériau de GelMA à du Polyéthylène glycol diméthacrylate (PEGDA) dans différentes proportions en associations avec des cellules souches du ligament parodontal. L'association de deux molécules méthacrylées permet de les lier ensemble par photopolymérisation. Leur but est de régénérer l'os lors de défauts osseux parodontaux(75).

Ils analysent tout d'abord le rôle de la formulation de leur matériau dans la variation des propriétés physiques et biologiques. Ils observent que plus la proportion de GelMA augmente, plus les pores du matériau sont gros. La variation de la taille des pores part d'une largeur de 55µm pour le dosage à 1/4 GelMA-PEGDA à 249µm pour le dosage 5/0 GelMA-PEGDA.

Ils mettent en relation cette propriété avec le module de Young. En effet, l'augmentation de la proportion de PEGDA dans le matériau diminue la largeur des pores mais augmente aussi la rigidité du matériau (**Figure 33 et 34**).



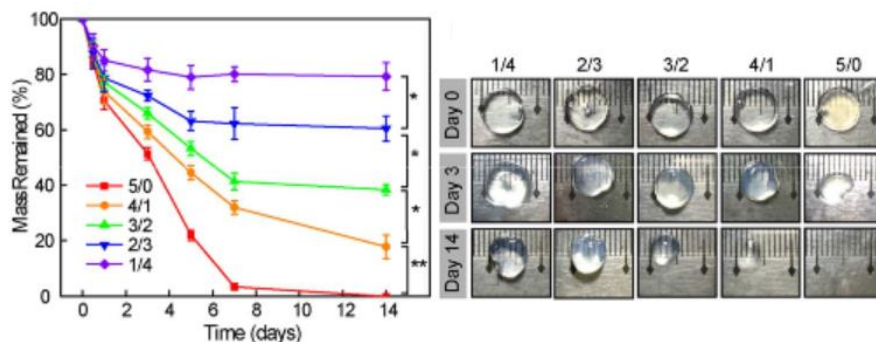
**Figure 33 : Observation au microscope électronique de la taille des pores en fonction du dosage des polymères, Ma *et al.*(75)**



**Figure 34 : Variation du module de Young en fonction du dosage des polymères, Ma et al.(75)**

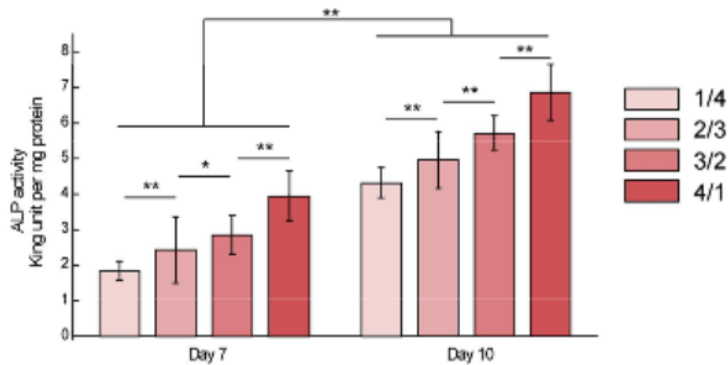
A partir de ce moment, Ma *et al.* décident de ne plus investiguer le dosage à 100% de GelMA car il présente des caractéristiques physiques qui ne sont pas intéressante pour eux.

La dégradation de leur matériau varie sensiblement avec la proportion des polymères. La dégradation est plus lente, et en moindre grande proportion lorsqu'est augmenté la proportion de PEGDA. Cela peut s'expliquer par le fait que le PEGDA n'est pas hydrolysé par les collagénases et la liaison à GelMA entraîne de ce fait une résistance à la dégradation **Figure 35).**



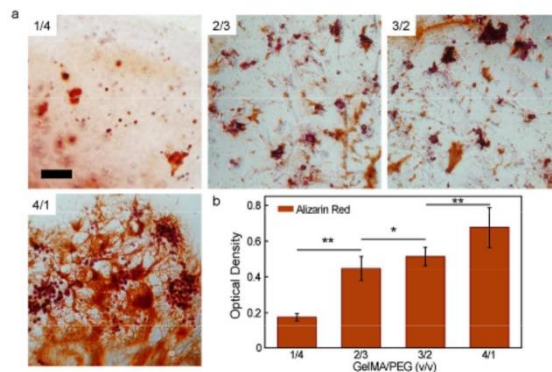
**Figure 35 : Modélisation de la dégradation des matériaux en fonction de leur dosage, Ma et al.(75)**

Pour terminer l'étude *in vitro*, ils objectivent l'activité de la phosphatase alcaline et la minéralisation à la surface du matériau. L'activité de la phosphatase alcaline augmente entre les jours 7 et 10. Cette augmentation est d'autant plus grande que la proportion de GelMa augmente dans le matériau **(Figure 36).**



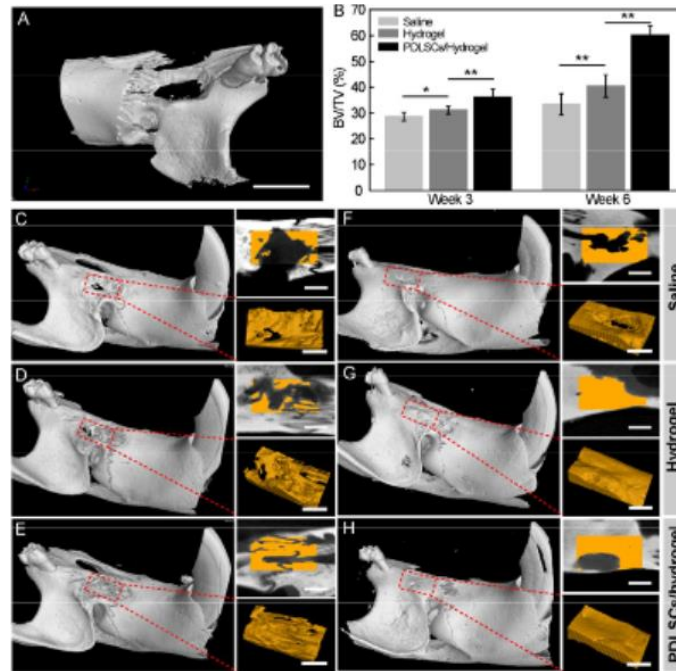
**Figure 36 : Mesure de l'activité de la phosphatase alcaline en fonction du dosage, Ma et al.(75)**

Puis, les matériaux sont observés au microscope après coloration des coupes au rouge d'alizarin. Cette coloration met en évidence la minéralisation à la surface du matériau. Plus la proportion de GelMA est grande, plus la minéralisation du matériau augmente (**Figure 37**).



**Figure 37 : Vue au microscope de la minéralisation des matériaux, Ma et al.(75)**

*In vivo*, les matériaux sont testés sur le rat. Des défauts osseux sont créés au niveau du parodonte des individus à tester. Il est mis en place les matériaux dans ces défauts qui seront ensuite analysés au microscanner 4 semaines après implantation. Le pourcentage de volume osseux régénéré est significativement différent entre le groupe contrôle et le biomatériau seul. Néanmoins, quand on ajoute à l'hydrogel des cellules souches du ligament parodontal, le volume osseux régénéré est encore plus important (**Figure 38**).



**Figure 38 : Vue au microscanner du volume osseux régénéré en fonction de l'utilisation d'un hydrogel ou d'un hydrogel avec des cellules du ligament, Ma et al.(75)**

En conclusion, la combinaison de polymères d'origine naturelle et de polymères d'origine synthétique, semble donner des hydrogels plus flexibles en potentialisant les propriétés à la fois des hydrogels naturels et synthétiques. Ce sont pour le moment les seuls dont l'évaluation sur l'animal ont été effectués et avec succès. Cependant il est encore un peu tôt pour penser à une révolution. Beaucoup d'autres investigations doivent être effectuées sur des animaux plus gros afin de passer ensuite vers l'être humain.



# PARTIE III : MISE AU POINT D'UN NOUVEL HYDROGEL

## 1) Introduction :

### a. Contexte

Historiquement centré sur le développement de biomatériaux de substitution osseuse, le laboratoire RMeS développe aujourd'hui des thématiques orientées vers la médecine régénératrice et l'ingénierie tissulaire du squelette. Cette recherche fait appel à une expertise forte dans les domaines de la physiopathologie ostéoarticulaire et dentaire (ostéoporose, arthrose, dégénérescence discale, maladie parodontale), des biomatériaux (phosphate de calcium, hydrogel), des cellules souches, des processus de croissance et la différenciation des cellules squelettiques (chondrocytes, ostéoblastes, odontoblastes). Les travaux conduits dans cette unité se déroulent autour de 6 axes :

- Les matériaux d'intérêts biologiques
- Le relargage de principes actifs
- La physiopathologie des tissus squelettiques
- L'ingénierie tissulaire osseuse
- L'ingénierie tissulaire du cartilage
- Les micro ARN et l'épigénétique : mécanisme de vieillissement et réparation osseuse.

Au sein de cette unité nous avons cherché à mettre au point un nouvel hydrogel, pour des applications en régénération osseuse, dont les propriétés pourraient s'accorder avec l'utilisation en 3D-Bioprinting. Pour cela nous souhaitons obtenir un matériau qui répondrait aux critères mécaniques et viscoélastiques inhérents aux imprimantes 3D, tout en étant compatible avec les propriétés biologiques de l'os et respectant l'organisme hôte. Notre choix s'est donc porté sur deux polymères étudiés au laboratoire qui semblent répondre à ce cahier des charges : l'acide hyaluronique et le chitosan (dérivé de la chitine).

La chitine est un polysaccharide azoté composé d'unités de N-acétylglucosamines liées entre elles par des liaisons  $\beta$ 1-4(76,77). On trouve cette molécule essentiellement dans les coquilles de crustacées et des insectes. Son rôle et sa structure sont similaires à celle de la cellulose dans les plantes ou du collagène chez l'animal(76–78).

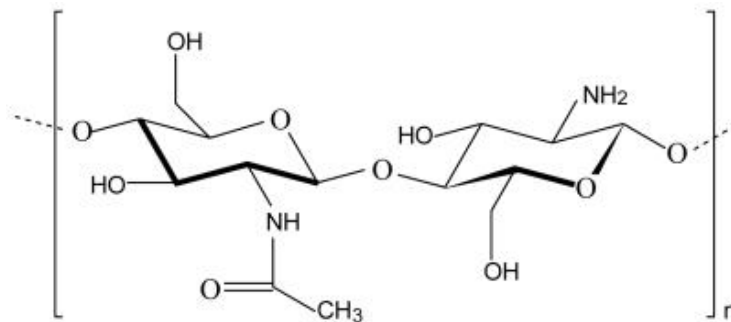
C'est une molécule insoluble dans l'eau ou dans les solvants organiques comme inorganiques, limitant ainsi son intérêt pour des applications biomédicales(77).

C'est pourquoi ces dernières années les recherches se sont surtout portées sur un de ses dérivés : le chitosan.

Le chitosan est un polysaccharide cationique, issu de la désacétylation en milieu alcalin ou en présence de chitine-désacétylase de la chitine(77) à plus de 50% de ses unités de N-acétylglucosamines. Il est donc constitué d'une distribution aléatoire d'unités N-acétylglucosamines et de D-glucosamines liées entre elles par des liaisons glycosidiques  $\beta$ 1-4 (**Figure 39**)(76).

Ce polymère a des propriétés chimiques variées : il est insoluble dans l'eau et les solvants organiques mais soluble en milieu acide de son fait du pKa de 6,3 ; ses groupes amines et hydroxyles sont très réactifs ce qui permet de le fonctionnaliser. De plus, le chitosan est un agent chélatant permettant de détoxifier les tissus en contact de celui-ci(77,78).

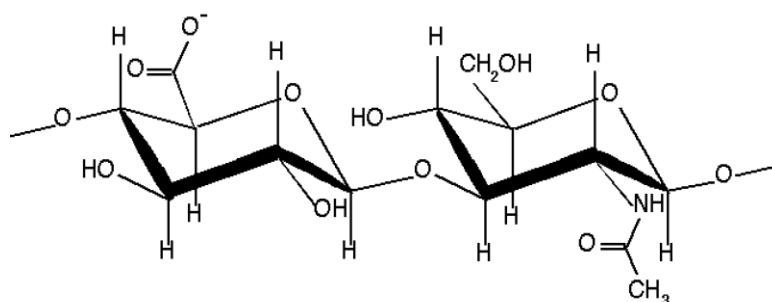
Au niveau des propriétés biologiques, le chitosan est biocompatible, il est biodégradable, cytocompatible, il accélère la formation des ostéoblastes, il est hémostatique, fongicide, spermicide, antitumoral et anti-cholestérolémiant(77–80).



**Figure 39 : Unité répétitive disaccharidique constitutive du chitosan**

L'acide hyaluronique (HA) est un polysaccharide anionique découvert par Meyer et Palmer en 1934(81). C'est un polymère linéaire composé d'une répétition d'un disaccharide de N-acétylglucosamine et d'acide glucuronique liés par une liaison glycosidique  $\beta$ 1-4 (**Figure 40**). L'HA est présent dans tout le règne animal en tant que composant essentiel de la matrice extra-cellulaire (MEC). Il est dégradé par les hyaluronidases(82,83). C'est la molécule polyanionique la plus hydratées. Son poids moléculaire varie de 100kDa à 8MDa(81,82,84).

A l'état naturel, l'acide hyaluronique possède de multiples propriétés structurales qui varient en fonction des tissus dont elle compose la matrice extra-cellulaire. Ces propriétés dépendent de la longueur et du poids moléculaires des chaînes de HA(84). Il est impliqué dans la croissance cellulaire, la viscoélasticité de la MEC, la réparation tissulaire et l'angiogenèse. Il est également impliqué dans la réponse immunitaire et inflammatoire, en se fixant sur les récepteurs CD44 et RHAMM des cellules immunitaires, entraînant des messages intracellulaires impliqués dans leurs migrations à travers les tissus(84).



**Figure 40 : Unité répétitive disaccharidique (Acide Glucuronique à gauche et N-acetylglucosamine à droite) constitutive de l'acide hyaluronique**

De par ses propriétés, l'acide hyaluronique présente donc un intérêt croissant pour la médecine régénératrice et l'ingénierie tissulaire. Sa grande polyvalence est aussi un argument en sa faveur pour son utilisation dans le domaine biomédicale(84).

## b. Objectif de la Recherche

Notre objectif est de mettre au point un hydrogel adapté à la régénération osseuse, biocompatible et dont les propriétés mécaniques et viscoélastiques permettraient son utilisation en 3D-bioprinting.

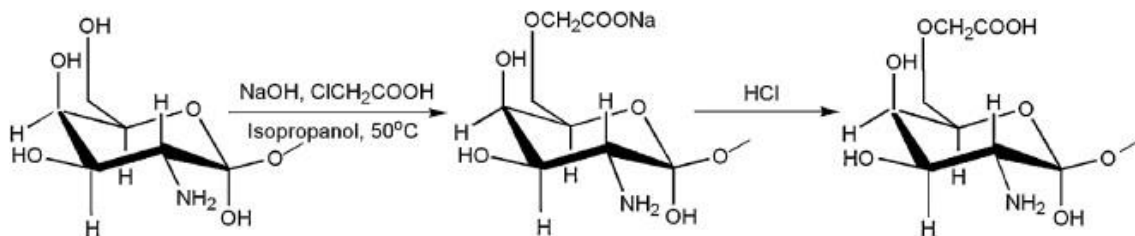
Dans ce contexte le chitosan comme l'acide hyaluronique sont des candidats évidents grâce à leurs propriétés variées, anti-inflammatoires et leur biocompatibilité naturelle. Leurs propriétés étant complémentaires notre objectif est donc d'obtenir un hydrogel composé d'un mélange de ces deux composés.

De par sa structure, l'acide hyaluronique possède plusieurs sites réactifs permettant le greffage de groupements ou la liaison à d'autres molécules.

De plus, la liaison à d'autres molécules augmente la stabilité du polymère de HA, modifie ses propriétés rhéologiques et potentialise ses caractéristiques biologiques et mécaniques. Notamment la liaison au chitosan, déjà documentée, qui modifie son module d'élasticité et augmente sa résistance à la dégradation face aux hyaluronidases(84).

Cette liaison pose 2 grandes problématiques pour obtenir un hydrogel avec les qualités voulues.

La première est le mélange direct des deux composés. En effet, le chitosan est soluble dans des solutions acides(77,78) et l'acide hyaluronique plutôt en milieu neutre ou basique(85). Cela pose des problèmes de dépendance au pH du mélange et d'étapes intermédiaires impliquant des molécules de liaisons pouvant interférer avec les propriétés des molécules d'intérêt ou relarguer des molécules parasites lors de la réaction de liaison. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur un dérivé du chitosan : le carboxyméthyl chitosan (CMC).



**Figure 41 : Synthèse du Carboxyméthyl Chitosan, Yu et al.(86)**

Ce dérivé est obtenu à partir du procédé décrit par Yu *et al.* qui consiste en la dissolution de poudre de chitosan dans de l'isopropanol chauffé à 50°C. Une fois la dissolution complète, il est ajouté progressivement une solution aqueuse de NaOH puis une solution d'acide

monochloroacétique. Un précipité de carboxyméthyl chitosan se forme dans la solution, qui est filtrée (**Figure 41**). Ce solide récupéré est ensuite rincé avec du méthanol avant d'être séché à 60°C(86).

Ce dérivé conserve toutes les propriétés du chitosan, comme ses capacités de biodégradabilité, de biocompatibilité, antibactériennes, antifongiques ainsi que sa capacité à stimuler l'ostéogenèse(87,88). En revanche, il présente l'avantage d'être soluble en milieu aqueux à pH neutre(88).

Des chercheurs ont travaillé sur la faisabilité d'un mélange d'HA et de CMC. Ce mélange présente les avantages d'être réalisé en milieu aqueux (en solution saline), une cytotoxicité vis-à-vis des cellules inexistante, un temps de gélification (point de gel) aux environs de 70 secondes ce qui permet une mise en place et une gélification sur site extrêmement rapide. Les études ont montré une biocompatibilité et une biodégradabilité intéressante puisque le matériau est dégradé en 14 jours *in vivo*, ainsi qu'une structure poreuse et interconnectée permettant la diffusion des nutriments et des facteurs de croissances(89,90).

La seconde problématique est la solidité des liaisons qui vont être en jeu dans cet hydrogel néoformé. L'acide hyaluronique étant une molécule poly-anionique et le carboxyméthyl chitosan étant un dérivé poly-cationique, nous allons obtenir une réaction de coacervation mettant en jeu des liaisons de type ioniques réversibles rendant le mélange pH dépendant(91).

Notre but est d'obtenir un matériau qui soit stable dans le temps, avec une réticulation qui soit irréversible par la mise en place de liaisons fortes.

Nous avons opté dans cette étude pour la fonctionnalisation à la fois du carboxyméthyl chitosan et de l'acide hyaluronique afin de permettre une liaison covalente des deux polymères qui vont venir s'ajouter aux liaisons physiques.

## **2) Matériels et Méthodes :**

### **a. Matériel**

L'acide hyaluronique de poids moléculaire 440kDa a été fourni par la société HTL (Fougères, France). Le carboxyméthyl chitosan désacétylé à environ 75% a été acquis auprès de la société HMC+ (Halle, Allemagne).

### **b. Fonctionnalisation des molécules**

Pour des raisons de publications de brevets pour la fonctionnalisation des deux molécules, il ne sera pas décrit la méthode choisie. Néanmoins, il est à noter que chacune des molécules a

reçu un traitement permettant de greffer sur l'un de leur site réactif, un radical permettant une liaison covalente.

### c. Le protocole de mélange

D'après des analyses précédentes sur des molécules de HA et de CMC natives, nous avons pu déterminer le  $C^*$  de l'acide hyaluronique de poids moléculaire de 440kDa et du carboxyméthyl chitosan. Le  $C^*$  est la concentration d'enchevêtrement et peut être défini comme la concentration à laquelle la solution est suffisamment concentrée en polymère pour que les polymères puissent créer des nœuds et donc gélifier. Pour les molécules natives il est de 2,65%, et de 2,85% pour l'acide hyaluronique et le carboxyméthyl chitosan respectivement. A partir de ces données nous cherchons à obtenir une solution de concentration minimum en polymère proche du  $C^*$  des molécules natives.

Pour cela nous mettons au point une solution de CMC fonctionnalisé et de HA fonctionnalisé en des proportions équivalentes dans deux dosages différents (notés A et B). Le mélange ainsi obtenu est dissout.

Afin d'obtenir un hydrogel à pH neutre et de démarrer le processus de gélification, la solution est tamponnée à l'aide d'un tampon à pH acide (2-3).

La solution de polymère et le tampon sont mélangés pour atteindre un pH de 7,4.

### d. Viscosité

Les mesures de rhéologie ont été effectuées avec un appareil HAAKE RS300 sur lequel sont montés des géométries cône-plans de diamètre 60mm à longue tige (C60 1° Ti L) dans des conditions de température de 23° en rotation continue. 1mL de solution CMC-fonctionnalisé/HA-fonctionnalisé a été déposé sur le plateau fixe du rhéomètre et la géométrie est mise en place. La viscosité est déterminée par des mesures d'écoulement en rampe de fréquence.

### f. Détermination du point de gel

Les points de gel ont été déterminés avec un appareil HAAKE MARS sur lequel sont montés des géométries cône-plans de diamètre 60mm à longue tige (C60 1° Ti L) dans des conditions de température de 23°. 1mL de solution HA-fonctionnalisé/CMC-fonctionnalisé a été préparé à l'aide de seringue avec une chambre de mélange. Ce mélange a ensuite été déposé sur le plateau fixe du rhéomètre et la géométrie a été descendue. Les mesures en rampe en fréquence à contrainte fixe (1Pa) sont réalisées. Le module de conservation ( $G'$ ) ainsi que le module de perte ( $G''$ ) ont pu être mesurés en fonction du temps. Ainsi nous avons pu définir le point de gel du mélange à l'instant où le module  $G'$  est devenu supérieur au module  $G''$ .

## h. Mesure du module de Young

Les mesures du module de Young (E) ont été effectuées à l'aide d'un appareil TAHD Plus Texture Analyser sur lequel est monté un capteur de 5Kg. Les échantillons sont préparés préalablement dans des moules cylindriques de diamètre de 2cm et de hauteur de 5mm. Ils sont laissés à gélifier pendant 5 jours avant d'effectuer les mesures.

Les disques de gels ainsi formés sont placés sous un poids qui va venir les compresser sur toute leur hauteur.

Le module de compression sera déterminé par le coefficient directeur de la tangente à la courbe dans sa partie initiale linéaire.

### 3) Résultats :

#### a. Viscosité

Le test de viscosité permet d'établir la fluidité du mélange de polymère, et d'objectiver son injectabilité. Cette injectabilité sera un paramètre important pour déterminer si l'hydrogel est compatible avec l'une ou l'autre des méthodes de bio-impression.

Pour déterminer cela, 5 échantillons du dosage A et du dosage B ont été testés.

A partir des mesures obtenues nous pouvons déterminer une viscosité de  $0,035 \pm 0,015$  Pa/s pour le dosage A, et de  $2,89 \pm 1,24$  Pa/s pour le dosage B (**Tableau9**).

	Viscosité Moyenne (Pa/s)	Ecart-type
Dosage A	0,0356	$\pm 0,015$
Dosage B	2,889	$\pm 1,24$

**Tableau 9 : Récapitulatif des moyennes et des écart-types des valeurs de viscosité**

Nous pouvons constater que la viscosité de ce mélange, peu importe son dosage, est faible. L'augmentation de la viscosité lors du changement de dosage n'est pas rédhibitoire en vue de l'injectabilité. En comparaison, il est admis qu'une viscosité de l'ordre de 40 à 60 Pa/s est le seuil maximal permettant une injectabilité par une main humaine à l'aide d'une seringue.

#### b. Point de gel

Le point de gel est défini comme le temps nécessaire aux polymères dans la solution pour amorcer leur réticulation et débiter la gélification. Cette propriété est essentielle, car d'elle dépend la capacité du matériau à gélifier rapidement une fois imprimé pour permettre le dépôt d'une nouvelle couche de matériau par-dessus.

Afin de mesurer ce paramètre, 5 échantillons du dosage A et du dosage B ont été investigués.

A partir des mesures effectuées, nous pouvons constater une moyenne du temps de gélification de l'ordre de 2140 secondes pour le dosage A et de 925,2 pour le dosage B. Le point de gel est donc de  $35,6 \pm 2,27$  minutes et de  $15,42 \pm 2,58$  minutes pour le dosage A et B respectivement (**Tableau 10**).

	Point de gel (min)	Ecart-type
Dosage A	35,6	$\pm 2,27$
Dosage B	15,42	$\pm 2,58$

**Tableau 10 : Récapitulatif des moyennes et de l'écart-type des points de gel**

### c. Module de Young

Le module de Young mesuré permet d'évaluer la rigidité du matériau et sa capacité à résister à une force en compression. Plus le module de compression (E) sera élevé plus le matériau sera rigide. Si l'on se réfère aux matériaux d'origine naturelle que nous avons pu étudier, le module de compression de ce type de matériau est souvent peu élevé, ces hydrogels possédant des propriétés mécaniques peu pertinentes.

Afin de mesurer ce module, 5 échantillons du dosage A et du dosage B ont été testés.

A partir des mesures effectuées, il est constaté que le module (E) augmente avec la concentration en polymère. En effet, le module du dosage A est  $E = 12,49 \pm 6,17$  kPa, alors que le dosage B présente un  $E = 82,52 \pm 44,65$  kPa (**Tableau 11**).

	E (kPa)	Ecart-type
Dosage A	12,49	$\pm 6,17$
Dosage B	82,52	$\pm 44,65$

**Tableau 11 : Récapitulatif des moyennes et écart-types des modules de compression**

#### **4) Discussion :**

Le tissu osseux est un tissu complexe essentiel de l'organisme jouant un rôle dans le maintien de la structure ainsi que dans l'équilibre ionique et moléculaire de l'organisme. Les multiples lésions pouvant affecter cette structure (traumatismes, malformations, cancer ...) entraînent des conséquences sur la qualité de vie des patients. Les différentes stratégies thérapeutiques conventionnelles présentent de bons résultats mais présentent des limites (comorbidités, quantités limitées). Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire, les chercheurs ont mis au point de nouveaux matériaux, tel que les hydrogels, pour le développement de la régénération osseuse. L'utilisation de ces hydrogels avec la technologie de 3D-bioprinting est une piste d'étude intéressante pour pouvoir individualiser et adapter au maximum les soins des patients. La recherche menée au laboratoire RMeS dans le but de mettre au point un nouveau matériau utilisable en 3D-bioprinting en vue de régénérer le tissu osseux s'inscrit parfaitement dans cette thématique. Dans cet objectif, nous nous intéressons à la mise au point d'un hydrogel à base d'acide hyaluronique et de chitosan.

Les résultats préliminaires ont montré que la viscosité des deux types de dosage est compatible avec une utilisation dans toutes les formes de 3D-bioprinting, permettant une grande latitude d'utilisation.

L'hydrogel à base de molécules de CMC-fonctionnalisé/Ha-fonctionnalisé présente des paramètres de compressions comparables aux autres hydrogels d'origine naturelle. Sa rigidité lui permet de conserver une bonne architecture une fois gélifié. En se référant aux études précitées, cette rigidité semble propice au développement cellulaire pour le dosage B(51,52). Le module E du dosage A semble quant à lui un peu faible. Cependant ces modules semblent adaptés pour guider la différenciation cellulaire vers des ostéoblastes.

Néanmoins, avec un point de gel de 35 minutes et de 15 minutes pour le dosage A et B respectivement, ces formulations sont difficilement applicables pour l'utilisation en bio-impression. En revanche, plusieurs stratégies sont envisagées afin d'augmenter la vitesse de réticulation (diminution du point de gel). L'une de ces stratégies est l'augmentation de la concentration qui devrait permettre d'obtenir une vitesse de gélification plus rapide afin de consolider rapidement la structure 3D une fois imprimée et d'ajouter des couches successives. La variation de la température (37°) devra aussi être étudiée afin de contrôler le point de gel.

De nombreux paramètres sont encore à adapter, afin d'optimiser les propriétés mécaniques de l'hydrogel. D'autres tests sont en cours afin de déterminer le temps de dégradation de l'hydrogel en condition physiologique ainsi que son taux de gonflement.

Une fois la formulation optimisée pour obtenir les bonnes propriétés mécaniques, nous caractériserons la cytocompatibilité afin de déterminer la survie cellulaire dans l'hydrogel de CMC-fonctionnalisé/Ha-fonctionnalisé. Mais compte tenu de l'utilisation de deux molécules naturelles et biocompatibles, il semble probable que nous obtenions un hydrogel lui aussi cytocompatible.



## **CONCLUSION**

La bio-impression est une discipline de l'ingénierie tissulaire récente et en pleine expansion. Ses indications sont multiples et ne font que se développer au cours du temps. Les implications cliniques de ces procédés ne sont à l'heure actuelle que théoriques mais ils pourraient révolutionner la médecine moderne en transformant une médecine à l'heure actuelle réparatrice en régénérative.

L'utilisation des hydrogels avec l'impression en trois dimensions a permis de constituer des environnements propices au développement des cellules tout en prenant en compte l'architecture et les contraintes imposées aux matériaux de reconstitutions osseuses.

La variété de ces matériaux permet d'adapter leurs compositions aux différentes indications pour lesquelles nous voulons les utiliser. Néanmoins, si on en croit la littérature, l'intérêt des chercheurs pour cette discipline est récent et il reste énormément de connaissances à acquérir sur leurs propriétés et leurs développements.

Malgré des résultats pour l'instant limités, beaucoup d'espoir sont fondés sur le développement de ce nouvel hydrogel à base d'acide hyaluronique et de carboxyméthyl chitosan. La cytocompatibilité devra bien entendu être investiguée avant toute implantation. Le choix du procédé de bio-impression le plus adéquat devra ensuite être très méticuleux afin de potentialiser la survie des cellules et profiter des propriétés mécaniques de ce matériau en développement.

Les recherches sur des nouvelles molécules permettant d'optimiser la structure du matériau à obtenir, le développement de l'interface matériau/cellule et le processus d'implantation sur des modèles animaux puis humain sont des enjeux majeurs pour l'expansion de l'ingénierie tissulaire, la médecine régénérative et l'accès à une médecine toujours plus personnalisée.

## **BIBLIOGRAPHIE**

1. Pradal G. Embryologie humaine élémentaire. L'individu de sa naissance à sa mise au monde. Ellipses. (Les cours du PCEM).
2. Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN, et al. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A (Suppl 2 Pt) 2:98-103.
3. Baldwin P, Li DJ, Auston DA, Mir HS, Yoon RS, Koval KJ. Autograft, allograft, and bone graft substitutes: clinical evidence and indications for use in the setting of orthopaedic trauma surgery. *J Orthop Trauma.* avr 2019;33(4):203-13.
4. Sohn H-S, Oh J-K. Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries. *Biomater Res* [Internet]. 14 mars 2019 [cité 9 avr 2019];23. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6417250/>
5. Buck BE, Malinin TI, Brown MD. Bone transplantation and human immunodeficiency virus. An estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clin Orthop.* mars 1989;(240):129-36.
6. Transmission of HIV through bone transplantation: case report and public health recommendations. *J Am Med Assoc.* nov 1988;260(17):2487-8.
7. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* mai 1993;260(5110):920-6.
8. Marx V. Organs from the lab. *Nature* juin 2015;522:373.
9. Daculsi G, Laboux O, Malard O, Weiss P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci Mater Med.* mars 2003;14(3):195-200.
10. Gauthier O, Bouler J-M. Noninvasive bone replacement with a new injectable calcium phosphate biomaterial. *J Biomed Mater Res.*
11. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials.* nov 2003;24(24):4337-51.
12. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact Mater.* déc 2017;2(4):224-47.
13. Flégeau K, Pace R, Gautier H, Rethore G, Guicheux J, Le Visage C, et al. Toward the development of biomimetic injectable and macroporous biohydrogels for regenerative medicine. *Adv Colloid Interface Sci.* sept 2017;247:589-609.
14. Mandrycky C, Wang Z, Kim K, Kim D-H. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnol Adv.* 2016;34(4):422-34.
15. Berchon M, Bertier L. L'impression 3D - 2e éd - Éditions Eyrolles, 2014.
16. Hull CW. Apparatus for production of three-dimensional objects by stereolithography. US4575330A, 1986.

17. Fabricated: the new world of 3D printing. Wiley.com.
18. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol.* août 2014;32(8):773-85.
19. Philippe P, Elodie P, Sébastien G, Benoît F. On site deployment of 3D printing for the building construction – The case of Yhnova™. *MATEC Web Conf.* 2018;10.
20. Irvine SA, Venkatraman SS. Bioprinting and Differentiation of Stem Cells. *Molecules.* sept 2016;21(9):1188.
21. Craniofacial Applications of 3D Printing. <https://clinicaltrials.gov/show/nct03292679>. 31 mai 2018.
22. Guillemot F, Mironov V, Nakamura M. Bioprinting is coming of age: report from the International Conference on Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux (3B\textquotesingle09). *Biofabrication* mars 2010;2(1):010201.
23. Wang X-F, Song Y, Liu Y-S, Sun Y, Wang Y, Wang Y, et al. Osteogenic differentiation of three-dimensional bioprinted constructs consisting of human adipose-derived stem cells in vitro and in vivo. *PLoS ONE.* juin 2016.
24. Keriquel V, Guillemot F, Arnault I, Guillotin B, Miraux S, Amédée J, et al. In vivobioprinting for computer- and robotic-assisted medical intervention: preliminary study in mice. *Biofabrication* mars 2010;2(1):014101.
25. Modern Meadow. *Our Technology.* 2016.
26. Schmidhuber J. Deep learning in neural networks: An overview. *Neural Netw.* janv 2015;61:85-117.
27. Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther.* 2003;5(1):32-45.
28. Singh M, Haverinen HM, Dhagat P, Jabbour GE. Inkjet Printing—Process and its applications. *Adv Mater.* févr 2010;22(6):673-85.
29. Cui X, Breitenkamp K, Finn MG, Lotz M, D’Lima DD. Direct human cartilage repair using three-dimensional bioprinting technology. *Tissue Eng Part A.* juin 2012;18(11-12):1304-12.
30. Xu T, Jin J, Gregory C, Hickman JJ, Boland T. Inkjet printing of viable mammalian cells. *Biomaterials* janv 2005;26(1):93-9.
31. Pepper ME, Seshadri V, Burg T, Booth BW, Burg KJL, Groff RE. Cell settling effects on a thermal inkjet bioprinter. In: 2011 Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. 2011: 3609-12.
32. Pepper ME, Seshadri V, Burg TC, Burg KJL, Groff RE. Characterizing the effects of cell settling on bioprinter output. *Biofabrication* janv 2012;4(1):011001.
33. Nair K, Gandhi M, Khalil S, Yan KC, Marcolongo M, Barbee K, et al. Characterization of cell viability during bioprinting processes. *Biotechnol J.* 2009;4(8):1168-77.

34. Bohandy J, Kim BF, Adrian FJ. Metal deposition from a supported metal film using an excimer laser. *J Appl Phys.* août 1986;60(4):1538-9.
35. Duocastella M, Colina M, Fernández-Pradas JM, Serra P, Morenza JL. Study of the laser-induced forward transfer of liquids for laser bioprinting. *Appl Surf Sci.* juill 2007;253(19):7855-9.
36. Guillotin B, Souquet A, Catros S, Duocastella M, Pippenger B, Bellance S, et al. Laser assisted bioprinting of engineered tissue with high cell density and microscale organization. *Biomaterials* oct 2010;31(28):7250-6.
37. Gauvin R, Chen Y-C, Lee JW, Soman P, Zorlutuna P, Nichol JW, et al. Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography. *Biomaterials* mai 2012;33(15):3824-34.
38. Gou M, Qu X, Zhu W, Xiang M, Yang J, Zhang K, et al. Bio-inspired detoxification using 3D-printed hydrogel nanocomposites. *Nat Commun.* mai 2014;5. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4024742/>
39. Wichterle O, Lím D. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* janv 1960;185(4706):117.
40. Sivashanmugam A, Arun Kumar R, Vishnu Priya M, Nair SV, Jayakumar R. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. *Eur Polym J.* nov 2015;72:543-65.
41. Hoffman AS. Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* déc 2012;64:18-23.
42. Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv Mater.* sept 2009;21(32-33):3307-29.
43. Tan H, Marra KG. Injectable, Biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Materials* mars 2010;3(3):1746-67.
44. Du C, Narayanan K, Leong MF, Wan ACA. Induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes and endothelial cells in multi-component hydrogel fibers for liver tissue engineering. *Biomaterials* juill 2014;35(23):6006-14.
45. Webber MJ, Appel EA, Meijer EW, Langer R. Supramolecular biomaterials. *Nat Mater.* janv 2016;15(1):13-26.
46. Hobkirk JA. Definitions in biomaterials: Williams DO editor 1987: *Progress in Biomedical Engineering 4*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 72pp. Dfl. 130.00. *Clin Mater.* janv 1988;3(3):261.
47. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials* juill 2008;29(20):2941-53.
48. ISO 10993-5:2009 - Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity [Internet]. Disponible sur: [http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=36406](http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=36406).
49. Bitar D, Parvizi J. Biological response to prosthetic debris. *World J Orthop.* mars 2015;6(2):172-89.
50. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* avr 2008;20(2):86-100.

51. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. août 2006;126(4):677-89.
52. Huebsch N, Arany PR, Mao AS, Shvartsman D, Ali OA, Bencherif SA, et al. Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate. *Nat Mater*. juin 2010;9(6):518-26.
53. Khetan S, Guvendiren M, Legant WR, Cohen DM, Chen CS, Burdick JA. Degradation-mediated cellular traction directs stem cell fate in covalently crosslinked three-dimensional hydrogels. *Nat Mater*. mai 2013;12(5):458-65.
54. Discher DE, Janmey P, Wang Y. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* nov 2005;310(5751):1139-43.
55. Campos DFD, Blaeser A, Buellesbach K, Sen KS, Xun W, Tillmann W, et al. Bioprinting organotypic hydrogels with improved mesenchymal stem cell remodeling and mineralization properties for bone tissue engineering. *Adv Healthc Mater*. 2016;5(11):1336-45.
56. Gasperini L, Mano JF, Reis RL. Natural polymers for the microencapsulation of cells. *J R Soc Interface*. nov 2014;11(100).
57. Schneider RK, Puellen A, Kramann R, Raupach K, Bornemann J, Knuechel R, et al. The osteogenic differentiation of adult bone marrow and perinatal umbilical mesenchymal stem cells and matrix remodelling in three-dimensional collagen scaffolds. *Biomaterials* janv 2010;31(3):467-80.
58. Kang Y, Kim S, Bishop J, Khademhosseini A, Yang Y. The osteogenic differentiation of human bone marrow MSCs on HUVEC-derived ECM and  $\beta$ -TCP scaffold. *Biomaterials* oct 2012;33(29):6998-7007.
59. Pawar SN, Edgar KJ. Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications. *Biomaterials* avr 2012;33(11):3279-305.
60. Augst AD, Kong HJ, Mooney DJ. Alginate hydrogels as biomaterials. *Macromol Biosci*. 2006;6(8):623-33.
61. Abouzeid RE, Khiari R, Beneventi D, Dufresne A. Biomimetic mineralization of three-dimensional printed alginate/TEMPO-oxidized cellulose nanofibril scaffolds for bone tissue engineering. *Biomacromolecules* nov 2018;19(11):4442-52.
62. Compaan AM, Christensen K, Huang Y. Inkjet bioprinting of 3D silk fibroin cellular constructs using sacrificial alginate. *ACS Biomater Sci Eng*. août 2017;3(8):1519-26.
63. Guillemot F, Souquet A, Catros S, Guillotin B, Lopez J, Faucon M, et al. High-throughput laser printing of cells and biomaterials for tissue engineering. *Acta Biomater*. juill 2010;6(7):2494-500.
64. Xu W, Wang X, Sandler N, Willför S, Xu C. Three-dimensional printing of wood-derived biopolymers: A review focused on biomedical applications. *ACS Sustain Chem Eng*. mai 2018;6(5):5663-80.
65. Poldervaart MT, Wang H, van der Stok J, Weinans H, Leeuwenburgh SCG, Öner FC, et al. Sustained release of BMP-2 in bioprinted alginate for osteogenicity in mice and rats. *PLoS ONE*. août 2013;8(8).

66. Zhang J, Allardyce BJ, Rajkhowa R, Zhao Y, Dilley RJ, Redmond SL, et al. 3D printing of silk particle-reinforced chitosan hydrogel structures and their properties. *ACS Biomater Sci Eng.* août 2018;4(8):3036-46.
67. Demirtaş TT, Irmak G, Gümüşderelioğlu M. A bioprintable form of chitosan hydrogel for bone tissue engineering. *Biofabrication* 2017;9(3):035003.
68. Harris JM, éditeur. *Poly(Ethylene Glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications.* Springer US; 1992. (Topics in Applied Chemistry). Disponible sur: <https://www.springer.com/us/book/9780306440786>
69. Gao G, Yonezawa T, Hubbell K, Dai G, Cui X. Inkjet-bioprinted acrylated peptides and PEG hydrogel with human mesenchymal stem cells promote robust bone and cartilage formation with minimal printhead clogging. *Biotechnol J.* 2015;10(10):1568-77.
70. Rashad A, Mohamed-Ahmed S, Ojansivu M, Berstad K, Yassin MA, Kivijärvi T, et al. Coating 3D printed polycaprolactone scaffolds with nanocellulose promotes growth and differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomacromolecules* nov 2018;19(11):4307-19.
71. Chen Y-W, Shen Y-F, Ho C-C, Yu J, Wu Y-HA, Wang K, et al. Osteogenic and angiogenic potentials of the cell-laden hydrogel/mussel-inspired calcium silicate complex hierarchical porous scaffold fabricated by 3D bioprinting. *Mater Sci Eng C.* oct 2018;91:679-87.
72. Irmak G, Demirtaş TT, Gümüşderelioğlu M. Highly methacrylated gelatin bioink for bone tissue engineering. *ACS Biomater Sci Eng.* déc 2018.
73. Daly AC, Pitacco P, Nulty J, Cunniffe GM, Kelly DJ. 3D printed microchannel networks to direct vascularisation during endochondral bone repair. *Biomaterials* avr 2018;162:34-46.
74. Byambaa B, Annabi N, Yue K, Trujillo-de Santiago G, Alvarez MM, Jia W, et al. Bioprinted osteogenic and vasculogenic patterns for engineering 3D bone tissue. *Adv Healthc Mater.* août 2017;6(16):1700015.
75. Ma Y, Ji Y, Zhong T, Wan W, Yang Q, Li A, et al. Bioprinting-based PDLSC-ECM screening for in vivo repair of alveolar bone defect using cell-laden, injectable and photocrosslinkable hydrogels. *ACS Biomater Sci Eng.* déc 2017;3(12):3534-45.
76. Roberts GAF. *Chitin Chemistry.* Macmillan. Macmillan; (Macmillan Publishers).
77. Zargar V, Asghari M, Dashti A. A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications. *ChemBioEng Rev.* 2015;2(3):204-26.
78. Dutta PK, Dutta J, Tripathi VS. *Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications.* 2004;63:12.
79. Sahariah P, Másson M. Antimicrobial chitosan and chitosan derivatives: A review of the structure–activity relationship. *Biomacromolecules* nov 2017;18(11):3846-68.
80. Hickman DA, Pawlowski CL, Sekhon UDS, Marks J, Gupta AS. Biomaterials and advanced technologies for hemostatic management of bleeding. *Adv Mater Deerfield Beach Fla.* janv 2018
81. Kakehi K, Kinoshita M, Yasueda S. Hyaluronic acid: separation and biological implications. *J Chromatogr B.* nov 2003;797(1):347-55.

82. Burdick JA, Prestwich GD. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Adv Mater.* 2011;23(12):H41-56.
83. Girish KS, Kemparaju K. The magic glue hyaluronan and its eraser hyaluronidase: a biological overview. *Life Sci.* mai 2007;80(21):1921-43.
84. Hemshekhar M, Thushara RM, Chandranayaka S, Sherman LS, Kemparaju K, Girish KS. Emerging roles of hyaluronic acid bioscaffolds in tissue engineering and regenerative medicine. *Int J Biol Macromol.* mai 2016;86:917-28.
85. Highley CB, Prestwich GD, Burdick JA. Recent advances in hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Curr Opin Biotechnol.* août 2016;40:35-40.
86. Yu S-H, Mi F-L, Pang J-C, Jiang S-C, Kuo T-H, Wu S-J, et al. Preparation and characterization of radical and pH-responsive chitosan-gallic acid conjugate drug carriers. *Carbohydr Polym.* mars 2011;84(2):794-802.
87. Inamdar N. Carboxymethyl chitosan and its applications. ResearchGate; Disponible sur: [https://www.researchgate.net/publication/260383551\\_Carboxymethyl\\_chitosan\\_and\\_its\\_applications](https://www.researchgate.net/publication/260383551_Carboxymethyl_chitosan_and_its_applications).
88. Upadhyaya L, Singh J, Agarwal V, Tewari RP. The implications of recent advances in carboxymethyl chitosan based targeted drug delivery and tissue engineering applications. *J Controlled Release* juill 2014;186:54-87.
89. Li L, Wang N, Jin X, Deng R, Nie S, Sun L, et al. Biodegradable and injectable in situ cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for postoperative adhesion prevention. *Biomaterials* avr 2014;35(12):3903-17.
90. Song L, Li L, He T, Wang N, Yang S, Yang X, et al. Peritoneal adhesion prevention with a biodegradable and injectable N,O-carboxymethyl chitosan-aldehyde hyaluronic acid hydrogel in a rat repeated-injury model. *Sci Rep.* nov 2016.
91. Karabiyik Acar O, Kayitmazer AB, Torun Kose G. Hyaluronic acid/chitosan cocervate-based scaffolds. *Biomacromolecules* avr 2018;19(4):1198-211.

**GLOMET (Jérémy).** – Les Hydrogels utilisés en 3D-Bioprinting en vue d’une régénération osseuse. – 41 f. ; ill. ; 11 tabl. ; 91 ref. ; 30cm (Thèse : Chir. Dent. ; Nantes ; 2019)

**RESUME :**

Les pertes de substances osseuses sont des complications fréquentes consécutives à de multiples pathologies ou traumatismes et pouvant entraîner de graves conséquences sur la vie des patients. Les thérapeutiques actuelles (autogreffes, allogreffes, xenogreffes) ont montré une bonne efficacité mais présentent de nombreux inconvénients (douleurs, suites post-opératoires, morbidité,). Les équipes de recherche se sont donc focalisé sur la mise au point de nouvelles thérapeutiques. Le développement de l’ingénierie tissulaire et de la médecine individualisée a permis l’émergence de la bio-impression. Ce procédé issu de la technologie 3D permet d’adapter la thérapeutique à chaque patient que cela soit dans la forme que dans la composition du matériau de remplacement du défaut osseux.

Les hydrogels, grâce à leurs propriétés mécaniques, de dégradation et de biocompatibilité, semblent être les matériaux d’intérêt pour l’utilisation de la bio-impression 3D en régénération osseuse. Malgré la variété des hydrogels existants pour l’utilisation en bio-impression, de nouvelles recherches voient le jour pour optimiser leurs utilisations avec pour objectif l’application dans les prochaines années sur l’homme en pratique quotidienne.

**RUBRIQUE DE CLASSEMENT :** Biomatériaux

**MOTS CLES MESH**

Matériaux Biocompatibles – Biocompatible Materials  
Bio-Impression – Bioprinting  
Ingénierie Tissulaire – Tissue Engineering  
Hydrogels – Hydrogels

**JURY**

Président : Professeur Weiss P.  
Assesseur : Professeur Badran Z.  
Directeur : Docteur Réthoré G.  
Co-Directeur : Docteur Struillou X.  
Assesseur : Docteur Kimakhe S.

**ADRESSE DE L’AUTEUR**

18 rue Gabriel Goudy – 44200 Nantes  
[jglomet@gmail.com](mailto:jglomet@gmail.com)