



HAL
open science

Hydrogels multifonctionnels en stéréolithographie pour la reconstruction tissulaire

Thomas Brossier

► **To cite this version:**

Thomas Brossier. Hydrogels multifonctionnels en stéréolithographie pour la reconstruction tissulaire. Autre. Université Montpellier, 2021. Français. NNT : 2021MONT076 . tel-03629215

HAL Id: tel-03629215

<https://theses.hal.science/tel-03629215v1>

Submitted on 4 Apr 2022

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Chimie et Physico-chimie des Matériaux

École doctorale Sciences Chimiques Balard

Unité de recherche de l'Institut Charles Gerhardt de Montpellier, UMR 5253

Hydrogels multifonctionnels en stéréolithographie pour la reconstruction tissulaire

Présentée par Thomas BROSSIER

Le 13 décembre 2021

Sous la direction de Vincent LAPINTE et Sébastien BLANQUER

Devant le jury composé de

Valérie LANGLOIS, PU, Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est (ICMPE)

Catherine LEVISAGE, DR, Regenerative Medicine and Skeleton (RMES)

Joulia LARIONOVA, PU, Institut Charles Gerhardt Montpellier (ICGM)

Arnaud SPANGENBERG, CR, Institut de Sciences des Matériaux de Mulhouse (IS2M)

Gaël VOLPI, CEO, 3DMEDLAB

Vincent LAPINTE, MCU, Institut Charles Gerhardt Montpellier (ICGM)

Sébastien BLANQUER, CR, Institut Charles Gerhardt Montpellier (ICGM)

Rapporteure

Rapporteure

Présidente du jury

Examineur

Invité

Directeur

Co-encadrant



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

REMERCIEMENTS

Une page se tourne pour en écrire une nouvelle. Bien que cette histoire ait connu des nombreuses intrigues, péripéties et rebondissements, la fin reste excellente. Ces trois années de recherches m'ont permis d'aboutir sur l'obtention de mon doctorat. Le chemin fut long et laborieux mais la réussite n'en est que plus agréable et belle. Cependant, cela n'aurait pas été possible sans le soutien de l'ensemble des personnes de mon entourage.

Pour ceci, je tiens à remercier mes directeurs de thèse qui ont cru en moi, m'ont soutenu et poussé vers le haut jusqu'au bout. À Vincent Lapinte qui ne m'a jamais laissé tomber même après avoir perdu une première thèse ensemble, avec qui « c'est bien, mais... », sans oublier les « POxs' à faire » issu certainement d'un reste de patois de l'Anjou (traduction possible par « pas que cela à faire » ou alors « j'ai des synthèses de POx à faire » au choix). À Sébastien Blanquer qui n'a pas hésité une seule seconde pour me prendre en thèse, qui a toujours su mettre le positif en avant et avec qui l'impossible a été rendu possible (toujours au détriment de mon sommeil). Notre trinôme a été une excellente expérience et réussite. J'en suis encore plus ravi puisque que celui-ci n'est pas dissolu avec la fin de cette thèse mais plutôt renforcer avec l'ensemble des projets montés car nous continuerons de travailler ensemble à venir.

Mes remerciements s'en vont par la suite à l'ensemble des membres de l'équipe. À Tarek, à Nina, à Tobias, à Laurianne, à Benoit, à Lucas, à Xavier, à Hamza, à Benjamin avec qui j'ai commencé puis Nikola, Loona, Paul, Laura, Lucie, Agnès et Sakthivel avec qui j'ai terminé pour ne citer qu'une partie des étudiants. Nous en avons passé de sacrés moments, inoubliables pour certains ! Vous avez rythmé ma vie au laboratoire et l'avez rendu extraordinaire à l'extérieur. Nous avons connu les intempéries climatiques, les fuites de phosphines, la Covid, la rédaction du manuscrit et nous sommes restés solidaires et présents les uns les autres aussi bien pour les moments de convivialité que pour les plus difficiles. J'ai passé d'excellents moments à vos côtés et j'ai bien l'impression que ce n'était qu'un début. Ce fut un plaisir de partager ces trois années avec vous aussi bien le labo que le bureau ou les pauses repas le tout dans une ambiance de grand n'importe quoi professionnelle. Ces bons moments ont aussi été rendus possibles grâce à la bonne humeur des permanents tout particulièrement avec Sylvain Catrouillet, Julien Pinaud, Olivia Giani, Jean Jacques Robin et bien d'autres.

Également, je souhaite remercier Gaël Volpi de m'avoir fait confiance, de m'avoir laissé de la liberté dans la science et surtout de m'avoir permis de réaliser cette thèse dans un environnement industriel qui a apporté un cadre complet à ces travaux de recherches ainsi qu'à l'ensemble des personnes de l'entreprise 3DMEDLAB qui m'ont accueilli chaleureusement. Je donne un remerciement tout particulier à Donatien Campion qui m'aura sauvé de nombreuses fois par son aide, son savoir-faire et son humanité. Pour cela, j'utilise ces propres mots qu'il m'a imposé dans mes remerciements : « Je remercie également Donatien Campion, qui malgré ses capacités limitées et son absence de doctorat m'a permis d'économiser de nombreuses minutes en réparant des fichiers .stl pendant que de mon côté je pouvais me consacrer à mon vrai travail, la science. » Bien que n'étant pas d'accord avec ces propos je les mets car je te dois bien au moins cela !

Mes remerciements vont aussi à ma famille qui m'aura soutenu durant toutes ses années et qui continuera à la faire. Tout d'abord, je remercie mes parents et mon frère pour n'avoir jamais douté de mes capacités et pour m'avoir fourni l'énergie nécessaire lors de toutes ces étapes. Également, je remercie tous mes oncles, tantes, cousin(e)s qui aiment tant me taquiner tout en assurant que tout se déroule pour le mieux. L'ensemble de ces soutiens furent essentiels. Je tiens aussi à remercier mes amis qui sont pour moi comme la famille. Que ce soit ceux du 49 avec Alban, Jean-Christophe, Florentin, Valentin, etc, ceux de Montpellier avec Pierre-Alexis, Juliette, Lisa, Marion, Thomas, etc ou d'ailleurs Brendan, Camille, Quentin, Luc, Cédric, François, etc tous m'ont permis de me dépasser, parfois de me relever et surtout d'avancer.

Je terminerai mes remerciements par tous ceux que je n'ai pas cités mais qui ont été importants dans mes travaux de recherches tels que le personnel des plateformes analytiques, toutes les personnes qui m'ont apporté de l'aide ou des réponses à mes questions scientifiques ou non et l'ensemble des personnes des collaborations.

Sommaire

Abréviations	15
Introduction générale	19
Chapitre I. Contexte et état de l'art	25
1 La fabrication additive d'hier à aujourd'hui	26
1.1 Les généralités sur la fabrication additive	26
1.2 Les différents procédés de fabrication additive	29
1.3 La fabrication additive en santé	33
1.3.1 Les dispositifs médicaux implantables passifs	34
1.3.2 Les dispositifs médicaux implantables actifs et l'ingénierie tissulaire.....	36
1.3.3 Le rôle du <i>scaffold</i> dans l'ingénierie tissulaire	37
1.3.4 Fabrication de <i>scaffold</i> : le potentiel de la stéréolithographie en ingénierie tissulaire	38
2 La stéréolithographie : une technique polyvalente de photopolymérisation	39
2.1 Le principe de la stéréolithographie.....	39
2.2 La mise au point en stéréolithographie.....	43
2.3 Les méthodes chimiques de réticulation.....	45
3 L'émergence de nouveaux matériaux pour la stéréolithographie dans le domaine de la santé	49
3.1 Les matériaux polymères non-hydrogels en stéréolithographie pour la santé	49
3.2 Les matériaux hydrogels en stéréolithographie pour la santé.....	53
3.2.1 Les hydrogels d'origine naturelle utilisés en stéréolithographie pour la santé. 56	
3.2.1.1 Les polysaccharides	56
3.2.1.2 Les protéines et polypeptides	58
3.2.2 Les hydrogels de synthèse utilisés en stéréolithographie pour la santé	59
3.2.2.1 L'homopolymère PEG	59

3.2.2.2	Les copolymères de PEG	61
3.2.2.3	Le PEG et les biopolymères	62
3.2.2.4	Autres polymères synthétiques hydrophiles.....	62
4	Evolution de la fabrication 3D vers de l'impression 4D	63
4.1	Définition de la fabrication additive 4D.....	63
4.2	Les stimulations externes envisageables en fabrication additive 4D.....	65
4.2.1	La température.....	65
4.2.2	La solvatation	66
4.2.3	Le pH.....	67
4.2.4	Les rayonnements	67
4.2.5	L'électricité	67
4.2.6	Un champ magnétique	68
4.3	L'ensemble des applications de la fabrication additive 4D	68
5	Conclusion	70
6	Références.....	71

Chapitre II. Copolymères hybrides en stéréolithographie pour l'ingénierie tissulaire

1.	Les modifications chimiques de polymères par greffage de macromolécules.....	84
1.1.	Greffage d'une macromolécule naturelle sur le PTMC.....	84
1.2.	Greffage d'un polymère de synthèse sur la gélatine	86
2.	La fabrication de <i>scaffolds</i> par stéréolithographie à base de PTMC ou de gélatine	89
3.	Conclusion	90
4.	Article - Photoprintable Gelatin- <i>graft</i> -Poly(trimethylene carbonate) by Stereolithography for Tissue Engineering Applications	91
4.1.	Introduction	92

4.2. Experimental Section.....	94
4.2.1. Materials.....	94
4.2.2. Synthesis and Formulation.....	95
4.2.2.1. Synthesis of Gelatin Methacrylate (Gel-MA).....	95
4.2.2.2. Synthesis of PTMC by Ring Opening Polymerization.....	95
4.2.2.3. Synthesis of Grafted PTMC from the Gelatin (Gel-g-PTMC _n).....	95
4.2.2.4. Synthesis of PTMC and Methacrylated Gel-g-PTMC _n (Gel-g-PTMC _n -MA).....	96
4.2.3. Characterization and Measurements.....	96
4.2.3.1. Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry.....	96
4.2.3.2. Complex Viscosity.....	97
4.2.3.3. Crosslinker Chamber and Building.....	97
4.2.3.4. Degree of Swelling.....	97
4.2.3.5. Contact Angle.....	98
4.2.3.6. Scanning Electronic Microscope and Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy.....	98
4.2.3.7. Mechanical Measurements.....	98
4.2.3.8. Evaluation of Cytotoxicity of the Crosslinked Polymers.....	98
4.2.3.9. Degradation Study.....	100
4.2.3.10. 3D Structures with Stereolithography Apparatus.....	100
4.3. Results and Discussion.....	100
4.3.1. Grafting-from Strategy.....	100
4.3.1.1. Validation of ROP Initiation from Gelatin Using ¹ H NMR in D ₂ O.....	104
4.3.1.2. Quantification of Grafted PTMC by Quantitative ¹³ C NMR Spectroscopy in CDCl ₃	105
4.3.2. Physical Properties of Photocrosslinked Hybrid Copolymers Gel-g-PTMC _n	107
4.3.3. Mechanical Properties of the Hybrid Materials Gel-g-PTMC _n Network.....	110
4.3.4. Cytocompatibility of the Hybrid Polymer Network Gel-g-PTMC _n	112

4.3.5.	Degradation Study of the Hybrid Polymer Network Gel-g-PTMC _n	114
4.3.6.	Design and Scaffold Fabrication by Stereolithography	115
4.4.	Conclusion	116
5.	Supporting informations	117
6.	Etude des <i>scaffolds</i> conçus par stéréolithographie	118
6.1.	Fabrication des <i>scaffolds</i> par stéréolithographie	118
6.2.	Propriétés mécaniques des <i>scaffolds</i>	122
6.2.1.	Etude théorique de la morphologie des TPMS	122
6.2.1.1.	Mise en évidence de l'anisotropie.....	122
6.2.1.2.	Comparaison des modules des TPMS.....	123
6.2.2.	Influence de la fraction volumique sur une gyroïde	123
6.2.3.	Etude de cas d'une structure type gyroïde	124
6.3.	Adhésion et prolifération cellulaire au sein des <i>scaffolds</i>	125
7.	Conclusion du chapitre.....	127
8.	Références.....	128
 Chapitre III. Les hydrogels à base de polyoxazoline en stéréolithographie		135
1.	Quelques généralités sur les polyoxazolines	136
1.1.	La chimie des polyoxazolines.....	136
1.2.	Les propriétés biologiques des POx.....	138
2.	Les propriétés des hydrogels à base de polyoxazoline	140
2.1.	Les différentes stratégies de synthèse des d'hydrogels à base de POx	140
2.2.	Les applications biologiques des hydrogels à base de POx.....	142
2.3.	Les propriétés physiques des hydrogels à base de POx	143
3.	L'émergence des polyoxazolines en fabrication additive	144
4.	Conclusion	147

5. Article - Polyoxazoline Hydrogels in Stereolithography.....	148
5.1. Introduction.....	149
5.2. Material and methods.....	151
5.2.1. Material.....	151
5.2.2. Synthesis.....	151
5.2.3. 3D printing resin.....	154
5.2.4. Characterization.....	155
5.3. Results and discussion.....	157
5.3.1. Synthesis of hydrogel precursors.....	157
5.3.2. Additive manufacturing.....	159
5.4. Conclusion.....	164
6. Supplementary Informations.....	165
7. Etude de la synthèse et de la formulation pour la stéréolithographie.....	169
7.1. Synthèse de la PMOx à partir de différents amorceurs.....	169
7.2. Ajustement des paramètres de formulation.....	170
7.3. Ajustement des paramètres machine.....	171
8. Conclusion du chapitre.....	172
9. Références.....	173
Chapitre IV. Hydrogels polymères thermosensibles en fabrication 4D.....	179
1. Etat de l'art des polymères thermosensibles et leur utilisation en 4D.....	180
1.1. La thermosensibilité des polymères.....	180
1.1.1. Généralités sur les phénomènes LCST et UCST.....	180
1.1.2. Les hydrogels thermosensibles à LCST.....	181
1.2. La stéréolithographie 4D d'hydrogels chimiques thermosensibles.....	184
1.2.1. Principe de transformation sous stimulation.....	184

1.2.1.1.	Le changement de morphologie par solvatation	184
1.2.1.2.	L'action de la température sur l'hydrogel	185
1.2.2.	Exemples d'applications d'hydrogel 4D de PNIPAM.....	186
1.2.3.	Les autres polymères	187
2.	Résultats – Hydrogels polymères thermosensibles en fabrication 4D	188
2.1.	Caractérisation des précurseurs d'hydrogels	189
2.2.	Formulation des résines thermosensibles.....	190
2.3.	Thermosensibilité des polymères à LCST et des hydrogels.....	192
2.4.	Gonflement des hydrogels en fonction de la température.....	194
2.5.	Comportement mécanique en compression des hydrogels	196
2.6.	Stéréolithographie des résines thermosensibles	197
3.	Informations complémentaires.....	199
3.1.	Matériaux.....	199
3.2.	Synthèse.....	200
3.3.	Caractérisation.....	201
4.	Conclusion du chapitre.....	206
5.	Références.....	207
	Conclusion générale et perspectives	211
	Techniques et méthodes expérimentales	217
	Annexes	219

Abréviations

Abréviations

Vocabulaire fabrication additive

CAO :	Conception assistée par ordinateur
CLIP :	<i>Continuous liquid interface production</i>
DIW :	<i>Direct ink writing</i>
DLP :	<i>Digital light processing</i>
FDM :	<i>Fused deposition modelling</i>
SLA :	<i>Stereolithography</i>
SLS/M :	<i>Selective laser sintering/melting</i>
STL :	<i>Standard triangle language</i>
TPP :	<i>2-photon polymerization</i>

Vocabulaire technique

(C)ROP :	<i>(Cationic) Ring-opening polymerization</i>
CT-scan :	<i>Computed tomography scanner</i>
DM :	Dispositifs médicaux
DSC :	Calorimètre à balayage (<i>Differential Scanning Calorimetry</i>)
EDX :	<i>Energy-dispersive X-ray spectroscopy</i>
ESD :	<i>Equilibrium swelling degree</i>
EWS :	<i>Equilibrium water content</i>
GPC/SEC :	Chromatographie phase gaz/ <i>Size exclusion chromatography</i>
LCST :	<i>Lower critical solution temperature</i>
Mg/Mi/Ms :	Masse gonflée/initiale/sèche
RMN/NMR :	Résonance magnétique nucléaire/ <i>Nuclear magnetic resonance</i>
SD :	<i>Swelling degree</i>
SEM :	<i>Scanning Electronic microscopy</i>
TE :	<i>Tissue engineering</i>
TPMS :	<i>Triply periodic minimal surface</i>
UCST :	<i>Upper critical solution temperature</i>

Vocabulaire chimique

Acry :	Acrylamide
DBU :	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène
DMAc :	<i>N,N</i> -diméthylacétamide
DMSO :	Diméthylsulfoxyde
HDOTs :	1,6-Hexaneditosylate
iPrOx :	2-Isopropyl-2-oxazoline
LA :	Lactide
MA :	Acide méthacrylique
MeOTs :	Méthyl <i>p</i> -toluène sulfonate
MOx :	2-Méthyl-2-oxazoline
NIPAM :	<i>N</i> -isopropylacrylamide
PAM :	Polyacrylamide
PAO :	Poly(<i>N</i> -acyléthylèneimine)
PCL :	Polycaprolactone
PEG/PEO :	Poly(éthylène glycol)/Poly(<i>ethylene oxide</i>)
PEI :	Polyéthylèneimine
PEtOx :	Poly(2-éthyl-2-oxazoline)
PiPrOx :	Poly(2-isopropyl-2-oxazoline)
PLA :	Acide polylactide
PMMA :	Poly(méthylméthacrylate)
PMOx :	Poly(2-méthyl-2-oxazoline)
PNIPAM :	Poly(<i>N</i> -isopropylacrylamide)
POx :	Poly(2-R-2-oxazolines)s
PPF :	Poly(propylène fumarate)
PTMC :	Poly(triméthylène carbonate)
PVA :	Alcool polyvinylique
TBD :	1,5,7-Triazabicyclo[4.4.0]déc-5-ène
TMC :	Triméthylène carbonate
TsCl :	Chlorure de 4-toluènesulfonyle

Introduction générale

Introduction générale

Actuellement, la demande en dispositifs médicaux répondant aux exigences mécaniques et biologiques du corps humain est en pleine expansion. La fabrication additive, dont fait partie la stéréolithographie, est une technologie qui permet de répondre à cette demande. Elle permet de concevoir avec une grande résolution des structures permettant d'imiter au plus près les tissus et ceci de façon patient dépendante. Malheureusement, la disponibilité des matériaux biofonctionnels pour la stéréolithographie est très limitée. Cette thèse a pour objectif de proposer de nouveaux matériaux polymères utilisables en stéréolithographie pour la régénération tissulaire. Le projet est une collaboration, dans le cadre d'un financement CIFRE, entre trois instituts de recherche et une entreprise spécialisée dans les dispositifs médicaux (**3DMEDLAB**). L'Institut Charles Gerhart de Montpellier (**ICGM**) dans lequel s'est déroulée cette thèse a permis le développement des polymères ainsi que leur mise en œuvre par stéréolithographie. L'étude biologique des matériaux à partir de cellules souches humaines a été menée à l'Institute for Regenerative Medicine & Biotherapy (IRMB), situé au CHU-Hôpital Saint Eloi de Montpellier alors que l'étude biomécanique a été réalisée au Laboratoire de Mécanique et Génie Civil (LMGC) de l'Université de Montpellier.

L'entreprise **3D MEDLAB** est experte en fabrication additive dans le secteur médical, principalement dans les domaines de l'orthopédie et du cardiovasculaire. Elle réalise des prestations de conception et production de dispositifs médicaux et souhaite développer des nouveaux biomatériaux pour les procédés de fabrication additive. C'est dans ce contexte que cette thèse a été initiée, avec comme **objectif le développement d'hydrogels multifonctionnels utilisables en stéréolithographie pour la reconstruction tissulaire**. En effet, les hydrogels sont les matériaux les plus pertinents en ingénierie tissulaire du fait de leur ressemblance avec les tissus biologiques, qui peuvent être obtenus à partir de nombreuses résines photosensibles par photoréticulation en stéréolithographie.

Les chapitres de cette thèse peuvent être étudiés indépendamment les uns des autres, impliquant des polymères naturel (gélatine) et de synthèse (poly(triméthylène carbonate) (PTMC) et polyoxazoline (POx)).

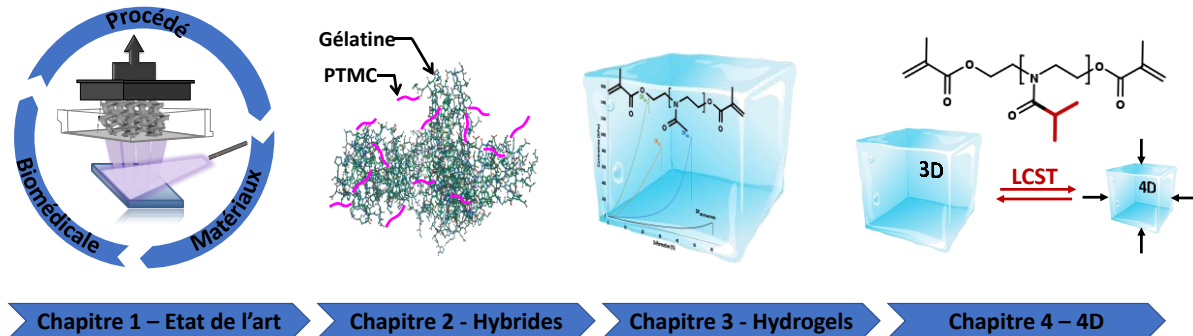
Le **chapitre 1** de ce manuscrit est une **étude bibliographique** de la fabrication additive appliquée au domaine de la santé et plus précisément à la médecine régénérative. Les différents procédés de fabrication additive y sont décrits avec une attention particulière apportée à la stéréolithographie. Les matériaux hydrogels à base de polymères synthétiques et/ou naturels, utilisés en stéréolithographie dans le domaine de la santé sont également discutés.

Le **chapitre 2** est consacré à l'étude de **polymères hybrides** à base de **gélatine**, pour ses propriétés biologiques, et de poly(triméthylène carbonate) **PTMC** pour ses propriétés mécaniques. Une importante étude a porté sur la validation du greffage de type « *from* » de PTMC sur la gélatine, Gélatine-*g*-PTMC. La preuve du greffage de chaînes polymères sur un polymère multifonctionnel de forte masse molaire est toujours compliquée à apporter, même si le sujet a déjà été très étudié. Plusieurs taux de greffage de PTMC ont été considérés afin de moduler les propriétés de la gélatine modifiée en allant de l'hydrogel à un comportement type élastomère en fonction du taux de PTMC greffé. Les propriétés mécaniques, biologiques et de dégradation des polymères greffés Gélatine-*g*-PTMC mais aussi leur utilisation, après méthacrylation, en photopolymérisation ont été évaluées. Pour finir, des *scaffolds* ont été fabriqués par stéréolithographie en portant attention à la porosité, l'adhésion et la prolifération cellulaire sur les *scaffolds*.

Le **chapitre 3** porte sur un autre type d'**hydrogels, synthétiques à base de polyoxazoline (POx) biocompatible**. L'ambition est ici de montrer l'intérêt de cette famille de polymères par la versatilité de sa chimie pour la construction 3D d'objets par stéréolithographie. Pour cela, des poly(2-méthyl-2-oxazoline)s de différentes masses molaires ont été synthétisées et rendues photosensibles par méthacrylation. Les hydrogels fabriqués à partir de ces PMOx par stéréolithographie ont ensuite été caractérisés mécaniquement et par des mesures de gonflement. Pour finir, la validation du potentiel de la PMOx en stéréolithographie a été validée par la conception d'objets sophistiqués ainsi que des *scaffolds* à porosité complexe.

Le **chapitre 4** prolonge l'étude des hydrogels synthétiques en fabrication 3D avec des **hydrogels thermosensibles** pour l'**impression 4D**. Les deux types hydrogels thermosensibles étudiés utilisent des polymères de LCST voisines, PNIPAM et poly(2-isopropyl-2-oxazoline) (PiPrOx). Un objectif est de mettre en évidence la différence de comportement d'hydrogels de LCST voisines au départ. Les hydrogels sont tous basés sur un monomère acrylamide

photosensible (NIPAM) ou non (acrylamide) et un agent réticulant photosensible (PiPrOx) ou non (PMOx). Les effets de gonflement, les propriétés mécaniques et la thermosensibilité des hydrogels ont été analysés sur des objets fabriqués par stéréolithographie.



Ces travaux ont donné lieu à différentes productions scientifiques :

Congrès :

Nationaux

- * T. Brossier, G. Volpi, V. Lapinte and S. Blanquer, Synthèse de polymères hybrides pour l'élaboration de *scaffolds* en ingénierie tissulaire par stéréolithographie, Journées d'Etude des Polymères, 29 Septembre 2019, Bordeaux, France
- * T. Brossier, G. Volpi, V. Lapinte and S. Blanquer, Hybrid polymer biomaterial for tissue engineering *scaffold* using stereolithography, Balard Chemistry Conferences, June 15. 2021, Montpellier, France

Internationaux

- * T. Brossier, G. Volpi, V. Lapinte and S. Blanquer, Elaboration of polymer materials for tissue engineering using stereolithography, September 12. 2019, Additive Manufacturing Meets Medicine, Lubeck, Allemagne
- * T. Brossier, G. Volpi, V. Lapinte and S. Blanquer, Hybrid polymer biomaterial for tissue engineering *scaffold* using stereolithography, World Biomaterials Congress, December 11. 2020, Online

Publications :

Dans le cadre de la thèse

- * Thomas Brossier, Gael Volpi, Vincent Lapinte and Sebastien Blanquer, Synthesis of Poly(trimethylene Carbonate) from Amine Group Initiation: Role of Urethane Bonds in the Crystallinity, *Polymers*, **13**, 280 (2021)
- * Thomas Brossier, Gael Volpi, Jonaz Vasquez-Villegas, Noémie Petitjean, Olivier Guillaume, Vincent Lapinte, and Sébastien Blanquer, Photoprintable Gelatin-graft-Poly(trimethylene carbonate) by Stereolithography for Tissue Engineering Applications, *Biomacromolecules*, **9**, 3873–3883 (2021)
- * Thomas Brossier, Tarek Benkhaled, Maxime Colpaert, Gael Volpi, Sébastien Blanquer, Vincent Lapinte, Polyoxazoline Hydrogels in Stereolithography (prêt à la soumission)

- * Thomas Brossier, Tarek Benkhaled, Gael Volpi, Sébastien Blanquer, Vincent Lapinte, Hydrogels polymères thermosensibles en fabrication 4D (prêt à la soumission)
- * Thomas Brossier, Marie-Noelle Labour, Vincent Lapinte, Emmanuel Belamie, Sébastien Blanquer, Review: Grafted biomaterials hybrid for biomedical applications (en cours de rédaction)
- * Thomas Brossier, Baptiste Quienne, Gael Volpi, Julien Pinaud, Sylvain Caillol, Vincent Lapinte and Sebastien Blanquer, Elastomeric polymers for stereolithography with biobased PU and NIPU stereolithography (en cours de rédaction)

Dans le cadre de collaboration

- * Benoit Delage, Benoit Briou, Thomas Brossier, Sylvain Catrouillet, Jean-Jacques Robin and Vincent Lapinte, Polyoxazoline associated with cardanol for bio-based linear alkyl benzene surfactants, *Polym Int*, **68**, 755–763 (2019)
- * Agnès Harlay, Thomas Brossier, Nicolas Morand, Marcos Batistella, Arnaud Regazzi, Sébastien Blanquer, José Lopez-Cuesta, Jean-Jacques Robin, Modification of poly(styrene ethylene butylene styrene) via free radical grafting and its photo-crosslinking, *Polym Eng Sci*. 1–12 (2021)
- * Nicolas Zivic, Thomas Brossier, Floriane Crestey, Sylvain Catrouillet, Abraham Chemtob, Valérie Héroguez, Patrick Lacroix-Desmazes, Christine Joly-Duhamel, Sébastien Blanquer, Julien Pinaud, Photo-induced Ring-Opening Polymerization of Trimethylene Carbonate-based liquid resins: towards biodegradable thermosets using stereolithography, *Macromolecules* (soumis)
- * Amorçage de collaboration sur des hydrogels stimulables par des nanoparticules photoactives type bleu de Prusse pour de la fabrication 4D par stéréolithographie (en cours de rédaction)
- * Amorçage de collaboration sur des polymères à mémoire de formes par des nanoparticules magnétiques d'oxyde de fer pour de la fabrication 4D par stéréolithographie (en cours de rédaction)
- * Amorçage de collaboration sur des polymères élastomères par stéréolithographie pour treillis abdominaux (en cours de rédaction)

Interview :

- * Matériaux multifonctionnels pour la chirurgie réparatrice par l'Institut Carnot Chimie Balard Cirimat, <https://www.youtube.com/watch?v=z8TzhJVphzo&t=50s>
- * Elaboration de polymères hybrides pour la conception de dispositifs médicaux par fabrication additive lors de Finale Régionale "Ma thèse en 180 secondes" - Occitanie-Méditerranée 2021, <https://www.youtube.com/watch?v=mkbtwBtKJ4I>

Encadrement :

- * 2018-2019 : Desmurs Natan, Biomedical Hydrogels produced by Stereolithography, stage
- * 2019-2020 : Hugo Signorino Gelo, Hydrogels biomédicaux par stéréolithographie, stage
- * 2020-2021 : Cansu Akkaya, Elastomères de polyuréthanes biosourcés par stéréolithographie, stage

Association :

Organisation du congrès international : 9^{èmes} Journées Méditerranéennes des Jeunes Chercheur(e)s, 28-29 Octobre 2021, Montpellier, France

Chapitre I.

Contexte et état de l'art

Chapitre I. Contexte et état de l'art

Introduction

L'objectif de ce chapitre est de présenter la **fabrication additive** et ses différentes technologies afin de comprendre l'engouement actuel pour celle-ci en particulier dans le domaine du **médical**. La **stéréolithographie** offre de nombreux avantages par rapport aux autres technologies de fabrication additive ce qui explique le focus fait sur ses **avantages** et ses limitations. La littérature décrit de nombreux **polymères**, qui sont regardés en détail ici, utilisés en stéréolithographie dans le domaine de la santé allant des polymères **naturels** aux polymères **synthétiques**. Un état de l'art sera également réalisé sur les **hydrogels** et leurs applications en SLA ainsi que sur **l'impression 4D** avec l'utilisation de polymères stimulables.

1 La fabrication additive d'hier à aujourd'hui

1.1 Les généralités sur la fabrication additive

En l'espace de quelques années, la fabrication additive s'est développée de manière exponentielle. Ce procédé de fabrication est basé sur des technologies innovantes qui bouleversent la relation entre le fabricant et le consommateur en réduisant certains délais de fabrication ou encore en assurant une conception optimisée (personnalisée). Ce nouveau mode de fabrication a atteint non seulement un stade de maturité permettant des productions en petites, moyennes et grandes séries par prototypage rapide, mais a également permis le développement d'objets 3D innovants et extrêmement sophistiqués. La fabrication additive est une méthode versatile permettant la production de pièces personnalisées à partir de métaux, céramiques ou encore polymères sans utilisation de moule ou de machinerie spécifique. Cette technologie est dite additive (ascendante) car elle ajoute de la matière couche après couche en opposition à la technologie soustractive (descendante) qui retire de la matière¹. Cette technologie remet en cause les **méthodes de fabrication traditionnelles**. En effet, comme présenté en Figure I-1, ces technologies s'affranchissent des limites des techniques soustractives, limitent la perte de matière ou encore diminuent le nombre d'étapes longues inhérentes à l'usinage ou au moulage. De plus, la fabrication additive est en constante évolution entraînant des diminutions des coûts de fabrication et une amélioration notable de la résolution de fabrication. La fabrication additive permet un gain de temps dans le développement de produits, une liberté de conception et de fabrication qui sont essentiels dans une chaîne de production². De même que si le coût de la matière première peut parfois être plus important, ses avantages peuvent l'emporter sur l'augmentation des coûts de fabrication par pièce. Il est à noter qu'en comparaison aux méthodes soustractives ou de moulage, la fabrication additive permet en plus d'utiliser des systèmes biologiques. Lors de la fabrication d'objets, des cellules peuvent être ajoutées à la matière première suivant la technique de fabrication. Ce mode de conception est connu sous le terme de bio-impression¹.

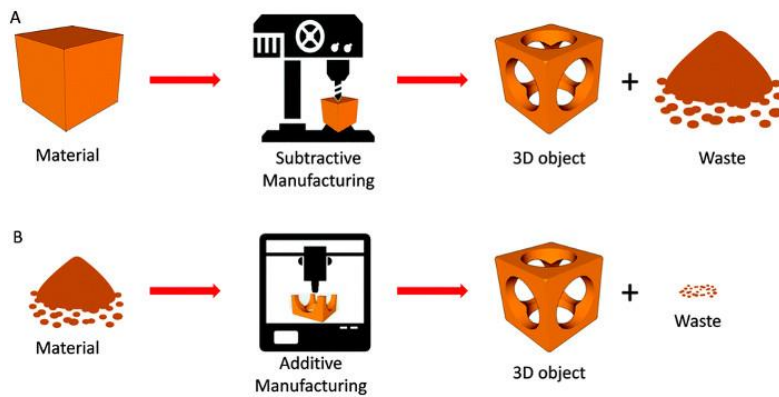


Figure I-1 - Différences entre la fabrication soustractive (A) et la fabrication additive (B)

La fabrication additive est apparue en 1984 simultanément par Jean-Claude André du côté français et Charles Hull du côté américain³⁻⁶. Cette capacité remarquable de fabrication tridimensionnelle s'explique par la **fabrication couche par couche** à très haute résolution.

Le principe de la fabrication additive est simple et repose sur peu d'étapes. La Figure I-2 résume les différentes étapes nécessaires à la fabrication. Dans un premier temps, avec la conception assistée par ordinateur (CAO), un important travail de modélisation doit être réalisé pour créer virtuellement la pièce. Le fichier est ensuite converti au format STL, de l'anglais « Standard Triangle Language »⁷ pour être utilisé sur l'ensemble des machines de fabrication additive. Le fichier informatique généré est divisé sous forme de lamelles correspondant aux couches de la construction dans le plan vertical z. Le fichier de construction est ensuite envoyé à la machine pour que la structure soit fabriquée. Une fois la pièce conçue, celle-ci est nettoyée avant de subir une étape éventuelle de post-traitement comme le retrait des supports, un traitement thermique ou la stérilisation pour être utilisable¹.

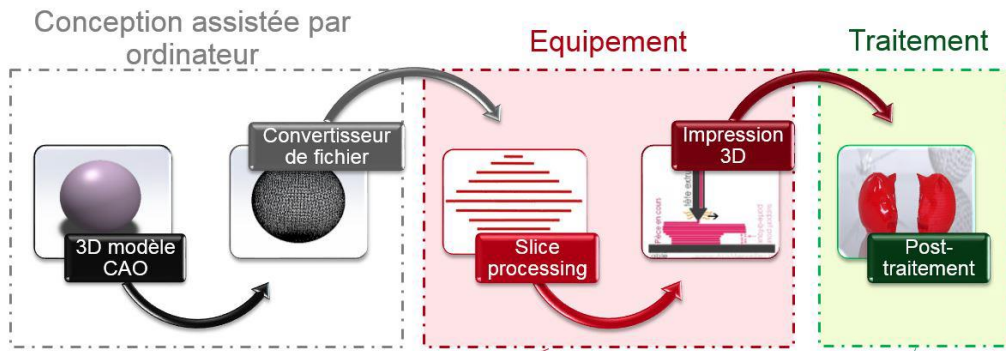


Figure I-2 - Créer un objet (matériau) en trois dimensions (3D) à partir d'une conception assistée par ordinateur (CAO) (immatériel) via un processus couche par couche

La fabrication additive est facilement adaptable ce qui accélère le traitement de la conception et de la fabrication d'objets personnalisés, conçus pour répondre aux exigences des utilisateurs et à des applications spécifiques¹. Elle permet également de proposer **de nouveaux produits** avec un allègement de structure, la création d'une porosité, la conception de structures macroscopiques et microscopiques hautement complexes ou même des produits ne pouvant être conçus par les technologies classiques comme présenté en Figure I-3. La suite de ce travail repose uniquement sur l'étude des polymères pour la fabrication additive.



Figure I-3 - Différentes structures 3D poreuses réalisables uniquement en fabrication additive

1.2 Les différents procédés de fabrication additive

L'essor de la fabrication additive a mené au développement de différentes technologies de mise en forme. La différence provient de l'état de la matière utilisée qui va de la résine liquide à la poudre en passant par le fil, en fonction de la source d'apport d'énergie qui va du laser à l'élément chauffant. Le principe reste le même. À savoir que l'objet est construit sur un plateau dans un plan x/y et une hauteur z est incrémenté tout au long de l'impression. Ces techniques peuvent être regroupées en 4 catégories en fonction de l'état de la matière de départ avec la matière extrudée, la matière projetée, la matière fusionnée et la matière photopolymérisée. L'ensemble de ces différentes technologies sont présentées dans la Figure I-4 et résumées brièvement par la suite.

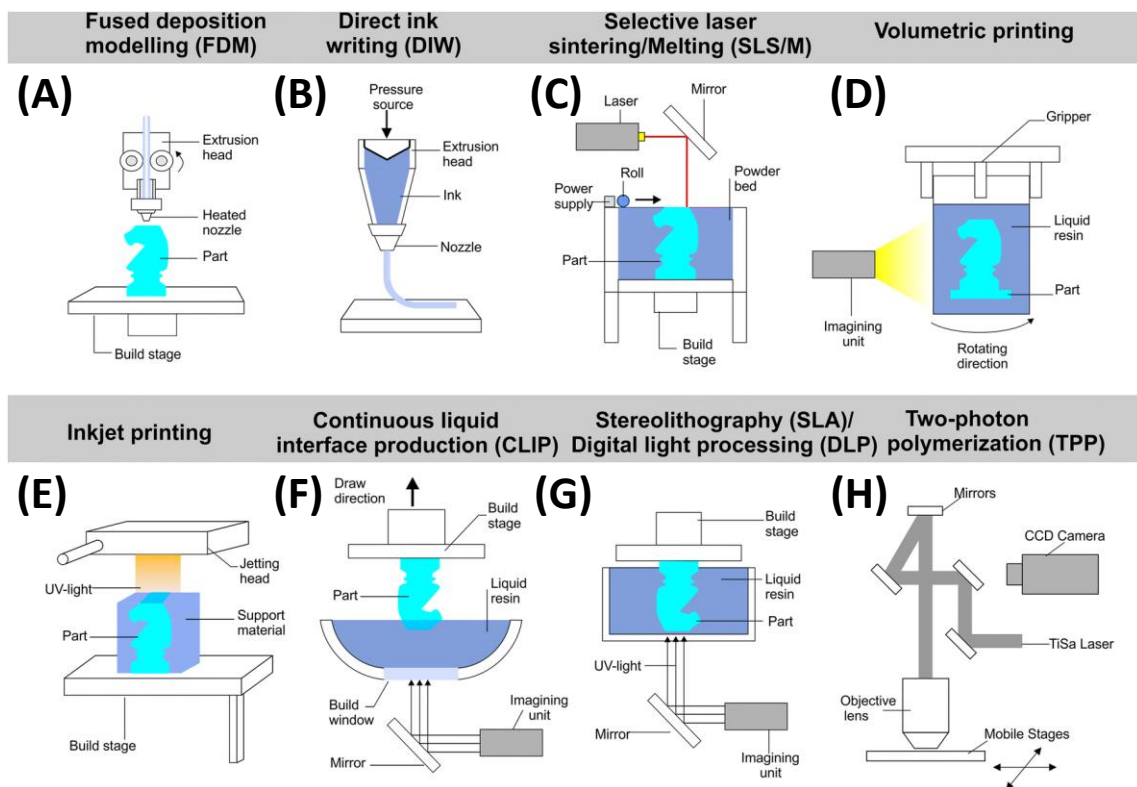


Figure I-4 - Schéma des différentes technologies de fabrication additive⁸

- **La matière extrudée**

Cette technologie repose sur le principe d'extrusion d'un filament de polymère thermoplastique. Ce dernier est chauffé dans sa zone d'écoulement, au-dessus de sa température de transition vitreuse (T_g) pour les amorphes et de la température de fusion (T_f) pour les semi-cristallins, puis est déposé au travers d'une buse sur un plateau. La matière, en refroidissant, se fige en se solidifiant au contact de la couche précédente. Cette technique est décrite comme le dépôt de fil fondu (« **Fused Deposition Modelling** » (**FDM**)) (Figure I-4 A). Ce mode d'impression est de loin le plus populaire car son principe simple et la technique peu onéreuse⁹⁻¹¹.

Une variante est appelée « **Direct Ink Writing** » (**DIW**) où une solution très visqueuse est utilisée (Figure I-4 B). En résumé, une encre visqueuse est déposée à travers une buse sous l'effet d'une pression. Lors du dépôt, l'encre se solidifie par évaporation de solvant et est renforcée par traitement thermique ou sous irradiations UV^{10,11}.

- **La matière projetée**

Cette technique qui est décrite dans la littérature sous le nom de **jet d'encre** (« **Inkjet** »), utilise des matériaux polymères sous forme de solution (Figure I-4 E). Des gouttelettes d'encre liquide sont simultanément éjectées des têtes d'impression. Ces gouttelettes viennent interagir avec les voisines et se solidifient ensuite à la surface, souvent en réponse à une photopolymérisation. Le jet et la solidification sont répétés de manière itérative jusqu'à ce que l'objet entier soit construit^{10,11}.

- **La matière fusionnée**

La technologie de **frittage sélectif par laser** (« **Selective Laser Sintering** » (**SLS**))^{10,11} consiste à fusionner ou coalescer des particules nano ou micrométriques ($< 60 \mu\text{m}$) de métal, céramique ou polymère. Le bain de poudre composé de ces types de matériaux est chauffé au voisinage de sa T_g ou T_f puis un laser vient sélectivement apporter l'énergie nécessaire pour coalescer les particules entre elles. Cette irradiation provoque une fusion localisée du matériau qui va venir adhérer à la couche précédente et former la structure en refroidissant. Enfin une nouvelle couche de poudre est apportée à l'aide d'un racleur puis est insolée de nouveau pour générer le processus couche par couche (Figure I-4 C).

- **La matière photopolymérisée**

Le terme **stéréolithographie (SLA)** est couramment utilisé pour parler de l'ensemble des techniques de photopolymérisation (« **vat photopolymérisation** »). Cette technique repose sur le principe d'irradiation d'une source lumineuse qui agit sur des fonctions photoréactives pour construire de manière sélective un objet solide à partir d'un matériau photosensible liquide (Figure I-4 D, F, G, H). Ce matériau est déposé dans une cuve qui est sélectivement exposée à la lumière avec une longueur d'onde spécifique (visible ou UV). La résine liquide réticule en une couche solide en réponse à la photoirradiation. Une nouvelle couche liquide recouvre la partie solide précédemment formée avant d'être exposée de la même manière^{10,11}. Cette technologie est l'axe principal de ce manuscrit et sera discutée en détails en partie 2.1. (Le principe de la stéréolithographie).

L'ensemble des technologies présentées sont regroupées dans le Tableau I-1 avec leurs avantages (prix de revient, résolution...) et leurs inconvénients (vitesse de construction, matériaux disponibles...). Le choix de la technologie de fabrication est donc primordial et dépend du matériau utilisé, du cahier des charges lié à l'application visée ou encore de la résolution de fabrication attendue.

La fabrication additive a rapidement attiré les médias et a capté l'imaginaire du public ainsi que des chercheurs et s'est popularisée dans de nombreux domaines (Figure I-5). Les plus marquants sont l'aérospatial (ex : buse de carburant, gicleur, ailette de stator de moteur)²⁰⁻²⁵ ; la dentisterie (couronnes, appareils dentaires ou guides de chirurgie)²⁶⁻³⁰ ou encore l'électronique et le domaine militaire. Enfin, le domaine biomédical dans la fabrication additive est certainement un des secteurs les plus prometteurs.

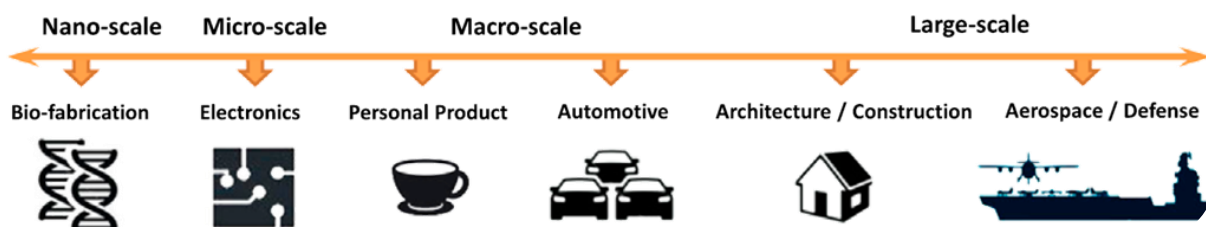


Figure I-5 - Applications où la 3D est présente²

Tableau I-1 - Résumé des techniques d'impression ainsi que leurs avantages et inconvénients

Procédé	Résolution (µm)	Avantages	Inconvénients	Matériaux
Matériaux extrudés ^{1,12-17}				
	50-200	<ul style="list-style-type: none"> - Bas prix - Rapide - Simple - Gradient de matériau polymères - Sans solvant organique - Conditions douces permettant l'impression de cellules / molécules bioactives 	<ul style="list-style-type: none"> - Surfaces rugueuses (malgré les pré-traitements) - Haute température - Faibles résistances mécaniques - Matériaux limités (uniquement polymères thermoplastiques) - Colmatage de la buse - Résolution limitée - Temps de construction long - Impossible de créer des angles 	Filaments de polymères thermoplastiques tels que PC, ABS, PLA, PA, PCL
Matière fusionnée ^{1,12-18}				
	50-100	<ul style="list-style-type: none"> - Haute résolution - Poudre sert de support - Pièces complexes - Large gamme de matériaux - Poudre recyclable - Sans solvant - Multi-matériaux 	<ul style="list-style-type: none"> - Porosité élevée - Coût élevé - Nécessite l'utilisation de poudres avec des distributions de particules étroites (<60 µm) - Impossible d'obtenir des gradients de composition 	Poudres fines de polymères thermoplastiques tels que PCL, PA, PEEK
Matériaux projetés ^{1,12,13,17-19}				
	0,025-200	<ul style="list-style-type: none"> - Rapide - Plusieurs têtes impression - Haute résolution - Basse température - Gradient de composition 	<ul style="list-style-type: none"> - Faible viscosité requise - Manque d'adhérence entre les couches - Le post-traitement peut endommager les éléments fins et petits - Matière de support non recyclable 	Solution de polymères à faible viscosité ou dispersion concentrée de particules dans un liquide
Matière photopolymérisée ^{1,12-18}				
	0,02-100	<ul style="list-style-type: none"> - Qualité de surface - Haute résolution - Faible volume de matière - Structures très complexes - Résine recyclable 	<ul style="list-style-type: none"> - Faibles viscosités requises - Possible utilisation de solvant - Limitée au polymère photosensible - Impression lente - Support nécessaire - Gradients de matière difficile - Problème de pénétration UV 	Résine photosensible de type acrylate, époxyde avec une faible viscosité

1.3 La fabrication additive en santé

Depuis quelques années, les technologies de fabrication additive ont bouleversé le domaine médical et notamment celui de la conception de dispositifs médicaux (DM). En effet, la haute résolution a permis de développer des DM de plus en plus sophistiqués jusqu'à même proposer de développer des DM personnalisés (ou patient-spécifiques). Cette évolution a été fortement impulsée par la capacité à générer des objets tridimensionnels en fabrication additive à partir de l'imagerie médicale. Ainsi, les images obtenues à partir de techniques comme les CT-scan (CT : « computed tomography ») ou l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) de patients peuvent être utilisées afin de concevoir des DM spécifiques³¹. Cette opportunité de fabrication a été utilisée aussi bien pour fabriquer des modèles d'organes synthétiques que pour développer des dispositifs médicaux implantables.

- Modèles d'organes synthétiques

L'étude du corps humain et l'utilisation de cadavres ont, de tout temps, été un débat éthique de controverse^{32,33}. C'est dans ce contexte que la fabrication additive s'est révélée être une alternative de choix pour **l'enseignement médical** afin de remplacer les organes cadavériques utilisés lors des travaux pratiques des médecins en formation^{32,33}. Il est ainsi possible d'étudier des pathologies complexes de patients grâce à l'utilisation **de l'imagerie** médicale et fabriquer des organes artificiels à façon^{31,33,34}. Ces modèles ont l'avantage de faciliter grandement **le diagnostic** et de développer l'entraînement préopératoire. En effet, les images bidimensionnelles obtenues nécessitent une grande capacité de représentation spatiale de la part du chirurgien, et cette capacité de fabrication de modèles anatomiques permet de rendre envisageable la répétition, la simulation de l'opération et la prédiction de complications éventuelles. Par conséquent, les risques, la durée de l'opération et les coûts de l'opération ont été fortement diminués^{31,33,34}. La Figure I-6 résume l'ensemble du processus de fabrication d'organes artificiels. L'entreprise française Biomodex est leader dans le domaine en proposant des modèles d'organes artificiels hautement complexes.

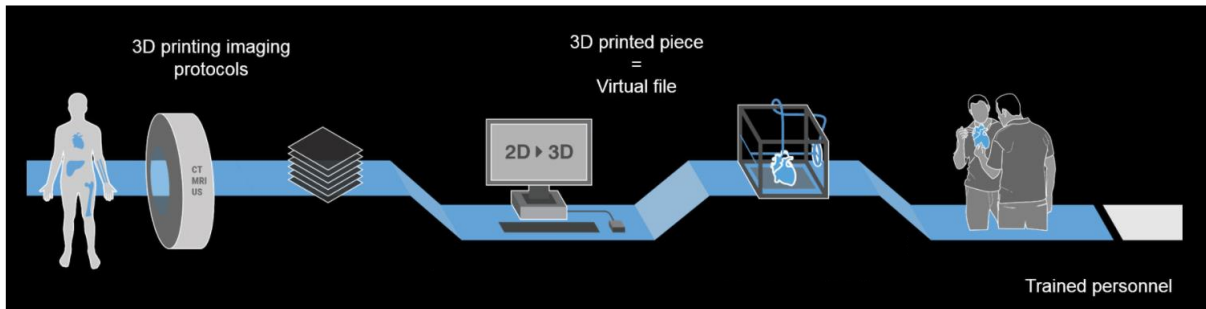


Figure I-6 - Suite d'opérations médicales où l'impression 3D est présente

- Dispositifs médicaux implantables

Les DM sont classiquement définis selon leur classe (de 1 à 4), leur temps d'utilisation (court, moyen, long terme) et leur utilisation (DM actifs, DM passifs, DM diagnostic et/ou équipement). Dans ce contexte, des DM implantables passifs sont conçus pour une utilisation à long terme qui englobe les prothèses dans un objectif de réparation, de comblement ou de soutien tissulaire (matériaux biostables), ou encore les DM actifs capables de régénérer les tissus tout en s'éliminant progressivement (matériaux biodégradables)^{35,36}.

1.3.1 Les dispositifs médicaux implantables passifs

Ces types **d'implants passifs** sont principalement présents dans des zones fortement sollicitées comme les articulations^{37,38}, la hanche^{37,38}, ou des zones rigides avec la mâchoire³⁹, le tibia, etc. Pour cela, les **métaux** (ex : titane, chrome-cobalt) sont principalement utilisés du fait de leur résistance élevée à la charge, leur faible déformation, leur biocompatibilité et leur stabilité à long terme^{36,38}. La Figure I-7 présente des dispositifs implantables passifs métalliques réalisés par la société 3D MEDLAB en fabrication additive. Cependant, leur coût de fabrication reste onéreux et leur présence à long terme peut engendrer des complications³⁹⁻⁴¹.

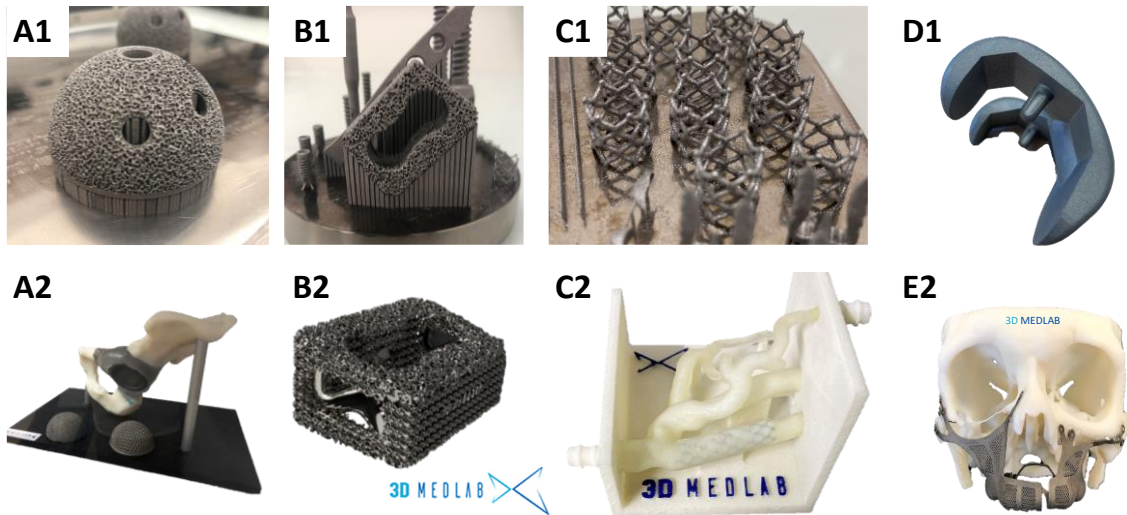


Figure I-7 - Dispositifs médicaux métalliques conçus en 3D par la société 3D MEDLAB (A1 à D1) après fabrication et (A2 à E2) sur modèle avec A) hanche B) disque intervertébral C) stent D) genou et E) maxillo-faciale

C'est pourquoi, les **polymères** sont également largement utilisés pour réaliser des prothèses biostables du fait de leur mise en forme facile et peu chère, leur biocompatibilité et leurs propriétés mécaniques ajustables³⁶. Dans cet objectif, le PEEK a très largement été utilisé en fabrication additive pour remplacer le titane⁴². Le PEEK possède les avantages des polymères (léger, flexible, forte résistance, ...) comme ceux du titane⁴³. Il a été utilisé dans des applications telles que les implants orthopédiques, les implants rachidiens, les implants maxillo-faciaux⁴⁴. Différents implants de PEEK 3D sont présentés en Figure I-8.



Figure I-8 - Différents implants réalisés en fabrication additive à base de PEEK pour le maxillo-facial, l'orthopédie et la colonne vertébrale

1.3.2 Les dispositifs médicaux implantables actifs et l'ingénierie tissulaire

Chaque année, des millions de patients font appel à la **médecine réparatrice** de tissus ou d'organes à la suite d'un trauma généré par une maladie, une dégénérescence, un dysfonctionnement physiologique ou un accident⁴⁵. Les **techniques chirurgicales conventionnelles** consistent à pratiquer une autogreffe ou une allogreffe⁴. L'**autogreffe** est la technique chirurgicale la plus employée actuellement. Cependant, elle se heurte à de sérieux obstacles tels que l'augmentation de la durée opératoire, une disponibilité limitée, une morbidité importante, un risque élevé de complications chirurgicales et des douleurs chroniques. La deuxième approche consiste en une greffe allogénique, qui correspond à une greffe d'un donneur génétiquement non identique. Cependant, l'utilisation d'**allogreffes** reste problématique en raison du risque de transmission de maladies infectieuses, la disponibilité limitée des tissus et le coût élevé⁵.

En raison de ces inconvénients, une demande croissante d'alternatives à l'autogreffe et l'allogreffe est apparue permettant de répondre à l'ensemble des contraintes, essentiellement sur la rapidité opératoire, l'efficacité de la réparation et le tout patient spécifique⁴⁶. C'est donc dans ce contexte que **l'ingénierie tissulaire** est née avec comme but principal de développer des dispositifs pouvant restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions des tissus^{6,47}. Du fait de la complexité des tissus humains, les dispositifs conçus doivent impérativement apporter les propriétés biologiques, mécaniques et structurelles adéquates et efficaces pour permettre une reconstruction tissulaire optimale^{6,47}. La mise au point d'un **support cellulaire**, communément appelé **scaffold** est un des paramètres fondamentaux en ingénierie tissulaire. La Figure I-9 résume brièvement le parcours de l'ingénierie tissulaire en utilisant un *scaffold*. Des cellules sont prélevées directement depuis le patient puisensemencées dans le *scaffold* pour y adhérer et proliférer. Pour finir, le *scaffold* est implanté dans la zone à soigner du patient.

L'ingénierie tissulaire est donc un domaine pluridisciplinaire englobant la chimie, la biologie et l'ingénierie^{1,9,10}. Ce travail a porté sur la conception de *scaffolds* en stéréolithographie pour l'ingénierie tissulaire à travers le développement de différents polymères.

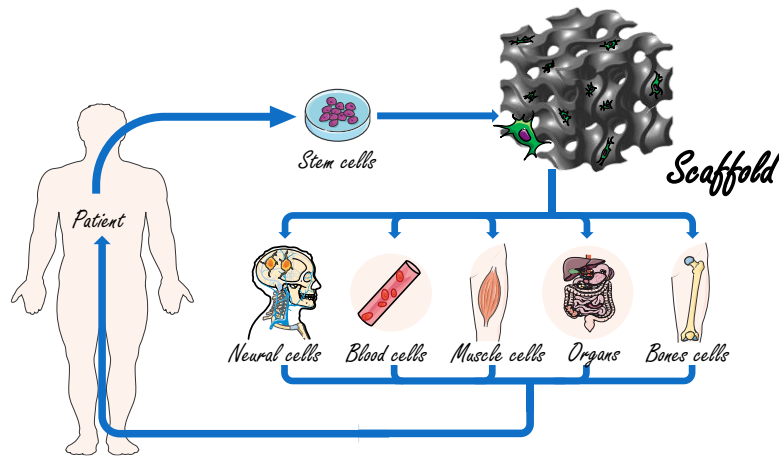


Figure I-9 - Principe de l'ingénierie tissulaire

1.3.3 Le rôle du *scaffold* dans l'ingénierie tissulaire

Un *scaffold* a pour rôle premier de guider, soutenir, garantir la vie et la croissance cellulaire ainsi que d'assurer la diffusion des nutriments et l'intégrité mécanique de la partie remplacée⁴⁷. Idéalement, un *scaffold* doit reproduire le plus possible les différentes propriétés du tissu endommagé et ainsi guider le bon devenir de la régénération avec les fonctions appropriées⁴⁷. Pour cela, les matériaux utilisés comme base de *scaffold* doivent être avant tout biocompatibles. Il est admis qu'un matériau biocompatible doit être non cytotoxique, non mutagène, non immunogène, non tératogène, non thrombogène⁴⁶. À ceci s'ajoute les concepts dérivants des matériaux capables de se dégrader dans un organisme vivant. Dans ce cas, les définitions sont les suivantes : (i) le terme « dégradable » est générique et s'applique aussi bien aux dégradations purement chimiques qu'aux dégradations enzymatiques, (ii) un polymère « biodégradable » est défini comme tel lorsque son intégrité est altérée au niveau moléculaire par un processus lié à l'activité biologique (cellules, bactéries ou enzymes). En particulier, la notion de biodégradabilité implique une perte de propriété, éventuellement une disparition du site d'implantation mais pas nécessairement une élimination de l'organisme, (iii) les éléments « bioabsorbables » sont des composés qui se dégradent macroscopiquement sans que les macromolécules le constituant soient elles-mêmes dégradées. Elles peuvent être solubilisées et retenues ou excrétées et (iv) le terme de « biorésorbable » est réservé pour les composés qui se dégradent et pour lesquels il est prouvé que les produits de dégradation sont éliminés de l'organisme par métabolisation ou filtration rénale⁴⁸.

Enfin, en plus d'une géométrie en adéquation avec les propriétés mécaniques, un *scaffold* doit posséder une certaine porosité et interconnectivité pour que les cellules migrent et prolifèrent. La taille des pores assure l'accès aux nutriments, oxygène et l'élimination des déchets cellulaires. Il paraît donc évident que la stratégie de fabrication de ce *scaffold* est primordiale pour assurer une reconstruction optimale et que le choix de la stratégie de fabrication est essentiel.

1.3.4 Fabrication de *scaffold* : le potentiel de la stéréolithographie en ingénierie tissulaire

Dans un premier temps, la construction de *scaffold* pour l'ingénierie tissulaire a été étudiée à partir de méthodes dites conventionnelles de réalisation d'objets 3D poreux. Il existe ainsi des techniques comme la lyophilisation, le moussage, l'électrospinning, le lessivage de particules ou encore la séparation de phases qui sont illustrés sur la Figure I-10. Cependant, ces techniques ont montré d'importantes limites comme le manque de contrôle sur la porosité, la reproductibilité et la polyvalence dans les architectures ainsi que les matériaux pouvant être utilisés^{4,5,49}.

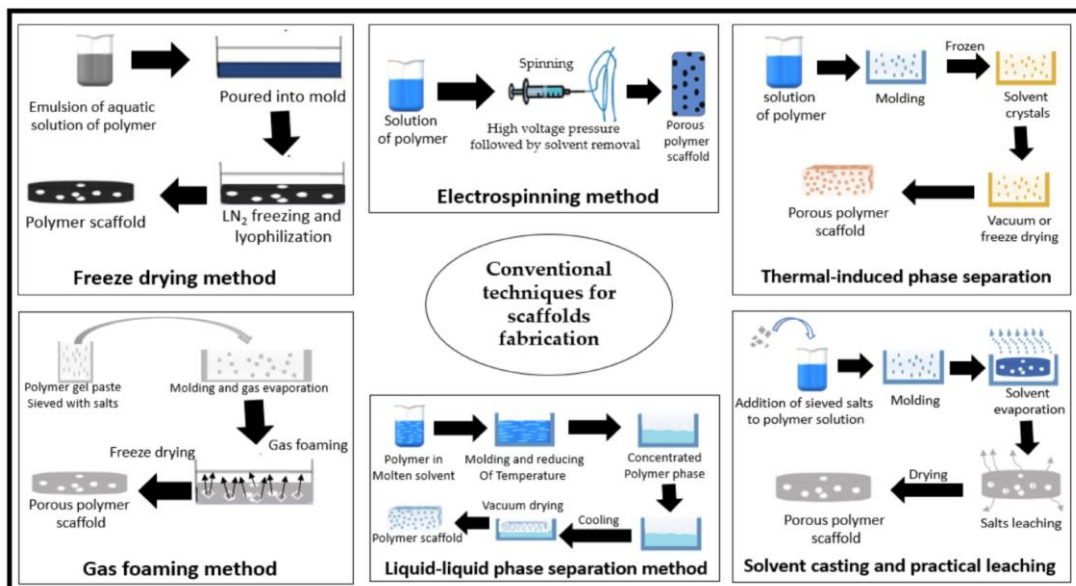


Figure I-10 - Méthodes conventionnelles de fabrication d'un *scaffold*⁵⁰

La fabrication additive permet de s'affranchir de ses limitations. La stéréolithographie a tout particulièrement connu un essor considérable dans le domaine de l'ingénierie tissulaire^{6,51}. Celle-ci offre une très haute précision et résolution, avec une grande versatilité d'architectures, voir Tableau I-1. De plus, la stéréolithographie se démarque des autres technologies de fabrication additive par son procédé basé sur la sollicitation lumineuse. La **photopolymérisation** et plus précisément la photoréticulation a de nombreux avantages par rapport aux autres procédés chimiques : i) procédé peu énergivore, ii) procédé sans émission de C.O.V., iii) très haute résolution et polyvalence de fabrication , iv) procédé rapide allant de la seconde à quelques minutes, v) diversité des matériaux utilisables et vi) procédé chimio-sélectif permettant une orthogonalité de réactivités, propriété importante dans le cas de molécules polyfonctionnelles où seules certaines fonctions doivent réagir sélectivement. De fait, cette technologie permet de contrôler précisément l'architecture des objets tridimensionnels mais également la capacité à développer des structures poreuses hautement sophistiquées permettant d'apporter de nouvelles propriétés aux objets 3D.

2 La stéréolithographie : une technique polyvalente de photopolymérisation

2.1 Le principe de la stéréolithographie

Le principe de la stéréolithographie est basé sur la fabrication par solidification par photoréticulation d'une résine prépolymère initialement à l'état liquide ou visqueux à l'aide d'une source photonique⁶. Le procédé est présenté en Figure I-11. Une source lumineuse est envoyée sur un miroir qui va réfléchir le rayonnement spatialement contrôlé sur la zone à illuminer. Sous l'action du rayonnement, la résine réagit pour se solidifier localement. Une fois la première couche illuminée, la plateforme se déplace de l'épaisseur souhaitée pour être recouverte de résine liquide puis illuminée de nouveau. La couche suivante est construite tout en étant simultanément associée à la couche précédente. Ce mouvement est répété jusqu'à obtenir la forme finale désirée⁵².

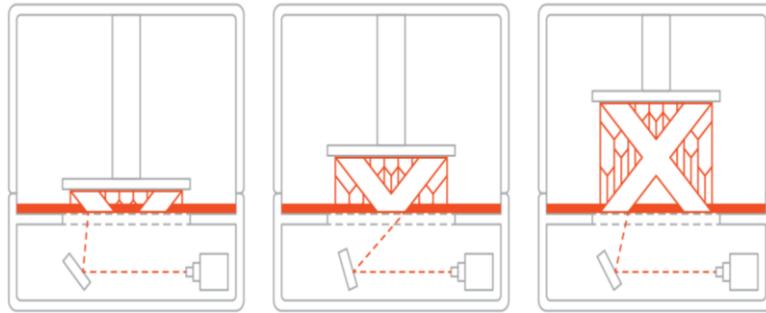


Figure I-11 - Principe de la stéréolithographie

Le terme stéréolithographie peut englober différentes technologies allant du balayage d'un laser (**SLA**), à la projection d'une image par des pixels (**DLP**), à la fabrication dans un volume (**volumétrique**) ou en continue (**CLIP**) jusqu'à la conception nanométrique (**2-photons**)^{8,53,54}. Ces différents termes sont discutés ci-suit.

- Stéréolithographie 2-photons

La technologie à **2 photons** repose sur l'absorption simultanée de deux photons dans un volume restreint. Le faisceau proche du rayonnement infrarouge peut se déplacer librement dans la résine. La réticulation a lieu uniquement au point focal (Figure I-12 et Figure I-4 H). En raison de l'absorption non linéaire, en dehors du point focalisé, il n'y a pas de processus d'absorption à un seul photon dans le chemin optique grâce à sa faible intensité. Par conséquent, la polymérisation à deux photons est très précise et permet de concevoir des objets de l'ordre de 100 nm^{8,54}.

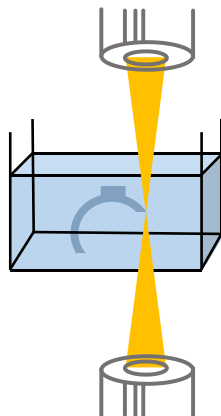


Figure I-12 - Fonctionnement schématique de la 2 photons

- Stéréolithographie laser (SLA)

Dans le cas de la SLA par laser, la réticulation de la résine se fait sur toute la surface où le faisceau passe (Figure I-13 et Figure I-4 G). Le contrôle de la direction du laser sur n'importe quel point du bain de résine s'effectue à l'aide de miroirs très précis. La précision de fabrication dans le plan horizontal est principalement déterminée par la taille du faisceau du laser⁸. Ce procédé est répété par la suite couche par couche.

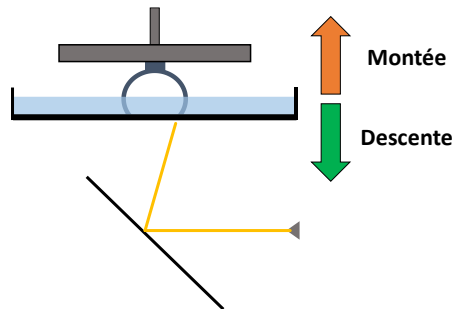


Figure I-13 - Fonctionnement schématique de la SLA

- Stéréolithographie DLP « Digital Light Processing »

Le **DLP**, fonctionne avec un écran de projection numérique (type vidéoprojecteur) qui projette une image 2D correspondant à une couche sur l'ensemble de la plateforme en une seule opération (Figure I-14 et Figure I-4 G). Le projecteur est composé de pixels qui bougent indépendamment les uns des autres et créent ainsi une image propre à chaque couche appelé système de **masque dynamique**. Par conséquent, la DLP a une vitesse de production plus rapide que la SLA. La résolution de conception dans le plan est dans ce cas déterminée par la taille du pixel. Souvent la résolution d'un pixel est supérieure à celle du laser. Néanmoins la résolution spatiale s'affaiblit rapidement sur de grandes zones d'exposition. Ceci est la principale différence entre les technologies SLA et DLP. Le processus de fabrication reste identique. Le DLP conçoit des microstructures 3D complexes couche par couche. Pour chaque couche, la zone éclairée est solidifiée simultanément en une seule exposition tandis que les régions sombres restent liquides. Ce procédé est itéré jusqu'à la conception de l'objet^{55,56}.

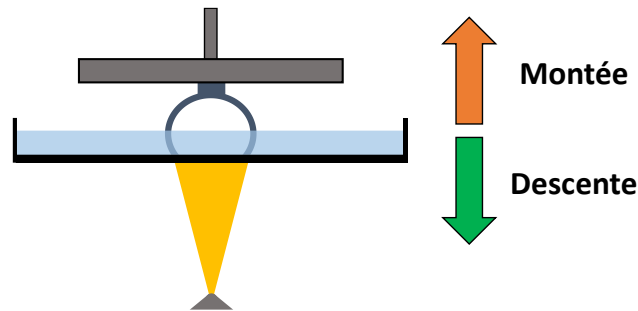


Figure I-14 - Fonctionnement schématique du DLP

- Stéréolithographie CLIP « Continuous Liquid Interface Production »

La technologie de **CLIP** est une méthode de fabrication rapide qui est une variante du DLP. Cette technique fonctionne selon un procédé de conception en continu. En opposition au DLP et SLA, le pied de construction monte constamment sans aller et retour dans le bain de résine. Son principe repose sur l'inhibition par l'oxygène. Elle possède une membrane transparente et perméable à l'oxygène qui se trouve au fond du bac de résine (Figure I-15 et Figure I-4 F). De ce fait, lorsque la lumière illumine la résine, les radicaux libres sont inhibés par l'oxygène. Ainsi, la partie en contact avec la membrane ne réticule pas et est appelée zone morte. Cette zone non solidifiée permet à la résine de s'écouler plus rapidement. De cette manière, la plateforme s'élève continuellement puisque la résine est toujours présente. Par rapport à la technologie SLA, la vitesse de production du CLIP est de 50 à 100 fois supérieure⁵⁷.

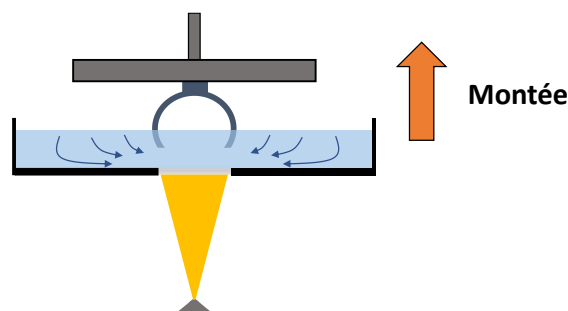


Figure I-15 - Fonctionnement schématique de la CLIP

- Stéréolithographie Volumétrique

Très récemment, un nouveau concept de DLP est apparu, l'impression **volumétrique**. Comme son nom l'indique cette technologie est basée sur l'irradiation dans un volume entier et non plus sous un fonctionnement de couche par couche. Son procédé s'inspire des CT-scan

médicaux. Pour récupérer l'image d'un patient, une série de radiographies à rayons X sont acquises sous différents angles. Par un algorithme, l'ensemble des images sont traitées et assemblées pour obtenir le scan final. C'est exactement l'inverse dans la fabrication volumétrique. La forme désirée est d'abord préparée numériquement puis des images de coupes transversales sont générées. Le récipient de résine est mis en rotation et irradié à 360° avec des projections par DLP. L'irradiation cumulative reproduit la forme de l'objet tridimensionnel à l'intérieur d'un volume homogène par solidification du photopolymère liquide (Figure I-16 et Figure I-4 D). Ce mode de fonctionnement semble très prometteur. En effet, il permet d'utiliser des résines à viscosité diverse, des temps courts, ne nécessite pas de supports et permet de construire l'objet seul ou directement sur un élément déjà existant⁵⁸⁻⁶⁰.

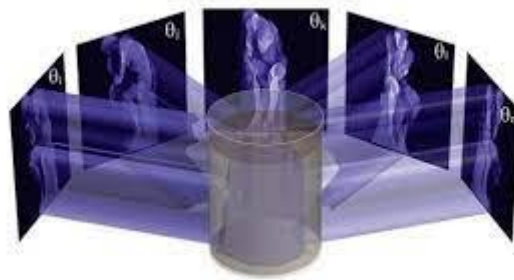


Figure I-16 - Fonctionnement schématique de la volumétrie

Le travail présenté par la suite dans les différents chapitres repose sur l'utilisation du processus de base du DLP. Cette technologie offre un bon compromis entre coût, précision, taille de pièce, vitesse de conception et mise en place du fonctionnement. Les paragraphes qui suivent détaillent avec précision son fonctionnement.

2.2 La mise au point en stéréolithographie

En stéréolithographie, le **contrôle de l'épaisseur de couche** est essentiel afin d'obtenir la résolution et les propriétés optimales⁶¹. Cela dépend d'un ensemble de paramètres tels que la puissance de la lumière, la longueur d'onde utilisée et le temps d'irradiation⁶². Ce groupe de paramètres dépend de chaque formulation. L'épaisseur de réticulation, zone solidifiée,

peut être déterminée par des équations reliant la puissance d'irradiation et le temps d'illumination⁵². Cette équation a été décrite comme la **loi de Jacobs**^{63,64} :

$$C_d = D_p \ln (E/E_c)$$

avec « C_d » l'épaisseur réticulée (en μm), « D_p » la pénétration de l'irradiation (en μm) et « E » l'énergie apportée (en mJ/cm^2) (« E_c » énergie minimale de solidification). Cette équation permet de déterminer l'épaisseur de résine réticulée après irradiation en fonction des différents paramètres appliqués. Avec un raisonnement inverse, connaissant l'épaisseur de solidification à appliquer, il est possible de remonter aux autres paramètres⁶⁵. Cette méthode présentée en Figure I-17 est appelée « courbe de travail (« working curve ») où une régression logarithmique est appliquée en fonction de l'exposition et de la pénétration.

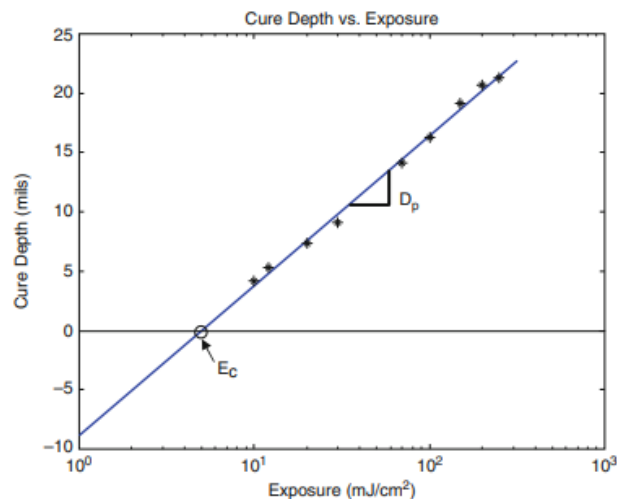


Figure I-17 – Standard de « Working curve » d'une résine déterminant l'épaisseur de réticulation en fonction de l'exposition

Différents composants constituent la formulation pour contrôler la photopolymérisation comme : (a) un photoamorceur, qui absorbe la lumière et génère les espèces actives ; (b) des monomères/oligomères photosensibles contenant au minimum deux fonctions réactives afin de permettre la photoréticulation, (c) un diluant réactif ou non qui a pour rôle d'ajuster la viscosité du mélange, qui est classiquement reconnu pour être optimal pour des valeurs de l'ordre de 1-10 Pa.s^{18,49,66}. Il doit être, si possible, non-toxique, non volatile et éliminable^{67,68}. De plus, le solvant peut être réactif et participer au réseau. Par exemple, dans l'objectif d'une utilisation antimicrobienne pour le dentaire, Yue *et al.* a utilisé un solvant réactif, le

diméthacrylate de glycérol⁶⁹. De son côté, Jansen *et al.* a construit des *scaffolds* en ayant recours au *N*-vinyl-2-pyrrolidone comme diluant réactif améliorant également la réactivité de la réticulation⁷⁰ et (d) un photoabsorbeur peut également être utilisé afin de limiter la pénétration de l'irradiation.

2.3 Les méthodes chimiques de réticulation

La photoréticulation mise en jeu dans la stéréolithographie est basée sur l'utilisation d'une résine liquide qui se solidifie par polymérisation radicalaire ou cationique à la suite de l'exposition d'une source lumineuse en présence d'un photoamorçeur⁷¹. Les photoamorçeurs peuvent être classés en deux catégories : les cationiques et les radicalaires. Les photoamorçeurs cationiques sont des espèces acides à base de sel d'onium qui activent des molécules époxyde ou vinyl ether (Figure I-18 B). Les photoamorçeurs radicalaires réagissent, quant à eux, sur des fonctions (méth)acrylate, alcène/yne, fumarate ou encore bismaléimide (Figure I-18 A). Les travaux de ce manuscrit ont porté sur l'utilisation de photoamorçeurs radicalaires pour leur solubilité et leur réactivité.

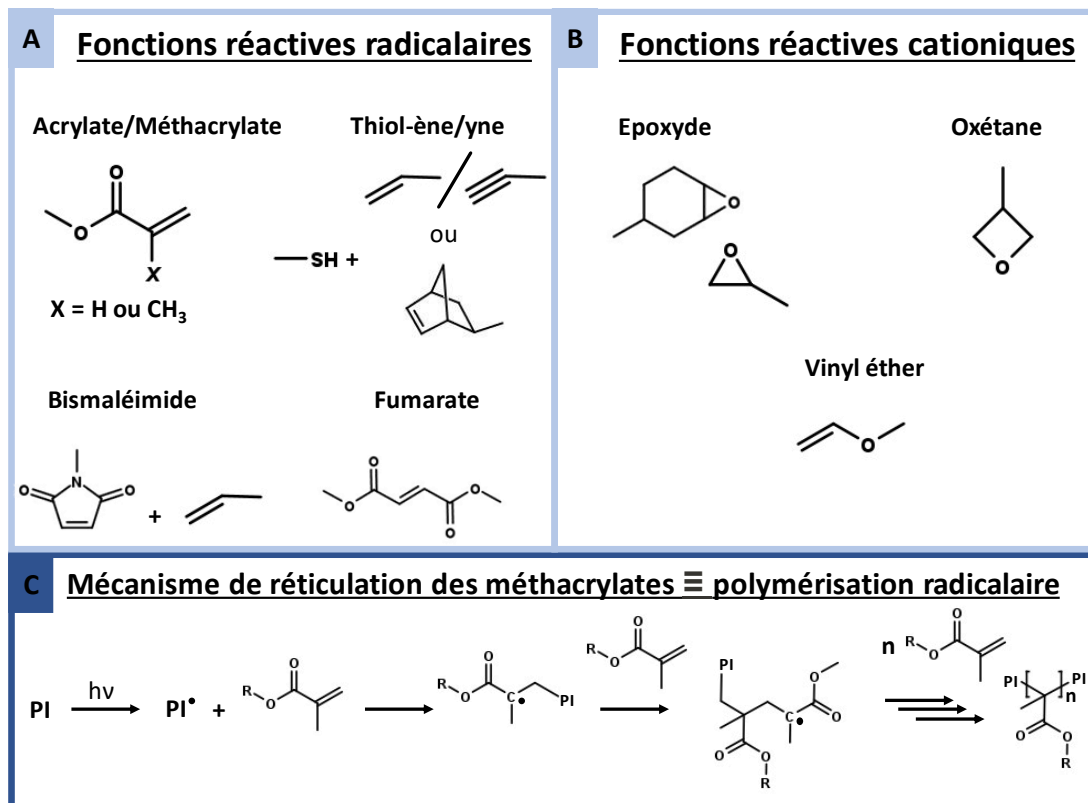


Figure I-18- Fonctions réactives en stéréolithographie

- Les photoamorceurs radicalaires

Le **photoamorceur** permet le transfert de l'énergie en espèces réactives (radicaux ou cations) qui vont réagir et entraîner la croissance de la chaîne polymère^{1,72}. Il est essentiel de minutieusement le sélectionner pour assurer un taux de polymérisation adéquat. Il faut tenir compte de différents paramètres comme la solubilité, la stabilité, la longueur d'ondes d'activation et l'efficacité à générer des espèces réactives. Dans le cas d'applications médicales, il faut également tenir compte de la cytotoxicité^{49,73}. Les photoamorceurs **radicalaires** sont largement les plus développés, ce qui a permis non seulement de développer des molécules avec une bonne solubilité dans les solvants organiques et dans l'eau, mais également d'apporter une biocompatibilité. Dans le cas d'un **mécanisme radicalaire**, il existe deux types de composés décrits comme photoamorceurs de type I ou II de Norrish¹. Les photoamorceurs de type I se clivent en générant des radicaux lorsqu'ils sont exposés à une longueur d'onde appropriée⁷⁴. Ils sont plus rapides et peuvent être utilisés à une faible concentration puisque les deux fragments de radicaux sont capables d'amorcer la polymérisation⁷⁵. Les systèmes de photoamorçage de type II sont des systèmes à deux composants constitués d'une molécule absorbant la lumière (ou sensibilisateur) et d'un co-amorceur (ou synergiste)¹. Les systèmes de type II, bien plus lents, sont encore très courants, car ils sont généralement moins coûteux et sont moins sensibles à l'oxygène⁷⁵.

Les photoamorceurs peuvent également être sélectionnés en fonction de la **longueur d'onde** à laquelle ils réagissent (Figure I-19)^{71,76}. Le système de DLP utilisé dans ce travail émet une émission de 385 nm. Pour cela, les photoamorceurs Irgacure 2959, Darocur 1173 et TPO ont été sélectionnés. Le Darocur 1173 est un liquide alors que le Irgacure 2959 et TPO sont des solides. D'autres photoamorceurs couramment utilisés en UV, non présentés ici, existent à base de phosphore tel que le lithium de phényl-2,4,6-triméthylbenzoylphosphinate (LAP). Cependant, l'utilisation **d'UV et de radicaux** peuvent être une **limitation** en *bioprinting* où des cellules sont additionnées à la résine. Néanmoins, plusieurs études ont montré une certaine compatibilité des photoamorceurs avec les cellules comme c'est le cas pour l'Irgacure 2959⁷⁷ ou encore le LAP⁷⁸. Actuellement, de nombreux groupes de recherche, comme l'équipe de Lalevée, travaillent sur le développement de nouveaux systèmes de photoamorceurs comme par exemple des dérivés de la coumarine^{79,80}, de chalcone^{81,82} et des dérivés actifs en proche infra-rouge^{83,84}.

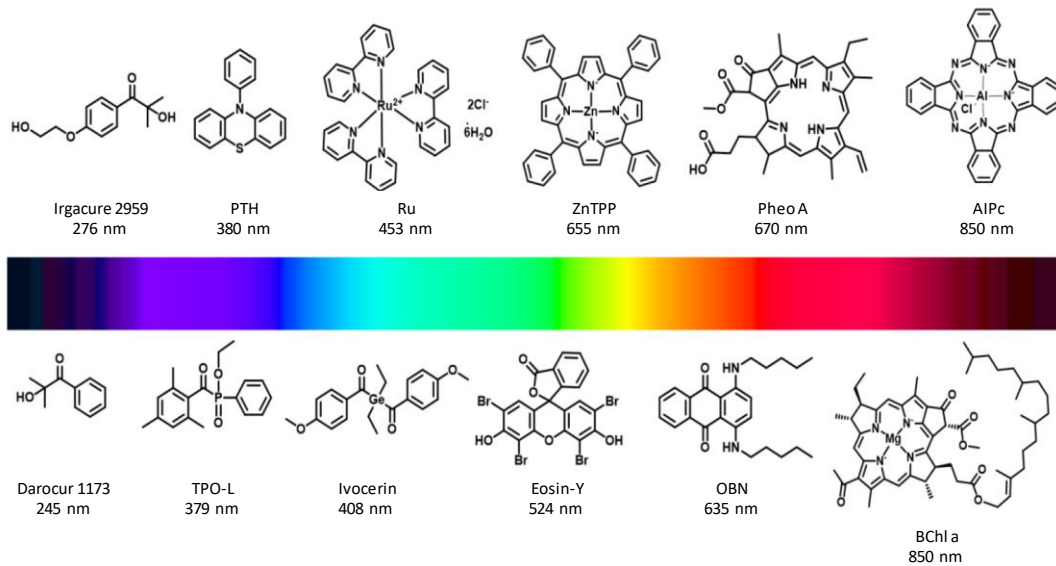


Figure I-19 - Exemples de structures chimiques de photoamorceurs disponibles pour la stéréolithographie et de leur longueur d'onde d'activation⁷¹

- Les fonctions photopolymérisables par voie radicalaire

La **voie radicalaire** regroupe principalement des monomères et oligomères de type (méth)**acrylate**. Ils sont très largement employés en raison de leur haute réactivité, de leurs conditions de polymérisation douces et de leur grande disponibilité commerciale⁸⁵. La structure chimique est $\text{CH}_2=\text{CR}_1\text{R}_2$ où la liaison π de la double liaison carbone-carbone se réarrange une fois exposée à un radical libre (Figure I-18 C)⁷³. Malgré leurs considérables atouts pour la stéréolithographie, il est nécessaire de souligner également les limites de la voie radicalaire :

- une tendance à subir une contraction volumique, appelée également retrait spatial, à la suite de la polymérisation. Ce dernier peut être réduit avec des monomères de masse moléculaire élevée ou l'utilisation de ponts hydrogène^{1,71},
- l'inhibition en présence d'oxygène, mais qui est limitée par les machines stéréolithographie à surface contrainte avec une irradiation par le bas. D'autres approches consistent à moduler l'irradiation en présence d'amines tertiaires⁷¹,
- la nécessité de s'assurer de l'absence de doubles liaisons qui n'auraient pas réagi et qui pourraient potentiellement réagir avec des substances biologiques^{74,86}. Celles-ci peuvent être éliminées par un post-traitement thermique.

D'autres réactions radicalaires ont été envisagées pour la réticulation avec les groupements ou réactions suivantes :

- Les fumarates⁸⁷⁻⁹¹,
- Les bismaleimides⁹²⁻⁹⁴
- Les thiol-ène :
 - Alcène^{1,71,74,95-102},
 - Norbornene¹⁰³⁻¹⁰⁶,
- Les thiol-yne^{1,71,107,108}.

La réticulation par thiol-ène/yne sont des réactions où un thiol est mis en présence d'une liaison insaturée type alcène ou alcyne. Ces réactions peuvent se dérouler par l'intermédiaire d'une polymérisation radicalaire par étapes ou par addition de Michael. La thiol-ène mène principalement à des liaisons flexibles qui entraînent la formation de matériaux souples. Pour contrer cela, il est possible d'utiliser un alcyne. La thiol-yne est capable de subir une seconde addition avec un excès de thiol. Ce phénomène génère un réseau plus dense, ce qui se traduit par une transition vitreuse et des modules plus élevés par rapport à ceux de la thiol-ène. Dans la thiol-ène, des alcènes cycliques ont été employés comme les norbornènes. Ces derniers, par la tension de cycle, sont plus réactifs et permettent ainsi de diminuer la quantité de photoamorceur ou encore la puissance d'irradiation. Ceci est un avantage dans l'utilisation de cellules. Les thiols ont l'avantage d'atténuer l'inhibition de l'oxygène en donnant un atome d'hydrogène à un peroxyde formé, de limiter la rétractation du réseau due à un taux de gel plus élevé et sont reconnus comme plus biocompatibles que les acrylates. Cependant, leur utilisation reste restreinte à cause de leur forte odeur et de leur instabilité^{1,71,103,104}.

Néanmoins, ces nouvelles approches ne compensent pas la large utilisation des (méth)acrylates qui restent la voie la plus efficace.

3 L'émergence de nouveaux matériaux pour la stéréolithographie dans le domaine de la santé

Il existe différents matériaux pour la médecine régénérative allant des élastomères aux hydrogels avec des polymères synthétiques comme naturels. Tout est réuni pour développer des structures perfectionnées pour la reconstruction cellulaire. Cependant, il y a aujourd'hui un manque de résines disponibles^{1,6,10,18,62}. Au regard des nombreuses techniques de fabrication additive présentées dans la partie 1.2 (Les différents procédés de fabrication additive), la partie suivante se focalise uniquement sur la stéréolithographie couche par couche type SLA ou DLP. Ceci exclut les technologies à deux photons, μ SLA, CLIP et volumique.

3.1 Les matériaux polymères non-hydrogels en stéréolithographie pour la santé

Dans le domaine de la santé, les polymères non-hydrogels utilisés sont principalement dégradables à partir de polyesters (ex : PCL, PLA, poly(fumarate) (PPF)) ou polycarbonate (ex : PTMC). D'autres types de polymères peuvent être présents comme les silicones ou l'émergence des huiles végétales. Cependant, ils ne seront pas décrits ici car leur utilisation en stéréolithographie pour la santé reste encore anecdotique¹⁰⁹⁻¹¹¹.

Le Tableau I-2 résume les polymères développés en stéréolithographie dans le domaine biomédical. Il en ressort que les polymères tels que les PPF, PCL ou PLA sont principalement utilisés dans la reconstruction osseuse, du fait de leur module et résistance mécanique élevés. Le PTMC reconnu comme plus flexible est plutôt employé pour la reconstruction de tissu mou comme le cartilage, le ménisque, le disque intervertébrale ou encore le système vasculaire. Globalement, sur l'ensemble des polymères les propriétés mécaniques ont pu être améliorées soit en utilisant des solvants réactifs comme le diethyl fumarate (DEF) ou N-vinyl-2-pyrrolidone (NVP) ou encore en ajoutant des charges inorganiques comme le β -tricalcium phosphate (β -TCP) ou l'hydroxyapatite (HA). Tous les polymères montrent une bonne activité biologique que ce soit en *in vitro* ou *in vivo*. Les auteurs commencent également à prendre en compte la structure et la porosité du *scaffold*. En effet, la stéréolithographie permet une grande liberté de conception qui mène à des propriétés mécaniques et biologiques très variées. De plus, des comportements apparaissent aussi pour des applications en santé

comme la mémoire de forme. Cette capacité permettrait un meilleur positionnement ou insertion du dispositif.

D'autres polymères émergent comme les silicones et les PU. Ces derniers possèdent des flexibilités bien plus importantes et sont utilisés pour des applications types vaisseaux sanguins. Leur viscosité est la majeure limitation.

Tableau I-2 - Résumé des polymère utilisés en stéréolithographie pour le domaine de la santé et leurs propriétés mécaniques et biologiques

Polymères	Reconstruction tissulaire		Propriétés mécaniques t : traction ; c : compression ; f : flexion			Voie de réticulation	Particularité dans la formulation	Ref
	Le tissu	Les cellules	Contrainte (MPa)	Déformation	Module d'Young (MPa)			
PPF	Os	Fibroblastes L929 (souris)	-	-	-	PPF ₁₄₀₀	DEF	112
PPF	Vertèbre	-	0.5-29		12-481	PPF ₁₅₀₀	Porosité/DEF	113
PPF	Scaffold T.E	Fibroblastes L929 (souris cellules lignées) et cellules mésenchymateuses (humaines souches) hMCS	-	-	-	PPF ₇₀₀₋₃₀₀₀	DEF	90
PPF	Os	Cellules stromales de moelle osseuse de rat (BMCS)	C 0.5-2	-	C 20-50	PPF ₁₂₀₀	Porosité/DEF/sel	114
		Cellules souches mésenchymateuses canines et humaines (hMCS)	-	-	-		DEF/TiO ₂	115
PPF	Moelle épinière	Protéine CBD-NT3 <i>In vivo</i> dans la vertèbre T9	C 0.4	C 3%	C 15.8	PPF	Collagène ajouté dans <i>scaffold</i>	116
PPF	Os	<i>In vivo</i> sous cutanée dans le dos de rats Sprague-Dawley	-	-	-	PPF ₉₀₀	DEF/TiO ₂	117

		Fibroblastes L929 (cellules lignées)	C 73-130	-	C 84-211	PPF ₁₀₀₀	DEF	118
PPF	Os	-	-	-	C 15-150	PPF ₂₅₀₀	Porosité/DEF	119
PCL	Guide de nerf	Lignée cellulaire de Schwann (RN22) et cellules de Schwann primaires de rat	T 0.1-4.0	T 0.75-1.5 (mm/mm)	T 0.1-3.5	triPCL ₉₀₀ MA (10 - 80 %)	β-carotène (PA)	120
PCL	<i>Scaffold</i> T.E	Fibroblastes	T 2.6-2.9	T 19-79 %	T 15.4-6.7	triPCL ₇₅₀₋₆₀₀₀ MA	Sans solvant (45 °C)	121
	<i>Scaffold</i> T.E	Fibroblastes gingivaux humains	-	-	C 1.0-3.5	triPCL ₇₀₀ MA	Bioglass (SiO ₂ , Na ₂ O, CaO, P ₂ O ₅)	122
PCL	<i>Scaffold</i> T.E Tissu neuronal sensible (modèle rétinien)	<i>In vitro</i> : cellules souches pluripotentes induites par la souris <i>In vivo</i> : rétines de porc	T 0.6-0.70	T 13-39%	T 3.3-6.9	diPCL ₅₃₀₋₁₂₅₀ MA triPCL ₃₀₀₋₉₀₀ MA	-	123
PCL	<i>Scaffold</i> T.E	Cellules mésenchymateuses (humaines souches) hMCS	-	-	-	diPCL ₁₅₀₀₋₆₀₀₀ VE	NVP	86
PLA	Os	Cellules mésenchymateuses (humaines moelle épinière) hMCS	C 0.6-1.2	C 0.07-0.09 (mm/mm)	C 12.3-30.8	diPLA ₃₀₀₀ MA	HA	124
	Os	-	F 42-66	F 1.2-3.5%	F 3100-5100	diPLA ₃₀₀₀ MA	HA	125
PLA	<i>Scaffold</i> T.E	Lignée cellulaire de préostéoblastes de souris	T 7.0-56.0	T 2.2-7.3%	T 200-2100	triPLA ₃₀₀₀ MA	fumaric acid monoethyl ester (FAME)/NVP	70
PLA	Os	-	-	-	C 165-2500	diPLA ₅₀₀₀ MA	3D TPMS	126
	Os	Lignée cellulaire de préostéoblastes de souris	F 79-118	F 2.4-6.2%	F 2500-3600	starPLA ₂₀₀₋₅₀₀₀ MA	-	127
PLA-co-PCL	Os	-	-	-	C 0.1-12	diPLA-co-CL ₅₀₀₀ MA	3D TPMS	126

PTMC	<i>Scaffold</i> T.E	-	T 1.3-2.1	T 96-990%	T 3.7-4.2	triPTMC ₃₂₀₀₋ 28000MA	-	128
	Cartilage	chondrocytes de bovins	-	-	C 0.046-0.119	triPTMC ₃₁₀₀ MA	-	129
	Réseau vasculaire	Cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC)	T 3.5	T 76.7	T 7.9	triPTMC ₃₁₀₀ MA	-	130
	Réseau vasculaire	-	T 0.5-6.6	T 67-143	T 0.3-9.0	triPTMC ₄₅₀₀ MA	CaCO ₃	131
	Plancher orbital	-	T 2.4-7.1 (N/mm ²)	T 239-410	T 2.8-60	triPTMC ₉₈₀₀ MA	HA	132
	Plancher orbital	<i>In vivo</i> : orbitale de mouton	-	-	-	triPTMCMA	HA	133
	Os	Cellules mésenchymateuses (humaines moelle épinière) hMCS	-	-	-	triPTMCMA	HA	134
	Os	Cellules mésenchymateuses (humaines moelle épinière) hMCS	C 0.1-0.6	C 60	C 0.1-0.9	triPTMC ₁₀₀₀₀ MA	HA	135
	Ménisque	-	-	-	C 0.085-2.3	triPTMC ₂₈₉₀₀ MA	Porosité	136
	Annulus fibrosus	-	T 7	T 80 %	T 0.028	triPTMC ₅₀₀₀ MA	Colle pour <i>scaffold</i>	137
	Annulus fibrosus	Cellules humaines de l'annulus fibrosus	-	-	C 0.2-0.3	triPTMC ₅₀₀₀ MA	Porosité	138
	Annulus fibrosus	Cellules souches humaines adipeuses (hADCS)	-	-	C 0.35	triPTMC ₅₀₀₀ MA	Différenciation cellulaire	139
PTMC	Os	-	T 0.8-4	T 10-150%	T 5-353	triPTMC ₈₆₀₀ MA	β-TCP	140
PTMC-co-PCL	<i>Scaffold</i> T.E	Cellules souches mésenchymateuses (humaines) hMCS	T 0.2-5.4	T 3.5-24	T 0.6-61	diPTMC-co- CL ₄₀₀₀ MA	PU	141
PTMC-co-PLA	<i>Scaffold</i> T.E	Cellules souches adipeuses (ACS)	C 0.5-4	C 20-70%	C 0.002-21	diPTMC-co- LA ₃₀₀₀₀ MA	Mémoire de forme	142
PC	Tissus adipeux	<i>In vitro</i> : NOR-10 (murine fibroblastes), Hs	T 2.1-18.3	T 67.2-144.1%	T 15-122 C 1.1-12	PTMPCTX ₂₀₀₀ VE	PU	143

		792 (fibroblastes humain), IC21 (murine macrophages), and D16 (murine adipocytes) lignée cellulaire <i>In vivo</i> : Sprague Dawley rats sous cutanée contact muscle						
Huile de soja	<i>Scaffold</i> T.E	Cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse humaine (hMSCs)	-	-	C 400-600	Huile de soja acrylée	Mémoire de forme	111
PDMS	Vaisseaux sanguin	Lignée cellulaire de fibroblastes de souris 3T3	C 3.7	C 195%	C 2.5	PDMS ₃₆₀₀ MA	PU (IPDI)	144

3.2 Les matériaux hydrogels en stéréolithographie pour la santé

Les **hydrogels** sont des réseaux tridimensionnels insolubles et hydrophiles capables d'absorber une grande quantité d'eau^{46,145,146}. Le réseau peut être chimiquement **réticulé** avec des liaisons covalentes ou physiquement par des interactions non-covalentes de type ionique, hydrogène, hydrophobe, par cristallisation, par enchevêtrement¹⁴⁷ ou bien encore par combinaison des deux¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Cette capacité est quantifiée par le **taux de gonflement** qui correspond à la quantité d'eau ou fluide biologique absorbée à l'état d'équilibre. Leur capacité d'absorption d'eau est calculée avec le « **water uptake** » ($\text{water uptake} = \frac{[m_{\text{swell}} - m_{\text{dry}}]}{m_{\text{dry}}} \times 100$).

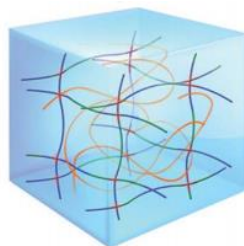


Figure I-20 - Représentation schématique d'un réseau d'hydrogel

Leurs **propriétés varient** selon la nature chimique, la densité, la morphologie et la capacité de gonflement du réseau¹⁵⁰. Les polymères synthétiques ont souvent été utilisés en raison de leurs propriétés modulables, contrôlées et reproductibles (structure, porosité, dégradabilité...)¹⁵¹. Les hydrogels peuvent être regroupés selon l'origine des polymères (naturel, synthétique ou hybride), la méthode de préparation, l'aspect physique (hydrogel liquide, semi-solide ou solide), leur sensibilité aux stimuli (pH, température...), ou encore leurs propriétés physiques¹⁵². Les hydrogels obtenus par **réticulation covalente** (voie chimique) peuvent être conçus de différentes manières à savoir par photopolymérisation, par voie enzymatique ou par liaisons covalentes dynamiques de type boroeester, Diels-Alder, réactif de Schiff, oxime, addition de Michael^{147,153,154}. Les hydrogels souffrent de **faibles propriétés mécaniques** (résistance à la rupture et module d'élasticité)^{10,155} qui restreignent considérablement leurs applications. À partir de ce constat, **différentes stratégies** ont été développées pour **renforcer** ces propriétés¹⁵⁵ à partir de doubles réseaux (semi-)interpénétrés (IPN et semi-IPN), de charges ou encore des ajouts d'interactions physiques (Figure I-21).

Le recours à des réseaux interpénétrés est la méthode la plus utilisée pour améliorer les propriétés mécaniques. Dans ce cas, un polymère non réticulé peut être ajouté à l'hydrogel (semi-IPN) ou deux réseaux peuvent être réticulés indépendamment et former l'hydrogel (double réseau). Ce second réseau peut apporter de la résistance mécanique par une densité de réticulation supérieure ou encore une asymétrie de réseau permettant une dissipation des contraintes. Une autre méthode est l'utilisation de charges. Dans ce cas, l'architecture du réseau n'est pas modifiée. Les charges couramment utilisées sont les argiles, les silicates ou le carbone. Ces charges réalisent un lien par liaisons covalentes ou physiques avec les chaînes de polymères et agissent comme des agents de réticulation. Ces charges permettent la dissipation des contraintes lors d'un effort et améliorent principalement la résistance à la compression. La dernière possibilité est l'utilisation de liaisons réversibles telles que les liaisons physiques. Des polymères ioniques peuvent être utilisés pour former des charges électrostatiques supplémentaires au sein du réseau qui auront pour effet de renforcer ce dernier. Ce phénomène permet de réaliser des ponts inter- ou intrachânes mais également de rajouter de la complexation pour améliorer les propriétés à la traction. Il est également possible de croiser ces différents types de réseaux.

Quatre groupes d'hydrogels peuvent donc être classés selon leur résistance mécanique. Le premier correspond aux **hydrogels conventionnels** avec une contrainte à la rupture et un module d'Young de **10 à 100 kPa**. Les hydrogels **ultra-durs** avec un module supérieur à **1 MPa**. Les **hydrogels ultra-résistants** avec des résistances à la déformation supérieures à 10 MPa et pour finir les **hydrogels alliant dureté et résistance** avec une contrainte à la rupture et un module d'Young supérieurs à **10 MPa et 1 MPa**¹⁵⁵. En revanche, ces hydrogels renforcés ont généralement des capacités de gonflement limitées en raison du fort taux d'enchevêtrement des réseaux par rapport aux hydrogels conventionnels¹⁵⁵.

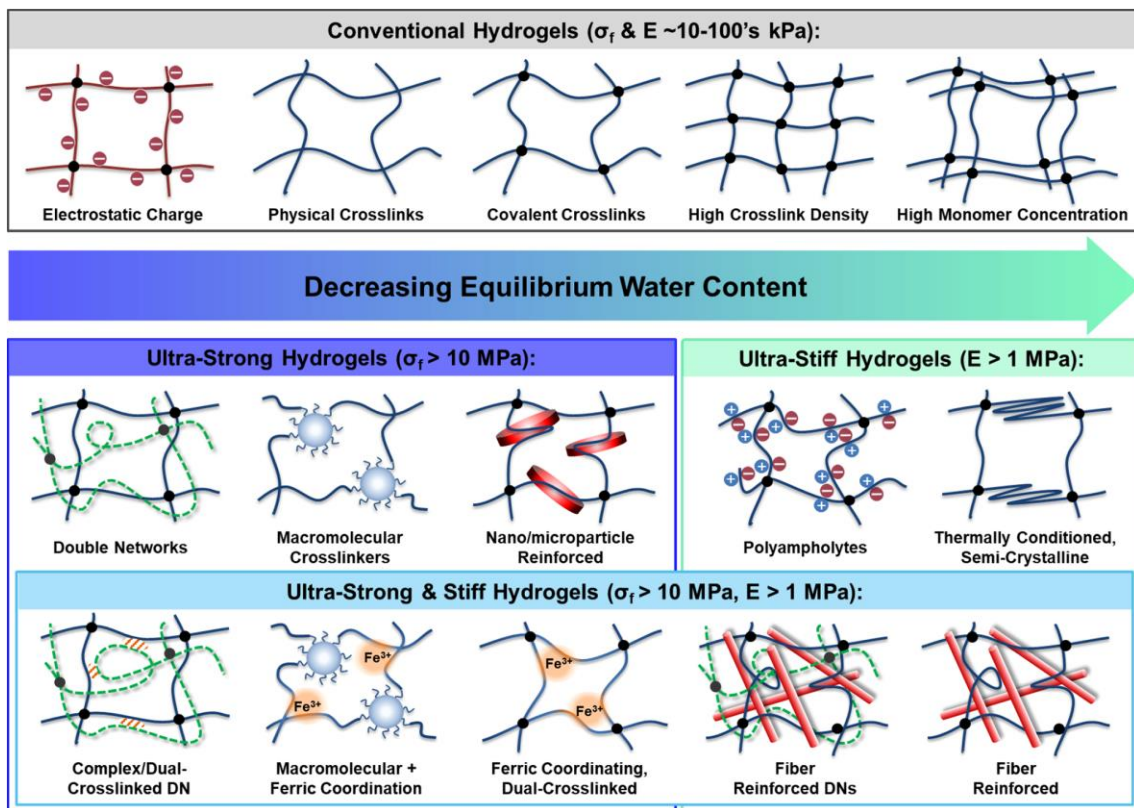


Figure I-21 - Classification des hydrogels en fonction de leur résistance à la rupture et de leur module d'Young¹⁵⁵

Les **hydrogels** ont été largement utilisés dans le domaine de la **médecine** régénératrice (cardiovasculaire, disque intervertébral, nerf, os, cartilage...) ^{46,151,154,156,157}. Dans la majorité des cas, les **hydrogels** par leur consistance et leur forte teneur en eau, possèdent une excellente **biocompatibilité** avec les cellules comme les tissus existants ^{46,145,146,157,158}. En conséquent, les hydrogels peuvent **mimer** les **tissus** ce qui est un atout considérable pour la mise au point de *scaffolds* en médecine régénérative ^{46,154,157}. La **formation de réseaux 3D** est

idéale pour fournir des micro-environnements pour l'adhésion, la prolifération et la migration des cellules¹⁴⁷. Pour cela, les **hydrogels** doivent répondre à différents **critères**, à savoir des propriétés mécaniques et de surface adaptées, une teneur en eau et une porosité contrôlées, être biocompatibles et dégradables^{45,46,159}. Ceci va moduler les différentes réponses mécaniques du *scaffold* et également le développement des cellules^{45,46}.

3.2.1 Les hydrogels d'origine naturelle utilisés en stéréolithographie pour la santé

Les polymères naturels, appelés biopolymères, sont issus de ressources naturelles (végétal ou animal). Leur origine naturelle leur confère d'excellentes propriétés biologiques. Cependant, leur utilisation en stéréolithographie est restreinte à cause de leur solubilité limitée, leurs masses molaires élevées et leurs forte dispersité.

3.2.1.1 Les polysaccharides

Les **polysaccharides** se composent d'un ensemble d'unités monosaccharidiques reliées entre elles par des liaisons glycosidiques. Ils sont de plus en plus utilisés pour leur activité biologique importante, leur grande capacité d'absorption d'eau et leurs différentes voies de modifications possibles^{160,161}. Ceux provenant de sources animales sont classiquement l'acide hyaluronique, la chondroïtine sulfate et le chitosan. Pour les sources végétales, ceux sont l'alginate, cellulose, dextran, la pectine et l'agarose¹⁶⁰⁻¹⁶⁵. Parmi la grande famille des polysaccharides, uniquement l'acide hyaluronique a été utilisé seul en stéréolithographie dans le biomédical^{166,167}. Le chitosan ou encore la cellulose ont été utilisés dans des résines de PEG (voir 3.2.2.1. L'homopolymère de PEG, p 59).

Dans la première étude sur l'acide hyaluronique, l'équipe de recherche a utilisé le biopolymère pour concevoir du cartilage artificiel *in vivo*. Dans un premier temps, l'acide hyaluronique a été modifié pour y ajouter des méthacrylates afin de pouvoir générer par stéréolithographie des dispositifs pour la réparation du ménisque (Figure I-22 (A)). Dans cette étude, l'utilisation de l'acide hyaluronique a permis de favoriser la formation de la matrice extracellulaire du cartilage et de récupérer le phénotype des chondrocytes (Figure I-22 (B))¹⁶⁶.

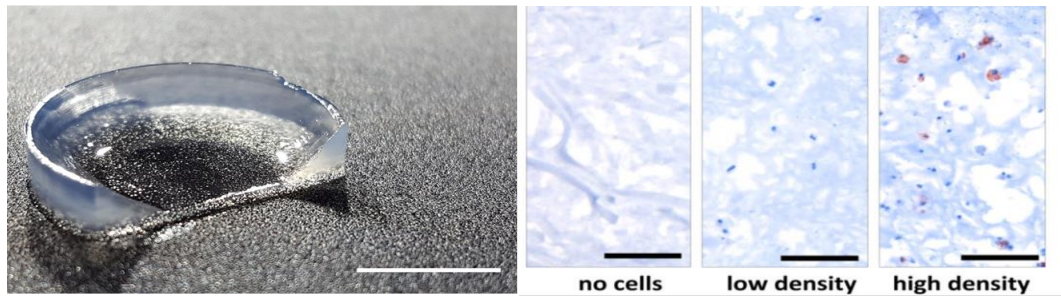


Figure I-22 – (A) Bioprinting d'une structure de la forme d'un ménisque avec de l'acide hyaluronique (B) Détection du collagène de type II spécifique au cartilage après 14 jours de culture avec la présence de protéoglycanes en rouge¹⁶⁶

Dans la seconde étude, des dispositifs à base d'acide hyaluronique et de gélatine ont été fabriqués dans le but de générer une porosité par dégradation sacrificielle. Ainsi, en changeant de bains de gélatine ou d'acide hyaluronique au cours de la construction, un dispositif multi-matériau a été conçu. La dégradation sélective par l'enzyme hyaluronidase a permis de sacrifier la construction à base d'acide hyaluronique ce qui a laissé place à une forme tubulaire reproduisant un vaisseau sanguin. Des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine ont étéensemencées pendant quatre semaines dans le dispositif (Figure I-23 (C)). Cette étude ouvre la voie à la réalisation de modèles 3D de tissus complexes voire organoïdes¹⁶⁷.

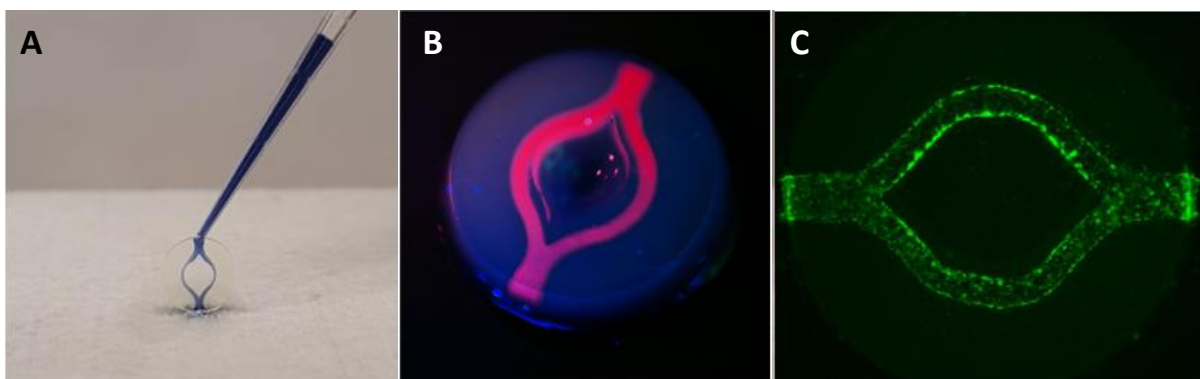


Figure I-23 – (A) Gros plans du modèle vasculaire imprimé en 3D et fabriqué en multi-matériaux. (B) Visualisation en microscopie optique du modèle vasculaire pour démontrer sa perfusion (C) Microscopie après « Live/Dead » traitement après 3 heures d'ensemencement¹⁶⁷

3.2.1.2 Les protéines et polypeptides

Les **protéines** sont essentiellement des polymères de hauts poids moléculaires, composés de motifs acides aminés reliés par des liaisons amide. Elles se présentent souvent sous forme de structures α ou β et font parties des matériaux les plus courants du corps humain^{160,161}. Les protéines sont déjà très utilisées en biomédecine du fait de leur importante activité biologique, leur grande capacité d'absorption d'eau et leurs différentes voies de modification^{160,161}. Les protéines les plus utilisées sont le collagène, la gélatine, la fibrine et l'albumine¹⁶⁰⁻¹⁶³.

Comme les polysaccharides, les protéines sont complexes à mettre en œuvre. De cela, uniquement la gélatine ressort dans la littérature comme protéine. Six études décrivent l'utilisation de la gélatine seule en stéréolithographie pour l'ingénierie tissulaire : (i) pour des applications sur la cornée oculaire ou le cerveau, qui sont des organes gorgés d'eau¹⁶⁸⁻¹⁷⁰, (ii) pour des applications en tant que guides de nerfs ou de vaisseaux sanguins, qui sont des tissus très souples¹⁷¹⁻¹⁷³. Sur l'ensemble des publications, la gélatine a été modifiée de la même manière avec des fonctions méthacrylate pour être utilisée avec le procédé de stéréolithographie et mis en solution de 10 à 20 % w/v à cause sa faible solubilité et forte viscosité. Des objets basiques tridimensionnels ont été obtenus par stéréolithographie (Figure I-24 (A) et (B))^{170,171}. Une excellente activité cellulaire a été observée avec différentes cellules (3T3 et NIH-3T3 fibroblastes, cellules PC-12, cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine et cellules stromales cornéennes humaines) sur les différentes architectures (Figure I-24 (C))¹⁷³. Les modules élastiques obtenus varient de 10 à 300 kPa avec des contraintes de 0,1 à 30 MPa et des déformations d'environ 40 à 60 %, valeurs comparables à celles décrites dans la littérature pour les tissus mous type muscle, vaisseau ou épithélial¹⁵⁵. Ces récentes études démontrent l'aspect prometteur de l'utilisation de protéines en stéréolithographie pour l'ingénierie tissulaire.

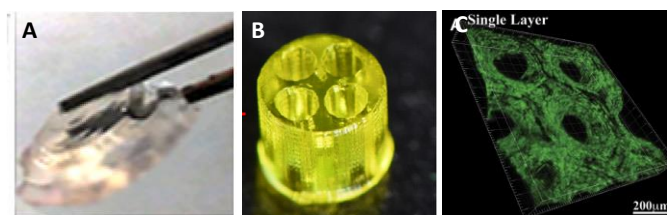


Figure I-24 - Fabrication d'architecture en 3D avec la gélatine pour (A) la cornée¹⁷⁰ ; (B) le guide de nerfs¹⁷¹ ; et (C) image en microscopie confocale après ensemencement après 4 jours dans un scaffold de gélatine¹⁷³

3.2.2 Les hydrogels de synthèse utilisés en stéréolithographie pour la santé

Les **polymères synthétiques** ont également été utilisés pour élaborer des **hydrogels**. Grâce à leur grande liberté d'architecture chimique, les hydrogels de synthèse sont beaucoup plus étudiés en stéréolithographie que les hydrogels naturels. De plus, les hydrogels de synthèse peuvent mener à des chaînes polymères plus courtes, amenant ainsi une meilleure solubilité, mais aussi à moduler les fonctions réactives afin de jouer sur la densité de réticulation. Les hydrogels de synthèse de référence sont ceux à base de PEG et ses copolymères. Cependant, en raison de sa nature bio-inerte, les hydrogels de PEG ne peuvent pas fournir l'environnement idéal pour assurer l'adhésion cellulaire et la formation de tissu. Il est donc nécessaire d'associer les polymères de synthèse afin d'optimiser leur utilisation en santé¹⁶².

3.2.2.1 L'homopolymère PEG

Le poly(éthylène glycol) **PEG** est de loin le plus utilisé des hydrogels¹⁶³. Il est reconnu pour sa biocompatibilité, ses caractères non-immunogénique et anti-fouling¹⁶²⁻¹⁶⁵. Le PEG a été largement décrit en stéréolithographie¹⁷⁴. Cependant, cette partie se limite à huit articles de la littérature. Dans ces études le PEG a été utilisé pour la conception de *scaffolds*^{78,175-177}, ou encore pour des applications de reconstruction de vaisseaux et de nerfs¹⁷⁸⁻¹⁸¹. Les propriétés mécaniques de l'hydrogel de PEG sont en dehors de ces études, mais d'autres travaux ont mis en évidence l'impact de la taille des PEG sur les propriétés mécaniques et de gonflement. Ainsi, plus le PEG est petit plus le réseau est dense avec une contrainte et un module d'Young importants et donc plus le matériau est fragile et le taux de gonflement diminue^{182,183}.

Les hydrogels de PEG ont, entre autres, été testés en reconstruction de cartilage¹⁷⁷. Des PEG courts de 575 g/mol ont été utilisés afin d'obtenir des propriétés mécaniques de 3 MPa en contrainte et 2 % de déformation, proche de celle de l'os. Des cellules souches mésenchymateuses ont proliféré avec succès sur ces *scaffolds*. D'autres types de PEG ont été étudiés (1 000 – 4 000 g/mol) afin de concevoir des *scaffolds* pour tissus mous^{78,175,176}. Dhariwala *et al.* ont été les premiers à réaliser l'ensemencement de cellules issues d'ovaires de hamster de Chine, dans des hydrogels de PEG par stéréolithographie¹⁷⁶. Arcaute *et al.*, ont utilisé des fibroblastes dermiques humaines. De plus, afin d'améliorer l'affinité avec les cellules, des tétrapeptides RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) ont été greffés à partir d'un PEG-

succinimidyl carboxyméthyl¹⁷⁵. Lin *et al.* ont poussé l'utilisation du PEG en stéréolithographie dans un objectif de *bioprinting*, en ensemençant des cellules souches adipeuses (hADSC) dans la résine, avant fabrication, en utilisant une longueur d'onde de 405 nm. Fait intéressant, la répartition cellulaire mesurée sur la bio-encre a été significativement supérieure à celle mesurée sur l'ensemencement de l'objet après fabrication qui, la plupart du temps, est uniquement de surface. De plus, la génération de porosité dans le *scaffold* a permis d'améliorer la viabilité cellulaire par rapport à un *scaffold* plein⁷⁸.

La forte capacité d'absorption d'eau et le côté mou du PEG ont principalement été utilisés pour de la reconstruction de tissus de type vaisseau sanguin et nerf¹⁷⁸⁻¹⁸¹. Dans un premier temps, des guides de nerfs ont été conçus avec un contrôle très fin de la définition (Figure I-25 (A))¹⁸⁰. Par la suite, le greffage de peptides RGD a permis d'améliorer significativement la viabilité cellulaire des fibroblastes dermiques humains incorporés directement dans la résine (Figure I-25 (B))¹⁷⁸. Enfin, en 2015, la même équipe a mené des études *in vivo* de guides de nerfs sur des rats de Sprague-Dawley (Figure I-25 (C))¹⁸¹. Ces travaux ont permis de mettre en évidence la possibilité d'utiliser le PEG en ingénierie tissulaire à partir de la stéréolithographie, mais pour autant le matériau souffre d'une bioadhésion limitée et d'une résistance mécanique faible. De ce constat, le PEG a été réalisé en copolymère ou encore mélangé avec des biopolymères.

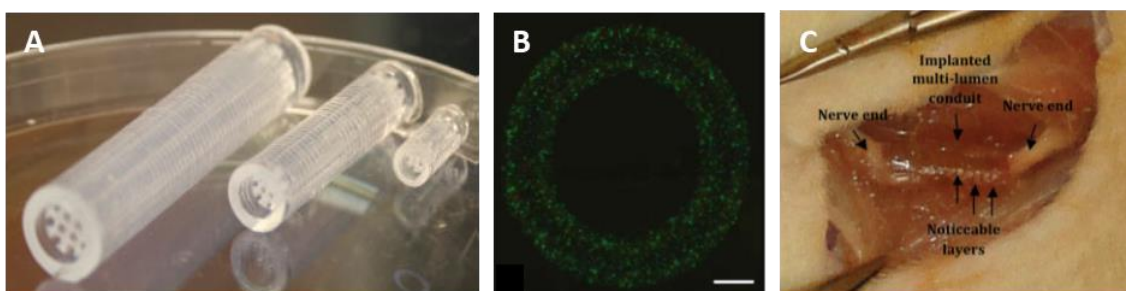


Figure I-25 - (A) guide de nerf de différentes tailles (50, 35, 15 mm) conçus en PEG par stéréolithographie¹⁸⁰ (B) microscopie confocale LIVE/DEAD de fibroblastes dermiques humains homogènement dispersées dans des hydrogels PEG¹⁷⁸ (C) Conduit de nerf implanté après 5 semaines¹⁸¹

Enfin, le développement des organoïdes apparaît comme une autre approche très prometteuse dans le domaine biomédical. Dans cette perspective, Grigoryan *et al.* ont réalisé des simulateurs de vascularisation organoïde (ex : poumon)¹⁸⁴. Leur travail se démarque des autres par la complexité des objets produits et surtout de leur réalité fonctionnelle. En effet, dans leur étude sur le poumon, le dispositif a permis un gonflement et un dégonflement à partir d'un flux d'air pour simuler la respiration (Figure I-26). Bien que leur étude se concentre sur la réalisation d'architectures, une partie démontre la bonne biocompatibilité du PEG *in vivo* avec des souris.

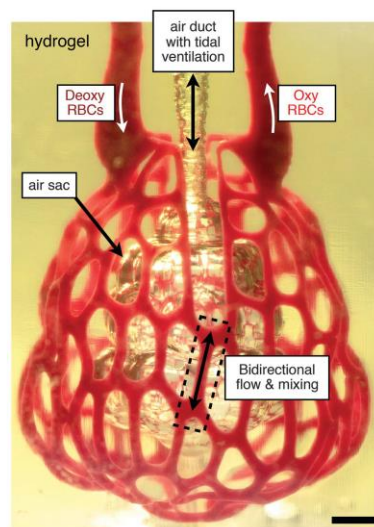


Figure I-26 - Photographie d'un hydrogel imprimé représentant une alvéole du poumon (barre d'échelle, 1 mm)¹⁸⁴

3.2.2.2 Les copolymères de PEG

Dans l'objectif d'améliorer les propriétés mécaniques du PEG, ce dernier a été copolymérisé avec des polymères hydrophobes biodégradables tels que PCL, PLA, PTMC pour générer des copolymères amphiphiles. Bien que la copolymérisation offre un champ immense de possibilités de structures chimiques, seulement cinq travaux ont été reportés avec la stéréolithographie¹⁸⁵⁻¹⁸⁹. Dans ce contexte, le PEG a servi de macro-amorceur pour de la ROP de TMC ou lactide¹⁸⁷⁻¹⁸⁹, ou encore pour la ROP de depsipeptide à partir de PEG étoiles (4 branches)¹⁸⁶. Enfin, une récente approche a mis en évidence la possibilité de générer des polyuréthanes à partir de PEG et PCL liés par du 1,6-diisocyanatohexane (HDI)¹⁸⁵.

Une autre possibilité pour améliorer la déformation du PEG est d'utiliser un co-monomère réactif. Ce dernier permet d'élargir le réseau et également d'apporter des liaisons hydrogène qui vont le renforcer. Lee *et al.* ont ajouté de l'acide acrylique¹⁹⁰ ou bien de l'acrylamide¹⁹¹ dans une résine de PEG pour concevoir des tubes vasculaires avec une plus grande déformation.

3.2.2.3 Le PEG et les biopolymères

Des résines pour stéréolithographie à base de PEG et de polymères naturels ont également été étudiées dans le but (i) d'améliorer l'adhésion cellulaire et (ii) de faciliter la fabrication des polymères naturels en structurant le réseau. Dans cet objectif, uniquement deux articles évoquent le greffage de PEG sur le collagène et la gélatine^{192,193}. Dans les deux cas, un PEG-succinimidyl carboxyméthyl a été greffé sur des macromolécules naturelles par le biais d'amine réactives. Cet ajout de PEG a permis de modifier les propriétés mécaniques de l'architecture finale tout en gardant une excellente bioactivité. Dans les deux papiers, des applications pour la reconstruction de cartilage ont été visées comme le ménisque ou même l'os avec des hydrogels. Ceci a été rendu possible grâce à l'utilisation des deux polymères. Néanmoins, la majeure partie des études menées sur le PEG et les biopolymères en stéréolithographie sont des mélanges. A titre d'exemple, Palaganas *et al.* ont ajouté des nanocristaux de cellulose pour renforcer le PEG¹⁹⁴. Zhou *et al.* ont mélangé le PEG à la gélatine afin de promouvoir l'adhésion cellulaire^{195,196}. Le chitosan a également été inséré avec du PEG pour sa réponse biologique, mécanique et stimuable¹⁹⁷⁻²⁰⁰.

3.2.2.4 Autres polymères synthétiques hydrophiles

De manière plus anecdotique, d'autres types de polymères hydrophiles ont également été étudiés en stéréolithographie comme le PVA et la PCL avec de la gélatine^{201,202}. Dans le travail de Lim *et al.*, des résines de PVA/Gélatine ont permis de générer des structures poreuses avec une haute définition des motifs complexes de type gyroïdique (Figure I-27 (A-D)). Des cellules souches mésenchymateuses ont été introduites dans la résine pour étudier la viabilité cellulaire. Il en ressort que la gélatine permet nettement d'améliorer la densité cellulaire. De

plus, ils ont pu mettre en avant une différenciation chondrogénique et ostéogénique qui indique un potentiel prometteur pour l'ingénierie tissulaire²⁰¹.

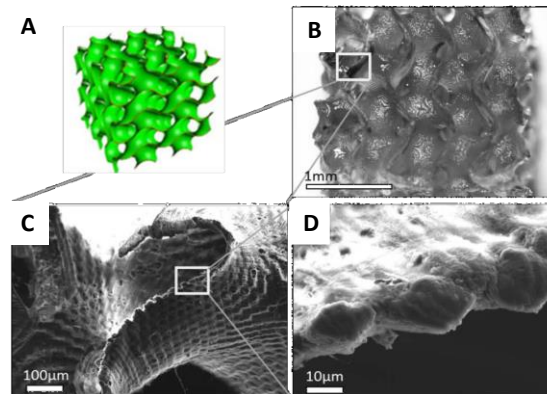


Figure I-27 - (A) STL du scaffold à porosité gyroïdique (B) microscopie optique du scaffold (C, D) microscopie électronique à balayage²⁰¹

Enfin, des *scaffolds* hybrides à base de PCL et de gélatine ont été développés. La forte viscosité de la gélatine rend très complexe son utilisation seule en stéréolithographie. Ainsi, le mélange PCL/gélatine a permis d'utiliser des taux élevés de gélatine dans la résine tout en contrôlant la définition de la fabrication. Cet ajout de biopolymère dérivé de la matrice extracellulaire permet d'améliorer la viabilité cellulaire à plus de 7 jours²⁰².

4 Evolution de la fabrication 3D vers de l'impression 4D

4.1 Définition de la fabrication additive 4D

L'évolution considérable de la fabrication additive 3D, aussi bien sur les matériaux que sur le procédé, a donné naissance à une nouvelle technologie connue sous le nom d'impression 4D. Pour concevoir un élément en impression 4D, il faut avoir recours à l'impression 3D en utilisant un matériau réagissant à une stimulation. L'objet passe par deux stades différents (passif-actif) sous l'effet de cette stimulation²⁰³. Les stimuli externes sont le plus souvent la température, l'hydratation, le champ magnétique... (Figure I-28)²⁰⁴. Cette innovation provient du fait que l'impression 3D considère les objets comme statiques et inanimés sans tenir compte de l'environnement extérieur. La 4D tient compte de cet environnement et ouvre d'autres perspectives avec des objets dynamiques²⁰⁴.

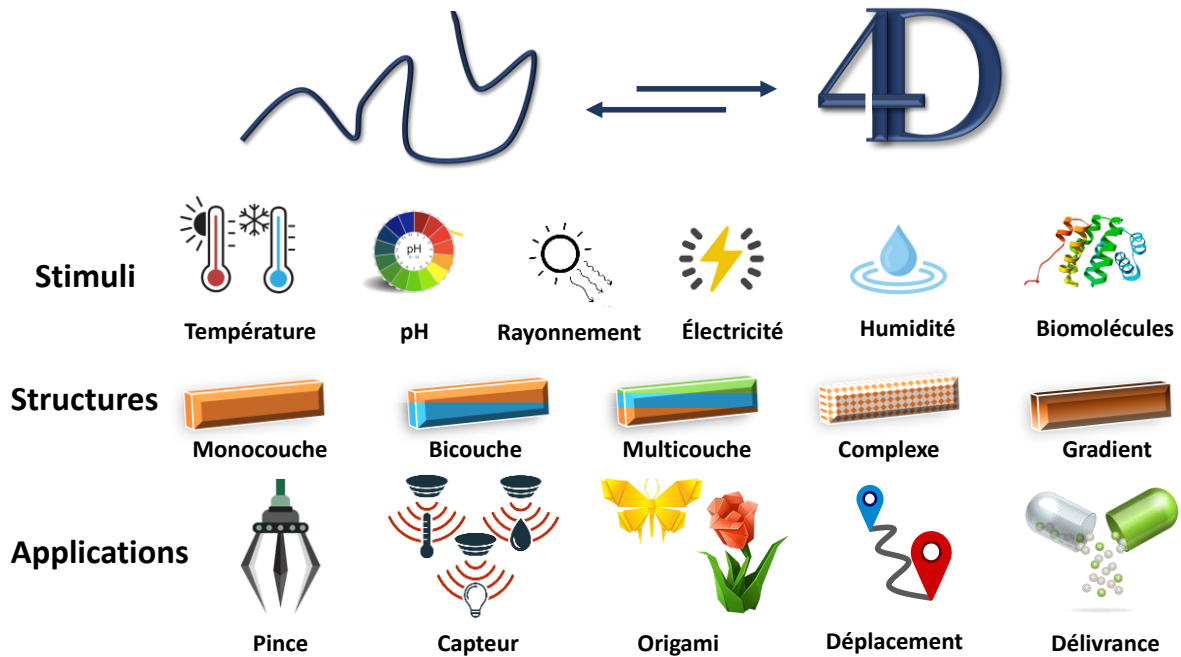


Figure I-28 - Résumé schématique des facteurs et applications de la fabrication 4D

En fabrication additive 4D, il est possible d'identifier différentes déformations d'objets comme le pliage, la courbure, la torsion, l'enroulement ou l'extension/contraction²⁰³. Ces modifications spatiales peuvent se classer en trois catégories :

- Les changements d'état de surface

La modification de surface s'exprime par le passage d'un plan plat à des déformations localisées de cette surface. Ces changements proviennent d'un décalage de contraintes locales. Par exemple, la Figure I-29 (A) montre un objet avec une alternance de matériaux hydrophobe et hydrophile qui par gonflement passe d'une surface plane à déformée (gonflée) en induisant un effet de vagues. Différentes formes ont pu être obtenues de cette façon allant de formes sinusoïdales (plissements ou vagues) à des délaminations (« cheveux »).

- Le pliage de structures

Les déformations sous forme de pliage (courbe, angle, torsion) sont principalement réalisées par l'utilisation de multi-matériaux avec des matériaux actifs/passifs face aux stimuli. A titre d'exemple, l'utilisation de matériaux bicouches entre un matériau hydrophile et un autre hydrophobe, va induire une courbure par hydratation différenciée. Il est également possible de générer des déformations de pliage avec les matériaux à mémoire de forme. Après l'avoir

déformé au préalable, ce dernier peut en fonction de la température se plier ou déplier. La Figure I-29 (B) montre le passage de cercles à losanges sous la température.

- L'expansion et/ou la contraction d'objets

Le changement de morphologie par expansion/contraction va induire une différence de taille de l'objet après stimulation. Par exemple, un objet hydrophile, sous l'action de l'humidité, va absorber de l'eau et gonfler. Ce qui par conséquent va générer une différence de taille de la structure. Un autre exemple, montré en Figure I-29 (C), utilise la température pour faire varier la dimension de l'objet avec la LCST. L'objet à température supérieure éjecte l'eau de son réseau induisant une réduction du volume.

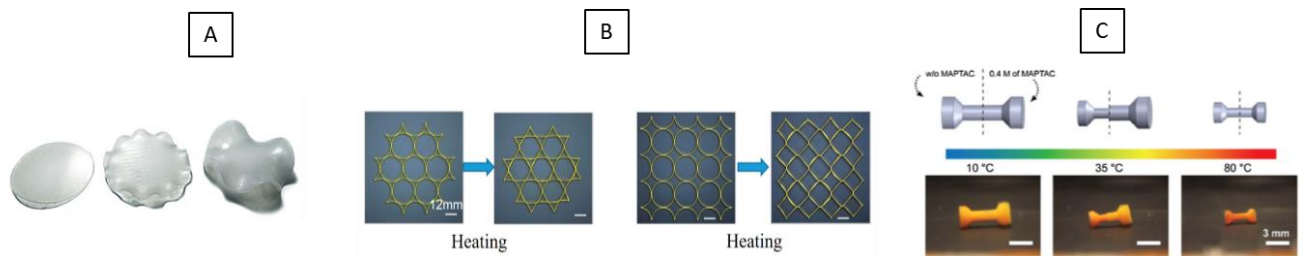


Figure I-29 - Exemple de déformations à la suite de stimulus (A) de surface (B) de pliage et (C) de contraction

4.2 Les stimulations externes envisageables en fabrication additive 4D

4.2.1 La température

La température est le stimulus le plus fréquemment utilisé pour générer une déformation aux objets 3D. Les matériaux thermosensibles ont la capacité de changer de forme sous l'effet de la température^{204,205}. L'effet de mémoire de forme est souvent recherché. Cette stimulation thermique peut être provoquée par deux types de mécanismes :

- Les polymères à **LCST** (« Lower Critical Solution Temperature ») ou **UCST** (« Upper Critical Solution Temperature ») ont la capacité de se rétracter ou gonfler en fonction d'une température caractéristique de transition²⁰⁴. Cette température seuil provoque un changement d'état qui est dû à la perte d'affinité solvant-polymère au profit des interactions polymère-polymère,

- Les polymères **réticulés à basse Tf ou haute Tg**, ont cette capacité de changement de forme réversible. Ces types de polymères sont traditionnellement constitués à la fois (i) d'un réseau réticulé qui stabilise la forme permanente et (ii) d'une phase réversible qui représente l'état temporaire et permettra d'apporter le mouvement (Figure I-30)^{206,207}.

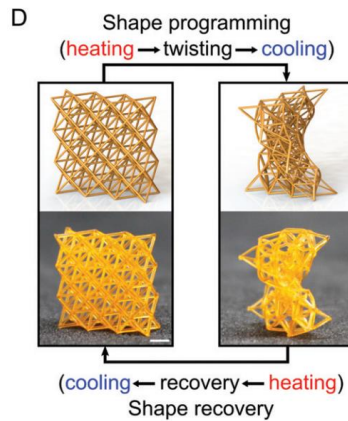


Figure I-30 - Exemple de déformations réversibles de mémoire de forme par action de la température sur des objets conçus en fabrication additive²⁰⁸

4.2.2 La solvatation

La solvatation, principalement dans l'eau, peut influencer les structures 3D. Typiquement, les polymères hydrophiles créés des liaisons hydrogène avec l'eau qui modifient le réseau et provoquent un gonflement du matériau. Cette déformation peut être modulée par la cinétique de gonflement ou la capacité d'absorption totale (Figure I-31). A l'inverse, la déshydratation va générer une rétractation du matériau²⁰⁴⁻²⁰⁷.

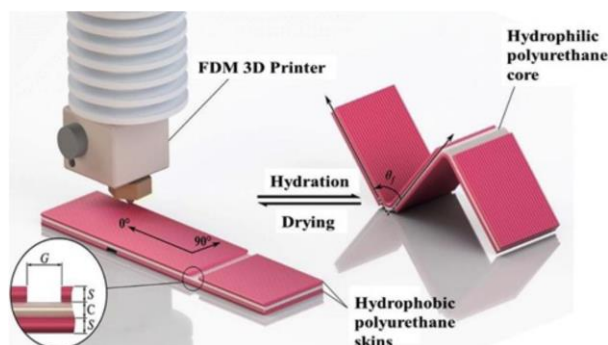


Figure I-31 - Exemple de déformation réversible type pliage par action d'un solvant, ici l'eau²⁰⁷

4.2.3 Le pH

Le pH est également une stimulation très étudiée qui peut apporter un changement de comportement d'un objet. Ce comportement est essentiellement dû à la rupture de liaisons hydrogène ou ioniques entre des groupements caractéristiques (alcool, acide carboxylique, amine...). Ainsi, les chaînes de polymères peuvent se lier ou se dissocier et provoquer un mouvement de l'objet par gonflement ou assouplissement du matériau^{205,209}.

4.2.4 Les rayonnements

L'activation par la lumière à ses différentes longueurs d'ondes (NIR, UV, visible) permet d'induire des pliages. Dans ce cas-là, des composés sensibles aux rayonnements type chromophores, cristaux liquides ou nanotube de carbone sont utilisés. Ces derniers sous sollicitation lumineuse réagissent en devenant hydrophile/hydrophobe, en changeant de morphologie ou en transformant l'énergie en chaleur. Par exemple, la Figure I-32 montre la possibilité de plier dans un sens ou dans l'autre suivant un chauffage sélectif dépendant de la longueur d'onde^{205,206}.

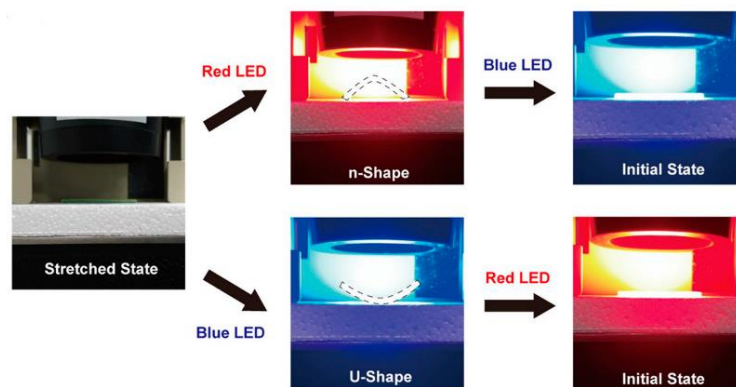


Figure I-32 -Exemple de déformation réversible type pliage par action de rayonnement²¹⁰

4.2.5 L'électricité

Les polymères électriquement stimulables ont également fait l'objet d'études en impression 4D. Au même titre que le rayonnement, des éléments comme les nanotubes de carbone sont incorporés dans les résines pour répondre à un champ électrique et générer de la chaleur. Le contrôle de l'amplitude des impulsions électriques peut permettre une déformation progressive et la reproduction d'un comportement musculaire. Une autre possibilité est

d'utiliser un polymère ionique pour construire l'objet. Cependant, cette voie est très peu décrite car elle nécessite l'immersion de l'objet dans un liquide^{209,210}.

4.2.6 Un champ magnétique

Récemment des composites ont été réalisés à partir de nanoparticules métalliques introduites dans une matrice polymère. Généralement des nanoparticules de Fe_3O_4 sont utilisées et permettent de rendre la structure sensible à un champ magnétique. Les nanoparticules peuvent convertir l'énergie magnétique en énergie thermique ce qui sur un matériau à mémoire de forme donnera l'énergie nécessaire pour changer de forme. Comme sur la Figure I-33, les objets peuvent aussi être actionnés par le champ magnétique et induire un déplacement^{205,206,209}.



Figure I-33 - Mouvement d'un objet sous l'action d'un stimulus magnétique²⁰⁵

4.3 L'ensemble des applications de la fabrication additive 4D

La fabrication additive 4D trouve sa place dans des applications similaires à l'impression 3D avec cette dimension en plus qui ouvre le champ à de nouvelles propriétés. Dans le domaine **biomédical**^{203-205,209}, les dispositifs 4D sont principalement utilisés comme **stent** (ex Figure I-34), dispositif qui est contracté, en amont de l'intervention chirurgicale, pour faciliter son introduction au sein de l'artère et qui va *in situ* se déployer aux dimensions de l'organe une fois la température du corps humain atteint²⁰⁶.

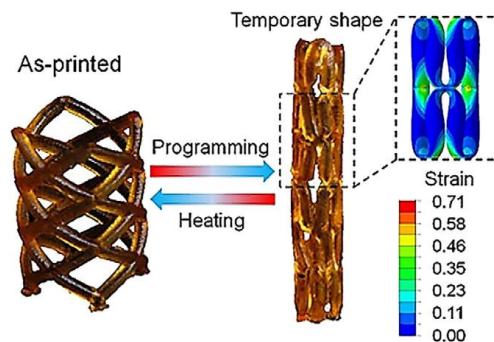


Figure I-34 - Exemple de stent déformable avec la température afin de faciliter la mise en place lors d'une intervention chirurgicale²⁰³

Dans l'**espace**, ce fonctionnement de réponse à un stimulus est très convoité dans un objectif de gain de place. Cette technologie permet de simplifier le déploiement de l'objet, car ceci va s'effectuer sans étape de montage mais par auto-réaction de l'objet. Cette technique est adaptée sur les satellites²⁰⁶.

En **robotique**, cette innovation a permis de rendre possible des mouvements complexes, impossible à réaliser auparavant. Suivant le type de stimulus et l'enchaînement des réponses, il est envisageable de générer une imitation de muscle. Des robots mini-invasifs peuvent également être conçus pour se déplacer et délivrer un principe actif localisé. Toujours en robotique, des structures ont été réalisées pour s'adapter à la topologie des fonds marins et ainsi n'engendrer aucune destruction du milieu lors de son passage. Des systèmes de pinces sont fabriqués pour fonctionner dans des milieux compliqués où l'homme est peu agile comme c'est le cas dans l'espace (Figure I-35)^{203,205,206,209}.

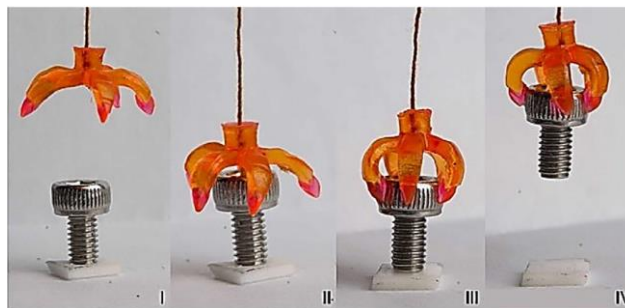


Figure I-35 - Applications en robotique avec l'utilisation de pince réversible²⁰³

5 Conclusion

La **fabrication additive 3D** a révolutionné la conception d'objets polymères et permis des avancées importantes dans le domaine de la santé. Elle permet entre autres la fabrication d'objets complexes avec des porosités contrôlées, connus sous le nom de *scaffolds*. Elle est de fait devenue un outil indispensable en ingénierie tissulaire. Parmi les procédés de fabrication additive, la **stéréolithographie** permet d'atteindre de hautes résolutions avec des temps d'impression courts et l'utilisation de faibles volumes de matière qui en outre est recyclable. Une large variété de matériaux a déjà été utilisée en stéréolithographie pour des applications en santé. Les polymères type polyester ont de loin été les plus décrits dans la littérature. Cependant, le caractère hydrophobe de ces derniers limite leur utilisation biologique. Les **hydrogels** ont été décrits comme les matériaux les plus proches des tissus grâce à leur forte absorption d'eau mais ceux-ci souffrent souvent de difficultés de mise en œuvre ou de tenue mécanique. La littérature révèle un manque d'hydrogels optimisés. Les biopolymères ont rarement été associés à des polymères de synthèse pour améliorer leur résistance ou leur déformation ce qui justifie l'étude d'hydrogels hybrides dans le **chapitre 2**. Concernant les hydrogels à base de polymères synthétiques, ils sont essentiellement en PEG, polymère qui a de nombreux avantages mais quelques limitations justifiant le **chapitre 3** où des polymères alternatifs seront développés. Enfin, l'association de polymères stimulables au procédé de stéréolithographie a permis l'extension de l'impression 3D à l'**impression 4D** comme cela est illustré dans le **chapitre 4** avec des hydrogels thermosensibles.

6 Références

1. Ligon, S. C., Liska, R., Stampfl, J., Gurr, M., Mülhaupt, R. Polymers for 3D Printing and Customized Additive Manufacturing. *Chem. Rev.* **117**, 10212–10290 (2017).
2. Gao, W., Zhang, Y., Ramanujan, D., Ramani, K., Chen, Y., Williams, C. B., Wang, C. C.L., Shin, Y. C., Zhang, S., Zavattieri, P. D. The status, challenges, and future of additive manufacturing in engineering. *CAD Comput. Aided Des.* **69**, 65–89 (2015).
3. Murphy, S. V., Atala, A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.* **32**, 773–785 (2014).
4. Bose, S., Vahabzadeh, S., Bandyopadhyay, A. Bone tissue engineering using 3D printing. *Mater. Today* **16**, 496–504 (2013).
5. Roseti, L., Parisi, V., Petretta, M., Cavallo, C., Desando, G., Bartolotti, I., Grigolo, B. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Mater. Sci. Eng. C* **78**, 1246–1262 (2017).
6. Melchels, F. P. W., Feijen, J., Grijpma, D. W. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials* **31**, 6121–6130 (2010).
7. Grimm, T. *User's Guide to Rapid Prototyping*. (2004).
8. Yan, C., Jiang, P., Jia, X., Wang, X. 3D printing of bioinspired textured surfaces with superamphiphobicity. *Nanoscale* **12**, 2924–2938 (2020).
9. Stansbury, J. W., Idacavage, M. J. 3D printing with polymers: Challenges among expanding options and opportunities. *Dent. Mater.* **32**, 54–64 (2016).
10. Wallin, T. J., Pikul, J., Shepherd, R. F. 3D printing of soft robotic systems. *Nat. Rev. Mater.* **3**, 84–100 (2018).
11. Tappa, K., Jammalamadaka, U. Novel biomaterials used in medical 3D printing techniques. *J. Funct. Biomater.* **9**, (2018).
12. Zhou, L. Y., Fu, J., He, Y. A Review of 3D Printing Technologies for Soft Polymer Materials. *Adv. Funct. Mater.* **30**, 1–38 (2020).
13. Ngo, T. D., Kashani, A., Imbalzano, G., Nguyen, K. T. Q., Hui, D. Additive manufacturing (3D printing): A review of materials, methods, applications and challenges. *Composites Part B: Engineering.* **143**, 172–196 (2018).
14. Wang, X., Jiang, M., Zhou, Z., Gou, J., Hui, D. 3D printing of polymer matrix composites: A review and prospective. *Composites Part B: Engineering.* **110**, 442–458 (2017).
15. Lee, J. Y., An, J., Chua, C. K. Fundamentals and applications of 3D printing for novel materials. *Appl. Mater. Today.* **7**, 120–133 (2017).
16. Goh, G. D., Yap, Y. L., Agarwala, S., Yeong, W. Y. Recent Progress in Additive Manufacturing of Fiber Reinforced Polymer Composite. *Adv. Mater. Technol.* **4**, 1–22 (2019).
17. Bracaglia, L. G., Smith, B. T., Watson, E., Arumugasaamy, N., Mikos, A. G., Fisher, J. P. 3D printing for the design and fabrication of polymer-based gradient scaffolds. *Acta Biomater.* **56**, 3–13 (2017).
18. González-Henríquez, C. M., Sarabia-Vallejos, M. A., Rodríguez-Hernandez, J. Polymers for additive manufacturing and 4D-printing: Materials, methodologies, and biomedical applications. *Progress in Polymer Science.* **94**, 57–116 (2019).
19. Ahn, C. B., Kim, Y., Park, S. J., Hwang, Y., Lee, J. W. Development of arginine-glycine-aspartate-immobilized 3D printed poly(propylene fumarate) scaffolds for cartilage tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **29**, 917–931 (2018).
20. Kumar, L. J., Krishnadas Nair, C. G. Current Trends of Additive Manufacturing in the Aerospace Industry. (eds) *Adv. 3D Print. Addit. Manuf. Technol.* 39–54 (Springer, 2017).
21. Liu, R., Wang, Z., Sparks, T., Liou, F., Newkirk, J. *Aerospace applications of laser additive manufacturing. Laser Additive Manufacturing: Materials, Design, Technologies, and Applications* (Elsevier Ltd, 2017).
22. Schiller, G. J. Additive manufacturing for Aerospace. *IEEE Aerosp. Conf. Proc.* (2015).
23. Nickels, L. AM and aerospace: An ideal combination. *Met. Powder Rep.* **70**, 300–303 (2015).
24. Bandyopadhyay, A., Heer, B. Additive manufacturing of multi-material structures. *Materials Science and Engineering R: Reports.* **129**, 1–16 (2018).
25. Yuan, S., Shen, F., Chua, C. K., Zhou, K. Polymeric composites for powder-based additive manufacturing: Materials and applications. *Progress in Polymer Science* vol. 91 141–168 (2019).
26. Dawood, A., Marti, B. M., Sauret-Jackson, V., Darwood, A. 3D printing in dentistry. *Br. Dent. J.* **219**, 521–529 (2015).
27. Roohani-Esfahani, S. I., Newman, P., Zreiqat, H. Design and Fabrication of 3D printed Scaffolds with a Mechanical Strength Comparable to Cortical Bone to Repair Large Bone Defects. *Sci. Rep.* **6**, 1–8 (2016).

28. Han, X., Yang, D., Yang, C., Spintzyk, S., Scheideler, L., Li, P., Li, D., Geis-Gerstorfer, J., Rupp, F. Carbon Fiber Reinforced PEEK Composites Based on 3D-Printing Technology for Orthopedic and Dental Applications. *J. Clin. Med.* **8**, 240 (2019).
29. Barazanchi, A., Li, K. C., Al-Amleh, B., Lyons, K., Waddell, J. N. Additive Technology: Update on Current Materials and Applications in Dentistry. *J. Prosthodont.* **26**, 156–163 (2017).
30. Tahayeri, A., Morgan, M., Fugolin, A. P., Bompolaki, D., Athirasala, A., Pfeifer, C. S., Ferracane, J. L., Bertassoni, L. E. 3D printed versus conventionally cured provisional crown and bridge dental materials. *Dent. Mater.* **34**, 192–200 (2018).
31. Giannatsis, J., Dedoussis, V. Additive fabrication technologies applied to medicine and health care: A review. *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* **40**, 116–127 (2009).
32. Mchenamin, P. G., Quayle, M. R., Mchenry, C. R., Adams, J. W. The production of anatomical teaching resources using three-dimensional (3D) printing technology. *Anat. Sci. Educ.* **7**, 479–486 (2014).
33. Chae, M. P., Rozen, W. M., McMenamin, P. G., Findlay, M.W., Spychal, R. T., Hunter-Smith, D. J. Emerging Applications of Bedside 3D Printing in Plastic Surgery. *Front. Surg.* **2**, 1–14 (2015).
34. Salmi, M., Paloheimo, K. S., Tuomi, J., Wolff, J., Mäkitie, A. Accuracy of medical models made by additive manufacturing (rapid manufacturing). *J. Cranio-Maxillofacial Surg.* **41**, 603–609 (2013).
35. Almoatazbellah, Y., Scott J, H., PaulD, D. Additive manufacturing of polymer melts for implantable medical devices and scaffolds. *Biofabrication* **9**, 012002 (2017).
36. Chen, Y., Li, W., Zhang, C., Wu, Z., Liu, J. Recent Developments of Biomaterials for Additive Manufacturing of Bone Scaffolds. *Adv. Healthc. Mater.* **9**, 1–28 (2020).
37. Elahinia, M. H., Hashemi, M., Tabesh, M., Bhaduri, S. B. Manufacturing and processing of NiTi implants: A review. *Prog. Mater. Sci.* **57**, 911–946 (2012).
38. Fukuda, H. Additive Manufacturing Technology for Orthopedic Implants. (eds) *Advances in Metallic Biomaterials.* **4**, 3–26 (Springer, 2015).
39. Wang, X., Xu, S., Zhou, S., Xu, W., Leary, M., Choong, P., Qian, M., Brandt, M., Xie, Y. M. Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review. *Biomaterials.* **83**, 127–141 (2016).
40. Yáñez, A., Cuadrado, A., Martel, O., Afonso, H., Monopoli, D. Gyroid porous titanium structures: A versatile solution to be used as scaffolds in bone defect reconstruction. *Mater. Des.* **140**, 21–29 (2018).
41. Corona-Castuera, J., Rodriguez-Delgado, D., Henao, J., Castro-Sandoval, J. C., Poblano-Salas, C. A. Design and Fabrication of a Customized Partial Hip Prosthesis Employing CT-Scan Data and Lattice Porous Structures. *ACS Omega* **6**, 6902–6913 (2021).
42. Kang, J., Zhang, J., Zheng, J., Wang, L., Li, D., Liu, S. 3D-printed PEEK implant for mandibular defects repair - a new method. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **116**, 104335 (2021).
43. Haleem, A., Javaid, M. Polyether ether ketone (PEEK) and its 3D printed implants applications in medical field: An overview. *Clin. Epidemiol. Glob. Heal.* **7**, 571–577 (2019).
44. Honigmann, P., Sharma, N., Okolo, B., Popp, U., Msallem, B., Thieringer, F. M. Patient-specific surgical implants made of 3D printed PEEK: Material, technology, and scope of surgical application. *Biomed Res. Int.* **2018**, 4520636 (2018).
45. Lee, K. Y., Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering. *Chem. Rev.* **101**, 1869–1879 (2001).
46. Slaughter, B. V., Khurshid, S. S., Fisher, O. Z., Khademhosseini, A., Peppas, N. A. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv. Mater.* **21**, 3307–3329 (2009).
47. Schuurman, W., Levett, P. A., Pot, M. W., van Weeren, P. R., Dhert, W. J., Hutmacher, D. W., Melchels, F. P., Klein, T. J., Malda, J. Gelatin-methacrylamide hydrogels as potential biomaterials for fabrication of tissue-engineered cartilage constructs. *Macromol. Biosci.* **13**, 551–561 (2013).
48. Vert Michel, Christel Pascal, Chabot François, Leray Jean. *Bioresorbable Plastic Materials for Bone Surgery.* (CRC Press, 1984).
49. Mondschein, R. J., Kanitkar, A., Williams, C. B., Verbridge, S. S., Long, T. E. Polymer structure-property requirements for stereolithographic 3D printing of soft tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* **140**, 170–188 (2017).
50. Khalil, H. P. S. A., Jummaat, F., Yahya, E. B., Olaiya, N. G., Adnan, A. S., Abdat, M., Nasir, N. A. M., Halim, A. S., Kumar, U. S. U., Bairwan, R., Suriani, A. B. A review on micro- to nanocellulose biopolymer scaffold forming for tissue engineering applications. *Polymers.* **12**, 1–36 (2020).
51. Chartrain, N. A., Williams, C. B., Whittington, A. R. A review on fabricating tissue scaffolds using vat photopolymerization. *Acta Biomater.* **74**, 90–111 (2018).
52. Bikas, H., Stavropoulos, P., Chryssoulouris, G. Additive manufacturing methods and modeling approaches:

- A critical review. *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* **83**, 389–405 (2016).
53. Xia, C., Fang, N. Fully three-dimensional microfabrication with a grayscale polymeric self-sacrificial structure. *J. Micromechanics Microengineering* **19**, 115029 (2009).
 54. Emami, M. M., Barazandeh, F., Yaghmaie, F. Scanning-projection based stereolithography: Method and structure. *Sensors Actuators, A Phys.* **218**, 116–124 (2014).
 55. Lee, M. P., Cooper, G. J., Hinkley, T., Gibson, G. M., Padgett, M. J., Cronin, L. Development of a 3D printer using scanning projection stereolithography. *Sci. Rep.* **5**, 9875 (2015).
 56. Sun, C., Fang, N., Wu, D. M., Zhang, X. Projection micro-stereolithography using digital micro-mirror dynamic mask. *Sensors Actuators, A Phys.* **121**, 113–120 (2005).
 57. Tumbleston, J. R., Shirvanyants, D., Ermoshkin, N., Janusiewicz, R., Johnson, A. R., Kelly, D., Chen, K., Pinschmidt, R., Rolland, J. P., Ermoshkin, A., Samulski, E. T., Desimone, J. M. Continuous liquid interface of 3D objects. *Science*. **347**, 1349–1352 (2015).
 58. Loterie, D., Delrot, P., Moser, C. High-resolution tomographic volumetric additive manufacturing. *Nat. Commun.* **11**, 1–6 (2020).
 59. Kelly, B. E., Bhattacharya, I., Heidari, H., Shusteff, M., Spadaccini, C. M., Taylor, H. K. Volumetric additive manufacturing via tomographic reconstruction. *Science*. **363**, 1075–1079 (2019).
 60. Loterie, D., Delrot, P., Moser, C. VOLUMETRIC 3D PRINTING OF ELASTOMERS BY TOMOGRAPHIC BACK-PROJECTION A PREPRINT. (2018).
 61. Pham, D. T., Ji, C. Design for stereolithography. *Proc. Inst. Mech. Eng. Part C J. Mech. Eng.* **214**, 635–640 (2000).
 62. Chia, H. N., Wu, B. M. Recent advances in 3D printing of biomaterials. *J. Biol. Eng.* **9**, 1–14 (2015).
 63. Jacobs, P. F. Rapid prototyping, manufacturing— Fundamentals of stereolithography. *J. Manuf. Syst.* **12**, 430–433 (1993).
 64. Paul F. Jacobs. *Fundamentals of stereolithography*. (1992).
 65. Bennett, J. Measuring UV curing parameters of commercial photopolymers used in additive manufacturing. *Addit. Manuf.* **18**, 203–212 (2017).
 66. Chartrain, N. A., Williams, C. B., Whittington, A. R. A review on fabricating tissue scaffolds using vat photopolymerization. *Acta Biomater.* **74**, 90–111 (2018).
 67. Sirrine, J. M., Meenakshisundaram, V., Moon, N. G., Scott, P. J., Mondschein, R. J., Weiseman, T. F., Williams, C. B., Long, T. E. Functional siloxanes with photo-activated, simultaneous chain extension and crosslinking for lithography-based 3D printing. *Polymer (Guildf)*. **152**, 25–34 (2018).
 68. Hegde, M., Meenakshisundaram, V., Chartrain, N., Sekhar, S., Tafti, D., Williams, C. B., Long, T. E. 3D Printing All-Aromatic Polyimides using Mask-Projection Stereolithography: Processing the Nonprocessable. *Adv. Mater.* **29**, 1–7 (2017).
 69. Yue, J., Zhao, P., Gerasimov, J. Y., van de Lagemat, M., Grotenhuis, A., Rustema-Abbing, M., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., Herrmann, A., Ren, Y. 3D-Printable Antimicrobial Composite Resins. *Adv. Funct. Mater.* **25**, 6756–6767 (2015).
 70. Jansen, J., Melchels, F. P. W., Grijpma, D. W., Feijen, J. Fumaric acid monoethyl ester-functionalized poly(D,L-Lactide)/N-vinyl-2-pyrrolidone Resins for the preparation of tissue engineering scaffolds by stereolithography. *Biomacromolecules* **10**, 214–220 (2009).
 71. Bagheri, A., Jin, J. Photopolymerization in 3D Printing. *ACS Appl. Polym. Mater.* **1**, 593–611 (2019).
 72. Zhang, Y., Xu, Y., Simon-Masseron, A., Lalevée, J. Radical photoinitiation with LEDs and applications in the 3D printing of composites. *Chem. Soc. Rev.* **50**, 3824–3841 (2021).
 73. You, S., Miller, K., Chen, S., Microstereolithography, in *Biofabrication and 3D Tissue Modeling*, **1**, 1-21 (2019).
 74. Pereira, R. F., Bártolo, P. J. 3D Photo-Fabrication for Tissue Engineering and Drug Delivery. *Engineering* **1**, 090–112 (2015).
 75. Ligon-Auer, S. C., Schwentenwein, M., Gorsche, C., Stampfl, J., Liska, R. Toughening of photo-curable polymer networks: A review. *Polym. Chem.* **7**, 257–286 (2016).
 76. Ahn, D., Stevens, L. M., Zhou, K., Page, Z. A. Rapid High-Resolution Visible Light 3D Printing. *ACS Cent. Sci.* **6**, 1555–1563 (2020).
 77. Chan, V., Zorlutuna, P., Jeong, J. H., Kong, H., Bashir, R. Three-dimensional photopatterning of hydrogels using stereolithography for long-term cell encapsulation. *Lab Chip* **10**, 2062–2070 (2010).
 78. Lin, H., Zhang, D., Alexander, P. G., Yang, G., Tan, J., Cheng, A. W., Tuan, R. S. Application of visible light-based projection stereolithography for live cell-scaffold fabrication with designed architecture. *Biomaterials* **34**, 331–339 (2013).

79. Abdallah, M., Hijazi, A., Graff, B., Fouassier, J. P., Rodeghiero, G., Gualandi, A., Dumur, F., Giorgio Cozzi, P., Lalevée, J. Coumarin derivatives as versatile photoinitiators for 3D printing, polymerization in water and photocomposite synthesis. *Polym. Chem.* **10**, 872–884 (2019).
80. Abdallah, M., Dumur, F., Hijazi, A., Rodeghiero, G., Gualandi, A., Giorgio Cozzi, P., Lalevée, J. Keto-coumarin scaffold for photoinitiators for 3D printing and photocomposites. *J. Polym. Sci.* **58**, 1115–1129 (2020).
81. Chen, H., Noirbent, G., Zhang, Y., Sun, K., Liu, S., Brunel, D., Gimes, D., Graff, B., Morlet-Savary, F., Xiao, P., Dumur, F., Lalevée, J. Photopolymerization and 3D/4D applications using newly developed dyes: Search around the natural chalcone scaffold in photoinitiating systems. *Dye. Pigment.* **188**, 109213 (2021).
82. Liu, S., Zhang, Y., Sun, K., Graff, B., Xiao, P., Dumur, F., Lalevée, J. Design of photoinitiating systems based on the chalcone-anthracene scaffold for LED cationic photopolymerization and application in 3D printing. *Eur. Polym. J.* **147**, 110300 (2021).
83. Noirbent, G., Xu, Y., Bonardi, A. H., Gimes, D., Lalevée, J., Dumur, F. Metalated porphyrins as versatile visible light and NIR photoinitiators of polymerization. *Eur. Polym. J.* **139**, 110019 (2020).
84. Bonardi, A. H., Dumur, F., Grant, T. M., Noirbent, G., Gimes, D., Lessard, B. H., Fouassier, J.-P., Lalevée, J. High Performance Near-Infrared (NIR) Photoinitiating Systems Operating under Low Light Intensity and in the Presence of Oxygen. *Macromolecules* **51**, 1314–1324 (2018).
85. Wang, F., Wang, F. Liquid Resins-Based Additive Manufacturing. *J. Mol. Eng. Mater.* **05**, 1740004 (2017).
86. Ronca, A., Ronca, S., Forte, G., Zeppetelli, S., Gloria, A., De Santis, R., Ambrosio, L. Synthesis and characterization of divinyl-fumarate poly- ϵ -caprolactone for scaffolds with controlled architectures. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **12**, 523–531 (2018).
87. Luo, Y., Le Fer, G., Dean, D., Becker, M. L. 3D Printing of Poly(propylene fumarate) Oligomers: Evaluation of Resin Viscosity, Printing Characteristics and Mechanical Properties. *Biomacromolecules* **20**, 1699–1708 (2019).
88. Le Fer, G., Luo, Y., Becker, M. L. Poly(propylene fumarate) stars, using architecture to reduce the viscosity of 3D printable resins. *Polym. Chem.* **10**, 4655–4664 (2019).
89. Dilla, R. A., Motta C. M. M., Snyder, S. R., Wilson, J. A., Wesdemiotis, C., Becker, M. L. Synthesis and 3D Printing of PEG-Poly(propylene fumarate) Diblock and Triblock Copolymer Hydrogels. *ACS Macro Lett.* **7**, 1254–1260 (2018).
90. Luo, Y., Dolder, C. K., Walker, J. M., Mishra, R., Dean, D., Becker, M. L. Synthesis and Biological Evaluation of Well-Defined Poly(propylene fumarate) Oligomers and Their Use in 3D Printed Scaffolds. *Biomacromolecules* **17**, 690–697 (2016).
91. Childers, E. P., Wang, M. O., Becker, M. L., Fisher, J. P., Dean, D. 3D printing of resorbable poly(propylene fumarate) tissue engineering scaffolds. *MRS Bull.* **40**, 119–126 (2015).
92. Berg, G. J., Gong, T., Fenoli, C. R., Bowman, C. N. A dual-cure, solid-state photoresist combining a thermoreversible diels-alder network and a chain growth acrylate network. *Macromolecules* **47**, 3473–3482 (2014).
93. Gouzman, I., Atar, N., Grossman, E., Verker, R., Bolker, A., Pokrass, M., Sultan, S., Sinwani, O., Wagner, A., Lück, T., Seifarth, C. 3D Printing of Bismaleimides: From New Ink Formulation to Printed Thermosetting Polymer Objects. *Adv. Mater. Technol.* **4**, 1–8 (2019).
94. Wu, T., Jiang, P., Zhang, X., Guo, Y., Ji, Z., Ji, X., Wang, X., Zhou, F., Liu, W. Additively manufacturing high-performance bismaleimide architectures with ultraviolet-assisted direct ink writing. *Mater. Des.* **180**, 107947 (2019).
95. Herwig, G., Perez-Madrigal, M. M., Dove, A. P. Customized Fading Scaffolds: Strong Polyorthoester Networks via Thiol-Ene Cross-linking for Cytocompatible Surface-Eroding Materials in 3D Printing. *Biomacromolecules* **22**, 1472–1483 (2021).
96. Wallin, T. J., Pikul, J. H., Bodkhe, S., Peele, B. N., Mac Murray, B. C., Therriault, D., McEnerney, B. W., Dillon, R. P., Giannelis, E. P., Shepherd, R. F. Click chemistry stereolithography for soft robots that self-heal. *J. Mater. Chem. B* **5**, 6249–6255 (2017).
97. Chen, L., Wu, Q., Wei, G., Liu, R., Li, Z. Highly stable thiol-ene systems: From their structure-property relationship to DLP 3D printing. *J. Mater. Chem. C* **6**, 11561–11568 (2018).
98. Mongkhontreerat, S., Öberg, K., Erixon, L., Löwenhielm, P., Hulta, A., Malkoch, M. UV initiated thiol-ene chemistry: A facile and modular synthetic methodology for the construction of functional 3D networks with tunable properties. *J. Mater. Chem. A* **1**, 13732–13737 (2013).
99. Quick, A. S., Fischer, J., Richter, B., Pauloehrl, T., Trouillet, V., Wegener, M., Barner-Kowollik, C.

- Preparation of reactive three-dimensional microstructures via direct laser writing and thiol-ene chemistry. *Macromol. Rapid Commun.* **34**, 335–340 (2013).
100. Kumpfmüller, J., Stadlmann, K., Li, Z., Satzinger, V., Stampfl, J., Liska, R. Two-photon-induced thiol-ene polymerization as a fabrication tool for flexible optical waveguides. *Des. Monomers Polym.* **17**, 390–400 (2014).
 101. Sycks, D. G., Wu, T., Park, H. S., Gall, K. Tough, stable spiroacetal thiol-ene resin for 3D printing. *J. Appl. Polym. Sci.* **135**, 1–12 (2018).
 102. Sahin, M., Ayalur-Karunakaran, S., Manhart, J., Wolfahrt, M., Kern, W., Schlögl, S. Thiol-Ene versus Binary Thiol-Acrylate Chemistry: Material Properties and Network Characteristics of Photopolymers. *Adv. Eng. Mater.* **19**, 1–10 (2017).
 103. Van Hoorick, J., Dobos, A., Markovic, M., Gheysens, T., Van Damme, L., Gruber, P., Tytgat, L., Van Erps, J., Thienpont, H., Dubruel, P., Ovsianikov, A., Van Vlierberghe, S. Thiol-norbornene gelatin hydrogels: Influence of thiolated crosslinker on network properties and high definition 3D printing. *Biofabrication* **13**, 015017 (2020).
 104. Tsai, Y. T., Chang, C. W., Yeh, Y. C. Formation of highly elastomeric and property-tailorable poly(glycerol sebacate)-Co-poly(ethylene glycol) hydrogels through thiol-norbornene photochemistry. *Biomater. Sci.* **8**, 4728–4738 (2020).
 105. Yeh, Y. C., Ouyang, L., Highley, C. B., Burdick, J. A. Norbornene-modified poly(glycerol sebacate) as a photocurable and biodegradable elastomer. *Polym. Chem.* **8**, 5091–5099 (2017).
 106. Lin, C.-C., Ki, C. S., Shih, H. Thiol-norbornene photoclick hydrogels for tissue engineering applications. *J. Appl. Polym. Sci.* **132**, 41563 (2015).
 107. Oesterreicher, A., Wiener, J., Roth, M., Moser, A., Gmeiner, R., Edler, M., Pinterb, G., Griesser, T. Tough and degradable photopolymers derived from alkyne monomers for 3D printing of biomedical materials. *Polym. Chem.* **7**, 5169–5180 (2016).
 108. Roppolo, I., Frascella, F., Gastaldi, M., Castellino, M., Ciubini, B., Barolo, C., Scaltrito, L., Nicosia, C., Zanetti, M., Chiappone, A. Thiol-yne chemistry for 3D printing: Exploiting an off-stoichiometric route for selective functionalization of 3D objects. *Polym. Chem.* **10**, 5950–5958 (2019).
 109. Xiang, H., Wang, X., Ou, Z., Lin, G., Yin, J., Liu, Z., Zhang, L., Liu, X. UV-curable, 3D printable and biocompatible silicone elastomers. *Prog. Org. Coatings* **137**, 105372 (2019).
 110. Liravi, F., Toyserkani, E. Additive manufacturing of silicone structures: A review and prospective. *Addit. Manuf.* **24**, 232–242 (2018).
 111. Miao, S., Zhu, W., Castro, N.J., Nowicki, M., Zhou, X., Cui, H., Fisher, J. P., Zhang, L. G. 4D printing smart biomedical scaffolds with novel soybean oil epoxidized acrylate. *Sci. Rep.* **6**, 1–10 (2016).
 112. Guerra, A. J., Lammel-Lindemann, J., Katko, A., Kleinfehn, A., Rodriguez, C. A., Catalani, L. H., Becker, M. L., Ciurana, J., Dean, D. Optimization of photocrosslinkable resin components and 3D printing process parameters. *Acta Biomater.* **97**, 154–161 (2019).
 113. Walker, J. M., Bodamer, E., Kleinfehn, A., Luo, Y., Becker, M., Dean, D. Design and mechanical characterization of solid and highly porous 3D printed poly(propylene fumarate) scaffolds. *Prog. Addit. Manuf.* **2**, 99–108 (2017).
 114. Kim, K., Dean, D., Wallace, J., Breithaupt, R., Mikos, A. G., Fisher, J. P. The influence of stereolithographic scaffold architecture and composition on osteogenic signal expression with rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* **32**, 3750–3763 (2011).
 115. Wallace, J., Wang, M. O., Thompson, P., Busso, M., Belle, V., Mammoser, N., Kim, K., Fisher, J. P., Siblani, A., Xu, Y., Welter, J. F., Lennon, D. P., Sun, J., Caplan, A.I., Dean, D. Validating continuous digital light processing (cDLP) additive manufacturing accuracy and tissue engineering utility of a dye-initiator package. *Biofabrication* **6**, 015003 (2014).
 116. Chen, X., Zhao, Y., Li, X., Xiao, Z., Yao, Y., Chu, Y., Farkas, B., Romano, I., Brandi, F., Dai, J. Functional Multichannel Poly(Propylene Fumarate)-Collagen Scaffold with Collagen-Binding Neurotrophic Factor 3 Promotes Neural Regeneration After Transected Spinal Cord Injury. *Adv. Healthc. Mater.* **7**, 1–13 (2018).
 117. Wang, M. O., Piard, C. M., Melchiorri, A., Dreher, M. L., Fisher, J. P. Evaluating Changes in Structure and Cytotoxicity During In Vitro Degradation of Three-Dimensional Printed Scaffolds.
 118. Wang, M.O., Vorwald, C.E., Dreher, M. L., Mott, E. J., Cheng, M. H., Cinar, A., Mehdizadeh, H., Somo, S., Dean, D., Brey, E. M., Fisher, J. P. Evaluating 3D-printed biomaterials as scaffolds for vascularized bone tissue engineering. *Adv. Mater.* **27**, 138–144 (2014).
 119. Lee, K. W., Wang, S., Fox, B. C., Ritman, E. L., Yaszemski, M. J., Lu, L. Poly(propylene fumarate) bone tissue engineering scaffold fabrication using stereolithography: Effects of resin formulations and laser

- parameters. *Biomacromolecules* **8**, 1077–1084 (2007).
120. Field, J., Haycock, J. W., Boissonade, F. M., Claeysens, F. A tuneable, photocurable, poly(caprolactone)-based resin for tissue engineering-synthesis, characterisation and use in stereolithography. *Molecules* **26**, 1199 (2021).
 121. Elomaa, L., Teixeira, S., Hakala, R., Korhonen, H., Grijpma, D. W., Seppälä, J. V. Preparation of poly(ϵ -caprolactone)-based tissue engineering scaffolds by stereolithography. *Acta Biomater.* **7**, 3850–3856 (2011).
 122. Elomaa, L., Kokkari, A., Närhi, T., Seppälä, J. V. Porous 3D modeled scaffolds of bioactive glass and photocrosslinkable poly(ϵ -caprolactone) by stereolithography. *Compos. Sci. Technol.* **74**, 99–106 (2013).
 123. Green, B. J., Worthington, K. S., Thompson, J. R., Bunn, S. J., Rethwisch, M., Kaalberg, E. E., Jiao, C., Wiley, L. A., Mullins, R. F., Stone, E. M., Sohn, E. H., Tucker, B. A., Guymon, C. A. Effect of Molecular Weight and Functionality on Acrylated Poly(caprolactone) for Stereolithography and Biomedical Applications. *Biomacromolecules* **19**, 3682–3692 (2018).
 124. Ronca, A., Ambrosio, L., Grijpma, D. W. Design of porous three-dimensional PDLLA/nano-hap composite scaffolds using stereolithography. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **10**, 249–258 (2012).
 125. Ronca, A., Ambrosio, L., Grijpma, D. W. Preparation of designed poly(d,l-lactide)/nanosized hydroxyapatite composite structures by stereolithography. *Acta Biomater.* **9**, 5989–5996 (2013).
 126. Melchels, F.P., Bertoldi, K., Gabbrielli, R., Velders, A. H., Feijen, J., Grijpma, D. W. Mathematically defined tissue engineering scaffold architectures prepared by stereolithography. *Biomaterials* **31**, 6909–6916 (2010).
 127. Melchels, F. P. W., Feijen, J., Grijpma, D. W. A poly(d,l-lactide) resin for the preparation of tissue engineering scaffolds by stereolithography. *Biomaterials* **30**, 3801–3809 (2009).
 128. Schüller-Ravoo, S., Feijen, J., Grijpma, D. W. Preparation of flexible and elastic poly(trimethylene carbonate) structures by stereolithography. *Macromol. Biosci.* **11**, 1662–1671 (2011).
 129. Schüller-Ravoo, S., Teixeira, S. M., Feijen, J., Grijpma, D. W., Poot, A. A. Flexible and elastic scaffolds for cartilage tissue engineering prepared by stereolithography using poly(trimethylene carbonate)-based resins. *Macromol. Biosci.* **13**, 1711–1719 (2013).
 130. Schüller-Ravoo, S., Zant, E., Feijen, J., Grijpma, D. W. Preparation of a Designed Poly(trimethylene carbonate) Microvascular Network by Stereolithography. *Adv. Healthc. Mater.* **3**, 2004–2011 (2014).
 131. Guo, Z., Grijpma, D., Poot, A. Leachable poly(trimethylene carbonate)/CaCO₃ composites for additive manufacturing of microporous vascular structures. *Materials.* **13**, 1–13 (2020).
 132. Geven, M. A., Varjas, V., Kamer, L., Wang, X., Peng, J., Eglin, D., Grijpma, D. W. Fabrication of patient specific composite orbital floor implants by stereolithography. *Polym. Adv. Technol.* **26**, 1433–1438 (2015).
 133. Guillaume, O., Geven, M. A., Varjas, V., Varga, P., Gehweiler, D., Stadelmann, V. A., Smidt, T., Zeiter, S., Sprecher, C., Bos, R. R. M., Grijpma, D. W., Alini, M., Yuan, H., Richards, G. R., Tang, T., Qin, L., Yuxiao, L., Jiang, P., Eglin, D. Orbital floor repair using patient specific osteoinductive implant made by stereolithography. *Biomaterials* **233**, 119721 (2020).
 134. Guillaume, O., Geven, M. A., Sprecher, C. M., Stadelmann, V. A., Grijpma, D. W., Tang, T. T., Qin, L., Lai, Y., Alini, M., de Bruijn, J. D., Yuan, H., Richards, R. G., Eglin, D. Surface-enrichment with hydroxyapatite nanoparticles in stereolithography-fabricated composite polymer scaffolds promotes bone repair. *Acta Biomater.* **54**, 386–398 (2017).
 135. Guillaume, O., Geven, M. A., Grijpma, D. W., Tang, T.T., Qin, L., Lai, Y.X., Yuan, H., Richards, R. G., Eglin, D. Poly(trimethylene carbonate) and nano-hydroxyapatite porous scaffolds manufactured by stereolithography. *Polym. Adv. Technol.* **28**, 1219–1225 (2017).
 136. van Bochove, B., Hannink, G., Buma, P., Grijpma, D. W. Preparation of Designed Poly(trimethylene carbonate) Meniscus Implants by Stereolithography: Challenges in Stereolithography. *Macromol. Biosci.* **16**, 1853–1863 (2016).
 137. Blanquer, S. B. G., Sharifi, S., Grijpma, D. W. Development of poly(trimethylene carbonate) network implants for annulus fibrosus tissue engineering. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **10**, 177–184 (2012).
 138. Blanquer, S. B. G., Haimi, S. P., Poot, A. A., Grijpma, D. W. Effect of pore characteristics on mechanical properties and annulus fibrosus cell seeding and proliferation in designed PTMC tissue engineering scaffolds. *Macromol. Symp.* **334**, 75–81 (2013).
 139. Blanquer, S. B. G., Gebraad, A. W. H., Miettinen, S., Poot, A. A., Grijpma, D. W., Haimi, S. P. Differentiation of adipose stem cells seeded towards annulus fibrosus cells on a designed poly(trimethylene carbonate) scaffold prepared by stereolithography. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **11**, 2752–2762 (2017).

140. Diemel, K. E. G., Van Bochove, B., Seppälä, J. V. Additive Manufacturing of Bioactive Poly(trimethylene carbonate)/ β -Tricalcium Phosphate Composites for Bone Regeneration. *Biomacromolecules* **21**, 366–375 (2020).
141. Kuhnt, T., Marroquín García, R., Camarero-Espinosa, S., Dias, A., Ten Cate, A. T., van Blitterswijk, C. A., Moroni, L., Baker, M. B. Poly(caprolactone-co-trimethylenecarbonate) urethane acrylate resins for digital light processing of bioresorbable tissue engineering implants. *Biomater. Sci.* **7**, 4984–4989 (2019).
142. Sharifi, S., Blanquer, S., Grijpma, D. W. Polymeric microstructures with shape-memory properties for biomedical use built by stereolithography. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **10**, 280–286 (2012).
143. Weems, A. C., Arno, M. C., Yu, W., Huckstepp, R. T. R., Dove, A. P. 4D polycarbonates via stereolithography as scaffolds for soft tissue repair. *Nat. Commun.* **2021** *121* **12**, 1–14 (2021).
144. Sinh, L.H., Harri, K., Marjo, L., Minna, M., Dang Luong, N., Jürgen, W., Torsten, W., Matthias, S., Jukka, S. Novel photo-curable polyurethane resin for stereolithography. *RSC Adv.* **6**, 50706–50709 (2016).
145. Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**, 27–46 (2000).
146. Peng, H. T., Martineau, L., Shek, P. N. Hydrogel-elastomer composite biomaterials: 1. Preparation of interpenetrating polymer networks and in vitro characterization of swelling stability and mechanical properties. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **18**, 975–986 (2007).
147. Hu, W., Wang, Z., Xiao, Y., Zhang, S., Wang, J. Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. *Biomater. Sci.* **7**, 843–855 (2019).
148. Peppas, N. A. Hydrogels and drug delivery. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2**, 531–537 (1997).
149. Maitra, J., Shukla, V. K. Cross-linking in Hydrogels - A Review. *Am. J. Polym. Sci.* **4**, 25–31 (2014).
150. Lim, J. Y. C., Lin, Q., Xue, K., Loh, X. J. Recent advances in supramolecular hydrogels for biomedical applications. *Mater. Today Adv.* **3**, 100021 (2019).
151. Drury, J. L., Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **24**, 4337–4351 (2003).
152. Varaprasad, K., Raghavendra, G. M., Jayaramudu, T., Yallapu, M. M., Sadiku, R. A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications. *Mater. Sci. Eng. C* **79**, 958–971 (2017).
153. Annabi, N., Tamayol, A., Uquillas, J. A., Akbari, M., Bertassoni, L. E., Cha, C., Camci-Unal, G., Dokmeci, M. R., Peppas, N. A., Khademhosseini, A. 25th anniversary article: Rational design and applications of hydrogels in regenerative medicine. *Adv. Mater.* **26**, 85–124 (2014).
154. Nguyen, K. T., West, J. L. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials* **23**, 4307–4314 (2002).
155. Means, A. K., Grunlan, M. A. Modern Strategies to Achieve Tissue-Mimetic, Mechanically Robust Hydrogels. *ACS Macro Lett.* **8**, 705–713 (2019).
156. Hunt, J. A., Chen, R., Van Veen, T., Bryan, N. Hydrogels for tissue engineering and regenerative medicine. *J. Mater. Chem. B* **2**, 5319–5338 (2014).
157. Chyzy, A., Plonska-Brzezinska, M. E. Hydrogel Properties and Their Impact on Regenerative Medicine and Tissue Engineering. *Mol.* **25**, 5795 (2020).
158. Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., Schacht, E. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: A review. *Biomacromolecules* **12**, 1387–1408 (2011).
159. Mahinroosta, M., Jomeh Farsangi, Z., Allahverdi, A., Shakoori, Z. Hydrogels as intelligent materials: A brief review of synthesis, properties and applications. *Mater. Today Chem.* **8**, 42–55 (2018).
160. Nair, L. S., Laurencin, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog. Polym. Sci.* **32**, 762–798 (2007).
161. Ulery, B. D., Nair, L. S., Laurencin, C. T. Biomedical applications of biodegradable polymers. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **49**, 832–864 (2011).
162. Zhang, Y., Huang, Y. Rational Design of Smart Hydrogels for Biomedical Applications. *Front. Chem.* **8**, 1–13 (2021).
163. Peppas, N. A., Hilt, J. Z., Khademhosseini, A., Langer, R. Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology. *Adv. Mater.* **18**, 1345–1360 (2006).
164. Gyles, D. A., Castro, L. D., Silva, J. O. C., Ribeiro-Costa, R. M. A review of the designs and prominent biomedical advances of natural and synthetic hydrogel formulations. *Eur. Polym. J.* **88**, 373–392 (2017).
165. Tavakoli, J., Tang, Y. Hydrogel based sensors for biomedical applications: An updated review. *Polymers.* **9**, 1–25 (2017).
166. Lam, T., Dehne, T., Krüger, J. P., Hondke, S., Endres, M., Thomas, A., Lauster, R., Sittinger, M., Kloke, L. Photopolymerizable gelatin and hyaluronic acid for stereolithographic 3D bioprinting of tissue-

- engineered cartilage. *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.* **107**, 2649–2657 (2019).
167. Thomas, A., Orellano, I., Lam, T., Noichl, B., Geiger, M. A., Amler, A. K., Kreuder, A. E., Palmer, C., Duda, G., Lauster, R., Kloke, L. Vascular bioprinting with enzymatically degradable bioinks via multi-material projection-based stereolithography. *Acta Biomater.* **117**, 121–132 (2020).
168. Wang, Z., Kumar, H., Tian, Z., Jin, X., Holzman, J. F., Menard, F., Kim, K. Visible Light Photoinitiation of Cell-Adhesive Gelatin Methacryloyl Hydrogels for Stereolithography 3D Bioprinting. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 26859–26869 (2018).
169. Kumar, H., Sakthivel, K., Mohamed, M. G. A., Boras, E., Shin, S. R., Kim, K. Designing Gelatin Methacryloyl (GelMA)-Based Bioinks for Visible Light Stereolithographic 3D Biofabrication. *Macromol. Biosci.* **21**, 1–17 (2021).
170. Mahdavi, S. S., Abdekhodaie, M. J., Kumar, H., Mashayekhan, S., Baradaran-Rafii, A., Kim, K. Stereolithography 3D Bioprinting Method for Fabrication of Human Corneal Stroma Equivalent. *Ann. Biomed. Eng.* **48**, 1955–1970 (2020).
171. Ye, W., Li, H., Yu, K., Xie, C., Wang, P., Zheng, Y., Zhang, P., Xiu, J., Yang, Y., Zhang, F., He, Y., Gao, Q. 3D printing of gelatin methacrylate-based nerve guidance conduits with multiple channels. *Mater. Des.* **192**, 108757 (2020).
172. Krishnamoorthy, S., Wadnap, S., Noorani, B., Xu, H., Xu, C. Investigation of gelatin methacrylate working curves in dynamic optical projection stereolithography of vascular-like constructs. *Eur. Polym. J.* **124**, 109487 (2020).
173. Gauvin, R., Chen, Y. C., Lee, J. W., Soman, P., Zorlutuna, P., Nichol, J. W., Bae, H., Chen, S., Khademhosseini, A. Microfabrication of complex porous tissue engineering scaffolds using 3D projection stereolithography. *Biomaterials* **33**, 3824–3834 (2012).
174. Seo, H., Heo, S. G., Lee, H., Yoon, H. Preparation of PEG materials for constructing complex structures by stereolithographic 3D printing. *RSC Adv.* **7**, 28684–28688 (2017).
175. Arcaute, K., Mann, B., Wicker, R. Stereolithography of spatially controlled multi-material bioactive poly(ethylene glycol) scaffolds. *Acta Biomater.* **6**, 1047–1054 (2010).
176. Dhariwala, B., Hunt, E., Boland, T., Ph, D. Rapid Prototyping of Tissue-Engineering Constructs , Using. *Rapid Prototyp. Constr.* **10**, 1316–1322 (2004).
177. Leigh, S. J., Gilbert, H. T., Barker, I. A., Becker, J. M., Richardson, S. M., Hoyland, J. A., Covington, J. A., Dove, A. P. Fabrication of 3-dimensional cellular constructs via microstereolithography using a simple, three-component, poly(Ethylene Glycol) acrylate-based system. *Biomacromolecules* **14**, 186–192 (2013).
178. Arcaute, K., Mann, B. K., Wicker, R. B. Stereolithography of three-dimensional bioactive poly(ethylene glycol) constructs with encapsulated cells. *Ann. Biomed. Eng.* **34**, 1429–1441 (2006).
179. Arcaute, K., Mann, B. K., Wicker, R. B. Fabrication of off-the-shelf multilumen poly(Ethylene glycol) nerve guidance conduits using stereolithography. *Tissue Eng. - Part C Methods* **17**, 27–38 (2010).
180. Arcaute, K., Ochoa, L., Mann, B. K., Wicker, R. B. Stereolithography of PEG Hydrogel Multi-Lumen Nerve Regeneration Conduits. *Am. Soc. Mech. Eng. Manuf. Eng. Div. MED* **16–1**, 161–167 (2008).
181. Evangelista, M. S., Perez, M., Salibian, A. A., Hassan, J. M., Darcy, S., Paydar, K. Z., Wicker, R. B., Arcaute, K., Mann, B. K., Evans, G. R. Single-lumen and multi-lumen poly(ethylene glycol) nerve conduits fabricated by stereolithography for peripheral nerve regeneration in vivo. *J. Reconstr. Microsurg.* **31**, 327–335 (2015).
182. Nguyen, Q. T., Hwang, Y., Chen, A. C., Varghese, S., Sah, R. L. Cartilage-like mechanical properties of poly(ethylene glycol)-diacrylate hydrogels. *Biomaterials* **33**, 6682–6690 (2012).
183. Parlato, M., Reichert, S., Barney, N., Murphy, W. L. Poly(ethylene glycol) Hydrogels with Adaptable Mechanical and Degradation Properties for Use in Biomedical Applications. *Macromol. Biosci.* **14**, 687–698 (2014).
184. Grigoryan, B., Paulsen, S. J., Corbett, D. C., Sazer, D. W., Fortin, C. L., Zaita, A. J., Greenfield, P. T., Calafat, N. J., Gounley, J. P., Ta, A. H., Johansson, F., Randles, A., Rosenkrantz, J. E., Louis-Rosenberg, J. D., Galie, P. A., Stevens, K. R., Miller, J. S. Multivascular networks and functional intravascular topologies within biocompatible hydrogels. *Science.* **364**, 458–464 (2019).
185. Farzan, A., Borandeh, S., Zanjanizadeh Ezazi, N., Lipponen, S., Santos, H. A., Seppälä, J. 3D scaffolding of fast photocurable polyurethane for soft tissue engineering by stereolithography: Influence of materials and geometry on growth of fibroblast cells. *Eur. Polym. J.* **139**, 109988 (2020).
186. Elomaa, L., Pan, C. C., Shanjani, Y., Malkovskiy, A., Seppälä, J. V., Yang, Y. Three-dimensional fabrication of cell-laden biodegradable poly(ethylene glycol-co-depsipeptide) hydrogels by visible light stereolithography. *J. Mater. Chem. B* **3**, 8348–8358 (2015).

187. Seck, T. M., Melchels, F. P. W., Feijen, J., Grijpma, D. W. Designed biodegradable hydrogel structures prepared by stereolithography using poly(ethylene glycol)/poly(d,l-lactide)-based resins. *J. Control. Release* **148**, 34–41 (2010).
188. Kostina, N. Y., Blanquer, S., Pop-Georgievski, O., Rahimi, K., Dittrich, B., Höcherl, A., Michálek, J., Grijpma, D. W., Rodriguez-Emmenegger, C. Zwitterionic Functionalizable Scaffolds with Gyroid Pore Architecture for Tissue Engineering. *Macromol. Biosci.* **19**, 1–9 (2019).
189. Sharifi, S., Blanquer, S. B. G., Van Kooten, T. G., Grijpma, D. W. Biodegradable nanocomposite hydrogel structures with enhanced mechanical properties prepared by photo-crosslinking solutions of poly(trimethylene carbonate)-poly(ethylene glycol)-poly(trimethylene carbonate) macromonomers and nanoclay particles. *Acta Biomater.* **8**, 4233–4243 (2012).
190. Lee, J. W., Soman, P., Park, J. H., Chen, S., Cho, D. W. A tubular biomaterial construct exhibiting a negative poisson's ratio. *PLoS One* **11**, 1–14 (2016).
191. Zhang, B., Li, S., Hingorani, H., Serjouei, A., Larush, L., Pawar, A. A., Goh, W. H., Sakhaei, A. H., Hashimoto, M., Kowsari, K., Magdassi, S., Ge, Q. Highly stretchable hydrogels for UV curing based high-resolution multimaterial 3D printing. *J. Mater. Chem. B* **6**, 3246–3253 (2018).
192. Madaghiele, M., Marotta, F., Demitri, C., Montagna, F., Maffezzoli, A., Sannino, A. Development of semi- and grafted interpenetrating polymer networks based on poly(Ethylene glycol) diacrylate and collagen. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **12**, 183–192 (2014).
193. Schuster, M., Turecek, C., Weigel, G., SAF, R., Stampfl, J., Varga, F., Liska, R. Gelatin-Based Photopolymers for Bone Replacement Materials. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **46**, 7207–7224 (2008).
194. Palaganas, N. B., Mangadlao, J. D., de Leon, A. C. C., Palaganas, J. O., Pangilinan, K. D., Lee, Y. J., Advincula, R. C. 3D printing of photocurable cellulose nanocrystal composite for fabrication of complex architectures via stereolithography. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 34314–34324 (2017).
195. Zhou, X., Nowicki, M., Cui, H., Zhu, W., Fang, X., Miao, S., Lee, S. J., Keidar, M., Zhang, L. G. 3D bioprinted graphene oxide-incorporated matrix for promoting chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Carbon N. Y.* **116**, 615–624 (2017).
196. Zhou, X., Tenaglio, S., Esworthy, T., Hann, S. Y., Cui, H., Webster, T. J., Fenniri, H., Zhang, L. G. Three-Dimensional Printing Biologically Inspired DNA-Based Gradient Scaffolds for Cartilage Tissue Regeneration. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **12**, 33219–33228 (2020).
197. Seo, J. W., Shin, S. R., Park, Y. J., Bae, H. Hydrogel Production Platform with Dynamic Movement Using Photo-Crosslinkable/Temperature Reversible Chitosan Polymer and Stereolithography 4D Printing Technology. *Tissue Eng. Regen. Med.* **17**, 423–431 (2020).
198. Bardakova, K. N., Akopova, T. A., Kurkov, A. V., Goncharuk, G. P., Butnaru, D. V., Burdukovskii, V. F., Antoshin, A. A., Farion, I. A., Zharikova, T. M., Shekhter, A. B., Yusupov, V. I., Timashev, P. S., Rochev, Y. A. From aggregates to porous three-dimensional scaffolds through a mechanochemical approach to design photosensitive chitosan derivatives. *Mar. Drugs* **17**, 48 (2019).
199. Timashev, P. S., Bardakova, K. N., Demina, T. S., Pudovkina, G. I., Novikov, M. M., Markov, M. A., Asyutin, D. S., Pimenova, L. F., Svidchenko, E. A., Ermakov, A. M., Selezneva, I. I., Popov, V. K., Konovalov, N. A., Akopova, T. A., Solovieva, A. B., Panchenko, V. Ya., Bagratashvili, V. N. Novel biocompatible material based on solid-state modified chitosan for laser stereolithography. *Sovrem. Tehnol. v Med.* **7**, 20–29 (2015).
200. Morris, V. B., Nimbalkar, S., Younesi, M., McClellan, P., Akkus, O. Mechanical Properties, Cytocompatibility and Manufacturability of Chitosan:PEGDA Hybrid-Gel Scaffolds by Stereolithography. *Ann. Biomed. Eng.* **45**, 286–296 (2017).
201. Lim, K. S., Levato, R., Costa, P. F., Castilho, M. D., Alcalá-Orozco, C. R., van Dorenmalen, K. M. A., Melchels, F. P. W., Gawlitta, D., Hooper, G. J., Malda, J., Woodfield, T. B. F. Bio-resin for high resolution lithography-based biofabrication of complex cell-laden constructs. *Biofabrication* **10**, 034101 (2018).
202. Elomaa, L., Keshi, E., Sauer, I. M., Weinhart, M. Development of GelMA/PCL and dECM/PCL resins for 3D printing of acellular in vitro tissue scaffolds by stereolithography. *Mater. Sci. Eng. C* **112**, 110958 (2020).
203. Momeni, F., M.Mehdi Hassani, N. S., Liu, X., Ni, J. A review of 4D printing. *Mater. Des.* **122**, 42–79 (2017).
204. Gao, B., Yang, Q., Zhao, X., Jin, G., Ma, Y., Xu, F. 4D Bioprinting for Biomedical Applications. *Trends Biotechnol.* **34**, 746–756 (2016).
205. Dong, Y., Wang, S., Ke, Y., Ding, L., Zeng, X., Magdassi, S., Long, Y. 4D Printed Hydrogels: Fabrication, Materials, and Applications. *Adv. Mater. Technol.* **5**, 1–19 (2020).
206. Joshi, S., Rawat, K., Karunakaran, C., Rajamohan, V., Mathew, A. T., Koziol, K., Thakur, V. K., Balan A. S. S. 4D printing of materials for the future: Opportunities and challenges. *Appl. Mater. Today* **18**, 100490

- (2020).
207. Pinho, A. C., Buga, C. S., Piedade, A. P. The chemistry behind 4D printing. *Appl. Mater. Today* **19**, 100611 (2020).
208. Yang, C., Boorugu, M., Dopp, A., Ren, J., Martin, R., Han, D., Choi, W., Lee, H. 4D printing reconfigurable, deployable and mechanically tunable metamaterials. *Mater. Horizons* **6**, 1244–1250 (2019).
209. Champeau, M., Heinze, D. A., Viana, T. N., Rodrigues de Souza, E., Chinellato, A. C., Titotto, S. 4D Printing of Hydrogels: A Review. *Adv. Funct. Mater.* **30**, 1–22 (2020).
210. Chu, H., Yang, W., Sun, L., Cai, S., Yang, R., Liang, W., Yu, H., Liu, L. 4D printing: A review on recent progresses. *Micromachines* **11**, 796 (2020).

Chapitre II.

Copolymères hybrides en
stéréolithographie pour
l'ingénierie tissulaire

Chapitre II. Copolymères hybrides en stéréolithographie pour l'ingénierie tissulaire

Introduction

Ce chapitre a pour objectif la **fabrication par stéréolithographie de *scaffolds* biodégradables à base de gélatine et de PTMC**. Le chapitre débute par une bibliographie sur le greffage chimique de polymères sur le PTMC ou sur la gélatine. La suite se présente sous forme d'article où des **copolymères hybrides, Gélatine-g-PTMC**, sont synthétisés par polymérisation par ouverture de cycle (ROP) du triméthylène carbonate (TMC) à partir de la gélatine. Une **étude préliminaire** a consisté à étudier l'**amorçage de la ROP du TMC par diverses amines modèles**, fonctions présentes dans la gélatine (article *Polymers*, annexes). Différentes longueurs de chaîne de PTMC ont ensuite été greffées sur la gélatine par *grafting from* afin de pouvoir moduler les propriétés mécaniques et biologiques selon la proportion de PTMC. Le greffage a été étudié en détail par spectroscopie RMN ¹³C quantitative. Après méthacrylation des extrémités de chaîne PTMC et photoréticulation, des matériaux ont été caractérisés en traction et la viabilité cellulaire des films est envisagée (article *Biomacromolecules*). Ce travail a mené à la fabrication de ***scaffolds* de type *gyroïde* de Gélatine-g-PTMC** de différentes compositions. Des essais de **compression** et l'étude d'**adhésion et de prolifération cellulaire** sur des *scaffolds* ont finalement été réalisés.

1. Les modifications chimiques de polymères par greffage de macromolécules

1.1. Greffage d'une macromolécule naturelle sur le PTMC

Le PTMC comme polymère biodégradable a gagné de plus en plus en popularité. L'homopolymère de PTMC est obtenu par ROP du TMC avec des catalyseurs métalliques ou organiques en solution ou en masse. Cette versatilité de synthèse lui permet d'être facilement copolymérisé. Ce polymère **hydrophobe non cristallin avec une basse Tg (-20 °C)** possède des propriétés qui dépendent de sa masse molaire. Le PTMC est particulièrement attractif par ses **propriétés élastomériques modulables** mais surtout pour son mode de dégradation unique. Il est résistant à l'hydrolyse non enzymatique et génère, contrairement aux polyesters, des sous-produits de dégradation non acides. Autre point, le PTMC possède une **dégradation par érosion** et non en masse qui permet de garder les propriétés mécaniques constantes au cours de la dégradation. Pour ces raisons, ce matériau a largement été utilisé dans des applications telles que l'encapsulation de molécules bioactives ou encore l'ingénierie tissulaire. Cependant, le PTMC du fait de sa forte hydrophobie manque cruellement de propriétés biologiques¹. Afin d'améliorer cette réponse biologique, la modification chimique du PTMC par le greffage de biopolymères semble être une approche prometteuse. Néanmoins, uniquement quelques récents travaux rapportés dans la littérature se sont orientés vers ce type de combinaison. Ce constat peut s'expliquer par la forte incompatibilité des deux polymères. Le PTMC est reconnu pour être hydrophobe et les macromolécules naturelles pour avoir une solubilité complexe même dans les solvants polaires (eau, DMSO). L'équipe de Lecommandoux s'est tout particulièrement intéressée au couplage entre le PTMC et des peptides basés sur l'**élastine**²⁻⁴. Par la suite, l'équipe de Zhong^{5,6} a réalisé un couplage dit « *grafting onto* » de chimie clic entre l'**acide hyaluronique** (HA-propargylamine) et le PTMC (N₃-P(TMC-co-DTC)) dans le DMSO afin de solubiliser les deux polymères comme décrit sur la Figure II-1. Ce type de couplage permet de contrôler facilement la taille du PTMC puisqu'il est polymérisé en amont. La caractérisation du copolymère a été suivie par la disparition de l'azide et de l'alcyne en spectroscopies RMN et FTIR. Cependant, plus la taille du PTMC est élevée plus la solubilité et l'homogénéité du système diminuent, ce qui rend difficile le contrôle et l'efficacité du greffage. Néanmoins, la présence de l'acide hyaluronique a permis de cibler les récepteurs CD44 exprimés par les cellules cancéreuses, et ainsi de libérer localement des principes actifs tels que la mertansine (DM1) et le docétaxel (DTX),

préalablement encapsulés dans le système nanoparticulaire. Ce système est intéressant comme alternative aux conjugués anticorps-médicament pour le traitement des cancers et être la thérapie future du cancer comme nanomédicaments simples, sélectifs et bioréactifs^{5,6}.

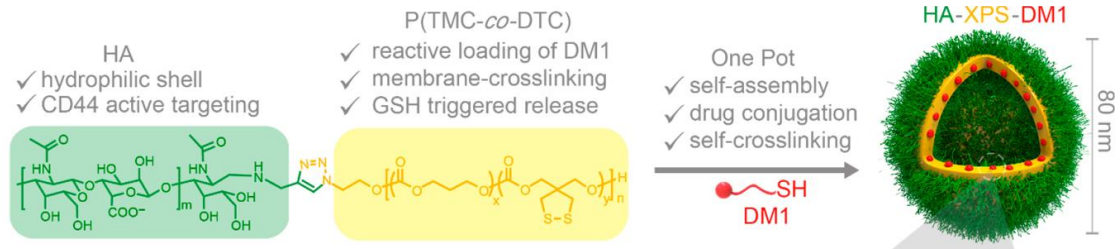


Figure II-1 - Illustration de l'encapsulation de principe actif à partir d'un copolymère biodégradable à base d'acide hyaluronique et de PTMC réticulé par des ponts disulfure⁵

Enfin, une dernière approche consiste en la modification du PTMC par des biopolymères tels que la cellulose et la lignine. Dans les deux cas de figure, les auteurs ont réalisé une ROP du TMC à partir des fonctions hydroxy présentes sur les macromolécules en présence de 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]déc-5-ène (TBD) (Figure II-2). Ce type de greffage est assimilé à un « *grafting from* ».

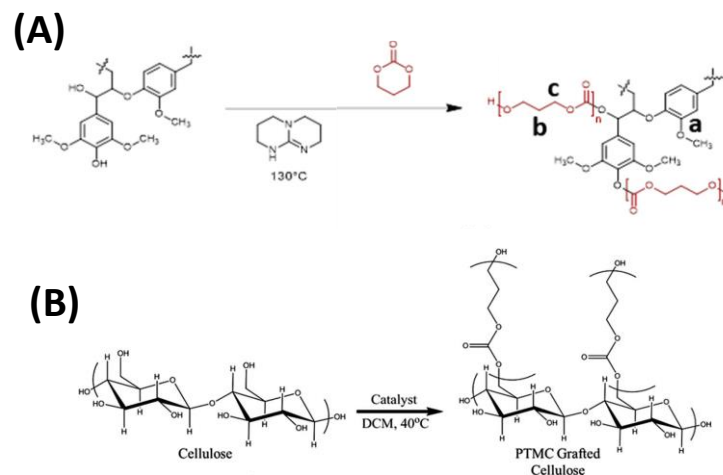


Figure II-2 - Greffage du PTMC par ROP sur des biomacromolécules issues du bois (A) lignine⁷ et (B) cellulose⁸

Dans l'article de Chee *et al.*, l'équipe s'est intéressée à la valorisation de déchets du bois comme la lignine. Le greffage a été suivi par spectroscopie FTIR grâce à la présence d'un groupement carbonyle qui n'est pas présent sur la **lignine** ainsi que par GPC avec

l'augmentation des masses molaires après greffage. Ces caractérisations ont pu être possibles du fait des faibles masses molaires de la lignine ($2\ 000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Il est à noter que les auteurs ont uniquement réalisé un rapport massique entre la lignine et le TMC sans chercher à contrôler ou faire varier le degré de polymérisation. De plus, aucune analyse poussée n'a été effectuée pour démontrer le greffage covalent. Pour autant, cette modification a permis d'augmenter la résistance à la traction et le module d'Young, et permis son utilisation en électrospinning⁷.

Concernant le couplage avec la **cellulose**, l'équipe de Pendergraph modifia directement la surface du papier avec le PTMC. La réaction a été menée dans des conditions relativement douces avec du TBD ou 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undéc-7-ène (DBU), à différents degrés de polymérisation. La spectroscopie RMN et la chromatographie GPC dans le DCM ont permis de quantifier les différents taux de polymérisation. Cette technique de caractérisation possède certaines limites. Elle néglige le fait que la cellulose n'est pas soluble dans le DCM et que les alcools primaires et secondaires présents sur la cellulose n'ont pas la même réactivité. Néanmoins, l'ajout du PTMC sur le papier a permis d'augmenter d'hydrophobie de ce dernier et de modifier la surface⁸. Ces travaux témoignent de la faisabilité de la copolymérisation du PTMC avec des polymères naturels même si la caractérisation du couplage est délicate.

1.2. Greffage d'un polymère de synthèse sur la gélatine

Comme indiqué dans le chapitre 1, la gélatine est un matériau extrêmement prometteur en ingénierie tissulaire du fait de sa forte affinité avec les cellules et tissus. Malheureusement, la gélatine souffre d'une dégradation enzymatique rapide et d'une faible résistance mécanique. Il est primordial d'apporter des modifications chimiques spécifiques afin d'améliorer ces propriétés^{9,10}. Ainsi, à travers ces groupements hydroxyle et amine libres, provenant des acides aminés, plusieurs types de modification de la gélatine ont été étudiés. Dans la majorité des cas, la gélatine a été réticulée chimiquement ou physiquement afin d'augmenter sa tenue mécanique (méthacrylate, EDC/NHS, formaldéhyde/glutaraldéhyde, norbornène...)¹¹⁻¹³. Bien que cela ait un effet significatif sur les propriétés, un faible taux de réticulation ne suffit pas à apporter la résistance nécessaire et un fort taux de réticulation génère une rigidité et une fragilité. Une alternative a été proposée et consiste à greffer des polymères de synthèse sur

la gélatine par le biais des mêmes fonctions libres. Le Tableau II-1 résume les différents polymères qui ont été greffés sur la gélatine. De nombreuses réactions chimiques ont été réalisées pour greffer ces polymères de synthèse, en particulier *via* la stratégie de « *grafting onto* » ou de « *grafting from* ». Ces derniers ont été réalisés par polymérisation redox, radicalaire ou encore par ROP. Il est à noter que sur les nombreux articles portant sur le « *grafting from* » de polymères synthétiques sur la gélatine, uniquement deux ont été effectués par ROP^{14,15}.

Tableau II-1 - Vue d'ensemble des différents polymères greffés sur la gélatine

Polymère greffé	Greffage	Références
PLA	<i>From</i>	14,15
PNIPAM		49–51
Acide Acrylique		16–18,42
MMA		19,40,41
Vinyl acétate		20,43
PVP		31
PPY		44,48
PEG	<i>Onto</i>	21,25,32–35,47
PLA		22
PDMS		23,24,37,38,46
PEI		26
PP		27,28
PLA		29
POx		30
PNIPAM		36,52
PAN		39
PEG-PCL		45
PVA		53
Pluronic		54,55

PPY : polypyrrole ; PEI : polyéthylèneimine ; PVP : polyvinylpyrrolidone

De ce tableau exhaustif des couplages chimiques de polymères sur la gélatine, quelques travaux se rapprochent de notre étude. Han *et al.* ont développé des nanoparticules

biodégradables de copolymères amphiphiles à base de **gélatine et de PLA** en tant que vecteurs de principes actifs¹⁵. Pour cela, le monomère lactide (LA) a été polymérisé à partir de la gélatine *via* les fonctions hydroxyle dans le DMSO. Ici, l'amorçage de la ROP par les fonctions amine de la gélatine a été négligé^{56,57} et la présence de la gélatine n'a pas été observée ni en spectroscopies FTIR ni en RMN. Enfin, des copolymères allant de 43 à 78 kDa ont été synthétisés avec un indice de dispersité allant de 1,27 à 1,52 qui sont des valeurs étonnamment basses pour un macro-amorceur telle la gélatine. Malgré le manque de détail sur la caractérisation du couplage, un effet antitumoral important a été observé avec les copolymères chargés en principe actif¹⁵.

Par la suite, Ma *et al.* ont proposé une étude plus complète sur la caractérisation du greffage du lactide sur la gélatine¹⁴. L'équipe a regardé l'impact des différentes voies de synthèse. Pour cela, ils ont réalisé une polymérisation en masse à 140 °C et une en solution dans le DMSO à 40 °C. La voie en masse a mené à un produit réticulé insoluble. La température élevée a induit des *trans*-estérifications et une réticulation du fait de la plurifonctionnalité de la gélatine. La réaction en solution a permis d'obtenir différents copolymères. Ils ont démontré qu'il est possible de moduler le taux de lactide sur la gélatine en fonction de la masse ajoutée. Ils ont tenu compte du nombre de groupements hydroxyle et amine libres dans la composition des acides aminés de la gélatine. Le Tableau II-2 résume les modifications de la gélatine avec le lactide.

Tableau II-2 - Copolymérisation par greffage en solution de DL-lactide sur de la gélatine dans le DMSO¹⁴

Number of samples	Average number of graft sites on each gelatin chain ^a	Weight ratio of feeding DL-lactide to gelatin	The formed gelatin–polylactide copolymers				
			Nitrogen content (%)	Molecular weight ^b	Total molecular weight of PLA branches ^c	Average molecular weight of each PLA branch ^d	Weight ratio of PLA to gelatin
1	325	50 : 1	1.112	1.51×10^6	1.41×10^6	4338	13.8 : 1
2	325	30 : 1	2.158	7.79×10^5	6.77×10^5	2083	6.64 : 1
3	325	20 : 1	5.295	3.17×10^5	2.15×10^5	662	2.11 : 1
4	325	10 : 1	7.189	2.34×10^5	1.32×10^5	406	1.29 : 1

Dans cette étude, la présence de PLA a été déterminée par analyse élémentaire à partir du rapport azote/carbone. Cependant, la masse molaire du PLA n'augmente pas linéairement en

accord avec le ratio ajouté. Les auteurs expliquent ce phénomène par les réactions de *trans*-estérification qui limiteraient la polymérisation du LA. Afin de mieux contrôler et moduler le taux de greffage, la gélatine a été protégée par différents taux de groupements triméthylsilyle (TMS). Ils ont de nouveau démontré que les masses molaires augmentaient avec le ratio de lactide et ceci également avec une différence entre le ratio visé et réel avec des taux de protection constants. Toutefois, il est intéressant de noter que des PLA plus grands ont été greffés sur la gélatine avec les pourcentages de protection les moins élevés pour le même ratio de monomère, mais aucune explication n'a été fournie sur ce phénomène¹⁴.

2. La fabrication de *scaffolds* par stéréolithographie à base de PTMC ou de gélatine

Le travail sur le PTMC en stéréolithographie a principalement été réalisé par l'équipe de Grijpma. Le PTMC a été utilisé dans de nombreuses applications allant de la régénération de tissus durs telles que l'os jusqu'à des tissus mous comme le cartilage⁶³, le disque intervertébral^{64,65} ou encore les vaisseaux sanguins^{58,59}. Pour cela, l'architecture macromoléculaire⁶⁰ mais aussi les masses moléculaires ont été ajustées afin de générer les propriétés mécaniques les plus adaptées^{61,62}. De plus, des hydrogels à base de PTMC ont également été développés avec ajout de charges inorganiques afin d'augmenter la résistance mécanique et favoriser le comportement cellulaire⁶⁶. Le PTMC a montré un excellent comportement d'adhésion, de prolifération voire de différenciation cellulaire avec plusieurs types de cellules (hUVEC, hMSC, hAF, hASC) et également *in vivo*⁵⁸. Cependant, aucune étude n'a été réalisée sur le greffage du PTMC avec un biopolymère pour la stéréolithographie en santé.

A l'inverse, le travail sur la gélatine en stéréolithographie a uniquement porté sur de la régénération de tissus mous type cornée oculaire ou vaisseaux sanguins^{67,68}. Dans la perspective de viser une reconstruction de tissus demandant une résistance plus efficace, la gélatine a été modifiée par greffage de PEG et photoréticulée par stéréolithographie⁴⁷. Cette modification a permis d'améliorer l'utilisation de la gélatine et d'augmenter la résistance mécanique. Cette étude est actuellement le seul exemple de résine hybride polymère synthétique/macromolécule naturelle utilisée en stéréolithographie.

3. Conclusion

Si l'association gélatine/PTMC n'a jamais été rapportée dans la littérature, le PTMC et la gélatine photosensibles ont indépendamment déjà fait l'objet d'études en stéréolithographie (chapitre 1). Dans ce chapitre, nous avons développé un nouveau biomatériau à base de PTMC greffé chimiquement sur la gélatine. Cependant, si l'amorçage de la polymérisation par ROP est classiquement étudié à partir de groupements hydroxyle, les fonctions amine ne sont pas considérées pour amorcer la polymérisation^{14,15,56,57}. Ainsi, la ROP du TMC amorcée par des fonctions amine n'a jamais été démontrée dans la littérature. C'est pourquoi, dans la perspective de polymériser le PTMC sur la gélatine par ROP à partir des fonctions hydroxyle mais aussi amine, nous avons initialement étudié la polymérisation par ROP du TMC par des fonctions amine et catalysées à partir de plusieurs types de catalyseurs. Cette étude a fait l'objet d'un article publié dans le journal *Polymers* (doi.org/10.3390/polym13020280, annexe) et a permis de démontrer l'amorçage efficace de la ROP du TMC par des amines en présence d'un organocatalyseur mais également de mettre en évidence l'impact des fonctions uréthane générées sur les propriétés du matériau. En effet, l'amorçage par des amines mène à des polymères semi-cristallins par la formation de liaisons entre les groupements uréthane et carbonate. Cette étude a été étendue à des acides aminés servant de modèles pour la polymérisation de la gélatine. Par soucis de place l'article est disponible dans la partie annexe.

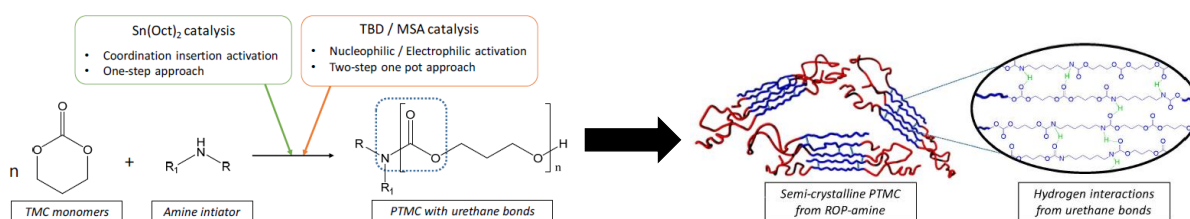


Figure II-3 - Schéma général de l'article sur l'ouverture de cycle des TMC par des amines

La suite du travail est présentée dans l'article suivant (*Biomacromolecules*, 2021 doi.org/10.1021/acs.biomac.1c00687) où la polymérisation du TMC sur la gélatine a été suivie par différentes méthodes et le copolymère photosensible a été étudié par la suite en stéréolithographie.

4. Article - Photoprintable Gelatin-*graft*-Poly(trimethylene carbonate) by Stereolithography for Tissue Engineering Applications

Thomas Brossier, Gael Volpi, Jonaz Vasquez-Villegas, Noémie Petitjean, Olivier Guillaume, Vincent Lapinte, Sébastien Blanquer*

ABSTRACT

The stereolithography process is a powerful additive manufacturing technology to fabricate scaffolds for regenerative medicine. Nevertheless, the quest for versatile inks allowing one to produce scaffolds with controlled properties is still unsatisfied. In this original article, we tackle this bottleneck by synthesizing a panel of photoprocessable hybrid copolymers composed of gelatin-*graft*-poly(trimethylene carbonate)s (Gel-*g*-PTMC_{*n*}). We demonstrated that by changing the length of PTMC blocks grafted from gelatin, it is possible to tailor the final properties of the photofabricated objects. We reported here on the synthesis of Gel-*g*-PTMC_{*n*} with various lengths of PTMC blocks grafted from gelatin using hydroxy and amino side groups of the constitutive amino acids. Then, the characterization of the resulting hybrid copolymers was fully investigated by quantitative NMR spectroscopy before rendering them photosensitive by methacrylation of the PTMC terminal groups. Homogeneous composition of the photocrosslinked hybrid polymers was demonstrated by EDX spectroscopy and electronic microscopy. To unravel the individual contribution of the PTMC moiety on the hybrid copolymer behavior, water absorption, contact angle measurements, and degradation studies were undertaken. Interestingly, the photocrosslinked materials immersed in water were examined using tensile experiments and displayed a large panel of behavior from hydrogel to elastomer-like depending on the PTMC/gel ratio. Moreover, the absence of cytotoxicity was conducted following the ISO10993 assay. As a proof of concept, 3D porous objects were successfully fabricated using stereolithography. Those results validate the great potential of this panel of inks for tissue engineering and regenerative medicine.

KEYWORDS: Biopolymer, hybrid copolymer, poly(trimethylene carbonate) (PTMC), hydrogel, photo-crosslinking, stereolithography, grafting-from

4.1. Introduction

Tissue engineering (TE) is one of the most promising approaches for the biomedicine of tomorrow. Most of the TE strategies rely on the use of biomaterials and on their processing to create temporary scaffolding structures. However, despite significant efforts, proposing a universal strategy that could generate an ideal scaffold for tissue engineering remains a considerable challenge. Indeed, such scaffolds must not only be biocompatible, biodegradable, and porous but must also display sufficient mechanical properties and be endowed with biofunctionalities such as promoting cellular adhesion and proliferation⁶⁹. In that sense, one of the crucial steps in the TE strategy is the choice of the polymer material.

In this context, a broad variety of natural biopolymers and synthetic polymers has been integrated in the composition of the TE scaffold^{70,71}. More particularly, synthetic-based polymers with specific biodegradability and tunable properties have been extensively used for scaffold production^{72,73}. Among them, the family of aliphatic polycarbonates, with the gold standard being poly(trimethylene carbonate) (PTMC), has been largely assessed as a scaffold for bone⁷⁴, cartilage⁷⁵ or intervertebral disc tissue⁶⁴. PTMC is especially recognized (i) for its specific biodegradation by surface erosion, which then does not compromise the mechanical properties during the degradation process, and (ii) for its elastomer-like property, especially upon curing¹. Moreover, the typical carbonate functions lead to the absence of acidic by-products generated upon degradation, which has been recognized as a huge advantage in tissue reconstruction⁷⁶. However, despite such promising interest, PTMC remains highly hydrophobic with no cell recognition sites, which explains the difficulty for the cells to adhere onto it⁷⁷. To overcome those limitations, an attractive approach is to combine such synthetic-based materials with biopolymers originating from the extracellular matrix^{78,79}.

Biopolymers are widely recognized to be an effective matrix for TE scaffolds especially because of their remarkable affinity with water and similarity with the native tissue composition. However, those biopolymers display often weak mechanical properties, and their degradation kinetics remains inappropriate to be used as a single component of any scaffolds⁸⁰. Hence, the approach could consist in developing a hybrid polymer based on PTMC to confer suitable mechanical performances and extracellular matrix biopolymers to endow the biomaterials with effective bioactivity. Several biopolymers from the extracellular matrix have been already investigated in the reconstructive tissue area including collagen, gelatin, fibrin, elastin, and

glycosaminoglycan^{81,82}. Gelatin remains one of the most traditional natural polymers in TE^{12,83}. Gelatin is a protein derived from the denaturation of collagen, which then allows one to provide favorable cellular bioadhesion due to the numerous RGD sequences. Multiple chemical strategies have been attempted to improve its mechanical properties either by grafting poly(ethylene glycol) (PEG) onto the gelatin^{84,85}, by crosslinking it *via* enzymes⁸⁶, or by photopolymerization of methacryloyl gelatin (Gel-MA)⁸⁷. Nevertheless, those processes have still limited successes, and the achieved mechanical strengths are still far from being suitable.

Consequently, the synthesis of a hybrid material based on gelatin and PTMC that will not only reinforce the mechanical properties of the gelatin but also significantly improve the cell response of the raw PTMC would be of great interest. However, the synthesis of such hybrid materials is challenging, mainly because of the physical and chemical incompatibility between the hydrophobic nature of PTMC and the highly hydrophilic natural biopolymers. Hence, the reported blend approach requires specific conditions to yield a homogeneous phase and, most of the time, involved the use of a toxic or hazardous solvent⁸⁸. An alternative of the blend approach has been recently reported by Grijpma *et al.*, which consists in a hybrid network of Gelatin-PTMC obtained from blended methacrylated macromonomer precursors and subsequently photocured⁸⁹. Despite promising mechanical properties, homogeneous dispersion can only be reached by using a harsh solvent with a high level of dilution, which then limits the possibility to use such a system for scaffold fabrication by additive manufacturing. Unlikely, from another perspective, PTMC has been coupled as a hybrid block terpolymer with other type of extracellular matrix such as elastin² and hyaluronic acid⁵ to generate amphiphilic and self-assembled block copolymers. But, to the best of our knowledge, directly grafting PTMC on gelatin is an approach never reported so far in the literature.

We propose here hybrid copolymers gelatin-*graft*-poly(trimethylene carbonate)s (Gel-*g*-PTMC_{*n*}), obtained by the “grafting-from” approach using TMC monomers and specific reactive functions of the gelatin as a macroinitiator (Figure II-4). In designing and synthesizing such complex materials, the lack of chemical characterizations remains a recurrent issue, which is required to elucidate the individual role of each component on the final behavior of the copolymer structure. Therefore, efforts have been devoted in this work to fully characterize the hybrid material using several lengths of PTMC block grafted from the gelatin. We further functionalized the Gel-*g*-PTMC_{*n*} copolymers by inserting photosensitive functions to generate

a photocrosslinked network. We then tested the photocrosslinked hybrid copolymers in terms of mechanical properties, cytocompatibility, and degradability. Finally, the photosensitive Gel-g-PTMC_n copolymers were also used to validate their processability by 3D printing technology using vat photopolymerization such as stereolithography (SLA). SLA is recognized for its remarkable efficiency and considerable advantages in terms of versatility in manufacturing, high accuracy, and speed⁹⁰. In consequence, we proposed here an attractive option, as it is a versatile and controlled approach, allowing one to generate a large variety of hybrid materials based on gelatin and PTMC without any issue of miscibility and which can be used to fabricate 3D porous scaffolds using SLA.

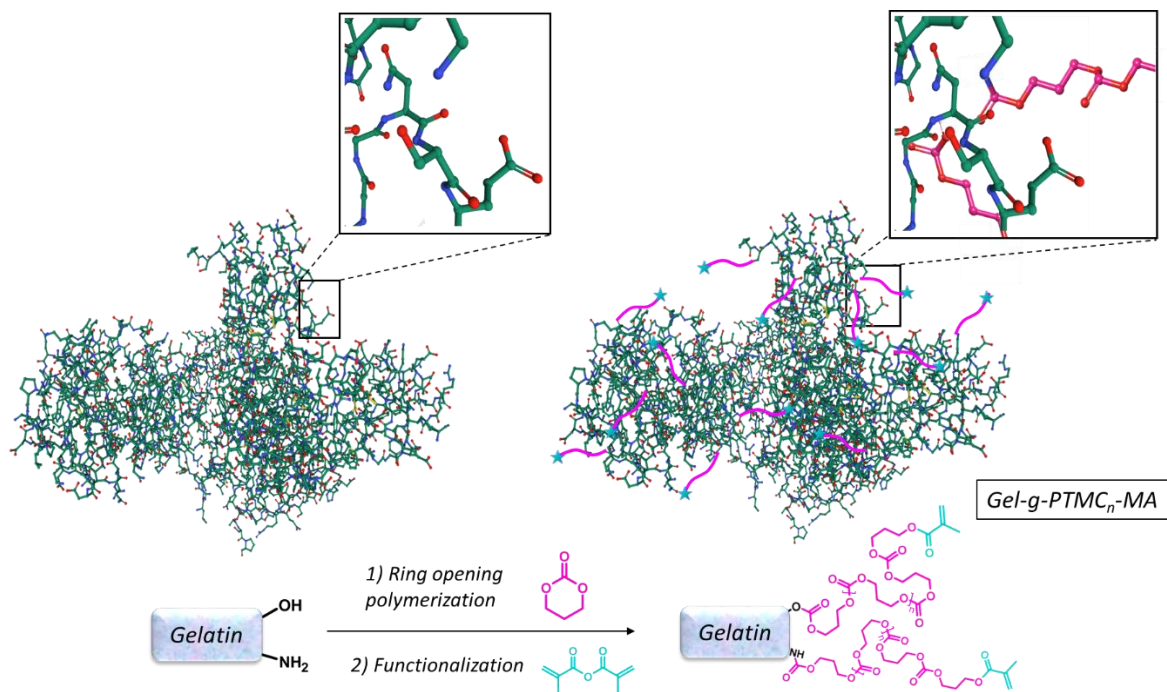


Figure II-4 - Schematic molecular overview and chemical pathway of the PTMC (pink) grafted from the gelatin and functionalized for further photofabrication (blue) (Gel-g-PTMC_n-MA).

4.2. Experimental Section

4.2.1. Materials

Trimethylene carbonate (TMC) was provided by Foryou Medical Devices, China. Gelatin from porcine skin (type A, gel strength 300 g Bloom), triethylamine (TEA), methacrylic anhydride, hexamethyldisilazane, anhydrous dimethyl sulfoxide (DMSO), dichloromethane (DCM), phosphate-buffered saline (PBS), and 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene (TBD), stannous

octanoate, and hexamethyldisilazane were purchased from Sigma-Aldrich, France. Darocur 1173 was acquired from BASF (Germany). Orange G dye comes from TCI, Japan. The reagents and solvents were of analytical grade and were used as received.

4.2.2. Synthesis and Formulation

4.2.2.1. Synthesis of Gelatin Methacrylate (Gel-MA).

Gel-MA was synthesized according to the previously published method⁹¹. Briefly, 10 g of porcine gelatin type A (0.015 mol, 1 equiv) was dissolved in 200 mL of PBS under continuous stirring at 50 °C. Then, methacrylic anhydride (0.06 mol, 4 equiv) and triethylamine (0.06 mol, 4 equiv) were added dropwise to the solution. The reaction was stirred vigorously at 50 °C for 2 h. The solution was then dialyzed against deionized water using a dialysis tubing (cutoff: 8 kDa) at 50 °C for one week to remove salts and unreacted methacrylic anhydride. The Gel-MA solution was freeze-dried, resulting in porous Gel-MA foam stored until use.

4.2.2.2. Synthesis of PTMC by Ring Opening Polymerization.

The synthesis of 50 g of PTMC ($M_n = 10,000$ g/mol) was carried out by ring-opening polymerization of TMC (0.49 mol, 100 equiv.), initiated by 1,6-hexanediol (0.0049 mol, 1 equiv) and catalyzed by stannous octanoate at 130 °C (0.05 wt %) for 24 h under inert N₂ gas. After cooling to room temperature, PTMC was dissolved in dried dichloromethane (50 mL) and precipitated in cold methanol. The precipitate was filtered and dried in the dark under ambient conditions overnight.

4.2.2.3. Synthesis of Grafted PTMC from the Gelatin (Gel-g-PTMC_n)

Gel-g-PTMC_n ($n = 6, 10, 16,$ and 32) were obtained *via* ring-opening polymerization in solution. Briefly, for the synthesis of Gel-g-PTMC₆, 1 g of gelatin (on the basis of the known composition, the amounts of available amine groups and hydroxyl groups for 1 g of gelatin represent 0.29 and 1.5 mmol, respectively⁹²) was charged in a round-bottom flask under an inert nitrogen atmosphere and dissolved in dry DMSO (20 mL). The solution was stirred at 50 °C until full gelatin dissolution before the addition of TMC (10 mmol, 5 equiv regarding the amount of active groups from the gelatin) monomer. The proportion of TMC is adjusted regarding the

expected n ratio of PTMC. The mixture was stirred at 50 °C until complete consumption of the free amino pendant groups as described in our previous report⁹³, followed by the addition of the TBD catalyst (0.9 mmol, 0.5 equiv regarding the amount of active groups from the gelatin). The polymerization reaction was stirred at 50 °C under an inert nitrogen atmosphere and the conversion was followed by ¹H NMR spectroscopy. After the reaction was completed, the crude was precipitated into water and washed with ethanol. Exception was done for the determination of ROP initiation where the reaction was stopped just after the beginning of the polymerization, then purified by dialysis, and analyzed by ¹H NMR spectroscopy in D₂O.

4.2.2.4. Synthesis of PTMC and Methacrylated Gel-g-PTMC_{*n*} (Gel-g-PTMC_{*n*}-MA)

PTMC and Gel-g-PTMC_{*n*} were end-functionalized with methacrylate groups using methacrylic anhydride (4 equiv) in the presence of triethylamine (4 equiv) in dichloromethane (50 wt %). For all the formulations, the solution was then stirred in the dark for 3 days at room temperature under a nitrogen atmosphere. The mixtures were precipitated in cold ethanol, and the precipitates were filtered and dried in the dark under ambient conditions overnight. The final products were stored at 4 °C until further use.

4.2.3. Characterization and Measurements

4.2.3.1. Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry

¹H NMR, DOSY NMR and quantitative ¹³C NMR spectra were recorded on 400 and 500 MHz Bruker Aspect spectrometers. CDCl₃ and D₂O were used as deuterated solvents. Chemical shifts were given in parts per million (ppm). The reference peaks were residual D₂O at 4.79 ppm for ¹H NMR or, CDCl₃ at 7.26 and 77 ppm for ¹³C NMR. Conversion was also determined by ¹H NMR spectroscopy. The degree of polymerization (DP_{*n*}) was calculated from quantitative ¹³C NMR according to eq 1.

$$DP_n = \frac{\int c_{62ppm}/2}{\int c_{59ppm}} \quad (1)$$

4.2.3.2. Complex Viscosity

Gel-*g*-PTMC_{*n*} polymers were diluted in 20 wt % DMSO. The viscosity properties were investigated by performing complex viscosity measurements. Viscoelastic properties of Gel-*g*-PTMC_{*n*} solutions were measured using a rheometer apparatus (Physica Modular Compact MCR301, Anton Paar, Germany) at frequencies ranging from 0.1 to 10 Hz (0.6 to 62.8 rad s⁻¹) at 25 °C. Oscillatory shear measurements were conducted using a 40 mm 2° diameter steel cone with a truncation gap of 55 μm to measure the complex viscosity (η^*) and deduce the zero-shear viscosity (η_0) at 0.1% strain.

4.2.3.3. Crosslinker Chamber and Building

Films were photocrosslinked in a UV Crosslinker Biolink chamber (Thermo Fisher, France) using UV lamps with a broad wavelength (maximum peak at 365 nm). Irradiation was performed at room temperature at 10 cm from the surface of the specimens, and the intensity was around 2-3 mW/cm² for 10 min.

4.2.3.4. Degree of Swelling

The swelling behavior and water uptake properties of the Gel-*g*-PTMC_{*n*} networks were performed on photocrosslinked disk films (1 cm in diameter and 2 mm in thickness). Samples were initially dried after irradiation and then weighted to obtain the initial mass (m_i). Then, samples were incubated in distilled water for 24 h (water was renewed five times). After swelling, the polymers were weighed to determine the swollen mass (m_s) and vacuum-dried to determine the dry mass (m_d).

The photocrosslinking efficiency was calculated by the gel content (eq 2) and the water absorption was determined by the equilibrium water content (EWC) (eq 3).

$$\text{Gel content} = \frac{m_d}{m_i} * 100 \quad (2)$$

$$\text{EWC} = \frac{m_s - m_d}{m_s} * 100 \quad (3)$$

4.2.3.5. Contact Angle

Disk samples (1 cm in diameter and 2 mm in thickness) of the photocrosslinked Gel-*g*-PTMC_{*n*} were initially prepared, and the measures were performed on extracted (three times in DCM) and dried samples. Contact angle measurement (G10 optical, Krüss, Germany) was conducted to determine the surface tension by depositing water drops on three different areas of the films with a microsyringe.

4.2.3.6. Scanning Electronic Microscope and Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy

The surface elemental compositions of photo-crosslinked Gel-*g*-PTMC_{*n*} films were determined on extracted and dried samples (1 cm in diameter and 2 mm in thickness). The analyses were performed using scanning electronic microscopy (SEM) (Phenom-World ProX) coupled with energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) using an accelerating voltage of 15 kV. Prior to SEM analysis, samples were freeze-dried and sputter-coated with gold. Mapping quantification analysis was performed using the dedicated Thermo Scientific Phenom Elemental Mapping Software. Results are given in % of atomic element.

4.2.3.7. Mechanical Measurements

The dumbbell shape (ISO527-2) of the Gel-*g*-PTMC_{*n*} network was first molded, and the samples were then extracted and dried under vacuum at room temperature for one night. The films were then immersed in water for 24 h. The samples were immersed in water, and the elongation at break and Young modulus were measured with an Instron3366L5885 tensile tester. The cross-head speed was 5 mm s⁻¹. The elongation at break was expressed as a percentage of the original length and the modulus was obtained at 0.5% deformation by stress/strain.

4.2.3.8. Evaluation of Cytotoxicity of the Crosslinked Polymers

The cytocompatibility of the different Gel-*g*-PTMC_{*n*} networks (with increasing percentage of PTMC, from DP₆ to DP₃₂) was tested via extraction tests in accordance with the ISO 10993-5

guidelines, to detect the presence of cytotoxic compounds released from the samples into the media.

The extract test was conducted by immersing crosslinked copolymer disks (surface area: $1.25 \text{ cm}^2 \text{ mL}^{-1}$) in extraction vehicle, consisting of cell culture medium, i.e., high-glucose Dulbecco's modified Eagle medium (HG-DMEM, Gibco, United Kingdom) supplemented with 10% newborn calf serum (NCBS) and 1% penicillin streptomycin. This incubation was conducted at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 3 days. Next, the extracts were collected and used as feeding media for L929 fibroblasts.

The L929 fibroblasts were seeded at a density of 5.0×10^3 cells well^{-1} in 96-well plates and cultivated until reaching approximately 70% confluency. Next, the culture medium was removed and the cells were incubated in $100 \text{ }\mu\text{L}$ of the extracts for 24h ($n=6$). Extract-free HG-DMEM was applied as the feeding medium for the cells as the positive control whereas a culture medium supplemented with 5% DMSO was applied as the feeding medium for the cells as the negative control.

The metabolic activity of the L929 fibroblasts was assessed using PrestoBlue™ Cell Viability Reagent (Invitrogen, Fisher Scientific, Vienna, Austria) at 24 h of the culture. The fluorescence of the medium was recorded ($\lambda_{\text{ex}} = 560 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$) using a plate reader (Synergy™ H1 BioTeK™ plate reader, Bad Friedrichshall, Germany). The fluorescence value obtained for the cells cultivated in the extract-free medium was considered as 100% viability for each time point. The fluorescence values of the sample extracts were normalized against the corresponding control group and expressed relative to this 100% viability. The morphology of the cells spreading onto the plastic of 96 well plates was observed by taking images after the extract test using bright-field imaging of the LSM700 (Zeiss, Germany), mag. 20 (Camera AxioCam 105).

The morphology of the cells spreading directly onto the surface of Gel-g-PTMC_n was observed by seeding 10.0×10^3 cells of L929 fibroblasts onto the film (2 mm in thickness and 10 mm in diameter). After 3 days of incubation in HG-DMEM supplemented with 10% NCBS and 1% penicillin streptomycin, the samples were retrieved for scanning electron microscopy observation (SEM Philips XL Series 30). Briefly, samples were washed in PBS and fixed in buffered paraformaldehyde at 4%, followed by gradual dehydration in ethanol and by

immersion in hexamethyldisilazane. After drying, the samples were sputter-coated with Au and investigated by SEM.

4.2.3.9. Degradation Study

In vitro degradation of the Gel-*g*-PTMC_{*n*} networks (1 cm in diameter and 2 mm in thickness) was evaluated in harsh conditions to accelerate the degradation process. Dried samples were placed in NaOH solution (1 M) at 40 °C. Before and after incubation (4 h, 6 h and 8 h), specimens were collected, wiped, and deposited on a glass plate to visualize the degradation.

4.2.3.10. 3D Structures with Stereolithography Apparatus

To prepare resin formulations for SLA processing, Gel-*g*-PTMC_{*n*} were mixed with DMSO (40 wt %) as nonreactive diluents. Darocur 1173 (3 wt % relative to the polymer) and Orange G (0.2 wt % relative to the polymer) were added as a photoinitiator and dye agent, respectively.

Cubic three-dimensional porous structures with an average pore size and strut of 1 mm were designed using the STL format from Rhinoceros 3D. The 3D structures were built from the above-mentioned resins by stereolithography (SLA) using a digital light processing (DLP) apparatus (Asiga Max X27, Australia). The 3D objects were constructed in the DLP apparatus by photocrosslinking subsequent layers of resin with thicknesses of 100 μm, upon which a pixel pattern was projected. Each layer was illuminated at an intensity of 20 mW/cm² for 30 s. After building, the structures were washed with DMSO and extracted for 72 h with DCM to leach out DMSO. The final structures were dried after 2 days at room temperature.

4.3. Results and Discussion

4.3.1. Grafting-from Strategy

By definition, the term of covalent grafting on polymers is applied to define one of the three following grafting methods: “grafting-to”, “grafting-through”, and “grafting-from”. In this work, we proposed to focus on the “grafting-from” method where the graft copolymers grow *in situ* from the active functions of the initial backbone polymer. In comparison to other methods, hybrid polymers obtained by the grafting-from approach lead to highly ramified

grafted copolymers because of the polymer–monomer reaction, which is less affected by steric hindrance than the other polymer–polymer reactions. Moreover, the purification steps are remarkably simpler as the separation of the resultant grafted copolymers from unreacted monomer precursors can be easily done by precipitation. However, the grafting-from method remains rarely employed especially because of the difficulty to characterize the ratio of the grafted copolymer. Such observation is even more true in the case of amphiphilic copolymers, especially due to the incompatibility between the blocks, which renders the characterization complex. We therefore particularly focused this work on the characterization procedure to prove the efficiency of the grafting and to determine the proportion of TMC grafted from the gelatin.

PTMC grafting from the gelatin has been done by ring-opening polymerization (ROP) of the monomer TMC from the specific active functions on the gelatin susceptible to initiate ROP. All amino acids exhibit a pendant alcohol function, which can actually be involved in the initiation of ROP. Moreover, we recently demonstrated that amino groups were also able to initiate the ROP of TMC, which then generates urethane functions⁹³. Therefore, the amino acids susceptible to initiate the ROP of TMC from the gelatin might be serine (0.328 mmol/g), threonine (0.144 mmol/g), hydroxyproline (0.902 mmol/g), lysine (0.259 mmol/g), and hydroxylysine (0.066 mmol/g)^{94–96} (Figure II-5).

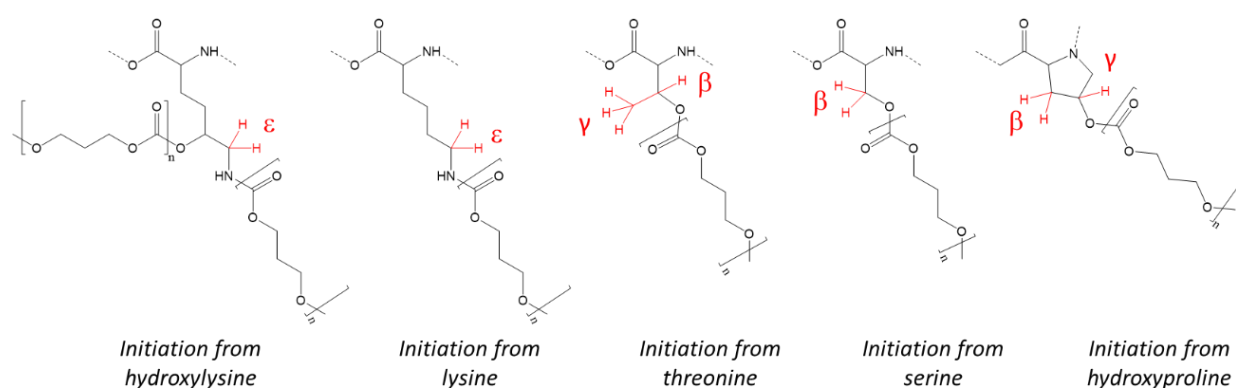


Figure II-5 - Resulting chemical structure after the ROP of TMC from amino acids of the gelatin.

To avoid the presence of residual metal in the final material, we decided to ban metallocatalysts, and oriented the study toward organo-catalysts in particular nucleophilic catalysts such as TBD. To prevent any gelatin degradation, the TBD reaction was conducted at low temperatures⁹⁷. The ROP of TMC using the TBD catalyst has already been investigated with alcohol^{98,99} or amine group initiation⁹³, even though the latter one requires multiple steps. Indeed, a previous work demonstrated that the ROP with TBD initiation by amine groups must be done in two successive steps, the first being the ring opening of one TMC unit in the absence of a catalyst followed by classic ROP initiated by the generated hydroxy groups⁵⁶. Therefore, the ROP initiation of TMC was activated from the alcohol and amine functions of the gelatin. Finally, it is also crucial to not neglect the type of solvent that will be used, as it must be able to solubilize the gelatin, the TMC monomers and the resulting hybrid polymer. DMSO was selected to perform the ROP of TMC as this solvent fulfills this requirement, and further, it is recognized as being a low hazardous solvent, in contrast to the traditional solvent used for the synthesis of hybrid copolymers.

Table II-3 - Chemical Shift of Characteristic Peaks from the Amino Acids Involved in ROP Initiation

characteristic proton of the amino acids involved in ROP initiation	amino acid abbreviation	chemical shift of protons before ROP (ppm)	chemical shift of protons after ROP (ppm)
γ -threonine (CH ₃)	γ -Thr	1.2	1.5
β -threonine (CH)	β -Thr	4.3	5.4
β -serine (CH ₂)	β -Ser	3.9	4.1
ϵ -hydroxylysine (CH ₂)	ϵ -Hyl	3.0	3.3
ϵ -lysine (CH ₂)	ϵ -Lys	3.0	3.3
γ -hydroxyproline (CH)	γ -Hyp	4.6	5.5
β -hydroxyproline (CH ₂)	β -Hyp	2.4	2.6

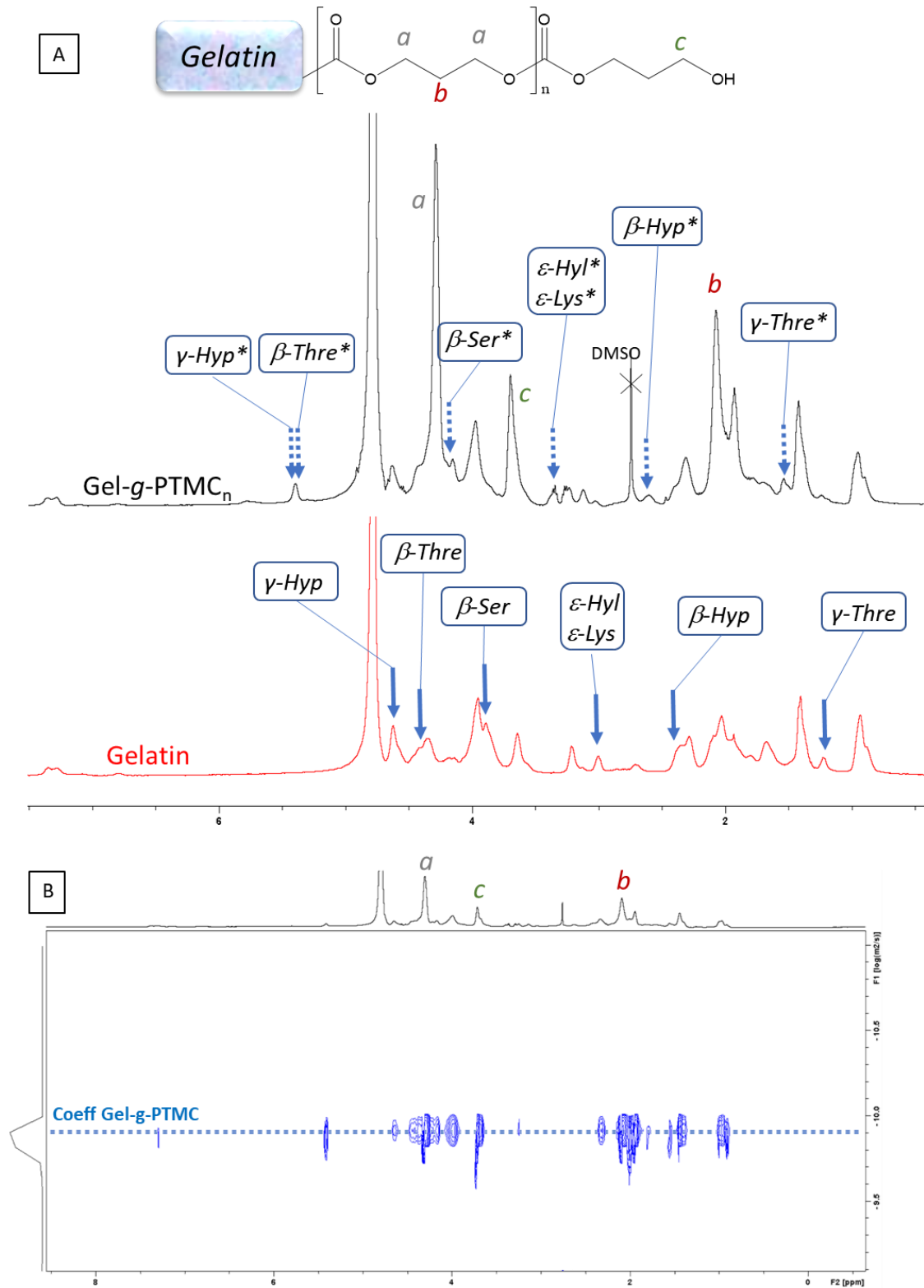


Figure II-6 - D_2O 1H NMR spectra of native gelatin and Gel-g-PTMC_n (A), with full line arrows to show the characteristic peaks of the amino acids involved in the ROP from the gelatin and dotted line arrows and asterisks for the modified amino acids from Gel-g-PTMC_n (Table II-3); D_2O DOSY NMR spectrum of Gel-g-PTMC_n (B).

Several ratios of PTMC have been synthesized, and the reaction yields reached in average $92 \pm 4\%$ for all the hybrid polymers, which then indicates the high performance of the reaction. It can be noticed that the physicochemical behavior of the resulting materials, especially the solubility, differs from the proportion of PTMC, which will then result in a serious issue for the characterization. Therefore, to get a global and correct characterization of the grafting, a diagonal approach was undertaken using first ^1H NMR in D_2O to validate the ROP initiation from the gelatin, while quantitative ^{13}C NMR spectroscopy in CDCl_3 was used to determine the proportion of grafted PTMC.

4.3.1.1. Validation of ROP Initiation from Gelatin Using ^1H NMR in D_2O

^1H NMR spectroscopy in D_2O has been used to determine the initiation process of TMC from the gelatin. Indeed, D_2O was the most appropriate solvent to characterize the gelatin with well-defined and attributed characteristic protons of amino acids, especially those involved in the ROP initiation (Figure II-6). Therefore, to keep the solubility in water, the analyses in D_2O must be performed at the beginning of the polymerization, just at the initiation of TMC by the active functions of the gelatin.

From the ^1H NMR spectrum of the gelatin, the characteristic peaks of the amino acids involved in the ROP initiation (serine, threonine, lysine, hydroxylysine and hydroxyproline) were assigned (Figure II-6 and Table II-3). Upon polymerization of the TMC monomers, the characteristic peaks from such amino acids shifted, which proved the grafting (Figure II-6 A and Table II-3). Based on the study from Claassen *et al.* on methacryloyl gelatin¹⁰⁰, it has been possible to assign each shifted peak attributed to the modified amino acids once the polymerization was initiated. Such peak shifting can be also correlated with the growing signal of the characteristic peaks from the PTMC polymer at 2 and 4.2 ppm. Moreover, to ensure the grafting of PTMC on the gelatin, a DOSY NMR analysis in D_2O was performed. In Figure II-6 B, the single diffusion coefficient demonstrated the presence of both gelatin and PTMC within the same macromolecule, and consequently, it proves the successful grafting-from approach for the synthesis of hybrid polymers. However, it must be noticed that in return, quantitative ^{13}C NMR spectroscopy of grafted gelatin in D_2O is not sufficiently consistent because of the

high complexity of the spectra, and the determination of the grafted PTMC ratio cannot be identified as long as the hybrid copolymer remains soluble in water.

4.3.1.2. Quantification of Grafted PTMC by Quantitative ^{13}C NMR Spectroscopy in CDCl_3

Even though the quantification in D_2O was not possible, ROP initiation from the gelatin was successfully demonstrated. Therefore, it was relevant for us to reach higher ratios of PTMC, to finally be potentially able to quantify the grafting. However, the threshold of solubility of the hybrid copolymer from water to the organic solvent is narrow, and the Gel-*g*-PTMC_{*n*} becomes rapidly insoluble in water once PTMC chains are growing. Consequently, as the gelatin fraction is not soluble in an organic solvent, only the PTMC blocks from the copolymer were visualized by NMR spectroscopy in CDCl_3 . We investigated the possibility of quantitative ^{13}C NMR spectroscopy to measure the average size of grafted PTMC from the gelatin. As shown in Figure II-7 A, the end-chains were easily distinguishable at 59 ppm, while the peak at 62 ppm represents the aliphatic carbons of the PTMC chain and, at 154 ppm, the carbon of the carbonate functions. By comparing the peak intensity using eq 1, the number of TMC grafted from the gelatin can be calculated and the average chain size of PTMC can be subsequently deducted. As schematized in Figure II-4, gelatin is a huge protein compared to the PTMC chains, and therefore, we chose a nomenclature that takes into consideration the different ratios of PTMC regarding their DP_{*n*} rather than the ratio of PTMC related to gelatin. We determined four different grafting ratios named as Gel-*g*-PTMC₆, Gel-*g*-PTMC₁₀, Gel-*g*-PTMC₁₆ and Gel-*g*-PTMC₃₂. It is crucial to mention that the conversion rates measured by ^1H NMR spectroscopy were around $93 \pm 2\%$ for all the synthesized Gel-*g*-PTMC_{*n*}. Consequently, the high degree of conversion with satisfying yield of reaction coupled with DOSY NMR spectroscopy can ensure that all TMCs were grafted on the gelatin.

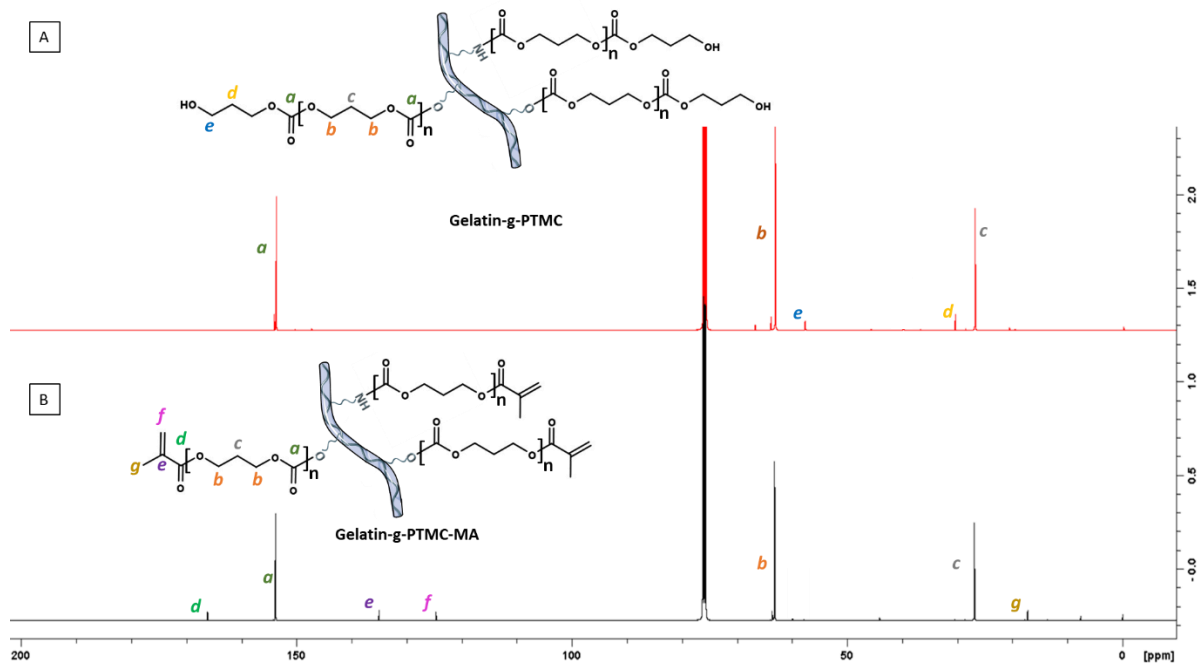


Figure II-7 - Quantitative ¹³C NMR spectrum of Gel-g-PTMC_n (A) and, after methacrylation, Gel-g-PTMC_n-MA (B) in CDCl₃.

Finally, the last step to obtain photosensitive polymers for SLA fabrication consists in the functionalization of the hybrid polymers by methacrylate active moieties. This approach is now widely used and recognized to be efficient to lead to photocrosslinkable polymers¹⁰¹. The functionalization was followed by quantitative ¹³C NMR spectrometry with the apparition of the characteristic signal of the carbonyl from the grafted methacrylate at 168 ppm (Figure II-7 B). The proportion of the methacrylate group was calculated by comparing the characteristic peaks of the methacrylate carbonyl with those of the carbonyl from the PTMC chains at 152 ppm. For all the hybrid polymers we reached an average of 80 ± 3% of grafted methacrylate functions.

The rheological viscosity measurement in DMSO was monitored on Gel-g-PTMC_n samples to determine the influence of the length of PTMC blocks grafted on a gelatin backbone. This characterization is essential for our application, as it is well known that viscosity is a leading parameter for further stereolithography processing. As shown in Figure II-SI-13, the Gel-g-PTMC_n viscosity was not dependent on the frequency in contrast to the native gelatin. The grafting of PTMC on the gelatin biomacromolecule stabilized the

rheological behavior in frequency as pristine PTMC. Moreover, the higher the DP_n of PTMC is, the higher the viscosity is, ranging from 0.24 to 136.7 MPa.s for DP_6 and DP_{32} , respectively. The viscosity depended highly on the ramifications of the macromolecular structure, and consequently, an exponential enhancement of the viscosity can be noted, which corroborates the proportion of PTMC calculated by NMR. The presence of longer PTMC chains increases the chain entanglement, which then amplifies the viscosity of the resin.

4.3.2. Physical Properties of Photocrosslinked Hybrid Copolymers Gel-*g*-PTMC_{*n*}

The photosensitive hybrid polymers Gel-*g*-PTMC_{*n*}-MA in 20 wt % DMSO were then successfully photocrosslinked in a UV crosslinker chamber at 365 nm after 10 min in the presence of a photoinitiator Darocur 1173 at room temperature. The complete consumption of the photoreactive methacrylate units has been checked by FT-IR spectroscopy regarding the characteristic C=C band at 1640 cm⁻¹ (data not shown). The network materials were characterized by various techniques to demonstrate the impact of PTMC on gelatin on both the surface and the inner part of films from the resulting materials.

First of all, the photocrosslinking density was determined by the measurement of gel content (Table II-4). It appears that for the grafted PTMC above DP_{10} , the networks were formed with a gel content between 81 and 95% in DMSO. As previously established, DMSO was the best solvent to solubilize the gelatin and TMC monomers. DMSO was consequently used for copolymer photocrosslinking and for investigating the gel content. However, the gel content for photocrosslinked gelatin and Gel-*g*-PTMC₆ was found not to be optimal in this solvent compared to PTMC or copolymers of higher DP. This behavior can be due to a lower solubility of gelatin and Gel-*g*-PTMC₆ in DMSO, which then reduces slightly the efficacy of the photocrosslinking reaction.

The only moiety of the hybrid Gel-*g*-PTMC_{*n*} bearing nitrogen atoms is the gelatin. Consequently, the percentage of nitrogen can be an efficient probe to estimate the amount of gelatin in the Gel-*g*-PTMC_{*n*} network. The SEM images were undertaken on the Gel-*g*-PTMC_{*n*} film after cross section to get access to the inner part of the materials (Figure II-SI-14), and no observation of phase separation could be visualized. The chemical homogeneity of the samples was then determined by the SEM EDX analysis (Figure II-8 A) for nitrogen

investigation. First, as shown in the mapping quantification, similar amounts of nitrogen were detected in different points of each Gel-*g*-PTMC_{*n*} network film, demonstrating the homogeneous distribution of the gelatin for each hybrid copolymer without phase segregation. Second, as expected, the proportion of nitrogen decreased when the length of PTMC blocks in the Gel-*g*-PTMC_{*n*} network increased, as shown in Figure II-8 A. Interestingly, such evolution is proportionately following the same trend as the DP_{*n*} of the grafted PTMC.

The Gel-*g*-PTMC_{*n*} network composition also influenced the hydrophilic behavior of the films, as illustrated by contact angle measurement (Figure II-8 B). We noted a round drop on the surface of pristine photocrosslinked PTMC and Gel-*g*-PTMC_{*n*} with PTMC chains above DP₁₀. The values were close to 100°, a typical value of a hydrophobic surface. By contrast, for pure gelatin or the Gel-*g*-PTMC₆ network, the contact angle decreased to 55-65° with a spread drop on the surfaces. The regular increase in contact angle value with the length of the PTMC blocks demonstrates the hydrophobization of the surface along with the PTMC content.

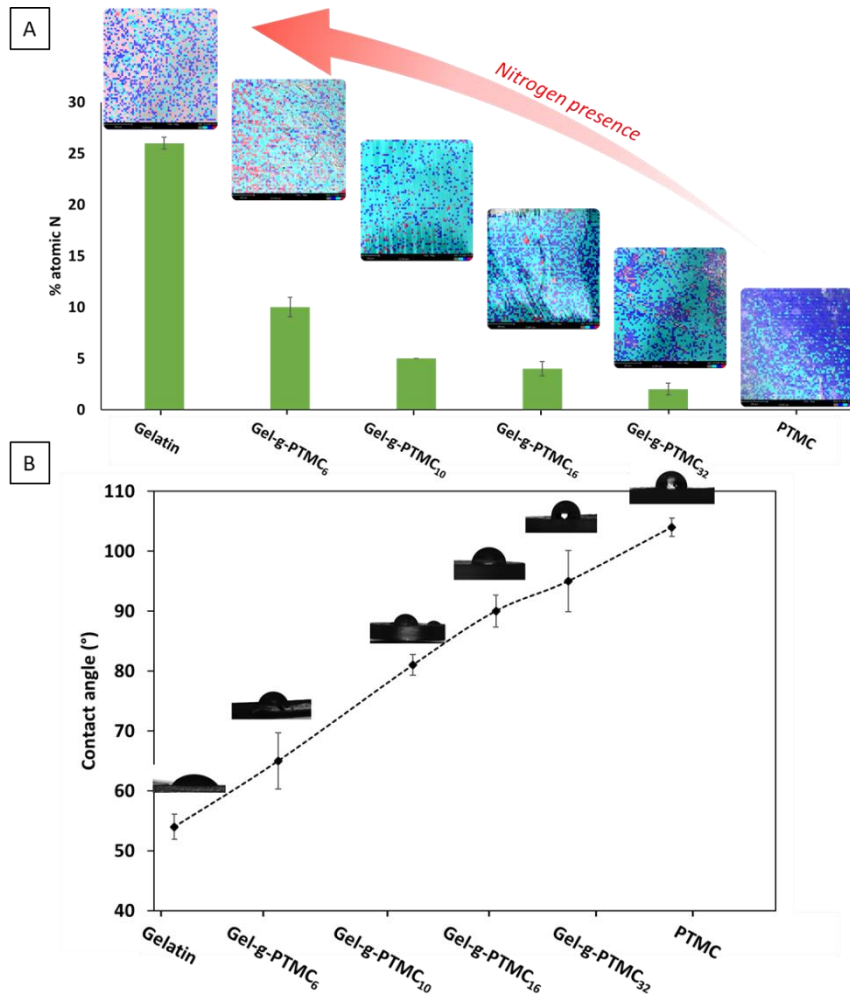


Figure II-8 - Nitrogen amount of photocrosslinked film's cross sections analyzed by SEM EDX (red for nitrogen, blue for oxygen, and green for carbon) (A) and contact angle on the Gel-g-PTMC_n surface (B).

The hydrophilic behavior of such hybrid polymers is crucial to foresee any tissue engineering applications. Hence, in correlation with the contact angle measurements, the capacity of the Gel-g-PTMC_n networks to absorb water was determined by the water uptake study (Table II-4). The Gel-g-PTMC_n adsorption values were gathered into the region from 2.2 to 8.7%. As expected, the most hydrophilic materials, owing to the highest water uptake values, were the pure photocrosslinked gelatin and the Gel-g-PTMC_n bearing the shortest PTMC chains. In contrast, pure photocrosslinked PTMC and Gel-g-PTMC_n bearing the longest PTMC chains exhibited more hydrophobic properties. Despite a non-neglected water uptake, the samples do not swell in water, which can be considered as a favorable parameter for our

targeted application. Indeed, materials that do not swell in water have reduced risks of deformation and more stable mechanical properties.

4.3.3. Mechanical Properties of the Hybrid Materials Gel-*g*-PTMC_{*n*} Network

The tensile test experiments conducted under water immersion, were realized on the photocrosslinked PTMC and gelatin samples as well as on Gel-*g*-PTMC_{*n*} networks (Figure II-9 and Table II-4). As reported in the literature, the singular behavior of crosslinked gelatin (low elongation at break, 18%; maximum stress, 0.16 MPa)¹⁰² contrasted with crosslinked PTMC (higher elongation at break, 327%; maximum strain, 1.53 MPa)^{103,104}. Our results corroborated such findings. For the Gel-*g*-PTMC_{*n*} network, the values ranged in a region between the properties of the gelatin and PTMC. From the resulting data, the evolution of the properties that are following three distinct trends can then be identified.

First of all, already for the Gel-*g*-PTMC₆ network, the mechanical properties are substantially improved compared to photocured gelatin in terms of maximum stress and elastic modulus. Then, by increasing the degree of polymerization of grafted PTMC, the Young modulus starts to significantly decrease, while the maximum stress and strain increase. Hence, 13% elongation at break was measured for short PTMC chains, whereas 96% was reached for DP₃₂ of PTMC (Table II-4). Finally, the Gel-*g*-PTMC₃₂ network tends to become softer and more elastic, with the elastic modulus falling down to 0.95 MPa and the stress at break down to 0.48 MPa. This typical evolution can be correlated with the mechanical properties of a photocrosslinked PTMC homopolymer, where low molecular weights are rather stiff with low elongation, while the elasticity increases with a higher degree of polymerization¹⁰⁴. Interestingly, between Gel-*g*-PTMC₁₀ and Gel-*g*-PTMC₁₆ networks, the low evolution of the mechanical properties is visible, which means that there may exist a threshold of PTMC length where the mechanical properties are stable and others where they significantly progress. These results demonstrated the relevance of the association between gelatin and PTMC by grafting while they are both immiscible.

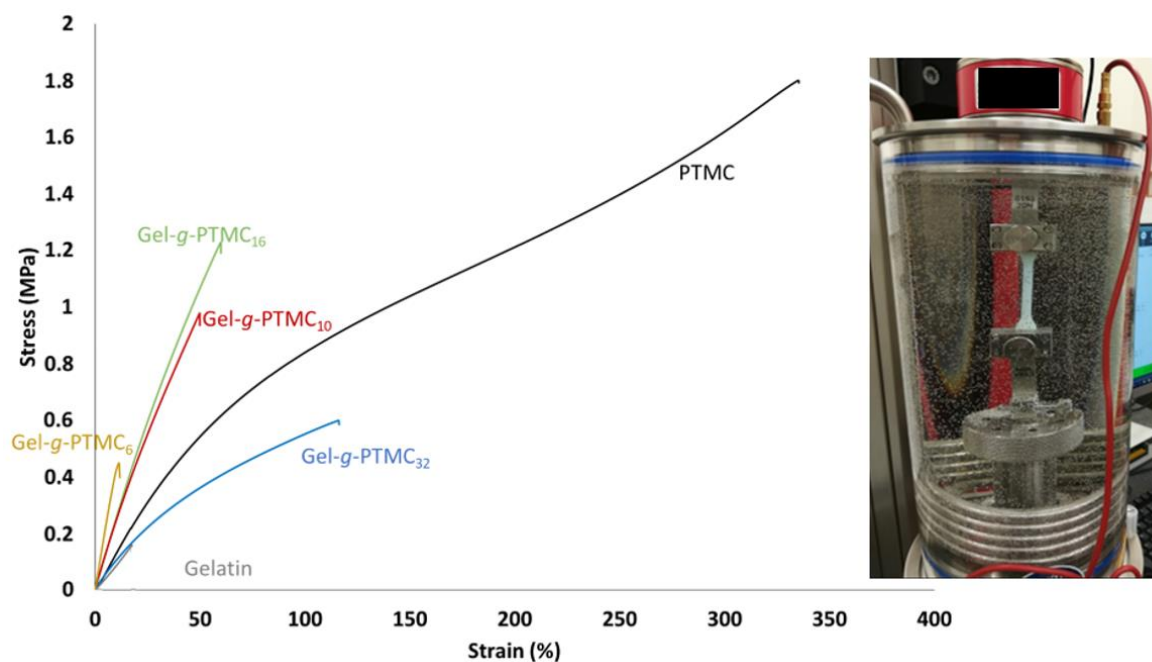


Figure II-9 - Mechanical properties of photocrosslinked gelatin, PTMC and the hybrid copolymer Gel-g-PTMC_n with increasing DP_n values.

Table II-4 - Mechanical Properties of Hydrated Photocrosslinked Gelatin, PTMC, and Gel-g-PTMC_n

	σ_{\max} (MPa)	ϵ_{\max} (%)	Young modulus (MPa)	gel content ^a (%)	water uptake ^b (%)
gelatin	0.16 ± 0.03	18.63 ± 3.96	0.74 ± 0.13	70.9 ± 0.5	71.2 ± 0.4
Gel-g-PTMC ₆	0.52 ± 0.18	13.73 ± 3.75	4.62 ± 0.84	81.9 ± 0.6	8.7 ± 0.7
Gel-g-PTMC ₁₀	1.07 ± 0.14	52.96 ± 8.12	2.76 ± 0.20	89.6 ± 1.4	3.8 ± 1.1
Gel-g-PTMC ₁₆	1.19 ± 0.04	59.58 ± 0.46	2.43 ± 0.05	90.9 ± 0.8	2.4 ± 0.5
Gel-g-PTMC ₃₂	0.48 ± 0.06	96.39 ± 16.10	0.95 ± 0.09	97.3 ± 2.2	2.2 ± 0.4
PTMC	1.53 ± 0.29	327.30 ± 6.89	1.29 ± 0.17	95.9 ± 1.1	1.3 ± 0.2

^a Determined by the equation and performed in DMSO (eq. 2).

^b Determined by the equation (eq. 3).

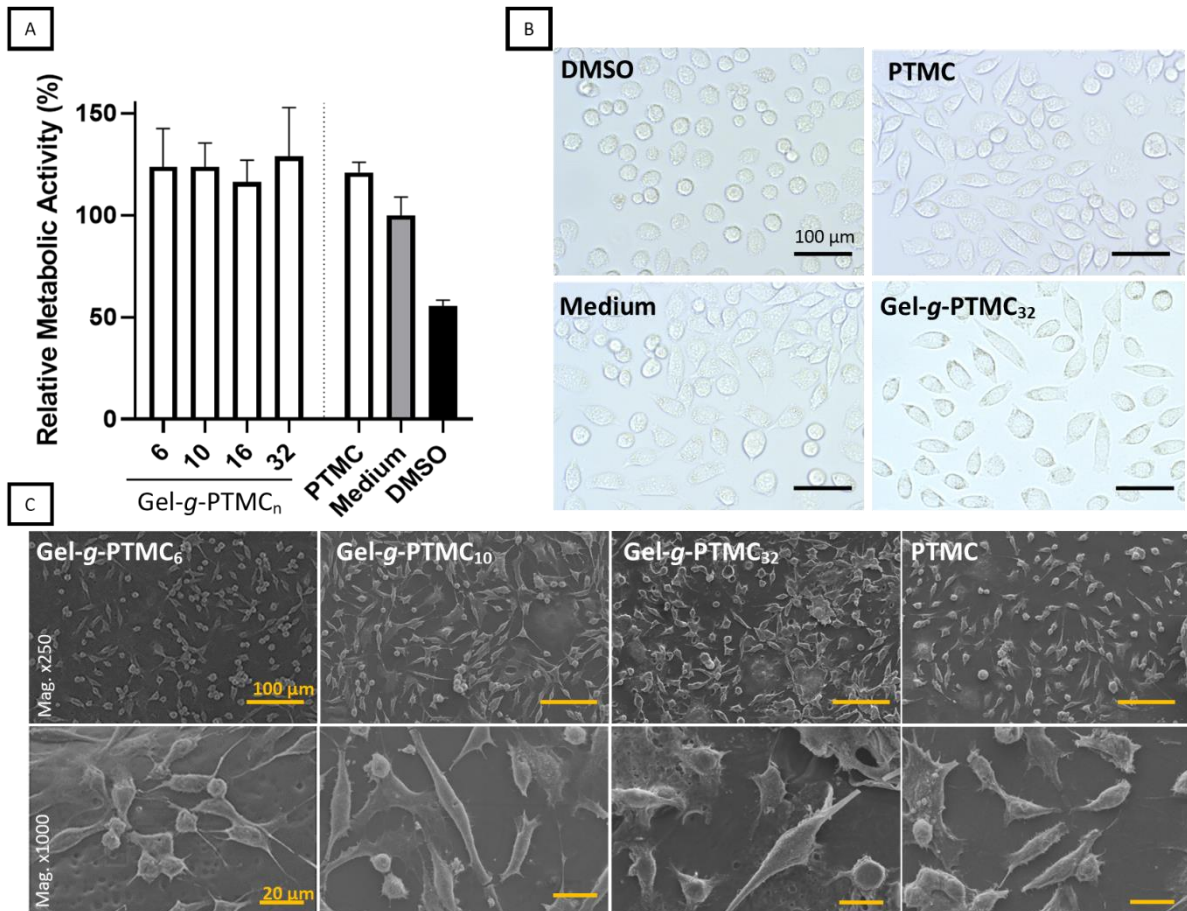
4.3.4. Cytocompatibility of the Hybrid Polymer Network Gel-g-PTMC_n

Figure II-10 - Indirect cytotoxicity assay: Relative metabolic activity of L929 fibroblasts cultured in sample extracts or extract-free media for 24 h. Ctrl (+) is extract-free medium and Ctrl (-) is the culture medium supplemented with 5% DMSO. The statistical analysis, performed by one-way ANOVA with Tukey post-test, with $p < 0.01$ ($n = 6$), did not show any differences when comparing Ctrl (+) to extract media (A). The morphology of L929 fibroblasts was similar after incubation with the different extracts (B). Direct cytotoxicity assay: SEM images of the cells proliferating onto the films of Gel-g-PTMC_n, mag. 250 (top row) and 1000 (bottom row) (C). Photocrosslinked Gel-MA has not been included in this study due to its well-known biocompatibility property.

Gelatin and PTMC are both biocompatible polymers and have been approved by Food and Drug Administration in various applications. However, the chemical modification applied to obtain photopolymerizable Gel-g-PTMC_n might induce potential adverse effects on cell viability (e.g., leachable chemical substances). To detect possible leachable cytotoxic compounds, we performed an extract test according to ISO 10993-5. Figure II-10 A represents the relative metabolic activity of L929 fibroblasts that were cultured in the extracts of Gel-g-PTMC_n with increasing amount of PTMC, normalized against medium (ctrl +). The extractions

performed in the cell culture medium revealed no significant adverse effect on the viability of L929 fibroblasts up to 72 h of the culture for any of the applied materials. Ctrl (-) based on 5% DMSO showed a sign of cytotoxicity as a reduction of the metabolic activity of L929 of 45% was detected. The morphology of the fibroblasts that were cultivated in sample extracts was similar to that of the positive control group and exhibited a spreading phenotype. Once more, cells incubated with 5% DMSO exhibited a distinct behavior, with a significantly more pronounced round-like morphology, a sign of cytotoxicity (Figure II-10 B).

A direct cytotoxicity assay was performed by directly seeding the fibroblasts onto the Gel-*g*-PTMC_{*n*} films (Figure II-10 C). After 72 h of proliferation, all the groups allowed cells to adhere and to colonize the surface of the films, independent of their chemical composition. The morphology of the adhering cells is similar, with numerous filopodia and extensive cytoplasmic elongation. Mitotic cells are distinguished in all the groups, which supports of the compatible nature of the biomaterials.

Overall, the cytocompatibility tests confirmed that the newly Gel-*g*-PTMC_{*n*} copolymers are compatible. No significant differences were observed between the groups with various PTMC lengths, neither in adhesion nor in proliferation. Further analyses are required to assess if the presence of gelatin further strengthens the cell adhesion as we hypothesized, due to the presence of RGD motif in gelatin, which is absent in PTMC.

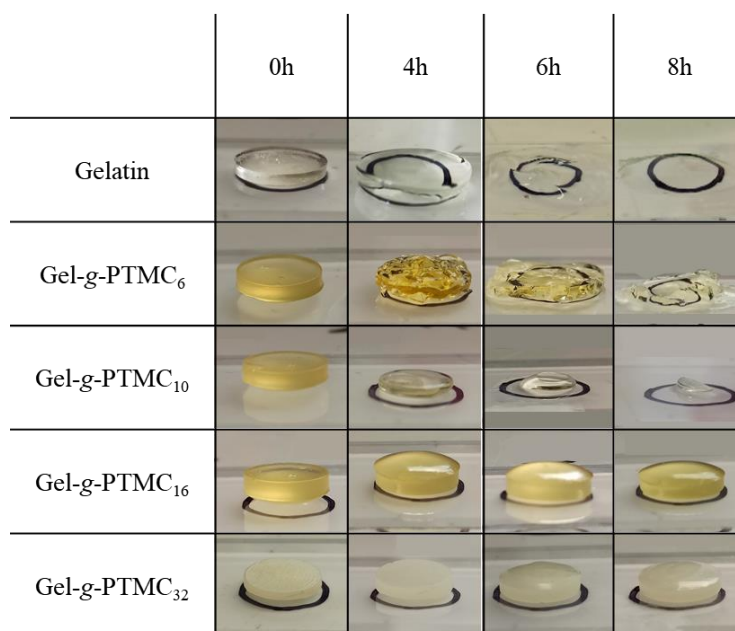
4.3.5. Degradation Study of the Hybrid Polymer Network Gel-g-PTMC_n

Figure II-11 - Pictures of the degraded Gel-g-PTMC_n and gelatin networks at different incubation time points in a solution of NaOH (1 M) at 40 °C.

To determine the degradation mechanism, we performed a preliminary study using an accelerated degradation condition. The degradation studies were evaluated on disk samples based on photocrosslinked Gel-g-PTMC_n and photocrosslinked gelatin (Figure II-11). In addition, when it was possible, the mass loss and the surface erosion were plotted (Figure II-SI-15). Interestingly, the degradation behavior of each grafted PTMC was different. Copolymers with the lowest amount of PTMC (Gel-g-PTMC₆) behave similarly to the photocrosslinked gelatin, which typically tend to swell after 4 h, and then collapse after 6 h, which then hinder the possibility to determine properly the mass loss of the samples (Figure II-SI-15 A). Such initial swelling behavior can be explained by the size of the network meshes that increases upon degradation and consequently absorbs more water. After 8 h, the gelatin is almost fully degraded, while Gel-g-PTMC₆ is disintegrated in several gel parts. In contrast, for the copolymer Gel-g-PTMC₁₀, a surface erosion behavior is noticed, which seems to help the samples maintain their physical integrity until total degradation (93% of surface erosion after 8 h) (Figure II-SI-15 B). The kinetics of surface erosion is PTMC-dependent. Indeed, we observed that Gel-g-PTMC₁₆ degrades slowly with a slight start of erosion after 8 h, whereas Gel-g-PTMC₃₂ did not show any degradation in the time scale of the study. This last behavior

is classically observed for crosslinked PTMC, in which the degradation mechanism relies mostly on enzymatic digestion.

4.3.6. Design and Scaffold Fabrication by Stereolithography

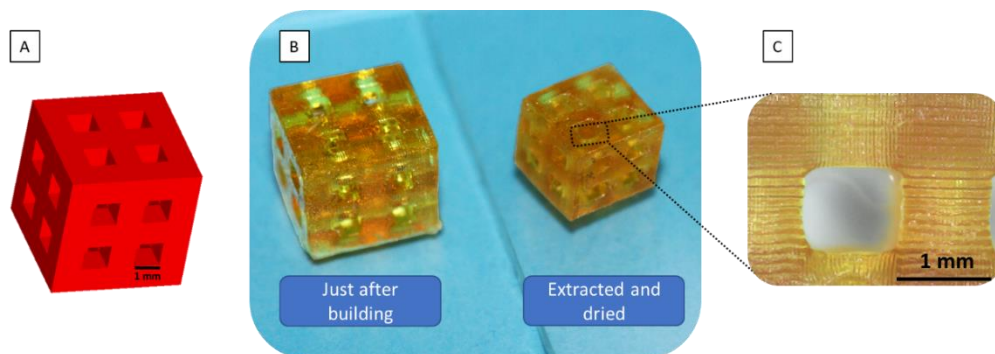


Figure II-12 - STL format of the designed scaffold (A), pictures of the SLA-produced 3D porous scaffold using Gel-g-PTMC₁₀ with different treatment conditions (B), and optical microscopy view of the scaffold (C).

Finally, the photoreactivity of the hybrid polymers makes it possible for the resin to be used in additive manufacturing by vat photopolymerization. The ink of Gel-g-PTMC_n-MA was processed in an SLA approach using a DLP apparatus. Having an appropriate resin viscosity is important to ensure efficient processability, and ideally, a resin viscosity around 1 to 10 Pa.s must be reached. Therefore, following the rheological measurement (Figure II-SI-13), the viscosities for Gel-g-PTMC_n solution diluted in 20 wt % DMSO were not suitable, as they were much higher than the ideal viscosity for SLA. Consequently, all the resins were then further diluted in 40 wt % DMSO.

To demonstrate the potential of such hybrid resins to be processed in SLA, we initially designed a squared scaffold with basic cubic porosity architectures (Figure II-12 A). 3D porous structures were successfully built by SLA using all the Gel-g-PTMC_n-MA (Figure II-12 B). Pictures show the high performance of the fabrication in remarkable respect of the fabrication compared to the initial STL file. The layer-by-layer pattern is visible in Figure II-12 C, with a layer thickness of approximately 100 μ m. Finally, Figure II-12 B shows picture scaffolds just after building (left scaffold) and after DMSO extraction and drying (right scaffold). As 40 wt % DMSO was used to reach the appropriate viscosity for fabrication by SLA, the scaffold lost 33%

of its initial volume after extraction and drying. This shrinking behavior is in correlation with previous studies with PTMC resins for SLA^{74,105}. One great advantage of our copolymers is the possibility to attain such a high concentration and, consequently, such a high resin viscosity, which is a prerequisite for SLA fabrication.

PTMC has great potential to be used for the TE strategy, which is highlighted by the numerous reports available in the literature¹. One can nevertheless not forget to mention that whenever strong cell adhesion is needed, surface or bulk modification of the PTMC polymer is needed. As a first proof of concept, we show that upon methacrylation, high-resolution 3D porous scaffolds of Gel-*g*-PTMC_{*n*} can be fabricated by SLA. Perspective works will be dedicated to further assess how the presence of gelatin moieties enhances the kinetics of cell adhesion within a scaffold.

4.4. Conclusion

Hybrid polymers Gel-*g*-PTMC_{*n*} resulting from the grafting of synthetic biocompatible PTMC on natural gelatin were successfully achieved with a large range of properties regarding the length of the grafted PTMC blocks. First, the challenging characterization of covalent association between synthetic and natural polymers was unlocked by diffusion and a quantitative NMR spectroscopy approach considering the selective solubility of the precursors. Moreover, the ROP of the TMC moiety from the gelatin was obtained with high monomer conversions and remarkable high yields. Second, homogeneous photocrosslinking films based on Gel-*g*-PTMC_{*n*} have shown promising mechanical improvement with effective cytocompatibility and cell bioadhesion, independent of the chemical composition. The degradation study allows one to decipher the key role of PTMC in Gel-*g*-PTMC_{*n*} copolymers, with a shift from bulk to surface degradation mechanism when increasing the ratio of PTMC. Impressively, all the Gel-*g*-PTMC_{*n*}-MA in solution led to appropriate viscosity while keeping a high degree of concentration to successfully build a well-defined 3D structure with highly controlled porosity by SLA. These promising results open perspectives in the challenging field of hybrid polymer characterization and in the research of biomaterials adapted for additive manufacturing with suitable properties for tissue engineering application.

5. Supporting informations

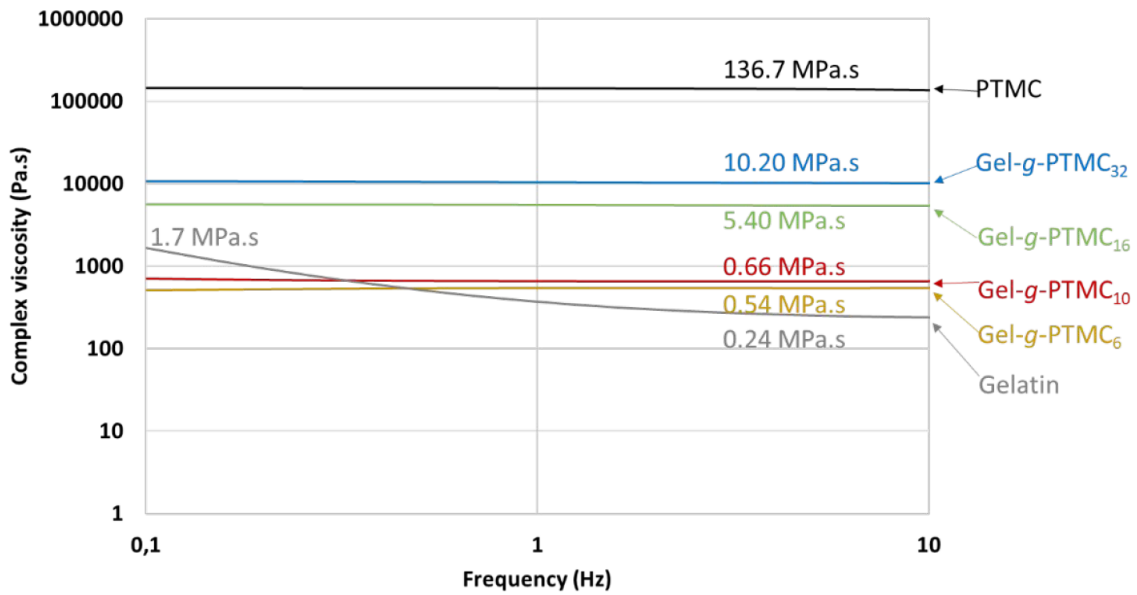


Figure II-SI-13 - Complex viscosity versus frequency of native gelatin, pure PTMC and various Gel-g-PTMC_n in DMSO (20 wt %)

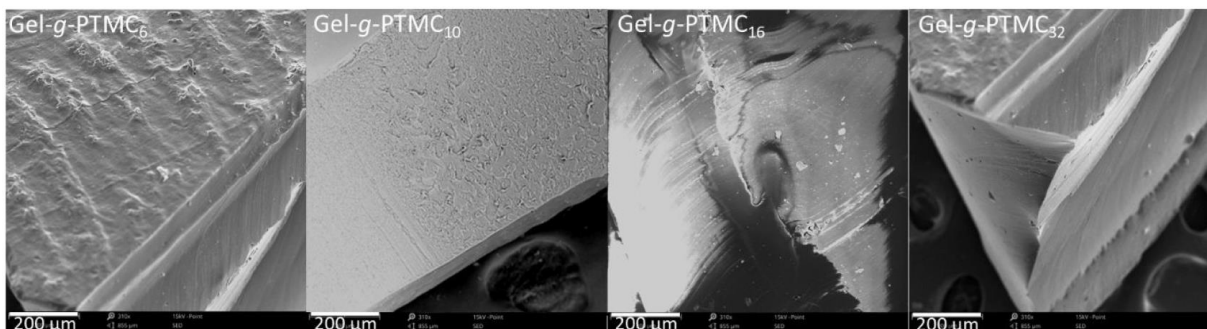


Figure II-SI-14 - SEM images of cross-section photo-crosslinked Gel-g-PTMC_n from low to high DP_n

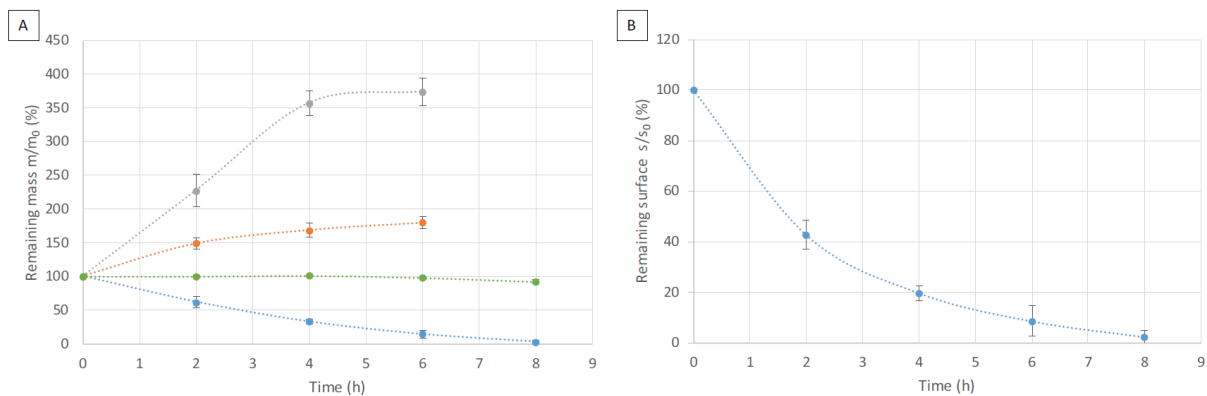


Figure II-SI-15 - Plot of remaining mass (A) and surface (B) vs time during hydrolytic degradation of photocrosslinked gelatin (grey), Gel-g-PTMC₆ (orange), Gel-g-PTMC₁₀ (blue), Gel-g-PTMC₁₆ (green). Mass loss was not measured beyond 6 h for gelatin and Gel-g-PTMC₆ due to the collapsing of the disks

6. Etude des *scaffolds* conçus par stéréolithographie

L'étude présentée ci-dessus a permis d'envisager l'utilisation des copolymères hybrides de Gel-g-PTMC pour la conception de *scaffolds* poreux par stéréolithographie. Ces nouveaux *scaffolds* ont été caractérisés mécaniquement en compression et étudiés en culture cellulaire.

6.1. Fabrication des *scaffolds* par stéréolithographie

Dans l'article, nous avons présenté une preuve de concept de l'adaptation de nos copolymères au procédé de stéréolithographie. Par la suite, la résine à base de Gel-g-PTMC (DP 6, 10 et 16) a été utilisée pour développer des *scaffolds* avec des porosités plus sophistiquées et adaptées pour l'ingénierie tissulaire. Quelques optimisations sur la formulation ont dû être réalisées afin de pouvoir construire ces structures poreuses avec une grande définition. Tout d'abord, le DMSO a été remplacé par le propylène carbonate afin d'optimiser le procédé. Le point éclair du DMSO de 87 °C entraîne son évaporation ce qui empêche de procéder à plusieurs fabrications à la suite. A l'inverse, le propylène carbonate a un point éclair de 132 °C qui est largement suffisant pour réaliser plusieurs fabrications à partir d'un même batch de résine et ainsi fabriquer une grande quantité de dispositifs 3D. Pour cela, la viscosité a été mesurée par rhéologie et une dilution de 40 wt % a été choisie. Enfin, les quantités en photoamorceur (Darocur 1173 ou Irgacure 2959) et photoabsorbeur (Orange G) ont été ajustées en conséquence.

Pour contrôler au mieux la réticulation et, de ce fait, la définition de la pièce lors du processus de fabrication, différentes formulations ont été étudiées en fonction de la puissance et du temps d'irradiation qui sont les paramètres clés de la machine. Ces essais ont mené à des « courbes de travail » présentées sur la Figure II-16. Le graphique de gauche représente une formulation où les paramètres de la formulation n'ont pas été optimisés, du fait de la non-linéarité de l'épaisseur de la couche réticulée en fonction du temps, pour une puissance donnée. Après optimisation de la formulation, le graphique de droite montre un contrôle de l'épaisseur de la couche réticulée sur des puissances et épaisseurs plus faibles.

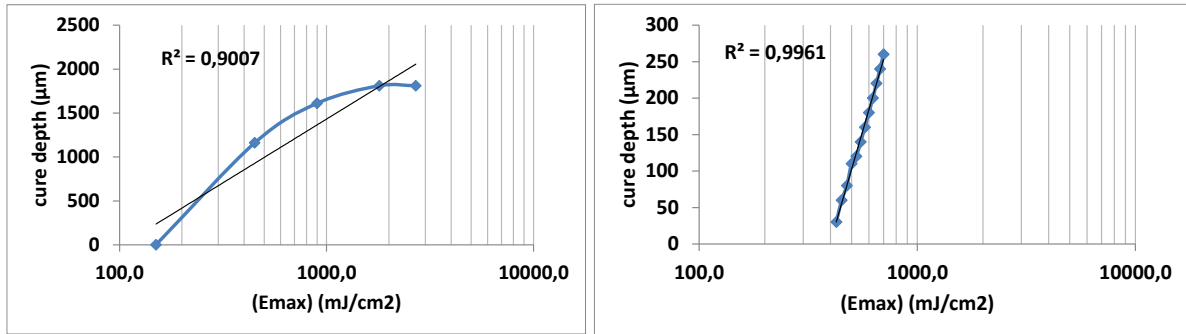


Figure II-16 - "Courbes de travail" des formulations avec à gauche pas de contrôle et à droite un contrôle de la réticulation

Une fois la maîtrise des différents paramètres acquis (formulation et machine), des architectures de pores plus complexes ont été fabriquées avec le copolymère hybride Gel-g-PTMC à trois degrés de polymérisation (DP 6, 10 et 16). L'architecture et la porosité ont un impact important en régénération tissulaire. Nous nous sommes donc intéressés à différentes structures poreuses définies par des équations trigonométriques, les surfaces minimales triplement périodiques (TPMS : « triply periodic minimal surface »). Les TPMS ont la particularité d'avoir une surface spécifique maximale, une courbure moyenne égale à zéro et sont infinies et périodiques dans l'espace euclidien 3D. De telles architectures, avec une surface de contact optimale pour les cellules, ont été sélectionnées pour la conception de *scaffolds* pour l'ingénierie tissulaire. De plus, les TPMS offrent d'autres avantages dans des applications biomédicales comme une bonne combinaison de rigidité spécifique et anisotrope, un rapport surface/volume élevé et une connectivité des pores. Les structures les plus étudiées sont la gyroïde, le diamant, la schwarz, la fischer-koch et la F-RD présentées en Figure II-17 avec leurs équations en Tableau II-5.

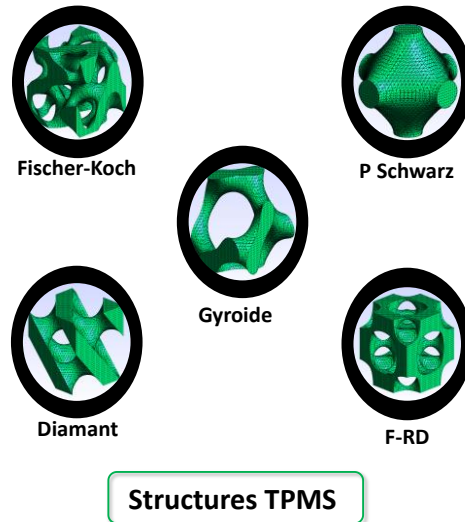


Figure II-17 - Représentation d'une unité de TPMS qui se répète dans les trois dimensions de l'espace

Tableau II-5 - Equations mathématiques correspondantes à chaque TPMS

TPMS structures	Equations (avec x , y et z les variables et C la constante)
Diamant	$\sin(x)\sin(y)\sin(z) + \sin(x)\cos(y)\cos(z) + \cos(x)\sin(y)\cos(z) + \cos(x)\cos(y)\sin(z) = C$
Gyroïde	$\cos(x)\sin(y) + \cos(y)\sin(z) + \cos(z)\sin(x) = C$
Schwarz P	$\cos(x) + \cos(y) + \cos(z) = C$
Fischer-Koch S	$\cos(2x)\sin(y)\cos(z) + \cos(2y)\sin(z)\cos(x) + \cos(2z)\sin(x)\cos(y) = C$
F-RD	$8\cos(x)\cos(y)\cos(z) + \cos(2x)\cos(2y)\cos(2z) - \cos(2x)\cos(2y) + \cos(2y)\cos(2z) + \cos(2z)\cos(2x) = C$

Des premiers essais sur l'architecture Schwartz P avec des tailles de pores de 800 μm ont été réalisés. Le contrôle de la fabrication a été fait en superposant le fichier informatique STL de la structure avec le fichier μCT de l'objet après fabrication. La Figure II-18 D montre la bonne corrélation entre les deux attestant du bon contrôle de la fabrication.

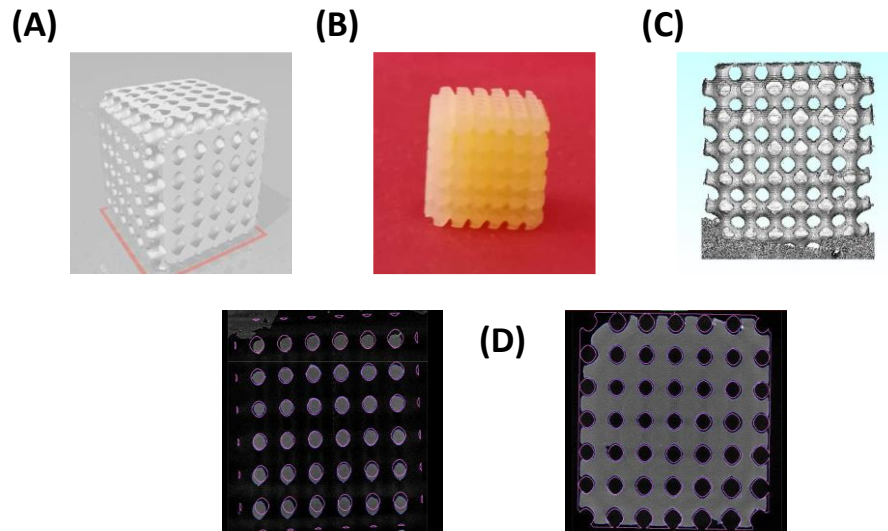


Figure II-18 - (A) Image STL (B) Image objet construit (C) μ CT de l'objet et (D) superposition des images

Par la suite, le degré de complexité a été augmenté en changeant d'architecture et de porosité. Pour cela, des architectures gyroïdes ont été sélectionnées avec une porosité plus faible de 500 μ m. Des objets ont pu être obtenus avec une bonne résolution comme le montre la Figure II-19.

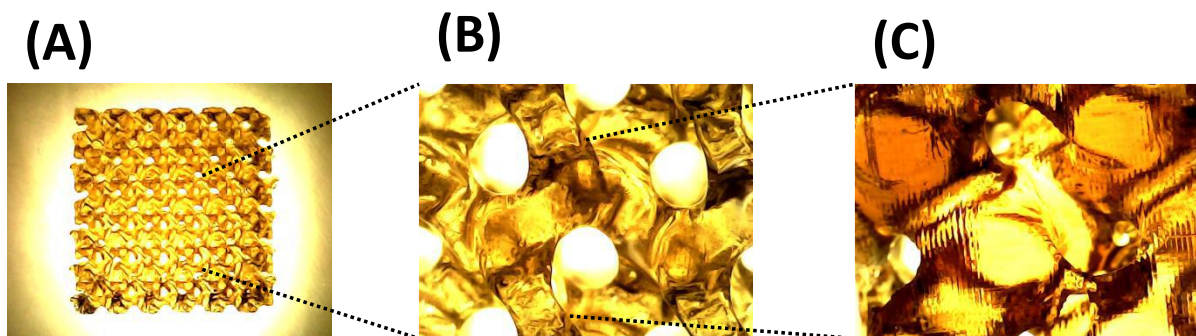


Figure II-19 - (A) scaffold gyroïde de 10 x 10 mm avec une porosité de 500 μ m (B) zoom sur une unité de répétition et (C) fabrication couche par couche, visible avec les stries

Pour compléter notre étude, des résines ont été formulées avec les copolymères Gel-g-PTMC₆, Gel-g-PTMC₁₀, Gel-g-PTMC₁₆ et des *scaffolds* de structures gyroïdiques ont été conçus. L'objectif est d'étudier l'impact du degré de polymérisation sur les propriétés mécaniques et biologiques.

6.2. Propriétés mécaniques des *scaffolds*

Dans l'objectif d'une application en ingénierie tissulaire, il apparaît indispensable de réaliser une étude mécanique approfondie sur les *scaffolds* fabriqués en stéréolithographie. Pour cela nous avons eu l'opportunité de collaborer avec le Laboratoire de Mécanique et Génie Civil (LMGC). A travers cette collaboration, nous avons mené une étude théorique sur la variation des paramètres des architectures poreuses à base de TPMS et leur l'impact sur les modules de Young et cisaillement. Enfin, des essais de compression ont été effectués en milieu physiologique sur des *scaffolds* de type gyroïde.

6.2.1. Etude théorique de la morphologie des TPMS

6.2.1.1. Mise en évidence de l'anisotropie

Les tissus répondent de manières différentes selon la nature de la sollicitation (traction, compression et cisaillement). Ce comportement est dit anisotrope. La propriété d'anisotropie a été vérifiée sur les architectures TPMS sélectionnées précédemment. Pour se faire, le ratio de Zener a été utilisé. Le ratio de Zener est un nombre sans dimension utilisé pour quantifier l'anisotropie d'un matériau. S'il est égal à 1 alors le matériau est isotrope. L'équation 4 indique le calcul de Zener et le Tableau II-6 montre l'anisotropie de quelques architectures TPMS sélectionnées. Le paramètre « C » correspond à des valeurs de rigidité de la matrice en compression/traction avec C_{11} dans la direction x, C_{22} dans la direction y et en cisaillement avec C_{44} dans le plan yz.

$$\alpha_r = \frac{2C_{44}}{C_{11} - C_{22}} \quad (4)$$

Tableau II-6 - Ratio de Zener en fonction des TPMS

	Diamant	F-RD	Gyroïde	Fischer-Koch	P-Schwarz
α_r	1.63	1.29	1.26	1.16	0.59

6.2.1.2. Comparaison des modules des TPMS

Une fois l'anisotropie validée, les architectures TPMS ont été comparées. Pour cela, la fraction volumique a été fixée à 0,5 ainsi que le module élastique pour un matériau modèle non poreux de $E = 1$ MPa. Les valeurs ont été analysées avec le module de cisaillement et le module de Young pour la traction/compression. Le Tableau II-7 montre que la structure possède un impact important sur les valeurs mécaniques et chaque architecture TPMS présente des modules notablement différents. L'architecture gyroïde a été sélectionnée pour être notre base de travail. Cette architecture a été choisie car elle propose un compromis entre les valeurs extrêmes des deux modules.

Tableau II-7 - Propriétés en traction/compression et cisaillement en fonction des TPMS

	Diamant	F-RD	Gyroïde	Fischer-Koch	P-Schwarz
Module de Young (MPa)	0,195	0,222	0,217	0,228	0,309
Module de cisaillement (MPa)	0,122	0,113	0,107	0,104	0,078

6.2.2. Influence de la fraction volumique sur une gyroïde

Comme indiqué ci-dessus, la structure gyroïde a été sélectionnée pour la suite de l'étude. Dans cette partie les modules ont été analysés avec différentes porosités qui sont associées à la fraction volumique. La fraction volumique est définie comme le rapport entre le volume occupé par le solide et le volume de l'unité périodique. Les Figure II-20 A et B montrent que les modules augmentent avec la fraction volumique. Ceci jusqu'à tendre vers une disparition des effets de la microstructure pour se rapprocher du comportement du matériau plein avec une perte de l'anisotropie. La Figure II-20 C présente ce dernier phénomène où plus la fraction volumique augmente plus la valeur de Zener tend vers 1 (isotropie).

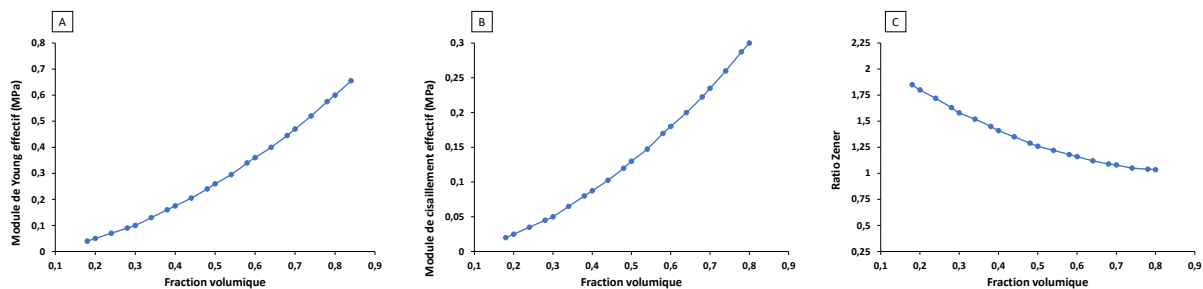


Figure II-20 – Impact de la variation volumique sur (A) le module de Young, (B) le module de cisaillement et (C) ratio de Zener

6.2.3. Etude de cas d'une structure type gyroïde

Le phénomène de contraction des *scaffolds* a été mis en évidence par l'étude expérimentale. La Figure II-21 montre cet effet de contraction du *scaffold* après élimination du solvant s'accompagnant également d'une diminution de la porosité. Une fraction volumique de 41 % a été obtenue au lieu de 50 %. Cette différence volumique lors de la contraction est du même ordre de grandeur que celle de solvant expulsé.

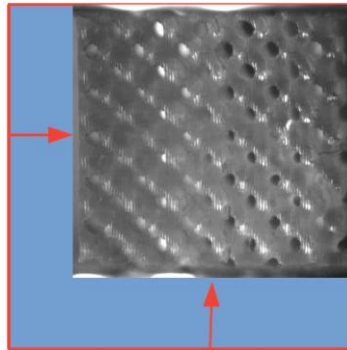


Figure II-21 - Conséquences géométriques d'une contraction dues à l'élimination du solvant

Nous avons montré précédemment (4.3.3. Mechanical Properties of the Hybrid Materials Gel-g-PTMC_n Network) que le module de Young diminue avec l'augmentation de la longueur de chaîne de PTMC sur la gélatine. Les essais de compression menés sur les *scaffolds* ont montré un comportement similaire (Tableau II-8). De plus, l'effet de la porosité est nettement visible avec des modules inférieurs sur les *scaffolds*. Cependant, il faut noter que ces valeurs peuvent être modulées en fonction de la fraction volumique et la forme de l'objet.

Tableau II-8 – Module de Young sur des *scaffolds* gyroïde et des éprouvettes

Module de Young (kPa)	Gel-g-PTMC ₆	Gel-g-PTMC ₁₀	Gel-g-PTMC ₁₆
Éprouvette	4600 ± 0,84	2800 ± 0,20	2400 ± 0,05
Gyroïde	200 ± 0,63	120 ± 0,38	50 ± 0,12

6.3. Adhésion et prolifération cellulaire au sein des *scaffolds*

Sur ces derniers *scaffolds* à architecture gyroïdique, nous avons réalisé en collaboration avec l'institut de biologie et médecine régénérative (IRMB-INSERM), des essais d'adhésion et de prolifération cellulaire. Les *scaffolds* construits en stéréolithographie ont d'abord été stérilisés dans un bain d'éthanol 70° puis des rinçages ont été effectués dans le PBS avant d'immerger les dispositifs dans le milieu de culture à 20 % dans du sérum de veau foetal (SVF) pendant 24 h. Des cellules souches mésenchymateuses (MSC) issues de tissus adipeux ont été utilisées et marquées au 5-chlorométhylfluoresceine diacétate (CMFDA) (25 μ M, incubation 40 min) et également détectées par une approche de LIVE/DEAD. La culture cellulaire a été réalisée en triplicata sur les *scaffolds* Gel-g-PTMC₆, Gel-g-PTMC₁₀, Gel-g-PTMC₁₆. L'ensemencement a été effectué avec 150 000 cellules/*scaffold* avec 80 μ L du milieu de prolifération sur 1 h puis un ajout de 1 mL a été réalisé pour totalement recouvrir l'objet. La viabilité et la prolifération cellulaire ont été observées sur 28 jours avec des points à J0, J2, J14 et J28 sur les bords mais aussi au cœur du *scaffold* afin de s'assurer de l'homogénéité de la colonisation. **Après 2 jours** de culture, la Figure II-22 montre la viabilité des cellules ainsi que l'adhésion sur les trois ratios de *scaffolds*. Les cellules sont visibles au cœur comme sur les bords, garantissant ainsi une bonne colonisation du *scaffold* par les cellules.

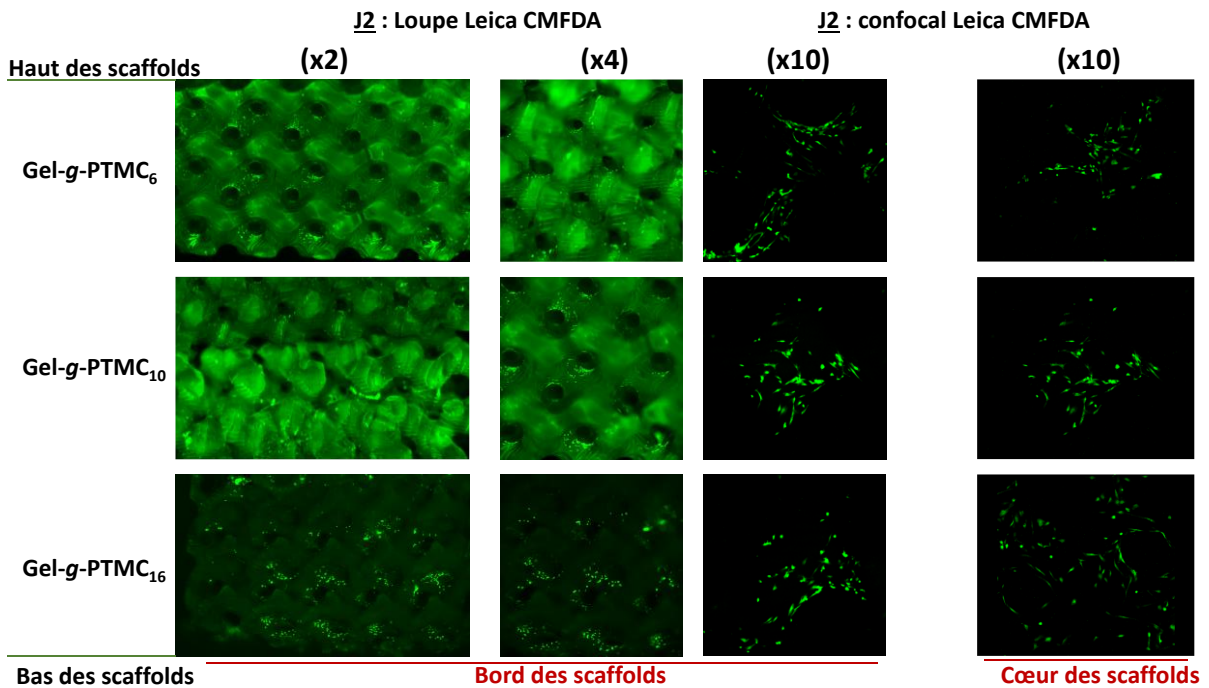


Figure II-22 - Images du bord et à cœur des *scaffolds* Gel-g-PTMC₆, Gel-g-PTMC₁₀, Gel-g-PTMC₁₆ après 2 jours de culture avec le marqueur CMFDA à trois zooms

Après 14 jours de culture, les cellules ont proliféré et colonisé l'ensemble des *scaffolds*. Cependant, une différence notable commence à apparaître. Pour les *scaffolds* Gel-g-PTMC₆, les cellules sont vivantes aux bords et à cœur. En revanche, pour les *scaffolds* Gel-g-PTMC₁₀ et Gel-g-PTMC₁₆, les cellules sont uniquement présentes sur les bords et ceci de manière plus prononcée pour les *scaffolds* Gel-g-PTMC₁₆. Ce phénomène s'est amplifié sur **28 jours** de culture. Les images sont regroupées en Figure II-23. Deux raisons peuvent être évoquées pour expliquer ce phénomène : (i) la prolifération cellulaire importante a entraîné une forte consommation des nutriments par les cellules localisées sur les bords du *scaffold*, empêchant ainsi les cellules situées au cœur du *scaffold* d'avoir la quantité en nutriment suffisante à leur survie ; (ii) l'augmentation du PTMC dans les copolymères induit une augmentation de l'hydrophobie et donc un transfert des nutriments limité au cœur du *scaffold* après 14 jours d'incubation.

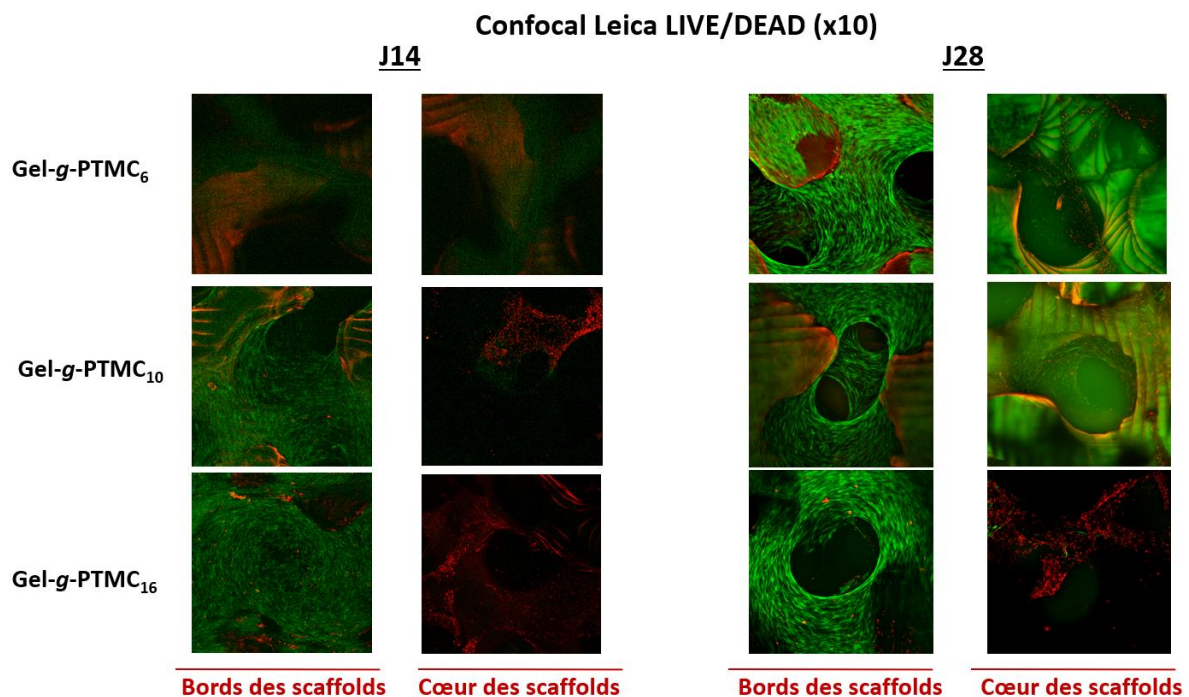


Figure II-23 - Images LIVE/DEAD du bord et à cœur des *scaffolds* Gel-g-PTMC₆, Gel-g-PTMC₁₀, Gel-g-PTMC₁₆ après 14 et 28 jours de culture

7. Conclusion du chapitre

Dans ce chapitre, l'amorçage du TMC par des amines, au travers d'une **étude modèle** (article *Polymers*), a permis de montrer la possibilité d'amorcer le TMC par différentes fonctions. Le greffage de PTMC sur la gélatine a pu être validé par des séquences de spectroscopie RMN et a rendu possible la quantification précise du taux de greffage. La variation de la longueur de chaîne de PTMC a mené à des **hydrogels** pour des chaînes de PTMC en dessous d'un DP₆ jusqu'à des **élastomères** pour des chaînes de PTMC de DP₃₂. Une conséquence qui est attendue avec l'augmentation de la longueur des chaînes de PTMC est la **diminution du module de Young**. Une seconde conséquence a été sur le mécanisme de **dégradation** du matériau, en masse ou en érosion. Puis, à partir des résines préparées avec trois différents degrés de polymérisation de PTMC, des **scaffolds** type gyroïde ont été fabriqués avec une **bonne résolution**. La présence de porosité a eu pour effet mécanique de **diminuer le module de Young**. L'étude biologique sur les *scaffolds* a permis de mettre en évidence deux comportements (i) les **cellules adhèrent** sur les trois ratios de greffage et ceci de façon homogène dans tout le *scaffold* et (ii) la **prolifération diminue avec le taux de greffage** du fait de l'insuffisant passage des nutriments dans le cœur du *scaffold* pouvant être dû à l'augmentation de l'hydrophobie. L'ensemble de ces résultats mène à la conclusion que ces biomatériaux sont des candidats prometteurs pour une utilisation en ingénierie tissulaire.

8. Références

1. Fukushima, K. Poly(trimethylene carbonate)-based polymers engineered for biodegradable functional biomaterials. *Biomater. Sci.* **4**, 9–24 (2016).
2. Dai, M., Goudounet, G., Zhao, H., Garbay, B., Garanger, E., Pecastaings, G., Schultze, X., Lecommandoux, S. Thermosensitive Hybrid Elastin-like Polypeptide-Based ABC Triblock Hydrogel. *Macromolecules* **54**, 327–340 (2021).
3. Drappier, C., Oliveira, H., Sandre, O., Ibarboure, E., Combet, S., Garanger, E., Lecommandoux, S. Self-assembled core-shell micelles from peptide-b-polymer molecular chimeras towards structure-activity relationships. *Faraday Discuss.* **166**, 83–100 (2013).
4. Bacinello, D., Garanger, E., Taton, D., Tam, K. C. Enzyme-Degradable Self-Assembled Nanostructures from Polymer – Peptide Hybrids. *Biomacromolecules.* **5**, 1882–1888 (2014).
5. Zhang, Y., Wu, K., Sun, H., Zhang, J., Yuan, J., Zhong, Z. Hyaluronic Acid-Shelled Disulfide-Cross-Linked Nanopolymersomes for Ultrahigh-Efficiency Reactive Encapsulation and CD44-Targeted Delivery of Mertansine Toxin. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **10**, 1597–1604 (2018).
6. Zhu, Y., Zhang, J., Meng, F., Cheng, L., Feijen, J., Zhong, J. Reduction-responsive core-crosslinked hyaluronic acid-b-poly(trimethylene carbonate-co-dithiolane trimethylene carbonate) micelles: Synthesis and CD44-mediated potent delivery of docetaxel to triple negative breast tumor in vivo. *J. Mater. Chem. B* **6**, 3040–3047 (2018).
7. Chee, P. L., Yew, P. Y. M., Kai, D., Loh, X. J. Reinforcement of aligned cellulose fibers by lignin-polyester copolymers. *Mater. Today Chem.* **18**, 100358 (2020).
8. Pendergraph, S. A., Klein, G., Johansson, M. K. G., Carlmark, A. Mild and rapid surface initiated ring-opening polymerisation of trimethylene carbonate from cellulose. *RSC Adv.* **4**, 20737–20743 (2014).
9. Gyles, D. A., Castro, L. D., Silva, J. O. C., Ribeiro-Costa, R. M. A review of the designs and prominent biomedical advances of natural and synthetic hydrogel formulations. *Eur. Polym. J.* **88**, 373–392 (2017).
10. Zhang, Y., Huang, Y. Rational Design of Smart Hydrogels for Biomedical Applications. *Front. Chem.* **8**, 1–13 (2021).
11. Xiang, L., Cui, W. Biomedical application of photo-crosslinked gelatin hydrogels. *J. Leather Sci. Eng.* **3**, 3 (2021).
12. Klotz, B. J., Gawlitta, D., Rosenberg, A. J. W. P., Malda, J., Melchels, F. P. W. Gelatin-Methacryloyl Hydrogels: Towards Biofabrication-Based Tissue Repair. *Trends Biotechnol.* **34**, 394–407 (2016).
13. Naahidi, S., Jafari, M., Logan, M., Wang, Y., Yuan, Y., Bae, H., Dixon, B., Chen, P. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnol. Adv.* **35**, 530–544 (2017).
14. Ma, J., Cao, H., Li, Y., Li, Y. Synthesis and characterization of poly(DL-lactide)-grafted gelatins as bioabsorbable amphiphilic polymers. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **13**, 67–80 (2002).
15. Han, S., Li, M., Liu, X., Gao, H., Wu, Y. Construction of amphiphilic copolymer nanoparticles based on gelatin as drug carriers for doxorubicin delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **102**, 833–841 (2013).
16. Zheng, Y., Zhu, Y., Wang, F., Wang, A. Gelatin-Grafted Granular Composite Hydrogel for Selective Removal of Malachite Green. *Water. Air. Soil Pollut.* **226**, (2015).
17. Mohammad, F., Taghreed, A., Ali, S. M. Synthesis and Characterization of Gelatin-G- Poly (Acryloyl Amide) Proflavine and Controlled Release Study Synthesis and Characterization of Gelatin-G-Poly (Acryloyl Amide) Proflavine and Controlled Release Study. *Chemical and Process Engineering Research.* **32**, 53–62 (2015).
18. Nath, J., Chowdhury, A., Ali, I., Dolui, S. K. Development of a gelatin-g-poly(acrylic acid-co-acrylamide)–montmorillonite superabsorbent hydrogels for in vitro controlled release of vitamin B 12. *J. Appl. Polym. Sci.* **136**, 1–11 (2019).
19. Zheng, J. P., Gao, S., Wang, J. X., Yao, K. D. Swelling behavior of gelatin-g-methyl methacrylate copolymers. *J. Mater. Sci.* **40**, 4029–4033 (2005).
20. Thomas, L. V., Nair, P. D. Influence of mechanical stimulation in the development of a medial equivalent tissue-engineered vascular construct using a gelatin-g-vinyl acetate co-polymer scaffold. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **23**, 2069–2087 (2012).
21. Park, K. M., Ko, K. S., Joung, Y. K., Shin, H., Park, K. D. In situ cross-linkable gelatin-poly(ethylene glycol)-tyramine hydrogel via enzyme-mediated reaction for tissue regenerative medicine. *J. Mater. Chem.* **21**, 13180–13187 (2011).
22. Takahashi, K., Takamoto, T., Tabata, Y. Preparation of Gelatin Grafted with Lactic Acid Oligomers. *Key Eng. Mater.* **288–289**, 441–444 (2005).

23. Zhang, M., Wu, Y., Zhang, Q., Xia, Y., Li, T. Synthesis and characterization of gelatin-polydimethylsiloxane graft copolymers. *J. Appl. Polym. Sci.* **120**, 2130–2137 (2011).
24. Yang, B., Hou, Z., Sun, M., Xu, J. Influence of Surfactants on the Microstructure and Performance of PDMS-E Grafted Gelatin Films. *Russ. J. Appl. Chem.* **91**, 264–269 (2018).
25. Geng, X., Mo, X., Fan, L., Yin, A., Fang, J. Hierarchically designed injectable hydrogel from oxidized dextran, amino gelatin and 4-arm poly(ethylene glycol)-acrylate for tissue engineering application. *J. Mater. Chem.* **22**, 25130–25139 (2012).
26. Li, B., Zhou, F., Huang, K., Wang, Y., Mei, S., Zhou, Y., Jing, T. Highly efficient removal of lead and cadmium during wastewater irrigation using a polyethylenimine-grafted gelatin sponge. *Sci. Rep.* **6**, 1–9 (2016).
27. Kaur, I., Gautam, N., Khanna, N. D. Synthesis and characterization of polypropylene-grafted gelatin. *J. Appl. Polym. Sci.* **115**, 1226–1236 (2010).
28. Kaur, I., Bhalla, T. C., Deepika, N., Gautam, N. Biodegradation and swelling studies of gelatin-grafted polyethylene. *J. Appl. Polym. Sci.* **107**, 3878–3884 (2008).
29. Balavigneswaran, C. K., Mahto, S. K., Subia, B., Prabhakar, A., Mitra, K., Rao, V., Ganguli, M., Ray, B., Maiti, P., Misra, N. Tailored Chemical Properties of 4-Arm Star Shaped Poly(d, l-lactide) as Cell Adhesive Three-Dimensional Scaffolds. *Bioconjug. Chem.* **28**, 1236–1250 (2017).
30. Rathna, G. V. N. Gelatin hydrogels: Enhanced biocompatibility, drug release and cell viability. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19**, 2351–2358 (2008).
31. Gao, J., Li, Z., Wang, W. E. I., Huang, M. Preparation of Gelatin – N-Vinylpyrrolidone. *J. Appl. Polym. Sci.* **9**, 1485–1492 (1998).
32. Kommareddy, S., Amiji, M. Biodistribution and Pharmacokinetic Analysis of Long-Circulating Thiolated Gelatin Nanoparticles Following Systemic Administration in Breast Cancer-Bearing Mice. *J. Pharm. Sci.* **96**, 397–407 (2007).
33. Kaul, G., Amiji, M. Biodistribution and targeting potential of poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles in subcutaneous murine tumor model. *J. Drug Target.* **12**, 585–591 (2004).
34. Ganta, S., Devalapally, H., Shahiwala, A., Amiji, M. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. *J. Control. Release* **126**, 187–204 (2008).
35. Van Vlerken, L. E., Vyas, T. K., Amiji, M. M. Poly(ethylene glycol)-modified nanocarriers for tumor-targeted and intracellular delivery. *Pharm. Res.* **24**, 1405–1414 (2007).
36. Oh, B. H. L., Bismarck, A., Chan-Park, M. B. Injectable, interconnected, high-porosity macroporous biocompatible gelatin scaffolds made by surfactant-free emulsion templating. *Macromol. Rapid Commun.* **36**, 364–372 (2015).
37. Wang, Z. Y., Zhao, Y., Ren, L., Jin, L. H., Sun, L. P., Yin, P., Zhang, Y. F., Zhang, Q. Q. Novel gelatin-siloxane nanoparticles decorated by Tat peptide as vectors for gene therapy. *Nanotechnology* **19**, 445103 (2008).
38. Xu, J., Xia, Y., Qiao, C. D., Zhu, W., Wang, Y., Li, T. D. Solid-state structure of gelatin-mono epoxy terminated polydimethylsiloxane polymer: Effect of electrostatic and hydrophobic interactions. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **123**, 945–950 (2014).
39. Soliman, S. M. A., Mohamed, M. E., Sabaa, M. W. Synthesis, characterization and application of gelatin-polyacrylonitrile and its nanoparticles. *Polym. Bull.* **75**, 1403–1416 (2018).
40. Salma, U., Chen, N., Richter, D. L., Filson, P. B., Dawson-Andoh, B., Matuana, L., Heiden, P. Amphiphilic core/shell nanoparticles to reduce biocide leaching from treated wood, 1 - leaching and biological efficacy. *Macromol. Mater. Eng.* **295**, 442–450 (2010).
41. Liu, Y., Liu, X., Wang, X., Wu, X., Yang, X., Lu, L. Ag₂O nanoparticle clusters coated with porous gelatin-g-PMMA copolymer. *Curr. Appl. Phys.* **10**, 776–782 (2010).
42. Pal, A., Bajpai, J., Bajpai, A. K. Poly (acrylic acid) grafted gelatin nanocarriers as swelling controlled drug delivery system for optimized release of paclitaxel from modified gelatin. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **45**, 323–333 (2018).
43. Thottappillil, N., Nair, P. D. Dual source co-electrospun tubular scaffold generated from gelatin-vinyl acetate and poly-ε-caprolactone for smooth muscle cell mediated blood vessel engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **114**, 111030 (2020).
44. Imani, F., Karimi-Soflou, R., Shabani, I., Karkhaneh, A. PLA electrospun nanofibers modified with polypyrrole-grafted gelatin as bioactive electroconductive scaffold. *Polymer (Guildf)*. **218**, 123487 (2021).
45. Bhowmick, S., Thanusha, A. V., Kumar, A., Scharnweber, D., Rothera, S., Koul, V. Nanofibrous artificial skin substitute composed of mPEG-PCL grafted gelatin/hyaluronan/chondroitin sulfate/sericin for 2nd degree burn care:: in vitro and in vivo study. *RSC Adv.* **8**, 16420–16432 (2018).
46. Ren, L., Tsuru, K., Hayakawa, S., Osaka, A. Synthesis and characterization of gelatin-siloxane hybrids

- derived through sol-gel procedure. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **21**, 115–121 (2001).
47. Schuster, M., Turecek, C., Weigel, G., Robert Saf, J. S., Franz Varga, R. L. Gelatin-Based Photopolymers for Bone Replacement Materials. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **46**, 7207–7224 (2008).
 48. Wang, S., Lei, J., Yi, X., Yuan, L., Ge, L., Li, D., Mu, C. Fabrication of Polypyrrole-Grafted Gelatin-Based Hydrogel with Conductive, Self-Healing, and Injectable Properties. *ACS Appl. Polym. Mater.* **2**, 3016–3023 (2020).
 49. Ohya, S., Kidoaki, S., Matsuda, T. Poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)-grafted gelatin hydrogel surfaces: Interrelationship between microscopic structure and mechanical property of surface regions and cell adhesiveness. *Biomaterials* **26**, 3105–3111 (2005).
 50. Ibusuki, S., Fujii, Y., Iwamoto, Y., Matsuda, T. Tissue-engineered cartilage using an injectable and in situ gelable thermoresponsive gelatin: Fabrication and in vitro performance. *Tissue Eng.* **9**, 371–384 (2003).
 51. Curcio, M., Spizzirri, U.G., Iemma, F., Puoci, F., Cirillo, G., Parisi, O. I., Picci, N. Grafted thermo-responsive gelatin microspheres as delivery systems in triggered drug release. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **76**, 48–55 (2010).
 52. Lai, J. Y., Hsieh, A. C. A gelatin-g-poly(N-isopropylacrylamide) biodegradable in situ gelling delivery system for the intracameral administration of pilocarpine. *Biomaterials* **33**, 2372–2387 (2012).
 53. Sukhlaaied, W., Riyajan, S. A. Green robust pH-temperature-sensitive maleated poly(vinyl alcohol)-g-gelatin for encapsulated capsaicin. *Polym. Bull.* **73**, 2303–2320 (2016).
 54. Van Thoai, D., Trung Nguyen, D., Hang Dang, L., Hao Nguyen, N., Toan Nguyen, V., Doan, P., Tram Nguyen, B., Van Thu, L., Ngoc Tung, N., Ngoc Quyen, T. Lipophilic effect of various pluronic-grafted gelatin copolymers on the quercetin delivery efficiency in these self-assembly nanogels. *J. Polym. Res.* **27**, (2020).
 55. Kim, D. H., Heo, S. J., Shin, S. W., Mun, C. W., Min Park, K., Dong Park, K., Soo Jee, K. Preparation of thermosensitive gelatin-pluronic copolymer for cartilage tissue engineering. *Macromol. Res.* **18**, 387–391 (2010).
 56. Alba, A., Du Boullay, O. T., Martin-Vaca, B., Bourissou, D. Direct ring-opening of lactide with amines: Application to the organo-catalyzed preparation of amide end-capped PLA and to the removal of residual lactide from PLA samples. *Polym. Chem.* **6**, 989–997 (2015).
 57. Bednarek, M., Basko, M., Biedron, T., Wojtczak, E., Michalski, A. Polymerization of lactide initiated by primary amines and catalyzed by a protic acid. *Eur. Polym. J.* **71**, 380–388 (2015).
 58. Guillaume, O., Geven, M. A., Sprecher, C. M., Stadelmann, V. A., Grijpma, D.W., Tang, T. T., Qin, L., Lai, Y.X., Alini, M., de Bruijn, J. D., Yuan, H., Richards, R. G., Eglin, D. Surface-enrichment with hydroxyapatite nanoparticles in stereolithography-fabricated composite polymer scaffolds promotes bone repair. *Acta Biomater.* **54**, 386–398 (2017).
 59. Schüller-Ravoo, S., Zant, E., Feijen, J., Grijpma, D. W. Preparation of a Designed Poly(trimethylene carbonate) Microvascular Network by Stereolithography. *Adv. Healthc. Mater.* **3**, 2004–2011 (2014).
 60. Schüller-Ravoo, S., Feijen, J., Grijpma, D. W. Preparation of flexible and elastic poly(trimethylene carbonate) structures by stereolithography. *Macromol. Biosci.* **11**, 1662–1671 (2011).
 61. Guillaume, O., Geven, M. A., Grijpma, D.W., Tang, T. T., Qin, L., Lai, Y.X., Yuan, H., Richards, R. G., Eglin, D. Poly(trimethylene carbonate) and nano-hydroxyapatite porous scaffolds manufactured by stereolithography. *Polym. Adv. Technol.* **28**, 1219–1225 (2017).
 62. Weems, A. C., Arno, M. C., Yu, W., Huckstepp, R. T. R., Dove, A. P. 4D polycarbonates via stereolithography as scaffolds for soft tissue repair. *Nat. Commun.* **2021 121 12**, 1–14 (2021).
 63. Schüller-Ravoo, S., Teixeira, S. M., Feijen, J., Grijpma, D. W., Poot, A. A. Flexible and elastic scaffolds for cartilage tissue engineering prepared by stereolithography using poly(trimethylene carbonate)-based resins. *Macromol Biosci.* **13**, 1711-9 (2013).
 64. Blanquer, S. B.G., Gebraad, A. W. H., Miettinen, S., Poot, A. A., Grijpma, D. W., Haimi, S. P. Differentiation of adipose stem cells seeded towards annulus fibrosus cells on a designed poly(trimethylene carbonate) scaffold prepared by stereolithography. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **11**, 2752–2762 (2017).
 65. Blanquer, S. B. G., Haimi, S. P., Poot, A. A., Grijpma, D. W. Effect of pore characteristics on mechanical properties and annulus fibrosus cell seeding and proliferation in designed PTMC tissue engineering scaffolds. *Macromol. Symp.* **334**, 75–81 (2013).
 66. Sharifi, S., Blanquer, S. B., van Kooten, T. G., Grijpma, D. W. Biodegradable nanocomposite hydrogel structures with enhanced mechanical properties prepared by photo-crosslinking solutions of poly(trimethylene carbonate)-poly(ethylene glycol)-poly(trimethylene carbonate) macromonomers and nanoclay particles. *Acta Biomater.* **8**, 4233-43 (2012).
 67. Kumar, H., Sakthivel, K., Mohamed, M. G. A., Boras, E., Shin, S. R., Kim, K. Designing Gelatin Methacryloyl

- (GelMA)-Based Bioinks for Visible Light Stereolithographic 3D Biofabrication. *Macromol. Biosci.* **21**, 1–17 (2021).
68. Mahdavi, S. S., Abdekhodaie, M. J., Kumar, H., Mashayekhan, S., Baradaran-Rafii, A., Kim, K. Stereolithography 3D Bioprinting Method for Fabrication of Human Corneal Stroma Equivalent. *Ann. Biomed. Eng.* **48**, 1955–1970 (2020).
 69. Jafari, M., Paknejad, Z., Rad, M. R., Motamedian, S. R., Eghbal, M. J., Nadjmi, N., Khojasteh, A. Polymeric scaffolds in tissue engineering: a literature review. *J. Biomed. Mater. Res. Part B-Applied Biomater.* **105**, 431–459 (2017).
 70. Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., Schacht, E. Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules* **12**, 1387–1408 (2011).
 71. Guo, B. L., Ma, P. X. Synthetic biodegradable functional polymers for tissue engineering: a brief review. *Sci. China-Chemistry* **57**, 490–500 (2014).
 72. Puppi, D., Chiellini, F. Biodegradable Polymers for Biomedical Additive Manufacturing. *Appl. Mater. Today* **20**, 100700 (2020).
 73. Hsu, S. H., Hung, K. C., Chen, C. W. Biodegradable polymer scaffolds. *J. Mater. Chem. B* **4**, 7493–7505 (2016).
 74. Guillaume, O., Geven, M. A., Varjas, V., Varga, P., Gehweiler, D., Stadelmann, V. A., Smidt, T., Zeiter, S., Sprecher, C., Bos, R. R. M., Grijpma, D.W., Alini, M., Yuan, H., Richards, G. R., Tang, T., Qin, L., Yuxiao, L., Jiang, P., Eglin, D. Orbital floor repair using patient specific osteoinductive implant made by stereolithography. *Biomaterials* **233**, 119721 (2020).
 75. van Bochove, B., Hannink, G., Buma, P., Grijpma, D. W. Preparation of Designed Poly(trimethylene carbonate) Meniscus Implants by Stereolithography: Challenges in Stereolithography. *Macromol. Biosci.* **16**, 1853–1863 (2016).
 76. Vyner, M. C., Li, A. N., Amsden, B. G. The effect of poly(trimethylene carbonate) molecular weight on macrophage behavior and enzyme adsorption and conformation. *Biomaterials* **35**, 9041–9048 (2014).
 77. Asti, A., Gioglio, L. Natural and Synthetic Biodegradable Polymers: Different Scaffolds for Cell Expansion and Tissue Formation. *Int. J. Artif. Organs* **37**, 187–205 (2014).
 78. Klimek, K., Ginalska, G. Proteins and Peptides as Important Modifiers of the Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*. **12**, 1–38 (2020).
 79. Liu, X. H., Holzwarth, J. M., Ma, P. X. Functionalized Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds for Tissue Engineering. *Macromol. Biosci.* **12**, 911–919 (2012).
 80. Ullah, S., Chen, X. Fabrication, applications and challenges of natural biomaterials in tissue engineering. *Appl. Mater. Today* **20**, 100656 (2020).
 81. Yi, S., Ding, F., Gong, L. I., Gu, X. S. Extracellular Matrix Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **12**, 233–246 (2017).
 82. Levett, P.A., Melchels, F. P., Schrobback, K., Hutmacher, D. W., Malda, J., Klein, T. J. A biomimetic extracellular matrix for cartilage tissue engineering centered on photocurable gelatin, hyaluronic acid and chondroitin sulfate. *Acta Biomater.* **10**, 214–223 (2014).
 83. Echave, M. C., Burgo, L. S., Pedraz, J. L., Orive, G. Gelatin as Biomaterial for Tissue Engineering. *Curr. Pharm. Des.* **23**, 3567–3584 (2017).
 84. Comeau, P., Willett, T. A Carbodiimide Coupling Approach for PEGylating GelMA and Further Tuning GelMA Composite Properties. *Macromol. Mater. Eng.* **306**, 2000604 (2021).
 85. Kushibiki, T., Matsuoka, H., Tabata, Y. Synthesis and physical characterization of poly(ethylene glycol)-gelatin conjugates. *Biomacromolecules* **5**, 202–208 (2004).
 86. Nie, K., Han, S., Yang, J., Sun, Q., Wang, X., Li, X., Li, Q. Enzyme-Crosslinked Electrospun Fibrous Gelatin Hydrogel for Potential Soft Tissue Engineering. *Polymers (Basel)*. **12**, 1977 (2020).
 87. Hoch, E., Hirth, T., Tovar, G. E. M., Borchers, K. Chemical tailoring of gelatin to adjust its chemical and physical properties for functional bioprinting. *J. Mater. Chem. B* **1**, 5675–5685 (2013).
 88. Joy, J., Aid-Launais, R., Pereira, J., Pavon-Djavid, G., Ray, A. R., Letourneur, D., Meddahi-Pellé, A., Gupta, B. Gelatin-poly(trimethylene carbonate) blend based electrospun tubular construct as a potential vascular biomaterial. *Mater. Sci. Eng. C-Materials Biol. Appl.* **106**, 110178 (2020).
 89. Liang, J., Grijpma, D. W., Poot, A. A. Tough and biocompatible hybrid networks prepared from methacrylated poly(trimethylene carbonate) (PTMC) and methacrylated gelatin. *Eur. Polym. J.* **123**, 109420 (2020).
 90. Chartrain, N. A., Williams, C. B., Whittington, A. R. A review on fabricating tissue scaffolds using vat photopolymerization. *Acta Biomater.* **74**, 90–111 (2018).

Chapitre II. Copolymères hybrides en stéréolithographie pour l'ingénierie tissulaire

91. Shirahama, H., Lee, B. H., Tan, L. P., Cho, N. J. Precise Tuning of Facile One-Pot Gelatin Methacryloyl (GelMA) Synthesis. *Sci. Rep.* **6**, 31036 (2016).
92. Kale, R. N., Bajaj, A. N. Ultraviolet spectrophotometric method for determination of gelatin crosslinking in the presence of amino groups. *J. Young Pharm.* **2**, 90–94 (2010).
93. Brossier, T., Volpi, G., Lapinte, V., Blanquer, S. Synthesis of Poly(Trimethylene Carbonate) from Amine Group Initiation: Role of Urethane Bonds in the Crystallinity. *Polymers (Basel)*. **13**, 280 (2021).
94. Claaßen, C., Claaßen, M. H., Truffault, V., Sewald, L., Tovar, G. E. M., Borchers, K., Southan, A. Quantification of Substitution of Gelatin Methacryloyl: Best Practice and Current Pitfalls. *Biomacromolecules* **19**, 42–52 (2018).
95. Ovsianikov, A., Deiwick, A., Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., Möller, L., Dräger, G., Chichkov, B. Laser Fabrication of Three-Dimensional CAD Scaffolds from Photosensitive Gelatin for Applications in Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **12**, 851–858 (2011).
96. Stevens, P. V. Trace Bioorganic Constituents of Gelatins - a Review. *Food Aust.* **44**, 320–324 (1992).
97. Yue, K., Li, X., Schrobback, K., Sheikhi, A., Annabi, N., Leijten, J., Zhang, W., Zhang, Y. S., Hutmacher, D. W., Klein, T. J., Khademhosseini, A. Structural analysis of photocrosslinkable methacryloyl-modified protein derivatives. *Biomaterials* **139**, 163–171 (2017).
98. Toshikj, N., Robin, J. J., Blanquer, S. A simple and general approach for the synthesis of biodegradable triblock copolymers by organocatalytic ROP from poly(lactide) macroinitiators. *Eur. Polym. J.* **127**, 109599 (2020).
99. Li, X., Mignard, N., Taha, M., Fernández-de-Alba, C., Chen, J., Zhang, S., Fort, L., Becquart, F. Synthesis of Poly(trimethylene carbonate) Oligomers by Ring-Opening Polymerization in Bulk. *Macromol. Chem. Phys.* **221**, 1900367 (2020).
100. Claaßen, C., Claaßen, M. H., Truffault, V., Sewald, L., Tovar, G. E. M., Borchers, K., Southan, A. Quantification of Substitution of Gelatin Methacryloyl: Best Practice and Current Pitfalls. *Biomacromolecules* **19**, 42–52 (2018).
101. Anastasio, R., Peerbooms, W., Cardinaels, R., van Breemen, L. C. A. Characterization of Ultraviolet-Cured Methacrylate Networks: From Photopolymerization to Ultimate Mechanical Properties. *Macromolecules* **52**, 9220–9231 (2019).
102. Shin, H., Olsen, B. D., Khademhosseini, A. The mechanical properties and cytotoxicity of cell-laden double-network hydrogels based on photocrosslinkable gelatin and gellan gum biomacromolecules. *Biomaterials* **33**, 3143–3152 (2012).
103. Pego, A. P., Grijpma, D. W., Feijen, J. Enhanced mechanical properties of 1,3-trimethylene carbonate polymers and networks. *Polymer (Guildf)*. **44**, 6495–6504 (2003).
104. Schüller-Ravoo, S., Feijen, J., Grijpma, D. W. Flexible, elastic and tear-resistant networks prepared by photo-crosslinking poly(trimethylene carbonate) macromers. *Acta Biomater.* **8**, 3576–3585 (2012).
105. Blanquer, S. B. G., Werner, M., Hannula, M., Sharifi, S., Lajoinie, G. P. R., Eglin, D., Hyttinen, J., Poot, A. A., Grijpma, D. W. Surface curvature in triply-periodic minimal surface architectures as a distinct design parameter in preparing advanced tissue engineering scaffolds. *Biofabrication* **9**, 25001 (2017).

Chapitre III.

Les hydrogels à base de polyoxazoline en stéréolithographie

Chapitre III. Les hydrogels à base de polyoxazoline en stéréolithographie

Introduction

Les polyoxazolines (**POx**)s ont des propriétés prometteuses pour de nombreuses applications et sont de plus en plus reconnues comme d'intérêt dans le domaine **biomédical**. Dans l'objectif d'étendre leurs applications, des **hydrogels** de POx ont été élaborés par **stéréolithographie** dans ce chapitre. Des poly(2-méthyl-2-oxazoline) (**PMOx**) de différentes masses molaires ont été **synthétisées** et fonctionnalisées par des groupements **photosensibles**, utilisables en stéréolithographie. La versatilité de la chimie des POx a également été mise à profit pour augmenter le taux de fonctionnalisation par hydrolyse partielle des POx en PEI. Les propriétés **mécaniques** et la mesure du taux de **gonflement** ont été étudiées sur des hydrogels conçus par stéréolithographie. Ce travail a permis de fabriquer des pièces complexes telles que des « Arcs de Triomphe » mais aussi des *scaffolds* à porosité contrôlée de type gyroïde. Une partie **bibliographique** est tout d'abord dédiée à la chimie des POx pour **élaborer** des **hydrogels**, leurs propriétés **biologiques** et **mécaniques** avec une attention particulière sur les quelques exemples de POx utilisées en fabrication additive. L'ensemble des **résultats** est présenté sous forme d'**un article**.

1. Quelques généralités sur les polyoxazolines

Les poly(2-R-2-oxazoline)s (POx)s, parfois nommées poly(*N*-acyléthylèneimine)s (PAOx)s, connaissent un réel essor depuis les années 2000¹⁻³. Elles possèdent une structure dite pseudo-peptidique (Figure III-1) mais contrairement aux polypeptides, leur fonction amide tertiaire n'est pas reconnue et hydrolysée par les enzymes, leur conférant ainsi une grande stabilité en milieu physiologique et une furtivité vis-à-vis du système immunitaire⁴. Les deux principaux représentants de cette famille sont la poly(2-méthyl-2-oxazoline) PMOx (choisie pour notre étude) et la poly(2-éthyl-2-oxazoline) PEOx.

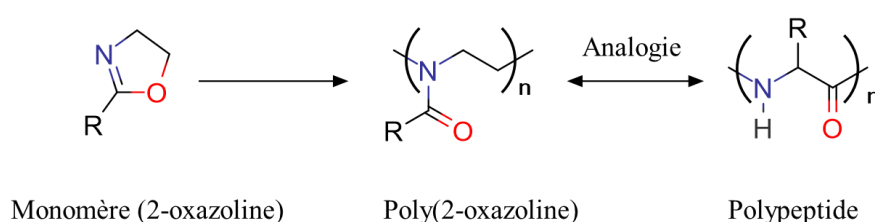
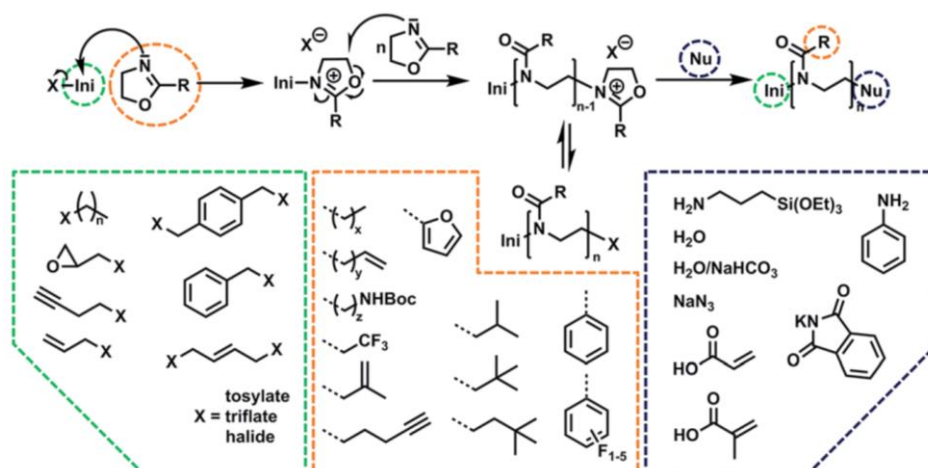


Figure III-1 - Structure pseudo-peptidique des poly(2-R-2-oxazoline)s

1.1. La chimie des polyoxazolines

Les **POx** sont obtenues par polymérisation cationique par ouverture de cycle (*cationic ring-opening polymerization*, CROP) du monomère 2-R-2-oxazoline. La polymérisation s'effectue en trois étapes : l'amorçage, la propagation et la terminaison^{1,2}. Deux mécanismes réactionnels existent ou co-existent, ionique et/ou covalent, conduisant au même produit final⁵. Le mécanisme dépend de la nucléophilie du contre-ion provenant de l'amorceur par rapport à celle du monomère⁶. Un attrait important des POx provient de la grande versatilité de leur chimie avec de multiples fonctionnalisations à façon par l'utilisation de divers **amorçeurs** (électrophiles porteurs du contre-ion, Figure III-2 en vert) ou d'agents de terminaison (nucléophiles venant stopper la réaction vivante, Figure III-2 en bleu)⁵. Une autre fonctionnalisation peut être réalisée à partir du groupement R porté par le monomère (Figure III-2 en orange)⁷.


 Figure III-2 - Exemples de fonctionnalisation des POx⁷

Parmi les **agents de terminaison**, les acrylates et les méthacrylates que nous avons utilisés au cours de cette étude⁵ peuvent être mentionnés. La (méth)acrylation peut être réalisée soit en une seule étape avec l'acide méthacrylique ou le méthacrylate d'hydroxyéthyle soit en deux étapes, avec la potasse qui génère des groupements hydroxyle en bouts de chaîne, suivi d'une méthacrylation en présence d'anhydride méthacrylique^{1,8,9}.

Les POx peuvent également être fonctionnalisées après **hydrolyse** des motifs répétitifs *N*-acyléthylèneimine en motifs éthylèneimine (Figure III-3 A) et ceci en milieu acide ou basique. L'hydrolyse peut être partielle et conduire à des copolymères POx-*stat*-PEI ou bien totale pour aller jusqu'à un poly(éthylèneimine) linéaire (L-PEI)¹⁰. La réaction a été énormément décrite sur la PMOx et la PEtOx¹¹. La présence d'amines secondaires le long de la chaîne offre la possibilité de nombreuses fonctionnalisations ultérieures résumées en Figure III-3 B (addition de Michael, ouverture de cycle époxyde...)⁷.

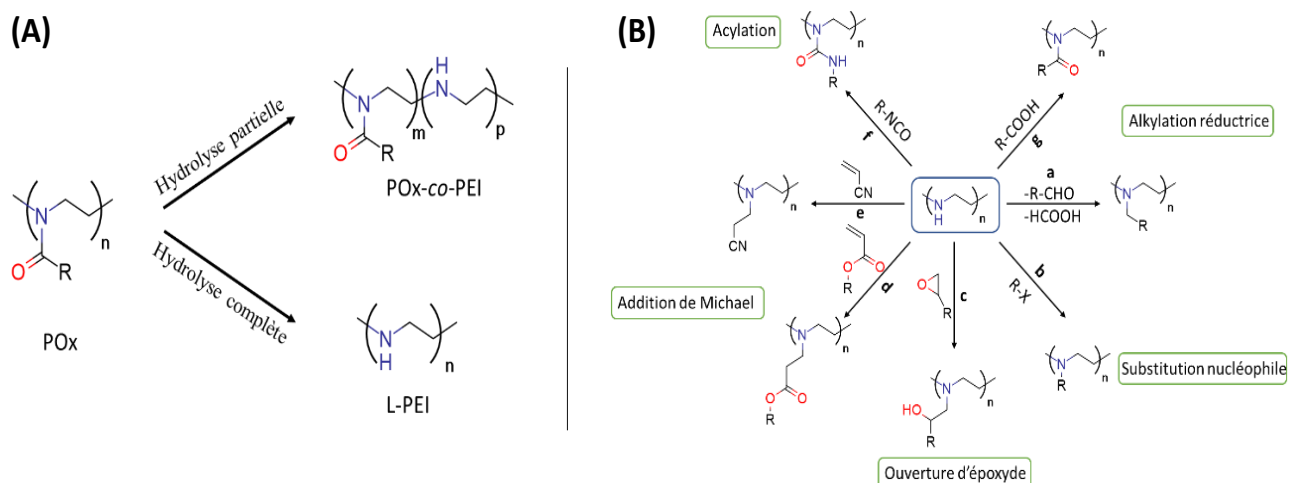


Figure III-3 - Hydrolyse totale ou partielle de la POx en PEI ainsi que leurs fonctionnalisations

1.2. Les propriétés biologiques des POx

Le poly(éthylène glycol) PEG également connu sous le nom de poly(oxyde d'éthylène) PEO est le polymère le plus utilisé en biomédecine. Ses propriétés biologiques (bio-inerte, non toxique, biocompatible...) font que son utilisation en santé est devenue une référence pour les polymères de synthèse. Cependant, il présente certains inconvénients. En effet, des anticorps anti-PEG ont été observés chez un nombre important de patients ainsi qu'une hypersensibilité et allergies dues à son omniprésence dans les cosmétiques et les additifs alimentaires^{12,13}. Il est également sujet à une bioaccumulation du fait de sa faible dégradation avec un sous-produit oxydatif toxique¹⁴. Les POx sont une **alternative de choix au PEG**. Les POx présentent une cytotoxicité, une hémocompatibilité, une furtivité et une biocompatibilité comparables à celles du PEG^{15,16}. De plus, les POx possèdent un avantage supplémentaire qui est la possibilité de fonctionnalisations sur la chaîne latérale qui ne sont pas possibles avec le PEG.

En ce qui concerne la **cytotoxicité** et l'**hémocompatibilité** des POx, deux études d'hémolyse ont été menées sur les PMOx et PEtOx en comparaison au PEG de même masse moléculaire^{17,18}. Celles-ci ont montré que les POx possèdent les mêmes cytotoxicité et hémocompatibilité que les PEG puisque qu'aucune des concentrations en polymère testées sur des érythrocytes membranaires n'a modifié leur comportement, provoqué d'agrégation érythrocytaire ou conduit à une hémolyse. De plus, le fait que les PMOx et PEtOx n'aient pas induit de libération d'hémoglobines confirme leur grande cyto-compatibilité^{17,18}. Par la suite, le **comportement *in vivo*** de la PEtOx a été évalué en l'administrant à des rats Sprague-Dawley

sous forme de doses aiguës par voie intraveineuse avec des injections uniques et multiples. Aucune toxicité, ni aucun effet indésirable n'ont été observés¹⁹. Ces résultats montrent le grand potentiel des POx en santé avec des propriétés biologiques comparables à celles du PEG.

Enfin, les POx sont connues pour être sensibles à l'hydrolyse acide et basique ainsi qu'à l'oxydation. Cependant, aucune hydrolyse significative n'a été observée dans des conditions très acides simulant l'estomac (pH de 2 à 5). Ce résultat suggère que l'amide tertiaire du motif POx pourrait empêcher la dégradation enzymatique et induire la non-biodégradabilité des polymères^{16,20}. À l'opposé, il a été démontré qu'une dégradation peut avoir lieu par des mécanismes oxydatifs avec des effets ROS/RNS (*reactive oxygen species/reactive nitrogen species*) dans des conditions physiologiques²¹. Il a également été observé que les POx ne s'accumulent pas dans les tissus et sont rapidement éliminées du sang par filtration glomérulaire dans les reins²².

Ces propriétés permettent aux POx d'être utilisées dans une grande variété d'**applications biomédicales** allant de la formulation de principes actifs, de vectorisation ciblée de médicaments à l'ingénierie tissulaire. La polyvalence structurale des POx permet de concevoir des architectures polymères complexes avec des propriétés adaptées²³ et des morphologies d'objets variées allant des micelles aux liposomes, aux nanoparticules lipidiques ou encore aux hydrogels dont nous faisons l'étude dans cette thèse (Figure III-4)^{1,7}.

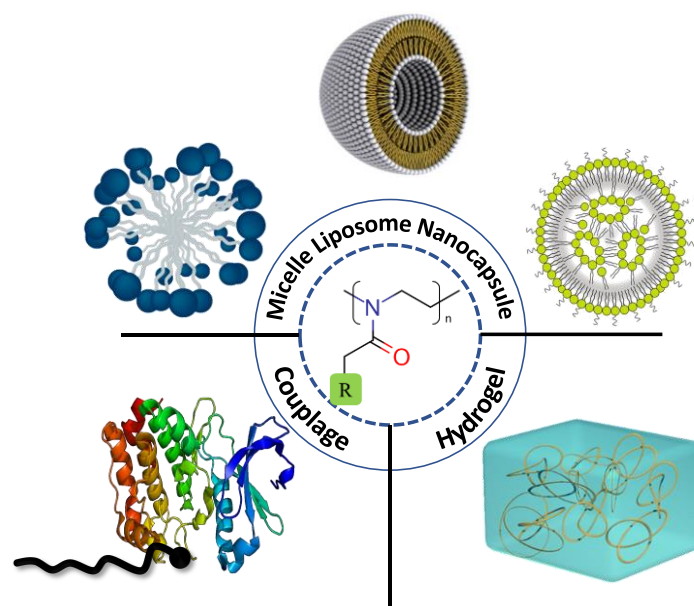


Figure III-4 - Exemples d'utilisation de POx dans le domaine biomédical

2. Les propriétés des hydrogels à base de polyoxazoline

2.1. Les différentes stratégies de synthèse des d'hydrogels à base de POx

Les généralités sur les hydrogels ont déjà été abordées dans le chapitre 1. Dans cette section, la discussion porte uniquement sur les méthodes d'élaboration d'hydrogels à base de POx. Comme l'ensemble des hydrogels, ceux à base de POx peuvent être constitués d'un réseau chimique (permanent) ou physique (réversible). Les hydrogels de POx résultants de réticulation physique (liaisons hydrogène, cristallisation, métaux de complexation...) ont très bien été décrits dans la revue de Kelly¹⁶. Cette voie n'a pas été étudiée dans ce chapitre et ne sera donc pas plus détaillée. Les hydrogels de POx réticulés chimiquement peuvent être classés en trois catégories selon leur méthode de synthèse, comme décrit en Figure III-5 issue de la revue de Schubert : A) de monomères bis-fonctionnels, B) de POx α,ω -fonctionnalisées et C) de POx possédant des groupements latéraux fonctionnalisés⁷.

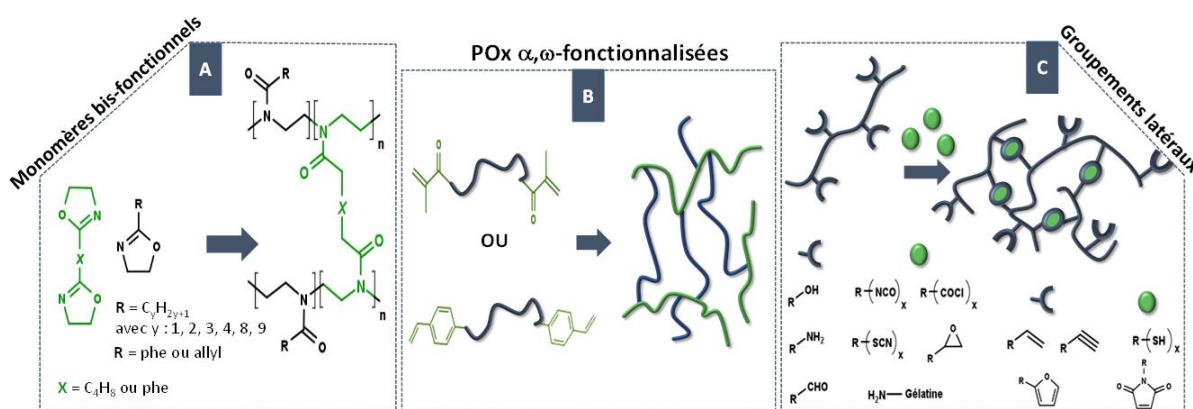


Figure III-5 - Différentes stratégies d'élaboration de réseaux chimiques de POx

La **première catégorie** repose sur la copolymérisation entre une oxazoline et une **bis-oxazoline** qui sert d'agent réticulant. *Chujo et al.*, en 1989, fut le premier à décrire des hydrogels à base de 2-alkyl-2-oxazolines (n-butyl, n-octyl, n-dodécanyl) et d'une bis-2-oxazoline aliphatique²⁴. Par la suite, plusieurs groupes se sont intéressés à d'autres associations de monomères comme illustré sur la Figure III-5 (A). Cependant, une différence de réactivité notable entre le monomère et l'agent réticulant a conduit à des copolymères de type gradient, qui sont défavorables à la formation de réseaux homogènes⁷. De plus, la réaction doit être menée en solution à hautes températures. Ceci limite l'éventuelle

incorporation de produits biologiques lors de la formation du réseau dû à la température et au solvant¹.

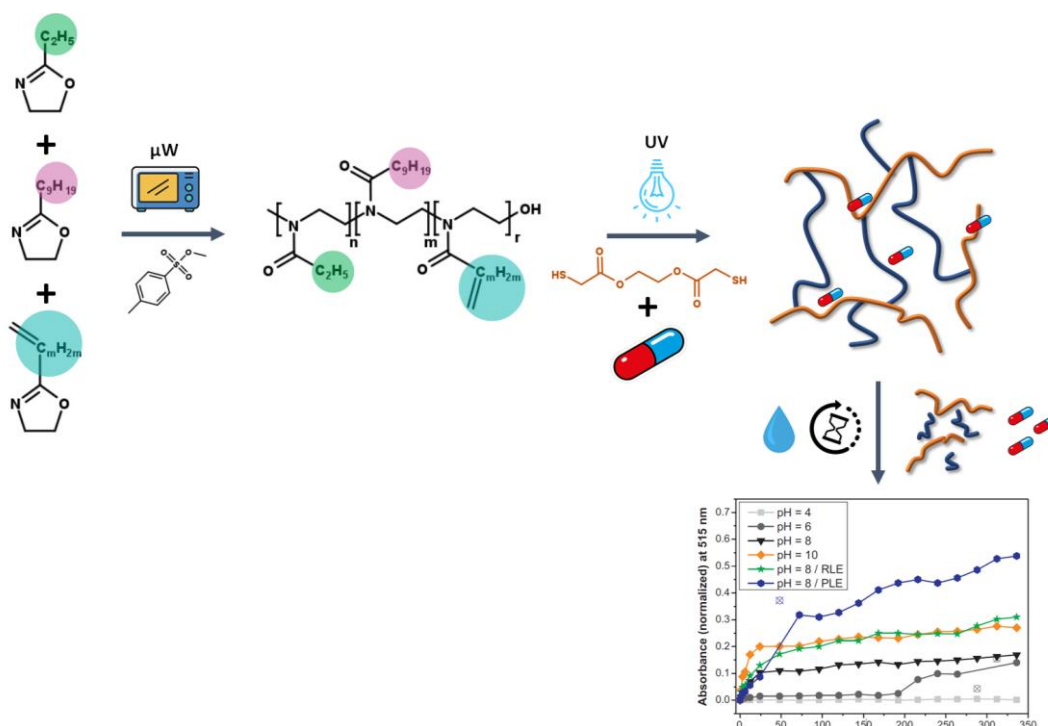
La **deuxième catégorie** est celle utilisée dans le travail de ce chapitre. Elle repose sur l'utilisation de POx α,ω -fonctionnalisés avec le plus souvent des fonctions réactives de type (méth)acrylate voire styrénique (Figure III-5 B). Le premier hydrogel, uniquement de POx a été réalisé par Christova *et al.* en 1997²⁵. Une POx bis-fonctionnelle a été synthétisée à partir de l'amorceur 1,4-dibromo-2-butène puis fonctionnalisée en extrémité de chaîne par l'acide acrylique, utilisé comme agent de terminaison. Ce concept a également été élargi pour concevoir des réseaux de POx thermosensibles. Ce point sera discuté dans le chapitre 4. L'avantage de cette voie vient de la possibilité de copolymériser la POx avec d'autres monomères de type HEMA, acide acrylique ou polymères comme le PLA⁷. De plus, il est possible d'introduire deux types d'hydrogels, qui réticulent de manières différentes. Cette stratégie mène à des réseaux interpénétrés (*Interpenetrating Polymer Networks, IPN*) fruit d'une réticulation menant à deux réseaux de polymères entrelacés distincts. Ce type de réseau n'est pas plus détaillé ici. Plus d'informations peuvent être obtenues dans l'article de Zoratto *et al.* où des IPN de POx avec du PVA, du MMA ou encore des PU sont décrits^{7,26}.

La **dernière catégorie** regroupe les hydrogels obtenus à partir de POx possédant des fonctions réactives en chaînes latérales provenant soit de la fonctionnalisation de POx-*stat*-PEI par différentes réactions avec la PEI soit par copolymérisation avec un monomère oxazoline possédant un groupement R fonctionnalisé comme reporté sur la Figure III-5 (C). Park *et al.* proposa ce type d'approche sur des homopolymères de POx²⁷. Dans son étude, il réalisa une réticulation par réaction de la POx avec un isocyanate trifonctionnel. D'autres articles décrivent des copolymères POx possédant des motifs ayant des groupements R pendants avec des fonctions terminales réactives pouvant induire la réticulation. C'est le cas avec les fonctions allylique, propargylique par réaction thiol-ène²⁸⁻³⁰, avec les fonctions coumarine ou anthracène par photodimérisation³¹, ou encore avec des fonctions furanique par réaction de Diels-Alder avec des motifs maléimide³². La POx-*stat*-PEI a également été utilisée où les fonctions amine réagissent avec des réactifs multifonctionnels de type isocyanate ou chlorure d'acide servants d'agents réticulants⁷. Un article de Rathna décrit la réticulation par couplage avec une protéine, comme la gélatine, par une étape d'amination réductrice³³. L'inconvénient de cette stratégie est qu'elle nécessite des monomères fonctionnalisés dont la synthèse est

souvent multiétapes et où de grandes quantités de matière sont difficilement accessibles. En revanche, l'avantage se trouve dans la densité de réticulation de l'hydrogel qui peut varier avec le taux de modification de la POx¹.

2.2. Les applications biologiques des hydrogels à base de POx

En raison de leurs propriétés biologiques, décrites en partie 1.2 (Les propriétés biologiques des POx), les hydrogels de POx ont de nombreuses applications potentielles en santé. Il est possible de citer leur utilisation pour l'élaboration de **systèmes d'encapsulation** de principes actifs. Par exemple, l'ibuprofène ou l'éosine B ont été encapsulés dans un hydrogel de copolymères de POx, présenté en Figure III-6 A, avec un agent de réticulation dégradable. La Figure III-6 B montre leur libération contrôlée au cours du temps grâce au pH et à la dégradation hydrolytique progressive de l'agent réticulant³⁴.



Les hydrogels de POx sont aussi des matériaux émergents en **ingénierie tissulaire**¹. Par exemple, des microbilles d'hydrogel de PMOx ont été utilisées pour de la reconstruction neuronale³⁵. Différents tissus neuronaux, possédant une adhésion cellulaire élevée, ont été

mimés en faisant varier le rapport monomère/agent réticulant pour obtenir une élasticité allant de 2 à 20 kPa. Toujours dans l'objectif de concevoir des biomatériaux, les hydrogels de POx ont été fabriqués avec des séquences peptidiques pour promouvoir l'adhésion cellulaire. Des travaux ont été réalisés en ce sens avec un copolymère de PMOx-co-PDecEnOx à base de MOx, utilisée pour son hydrophilie et de 2-(déc-9-ène)-2-oxazoline (DecEnOx) utilisé pour le couplage (séquence **CRGDSG**)³⁶. La Figure III-7 montre la possibilité de faire varier l'attachement cellulaire en fonction de la quantité de RGD greffée et de promouvoir un alignement cellulaire.

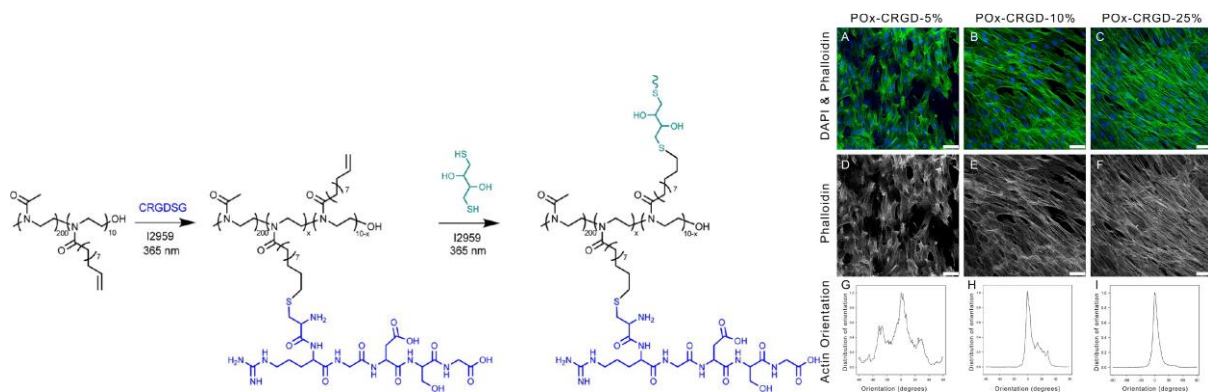


Figure III-7 – Hydrogels obtenus par couplage POx-peptidique³⁶

2.3. Les propriétés physiques des hydrogels à base de POx

Les PMOx et PEOx sont connues comme ayant une forte capacité d'absorption d'eau du fait de la présence de leurs motifs amide, fortement accepteurs de liaisons hydrogène, qui permettent de former des interactions avec l'eau. Dans la littérature, des **taux de gonflement** très différents sont reportés en fonction du polymère et du type de réseau : de quelques dizaines à plusieurs centaines de pourcents comme résumé dans le Tableau III-1 . En parallèle de ces mesures de gonflement, des études mécaniques ont été réalisées. La grande majorité des études sont des mesures de module locales réalisées par nano-indentation, seules deux études ont été effectuées en traction/compression. Comme le montre le Tableau III-1 , d'une manière générale, les valeurs de module d'élasticité sont faibles, de l'ordre de 10 à 100 kPa. Ceci est comparable aux autres hydrogels (Chapitre 1). Un seul exemple d'hydrogel POx possédant un module de l'ordre du MPa a été reporté par Czich *et al.* en utilisant des réseaux très denses avec de faibles masses molaires³⁷.

Tableau III-1 - Propriétés mécaniques des hydrogels de POx

Formule POx	Type hydrogel	Taux de gonflement (%)	E	Technique d'analyse	Réf
POx_{C1-9} DP₆₀₋₁₀₀	Film sec	/	1 - 8 GPa	Nano-indentation	38,39
PEtOx₁₀ + Bis_{C4-8}Ox BisOx:EtOx 2:98, 3:97, 4:96, 5:95, et 10:90	Hydrogel	2 – 21	11-85 kPa	Nano-indentation	40
PEtOx₂₀₀-g-Alginate + CNF	Hydrogel réticulé par CaCl ₂	8 – 14	20 – 30 kPa	Nano-indentation	41
PMeOx₁₉₀- 380-ButenOx₁₀₋₂₀ PMeOx₁₉₀- 380-DecenOx₁₀₋₂₀ + DTT	Solution Thiol-ène	10 – 80	10 – 100 kPa	Photo-DMA	30
PMOx₉₀-EnOx₁₀ PEtOx₉₀-EnOx₁₀ + dithiol_{C3,4,6,9}	Hydrogel	4 – 18	10 – 125 kPa	Nano-indentation	28
PIPOx₃₃₀ + Acide dicarboxylique fonctionnalisé	Hydrogel	50 - 600	0,13 – 124 kPa	Traction / compression	42
PEtOx-DAcry DP₁₀₋₂₀ + PEtOx-Acry DP₁₀₋₅₀	Hydrogel	50-90	1 - 4 MPa	Nano-indentation	37

3. L'émergence des polyoxazolines en fabrication additive

De nombreuses publications ont récemment décrits l'utilisation des POx comme matériaux pour la fabrication d'objets en 3D⁴³. Ainsi, les POx se retrouvent dans les technologies de type DIW, FDM et 2-photons (chapitre 1), principalement dans un objectif d'ingénierie tissulaire^{1,43}. Sur la technologie du **DIW**, Luxenhofer *et al.* ont développé des copolymères diblocs amphiphiles thermosensibles à base de PMOx et de poly(2-n-propyl-2-oxazine) (PrOzi)

(oxazoline : cycle à 5 chaînons et oxazine cycle à 6 chaînons) qui gélifient avec l'augmentation de la température et mènent à une réticulation physique. Ce phénomène est connu sous le terme de thermogélation. Le principe repose sur la **LCST** et sera discuté dans le chapitre 4. Comme preuve de concept, ils ont incorporé des cellules fibroblastes (NIH-3T3) dans la résine et ont démontré une bonne répartition et viabilité des cellules après 24 h sur la structure conçue par DIW (Figure III-8). Cependant, la qualité de la fabrication est médiocre et ne permet pas de construire des pièces complexes. Ce défaut est dû à une faible viscosité de la solution qui induit un écoulement de la matière, rédhibitoire lors de la fabrication⁴⁴. Un résultat similaire a été obtenu dans une autre de leur étude à partir de copolymères triblocs de PMOx-*b*-PiBuOx-PMOx⁴⁵.

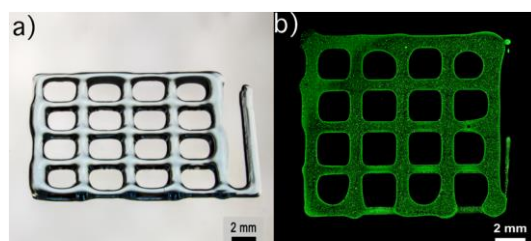


Figure III-8 - (a) Image en microscope optique d'une construction imprimée composée d'empilements orthogonaux de brins, (b) des constructions chargées de cellules⁴⁴

Afin de pallier cet inconvénient, l'incorporation de **nanoparticules minérales d'argile** (LAPONITE) ont été proposées pour augmenter la viscosité et l'élasticité de l'hydrogel. Cela a permis d'améliorer l'ensemble des propriétés du processus de **DIW** tout en gardant les aspects thermosensibles et biocompatibles^{46,47}. Enfin, l'ajout de poly(*N,N*-diméthylacrylamide) à la solution a également fait l'objet d'études pour améliorer les propriétés mécaniques. Après construction, la structure gélifiée a été chimiquement réticulée par un passage à chaud. Cette étape supplémentaire a fait réagir les monomères de bisacrylamide par voie thermique. Cette solution a permis de fabriquer des structures complexes plus résistantes (voir Figure III-9)⁴⁷. Un autre groupe de recherche proposa d'augmenter la viscosité par l'incorporation de fibres de nanocellulose. En plus d'améliorer le processus, des chondrocytes auriculaires humains ont été chargés directement dans le mélange. Ceci a permis d'obtenir une excellente viabilité à J +1 et J +7 ($90 \pm 2\%$)⁴¹.

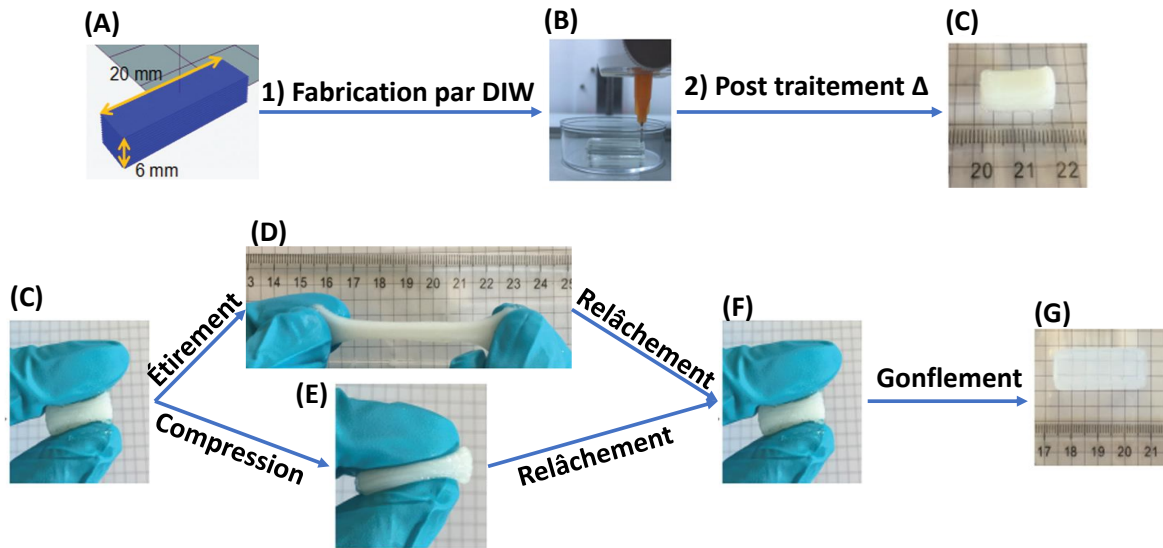


Figure III-9 - (A et B) STL et procédé de fabrication, (C) objet après réticulation, (D, E et F) déformation en traction et compression et (G) objet gonflé d'eau

Enfin, toujours sur le **DIW**, le groupe de Luxenhofer s'est intéressé au phénomène inverse de la LCST, la **UCST** où le polymère réticule physiquement à basse température et devient liquide à haute température. Les détails de la UCST sont discutés dans le chapitre 4. Deux voies ont été envisagées pour obtenir ce comportement de UCST. Dans un cas, un copolymère triséquencé (ABA) a été développé à base de PMOx (A) et de poly(2-phényl-2-oxazine) (PPhOzi) (B). Le groupe a tiré avantage de la réversibilité de la réticulation physique du polymère pour générer des supports sacrificiels où le polymère a servi de base pour concevoir un objet en alginate⁴⁸. Dans l'autre cas, un copolymère tribloc (ABA) entièrement à base de POx a été développé avec de la PMOx (A) et de la poly(2-phénéthyl-2-oxazoline) (PPhenEtOx) (B). Ici, l'alginate a été directement mélangée à l'encre avec des cellules NIH 3T3 pour améliorer la viabilité cellulaire⁴⁹.

Les POx ont également été utilisées en **FDM**^{50,51}. Pour cela, des POx dont le groupement R possède plus de trois atomes de carbone ont été utilisées car connues pour donner des polymères semi-cristallins. Kalaoglu-Altan *et al.* ont mis en forme des copolymères PiPrOx-nPrOx à des températures allant de 160 et 205 °C selon les masses molaires⁵⁰. Wałach *et al.* ont utilisé la PEtOx commerciale (aquazol 50) et une PEtOx-PEI provenant de l'Aquazol 200. Ces matériaux ont également nécessité un chauffage de 160 et 210 °C⁵¹. Dans les deux cas, la résolution des pièces et les hautes températures sont limitantes pour des applications en

santé. Plus récemment, des **polyuréthanes** à base de PEOx et de PCL de différentes tailles ont été utilisés en **FDM**. Le matériau s'est révélé être hétérogène du fait de l'hydrophobie et hydrophilie des deux constituants de même qu'une capacité de gonflement limitée. De plus, la résolution de la fabrication est extrêmement faible à cause de la forte viscosité. Néanmoins, l'activité cellulaire montre une excellente viabilité de 98 % après 24 h. Ce type de matériau bien que prometteur reste encore à améliorer⁵².

La **stéréolithographie (SLA ou DLP)** a fait ses preuves dans le domaine du médical (chapitre 1). Pour autant, à notre connaissance l'utilisation des POx en stéréolithographie n'a jamais été reportée. A ce jour, uniquement deux articles de l'équipe de Schubert mentionnent leur utilisation avec la **technologie de deux photons**^{9,37}. Leur première étude a été une preuve de concept et une recherche d'un photoamorceur adapté à la technologie. Pour cela, des PEOx de 1 000 et 20 000 g/mol ont été bifonctionnalisées avec des groupements acrylate pour réagir sous sollicitation lumineuse⁹. Leur second article porte sur l'amélioration de ce système en utilisant des masses molaires de l'ordre de 1 000 et 2 000 g/mol. Ils ont également ajouté de la PEOx monoacrylée pour diminuer la fragilité de l'objet en diminuant la densité du réseau. Ceci leur a permis d'obtenir des pièces avec des modules de l'ordre du MPa, présentés dans le Tableau III-1 avec des taux de gonflement de 100 %³⁷.

4. Conclusion

Cette étude bibliographique s'est focalisée sur la fonctionnalisation des POx menant à des hydrogels, en insistant sur leurs applications en santé et en fabrication additive. De nombreuses études ont démontré la possibilité d'insérer des cellules dans de tels hydrogels. Bien que les POx possèdent un excellent comportement d'absorption d'eau, ceci a pour effet insidieux de limiter les propriétés mécaniques des hydrogels. De plus, jusqu'à maintenant les POx n'ont jamais été développées en stéréolithographie.

L'étude suivante a ainsi pour objectif de décrire des hydrogels à base de PMOx obtenus par stéréolithographie type DLP. L'article présente une synthèse simple pour obtenir des PMOx fonctionnels de différentes masses molaires en une étape avec de larges quantités de matière. Également des objets conçus par stéréolithographie seront décrits en fonctions de leur taux d'absorption et résistance mécanique.

5. Article - Polyoxazoline Hydrogels in Stereolithography

Thomas Brossier^{1, 2}, Belkacem Tarek Benkhaled¹, Maxime Colpaert¹, Gael Volpi², Sébastien Blanquer^{1}, Vincent Lapinte^{1*}*

Abstract

A large range of poly(2-methyl-2-oxazoline) resins were investigated as hydrogel precursors for additive manufacturing by stereolithography. Taking advantage of the versatility of polyoxazoline chemistry, multifunctional photosensitive polyoxazolines were synthesized by direct methacrylation of terminal groups (MA_2POx_n) or by methacrylation of poly(ethyleneimine) units resulting from partial POx hydrolysis ($M_mPOx_n-PEI_p$). The length and the functionality of these UV-active macro-crosslinkers influence both on the mechanical properties and the hydration behavior of the resulting hydrogels. The benefit of the layer-by-layer crosslinking of the POx resin during the vat photopolymerization was also evaluated and allowed to fabricate complex 3D architectures objects. Their high-definition and high mechanical strength show the great potential of these copolymers for stiff and mechanically resistant hydrogels. Finally, porous 3D scaffolds with gyroid architectures were built and open the opportunities of the POx materials for tissue engineering applications.

Keywords: Additive manufacturing; Hydrogel; Photosensitive resin; Polyethyleneimine; Poly(2-methyl-2-oxazoline); vat photopolymerization

5.1. Introduction

Hydrogels are soft three-dimensional hydrophilic networks able to absorb a large quantity of water without losing their mechanical integrity⁵³⁻⁵⁵. The large hydration contributes not only to a certain biocompatibility but also allows to get closer to the chemical and physical structuration of the biological tissue^{53,55,56}. Therefore, hydrogels are extremely suitable for a variety of applications in pharmaceutical, medical industry and more particularly in tissue engineering^{55,57}.

However, hydrogels are also widely known for their high fragility and low elasticity which then limit their use in applications where mechanical solicitations are required⁵⁸. One of the options to reinforce the mechanical resistance of the hydrogel is by using synthetic polymers. Hydrogels based on synthetic polymers have been often employed because of their tunable, controlled, and reproducible properties (chemistry, structure, porosity, degradability...)^{59,60}. Such polyvalence of properties has been recently enhanced in additive manufacturing, and more precisely with vat photopolymerization process⁶¹. In fact, the layer-by-layer photocrosslinking process overcomes the issue of low crosslinking for thick samples because of the light absorption and diffusion in the samples. Moreover, vat photopolymerization such as stereolithography (SLA) offers a unique path that allows precise control of the external architecture of three-dimensional objects, but also the ability to develop highly sophisticated porous structures which is a huge benefit for developing tissue engineering scaffolds⁶². Poly(ethylene glycol) (PEG) is recognized to be the reference as hydrophilic synthetic polymers, and consequently has been widely used in SLA to build hydrogels. Methacrylation of PEG or else their derivatives as block copolymers, were proposed as precursor resins for SLA fabrication, especially for tissue engineering application.

Unfortunately, PEG was proved to generate an immune response⁶² and accumulation in the body tissues^{63,64}. Among all the hydrophilic synthetic polymers, the polyoxazoline (POx) family tends to be the best substitute of PEG, which then explain the considerable growing investigation in the literature around POx, and especially for their ability to generate hydrogels.

POx is qualified as pseudo-peptides and synthesized by living cationic ring-opening polymerization (CROP) of commercial 2-R-2-oxazoline monomers where R corresponds to

alkyl or aromatic groups. The well-known candidates of the POx family are poly(2-methyl-2-oxazoline) (PMOx) and poly(2-ethyl-2-oxazoline) (PEtOx) considered as promising weakly toxic water-soluble polymers²³, largely employed in the health field^{23,65} and appearing as a legitimate substituent to PEG^{18,66,67}. POx are easily tunable by manifold end-groups and offer the additional ability to be partially or fully hydrolyzed into poly(ethyleneimine), leading to POx-PEI or PEI, respectively^{2,68,69}. This modification opens the door to another generation of grafted polymers which correspond to substituted POx by functional pendent chains⁷⁰ as already reported for photosensitive methacrylate groups by Hoogenboom¹ and Schubert⁷ teams and our team with coumarin units^{31,71,72}. Nevertheless, to the best of our knowledge the use of photosensitive POx resin was never reported with stereolithography even if POx hydrogel was very recently reported as polymer precursor for other additive manufacturing processes⁴³. Luxenhofer *et al.*, studied biomaterial inks based on thermoresponsive PMOx-*b*-PPheOzi-*b*-PMOx⁴⁸ or PMOx-*b*-PnPOx⁴⁴ alone or combined with nanoclay Laponite XLG^{46,47,73} in extrusion-based 3D printing. The bioprinting approach relies on thermogelling properties of precursors, and consequently does not require photoreactive POx resin. Finally, Schubert *et al.*,³⁷ described 3D microstructures using two-photon polymerization by mixing different chain lengths of poly(2-ethyl-2-oxazoline).

Herein, we investigated photosensitive poly(2-methyl-2-oxazoline) in stereolithography (SLA) process. Di- and multifunctional POx precursors were synthesized by methacrylation of either terminal end groups of POx or lateral ethyleneimine units of POx-PEI resulting from the partial hydrolysis of POx, respectively (Figure III-11). Independently to additive manufacturing, a special attention was given on the physical and mechanical properties of the POx hydrogels, which are barely reported in the literature. These tailor-made polymers used as photocrosslinkable resins in SLA allowed fabricating well-defined 3D objects as the Paris triumphal arch or potential tissue engineering scaffolds with gyroid porous architectures.

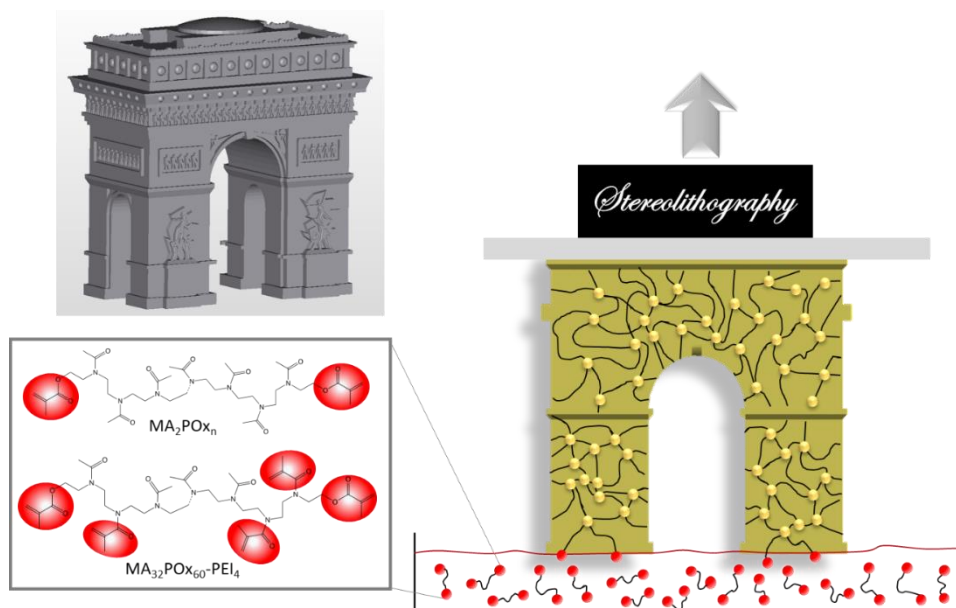


Figure III-10 - 3D scaffolds of methacrylated POx hydrogels using stereolithography process.

5.2. Material and methods

5.2.1. Material

2-Methyl-2-oxazoline (MOx, Sigma Aldrich, 99.0%), 1,6-hexanediol (HD, Sigma Aldrich, 99.0%), methyl p-toluene sulfonate (MeOTs, Sigma Aldrich, 97.0%), methacrylic acid (MAA, Alfa Aesar, 99.0%), triethylamine (TEA, Sigma Aldrich, 98.0%), anhydrous acetonitrile (Sigma Aldrich, 99.9%), p-toluenesulfonyl chloride (TsCl, Sigma Aldrich, 99.0%), methacrylic anhydride (Sigma Aldrich, 94%), orange G (Sigma Aldrich), potassium hydroxide (Sigma Aldrich, 90%), diethyl ether were commercial products and used without further purification. Dialysis membranes, Spectra/Pors-MWCO 1.5 kDa, were purchased from Spectrum Laboratories.

5.2.2. Synthesis

Synthesis of 1,6-hexaneditosylate (HDOTs)

To a 250 mL round-bottom flask equipped with a magnetic stir bar, 1,6-hexanediol (HD) (10 g, 850 mmol, 1 equiv.) and TEA (57 mL, 4,25 mol, 5 equiv.) were dissolved in 100 mL of chloroform. The solution was cooled at 0 °C and TsCl (65 g, 3 400 mol, 4 equiv.) was added dropwise. The resulting mixture was stirred overnight at 25 °C. The crude was washed with water and 3 times with dichloromethane. The organic phase was concentrated and stored in

fridge until crystallization. The compound was recrystallized with ethanol and a white solid product was isolated in 75% yield.

^1H NMR (CDCl_3), δ (ppm): 7.7 (d, 4H, Hd), 7.3 (d, 4H, Hc), 3.9 (t, 4H, Hb), 2.5 (s, 6H, He), 1.6 - 1.3 (m, 8H, Ha), (Figure III-SI-17).

Synthesis of bis-methacrylated poly(2-methyl-2-oxazoline) ($M_2\text{POx}_n$)

To a 500 mL round-bottom flask equipped with a magnetic stir bar, HDOTs (11 g, 26 mmol) was dissolved in 300 mL of anhydrous acetonitrile and MOx (22 mL, 260 mmol) were added. The solution was vigorously stirred at 80 °C for 4 h. The resulting polymer was then quenched by the dropwise addition of TEA (7 mL, 52 mmol) and methacrylic acid (5 mL, 52 mmol). The flask was maintained at 40 °C for 15 h. After cooling, the reaction mixture was concentrated, then precipitated in diethyl ether and dry under pressure. A solid powder was obtained with a yield of 93%.

^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 6.08 (1H, He1), 5.26 (1H, He2), 4.28 (2H, Hc) 3.20–3.66 (4H, Hb), 1.96-2.19 (3H, Hd), 1.94 (3H, Hf), 1.06-1.59 (8H, Ha), (Figure III-SI-18).

Synthesis of monomethacrylated poly(2-methyl-2-oxazoline) ($M\text{POx}_n$)

To a 500 mL round-bottom flask equipped with a magnetic stir bar, MeOTs (9.1 g, 49 mmol) was dissolved in 300 mL of anhydrous acetonitrile and MOx (42 mL, 490 mmol) were added. The solution was vigorously stirred at 80 °C for 4 h. The resulting polymer was then quenched by the quick addition of a solution of methacrylic acid (17 mL, 196 mmol) and triethylamine (27 mL, 196 mmol). The flask was maintained at 40 °C for 15 h. After cooling, the reaction mixture was concentrated, then precipitated in diethyl ether and dry under vacuum pump. A sticky solid was obtained with a yield of 95%.

^1H NMR (CDCl_3) δ (ppm): 6.0 (1H, He1), 5.5 (1H, He2), 4.15 (2H, Hd), 3.1-3.6 (4H, Hb), 2.9 (3H, Ha), 1.9-2.1 (3H, Hc), 1.8 (3H, Hf), (Figure III-SI-19).

Synthesis of poly(2-methyl-2-oxazoline) (PEI) methacrylate (MA_oPOX_m-PEI_p)

Step 1. Ring-opening polymerization of MeOx (DP_n=100) (POX_n)

To a 500 mL round-bottom flask equipped with a magnetic stir bar, HDOTs (2.51 g, 5.8 mmol) was dissolved in 90 mL of anhydrous acetonitrile and MOx (49.5 g, 588 mmol) were added. The solution was vigorously stirred at 80 °C for 24 h. Then, the growing polymer chains were quenched at 40°C by addition of an adequate amount of methanolic potassium hydroxide solution (50 mL at 2 M). The flask was maintained at 40 °C overnight. After cooling, the reaction mixture was concentrated and after precipitations in cold diethyl ether a resulting POX_n was dissolved in water (100 mL) and freeze-dried in a dry white powder (45 g, 90% yield).

¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 3.20–3.66 (4H, H_b), 1.96-2.19 (3H, H_c), 1.06-1.59 (8H, H_a), (Figure III-SI-20).

Step 2. Partial hydrolysis of POX_n into POX_m-PEI_p

A 6 M HCl solution was prepared from distilled water (100 mL) and hydrochloric acid solution 37% (150 mL). POX_n (40 g) was dissolved in the previous solution. The round-bottom flask was heated at 100 °C. After 1.5 h of hydrolysis roughly 40% of *N*-acylmethylene imine repetitive units were converted in the corresponding ethylene imine moieties (EI). The mixture was cooled until room temperature, then a concentrated NaOH solution 2.5 M was added to neutralize the mixture at pH=7. The propionic acid by-product was removed by dialysis using 1 kDa dialysis membrane during 48 h. The water was removed by freeze-drying to reach a powder in a good yield (29 g, 72.5%). The hydrolysis rate (H%) was calculated by ¹H NMR spectroscopy using the integration of the corresponding peak of NCH₂CH₂ protons of POX_n related to that of PEI using equation 1:

$$H\% = \frac{\int_{\text{CH}_2\text{PMOx}} + \int_{\text{CH}_2\text{PEI}}}{\int_{\text{CH}_2\text{PEI}}} * 100 \quad (1)$$

¹H NMR (CDCl₃) δ (ppm): 3.20–3.66 (4H, H_b), 2.57-2.84 (4H, H_c), 1,96-2.19 (3H, H_d), 1.06-1.59 (8H, H_a), (Figure III-SI-21).

Step 3. Methacrylation of $\text{POx}_m\text{-PEI}_p$ into $\text{MA}_o\text{POx}_m\text{-PEI}_p$

$\text{POx}_m\text{-PEI}_p$ (19 g, 2.23 mmol) was dissolved in anhydrous dichloromethane. A solution of anhydride methacrylic (6.99 mL, 46 mmol) and TEA (15.65 ml, 112.5 mmol) in anhydrous dichloromethane (10 mL) was added dropwise to the initial solution. Then, the mixture was maintained at room temperature for 3 days. After that, the reaction mixture was concentrated, then precipitated in diethyl ether and dry under pressure. Finally, the resulting polymer was dissolved in water (100 mL) and freeze-drying. A solid powder was reached in a good yield (16.5 g, 86%).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ (ppm): 6.01 and 5.5 (2H, Hh), 4.93-5.27 (2H, Hf), 3.20–4.2 (4H, Hb), 2.4-2.7 (4H, Hc), 1.98-2.19 (3H, He), 1.96 (3H, Hg and 3H, Hi), 1.06-1.59 (8H, Ha), (Figure III-SI-22).

5.2.3. 3D printing resin

POx based macromonomers ($\text{MA}_o\text{POx}_m\text{-PEI}_p$ or $\text{MPOx}/\text{M}_2\text{POx}_n$ blend) were dissolved into distilled water at a concentration ranging from 40 to 60 wt% depending on the length of POx chains and stirred until fully dissolution. Photoinitiator, Darocur (3% w/w), photoabsorber, and Orange G (0.2 % w/w) were added to the POx solution and stirred few minutes to allow homogeneous photopolymerization and provided an efficient cure depth and optimal pattern resolution.

The ideal layer thick was fixed at 100 μm . To allow this layer the Jacob's equation have been used. Briefly, 6 drops of formulated resin were placed successively on a transparent plate and irradiated at 20 mW/cm^2 during 10, 20, 30, 40, 50, 60 s. Following, the glass plate was carefully wiped to remove all the unpolymerized material. A digital thickness gauge from Schmidt (Germany) was used to measure the cure depth with 10 μm precision.

The 3D structures were then built from the above-mentioned resins by stereolithography (SLA) using a 385 nm digital light processing (DLP) apparatus (Asiga Max X27, Australia). The 3D objects were constructed by photocrosslinking layer-by-layer with a thickness of 100 μm . Each layer was illuminated over an intensity of 20 mW/cm^2 for 30 s. After building, the scaffolds were removed from the stage and washed using distilled water to remove unreacted prepolymer residues from the scaffolds.

3-Dimensional porous scaffolds were designed using STL format from K3DSurf and Rhinoceros 3D. Gyroid structures were produced from equation 2⁷⁴:

$$\cos(x).\sin(y)+\cos(y).\sin(z)+\cos(z).\sin(x) = 0.75 \quad (2)$$

5.2.4. Characterization

Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

¹H NMR spectra were recorded on a 400 MHz Bruker Aspect Spectrometer. D₂O was used as deuterated solvent. Chemical shifts were given in parts per million (ppm). For ¹H NMR the residual H₂O and CHCl₃ in D₂O and CDCl₃ at 4.79 and 7.26 ppm was considered as reference peak. The molar mass of PMO_xMA was determined using the following equations 3 and 4:

$$DP_n(\text{PMO}_x\text{MA}) = \frac{\int_{3.2}^{3.8} I}{8} \quad (3)$$

$$\frac{\int_{5.7}^{6.1} I}{4}$$

$$M_{n,\text{NMR}} = DP_n(\text{PMO}_x\text{MA}) \times M_{\text{MO}_x} + 2 * M_{\text{methacrylate}} \quad (4)$$

where M_{MO_x} and $M_{\text{methacrylate}}$ are the molar masses of MO_x repetitive unit (85 g.mol⁻¹) and methacrylate end chain (86 g.mol⁻¹), respectively.

Size Exclusion Chromatography (SEC)

The apparent number-average molar masses and dispersity of PMO_xMA were determined using a DMAc GPC system (PL-GPC 50 Plus) equipped with an autosampler (Varian model 410). The SEC apparatus comprised a refractive index detector and was filled with one PolarGel-M pre-column (7.5 x 50 mm) and two PolarGel-M columns (7.5 x 300 mm) thermostated at 50 °C. The mobile phase was *N,N*-dimethylacetamide (DMAc) (with 0.1 wt% LiCl) at a flow rate of 0.8 mL.min⁻¹, calibrated with poly(methylmethacrylate) (PMMA) standards ranging from 550 to 2 000 000 g.mol⁻¹ (EasiVial-Agilent).

Viscosimetry

The viscosity of the PO_x based resins was determined by rheologic measurements using a Physica Modular Compact MCR301 Rheometer from Anton Paar (Germany) and a parallel

plate model. The viscosity of POx resin was determined by oscillatory measurements over time at 30 s⁻¹ shear rate at 25 °C.

UV-box crosslinking

Molded cylinders of MA2POx75 stereolithography resin were photo-crosslinked using UV crosslinker Biolink chamber (Thermo Fisher, France) for 10 min at room temperature at 2-3 mW/cm² using 365 nm wavelength at 10 cm from the surface of the specimens.

Mechanical testing

Compression tests of hydrogels were realized on an Instron 3366L5885 mechanical tester. Cylindrical samples of 10 × 5 mm were prepared by 3D printer and poured onto the water for 2 days before the test. The compression stress was operated at a rate of 5 mm.s⁻¹. The compression strain was expressed as a percentage of the original length. Each point represented the mean ± SD (n = 3).

Scanning Electronic Microscopy (SEM)

The hydrogels were freeze-dried and sputter-coated with gold before being taken photographed using a scanning electronic microscope (SEM) (Phenom-world ProX) with an accelerating voltage of 10 kV.

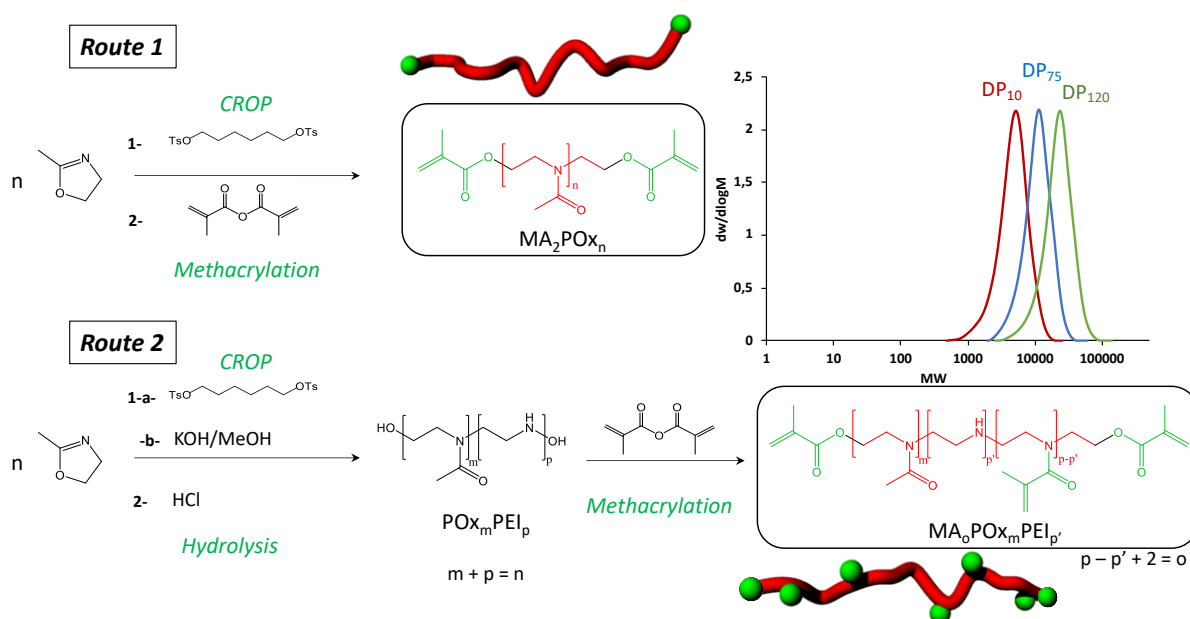
Swelling studies

The water uptake of hydrogels was calculated from the swollen mass (m_s) and the dry mass (m_d). Freshly hydrogels were weighted after irradiation to get m_i and kept in distilled water for 48 h (water renewed five times). After swollen, the hydrogels were weighed to determine m_s and vacuum-dried to deduce m_d. The equilibrium water absorption (Q) was calculated as equation 5:

$$Q [\%] = \frac{m_s - m_d}{m_d} \quad (5)$$

5.3. Results and discussion

5.3.1. Synthesis of hydrogel precursors

Figure III-11 - Synthetic routes to hydrogel precursors: MA_2POx_n and $\text{MA}_o\text{POx}_m\text{PEI}_p$

Herein, two well-defined structures of photo-sensitive POx precursors of hydrogels are considered: (i) α,ω -methacrylate POx (MA_2POx_n , route 1) and (ii) more sophisticated macromolecular architecture bearing not only terminal methacrylate groups but also supplementary pendant ones along the polymer chain, which then generated higher functionality ($\text{MA}_o\text{POx}_m\text{-PEI}_p$, route 2) (Figure III-11). In the first case, MA_2POx_n were produced in one pot strategy based on cationic ring-opening polymerization (CROP) of 2-methyl-2-oxazoline (MOx) using 1,6-hexanedithiosylate (HDOTs) initiator followed by *in situ* terminal methacrylation in presence of methacrylic acid. The initial monomer/initiator ratio provides various lengths of POx chain ranging from 1 to 10 kg/mol corresponding to a degree of polymerization average number (DP_n) of 10 and 120, respectively as summarized in Table III-2. The DP_n values were followed by ^1H NMR spectroscopy and deduced from the corresponding signals of POx ethylene (3.5 ppm) or methyl (2.0 ppm) protons related to initiator ones at 1.0 ppm. SEC analysis depicted well-defined oligomers with a single population and a dispersity of 1.2-1.3 (Figure 1 and Table III-SI-3).

The route 2 employs the same CROP initiator HDOTs with potash as terminating agent to afford α,ω -hydroxy POx (POx_n) before partially hydrolyzing *N*-acylethylene units of POx into ethylene units ($\text{POx}_m\text{-PEI}_p$) using acidic conditions (HCl) as previously described⁷¹. The ratio of hydrolysis is estimated from the ethylene signal at 2.6-2.8 ppm providing a 40% conversion of the 110 initial units giving $\text{POx}_{66}\text{-PEI}_{44}$ (Figure III-12). The next step consists in the methacrylation of the amine located along the $\text{POx}_m\text{-PEI}_p$ chain as well as the terminal hydroxy groups. In ^1H NMR spectrum, the ethylenic protons of methacrylate (5.8-6.3 ppm) were easily distinguished from methacrylamide (4.9-5.3 ppm).

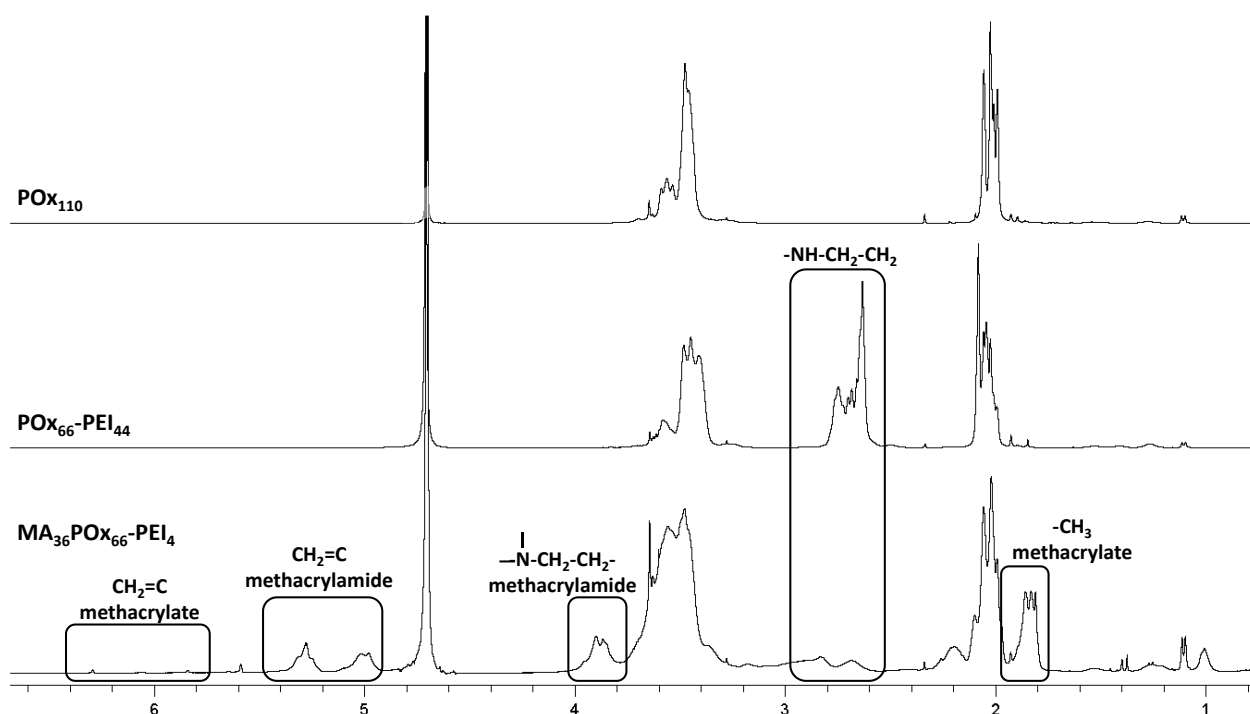


Figure III-12 - ^1H NMR spectra of PMOX_{110} , $\text{POX}_{66}\text{-PEI}_{44}$, and $\text{MA}_{36}\text{POX}_{66}\text{-PEI}_4$ (D_2O).

The methacrylate equivalent weight (MEW) parameter was calculated from the molecular weight and the functionality of the POx precursors to further discuss the mesh size of the photo-crosslinked materials (Table III-2). We noted the low MEW of $\text{MA}_{36}\text{POX}_{66}\text{-PEI}_4$ ($285 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) by contrast to MA_2POX_n ($540\text{-}5215 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) which would induce a denser network respectively.

Table III-2 - Characteristics of POx precursors

Name	$DP_{n, POx} / DP_{n, PEI} / DP_{n, MA}^a$	F^b	$M_n^{a, c}$ (g/mol)	MEW ^d (g/mol)
MA ₂ POX ₁₀	10/0/2	2	1 080	540
MA ₂ POX ₇₅	75/0/2	2	6 605	3 302
MA ₂ POX ₁₂₀	120/0/2	2	10 430	5 215
MA ₃₆ POX ₆₆ -PEI ₄	60/4/36	36	10 252	285

^a: Value calculated by ¹H NMR spectroscopy; ^b: Functionality of the oligomer POx in methacrylate units; ^c: $M_n = DP_{n, POx} \times 85 + DP_{n, PEI} \times 44 + F \times 68 + Ext$; ^d: Methacrylate-equivalent weight.

5.3.2. Additive manufacturing

All the hydrogel samples based on MA₂POX_n and MA_nPOX_mPEI_p were fabricated by stereolithography. We noted the high-water solubility of the POx precursors permitting additive manufacturing in water which can be an advantage for applications with biological substances unstable in organic solvent. In order to settle the conditions of processability, the POx resins viscosity was targeted to be lower than 1 Pa.s (Figure III-SI-23). Consequently, the POx precursors were more and less diluted in function of its chemical architecture (polymer length and methacrylate functionality) as listed in Table III-SI-4. Other machine parameters were optimized as well as the amount of photoabsorbent (Orange G) and the curing time to improve the layer-by-layer resolution.

To study the mechanical properties of the hydrogels based on MA₂POX_n and MA_nPOX_mPEI_p, cylinder shapes were fabricated by SLA and examined in compressive experiments. Indeed, the layer by layer of vat photopolymerization 3D process (each layer of 100 μm) can be a real benefit to reinforce the mechanical properties of the hydrogels. As reported in Figure III-13 from the compression test curves, the Young modulus (E) in the low strain region and the stress (σ_{max}) and the strain (ϵ_{max}) at break were deduced. As expected, E and σ_{max} decreased with the length of MA₂POX_n while ϵ_{max} increased from 22 to 48%. It must be noted the

remarkable high modulus values for hydrogels, ranging from 0.79 to 4.33 MPa, which is not traditionally obtained with conventional hydrogels (σ_f and $E \approx 10 - 100$'s kPa)⁷⁴. By contrast, hydrogels based on MA₃₆POx₆₆-PEI₄ displayed unexpected high strain with low elastic modulus. However, such chemical configurations should increase the number of crosslinking nodes which then must lead to dense and rigid material. Such behavior can be hypothetically explained by the non-participation of some methacrylate units in the network building due to their intramolecular reactions along a same chain forming bridges without reducing the network size.

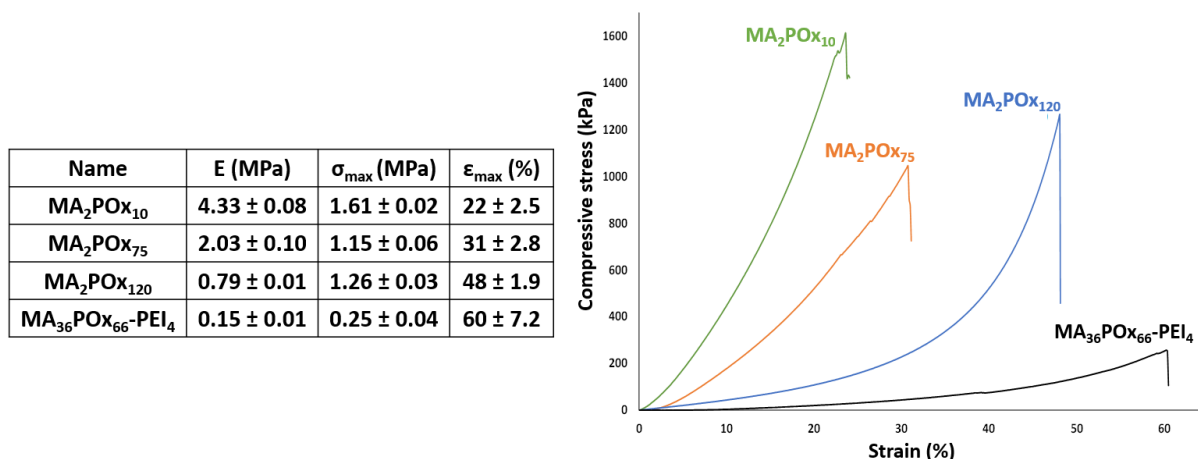


Figure III-13 - Compressive properties of POx hydrogels fabricated by stereolithography.

A monomethacrylated POx (MAPOx₁₀) (1/10 % w/w) was added to a MA₂POx₁₀ to enhance the elongation of the hydrogels. The logical decrease of the Young modulus for lower network density was observed whereas unfortunately the strain at break did not change (Table III-SI-5).

For MA₂POx_n hydrogels, the swelling rate (Q), calculated according to equation 5, was also put in opposition to the Young modulus in Figure III-14 A (the corresponding values were gathered in Table III-SI-6). A sharp increase of the swelling rate goes with the inverse trend of elastic modulus E for the growing POx chains, represented by DP_n. This behavior is typically due to the reduction of the network density when the DP_n is increasing. To illustrate the ability of swelling of POx-based resins, the logo of our institute "ICGM plate" model was fabricated by SLA with MA₂POx₁₂₀ resin (Figure III-14 B). From the picture, we can easily identify the swelling effect of hydration, keeping a high resolution.

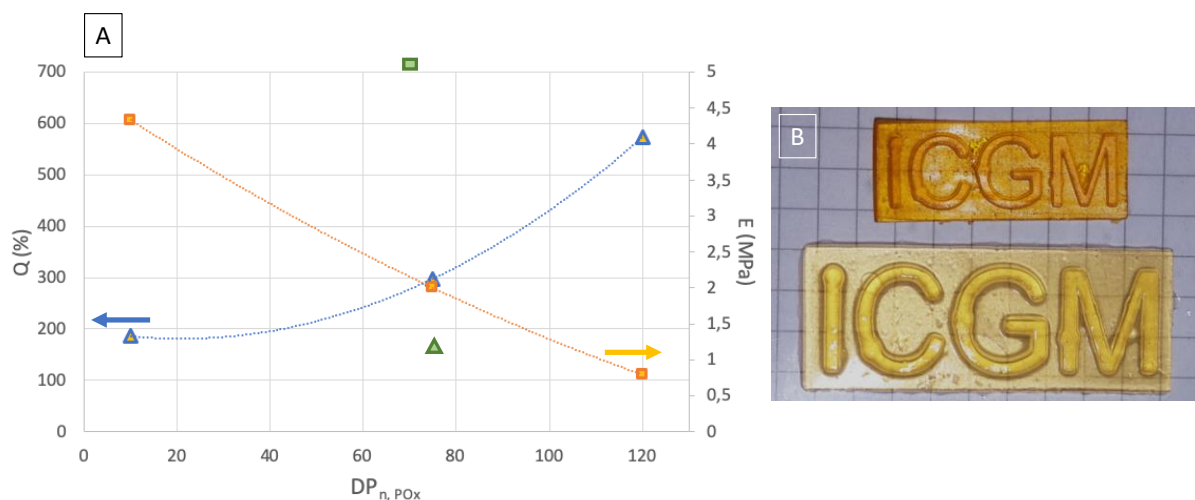


Figure III-14 - (A) Swelling ratio (triangle) and Young modulus (square) related to the length of POx chain ($MA_{36}PO_{x66}-PEI_4$ in green). (B) Illustration of the swelling of POx-based resin (MA_2PO_{x120}) with ICGM plate logo of the Institute Charles Gerhardt of Montpellier.

$MA_{36}PO_{x66}-PEI_4$ hydrogel has a peculiar behavior in comparison to a similar length of precursor MA_2PO_{x75} with a very high swelling rate and very low elastic modulus (Figure III-14 A). The most likely explanation should be the occurrence of intramolecular reactions between methacrylate of a same chain which do not participate to the network building as aforementioned in the comment of Figure III-13.

To highlight the potential to manufacture sophisticated structures by SLA with POx-based resins, the famous triumphal arch in Paris was designed and fabricated. The monument is typically constituted of two higher arches in face and two smaller aside arches supported by four pillars. Such architectural configuration is not only challenging in terms of fabrication but also for the stability of the system based on swollen hydrogel. We then succeeded to fabricate by SLA the arches with high resolution using the following resins $MA_{36}PO_{x66}-PEI_4$, MA_2PO_{x120} , MA_2PO_{x75} , and MA_2PO_{x10} (Figure III-15). All the structures were subsequently washed and swollen in water for 3 days. Finally, it was also relevant to show the promising mechanical resistance of the fabricated and swollen arches by applying a maximum mass before collapsing. As illustrated in Figure III-15, the swelling rate of the fabricated arches seems to follow the same trend that was established in Figure III-13 on the fabricated cylinders $MA_{36}PO_{x66}-PEI_4 < MA_2PO_{x120} < MA_2PO_{x75} < MA_2PO_{x10}$. In the same optic, $MA_{36}PO_{x66}-PEI_4$ which showed the highest degree of swelling displayed the lowest compressive resistance

with the lowest mass applied, while progressively higher masses were applied on the other fabricated hydrogels, to reach the highest compressive resistance for the hydrogel based on MA₂POx₁₀ which undergoes a mass of 200 g. Another main highlight on the arches is regarding the coloration of the hydrogels. To improve the resolution and the depth light penetration in the vat photopolymerization 3D process, it is widely known to use a low amount of photo-absorbing dye, orange G in our study. The dye remains chemically inert in the photopolymerization process and can therefore be removed through successive washing treatments. However, in the case of MA₂POx₇₅ and MA₂POx₁₀ the density of crosslinking is high, and the generated network is considerably dense which then induces a low evacuation of the dye. In contrast, upon 3 days of washing, the dye was totally removed for MA₃₆POx₆₆-PEI₄, MA₂POx₁₂₀ which is due to the much more open network.

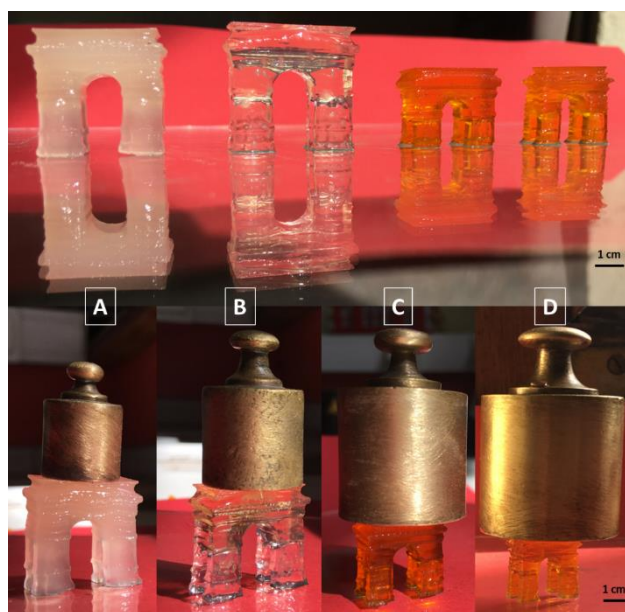


Figure III-15- Top pictures: Swelling in water of A/ MA₃₆POx₆₆-PEI₄, B/ MA₂POx₁₂₀, C/ MA₂POx₇₅, and D/ MA₂POx₁₀ samples; Bottom pictures: Samples bearing maximum weight before distorting of triumphal arch samples a) 20 g, b) 50 g, c) 100 g, d) 200 g.

Another proofs of concept to show the potential of fabrication by SLA with POx-based resin are represented in Figure III-16. To emphasize the originality of the fabricated hydrogel based on polyoxazoline, the chemical abbreviation “POx” was successfully built by SLA with a layer thickness of 100 μm (Figure III-16 A). The built hydrogel was then freeze dried to visualize in SEM. As classically observed with the hydrogels, an alveolar heterogeneous porosity was

generated. However, such behavior is interestingly limited as the layer by layer from the photo-processability is conserved which is clearly visible in Figure III-16 B.

Finally, a more sophisticated porous architecture was designed and built successfully with MA_2POx_{120} precursor resin (Figure III-16 C). The porous structure is a gyroid-type triply periodic minimal surface architecture as it has been already investigated in the literature for tissue engineering scaffold⁷⁵. Once the gyroid structure fabricated by SLA the traditional washing treatment has been also performed which then led to extensive swelling of the original structure, but the macroporous hydrogel was not collapsed. In agreement with the swelling ratio measured for MA_2POx_{120} which was measured around 570 %, the volume of the gyroid porous hydrogel increased 3.5-fold regarding the initial volume just after building. We therefore demonstrated the possibility to build by SLA a highly porous structure based on POx hydrogel, which then open the field of biomedical application especially in tissue reconstruction where the demand of performant porous hydrogel is highly requested.

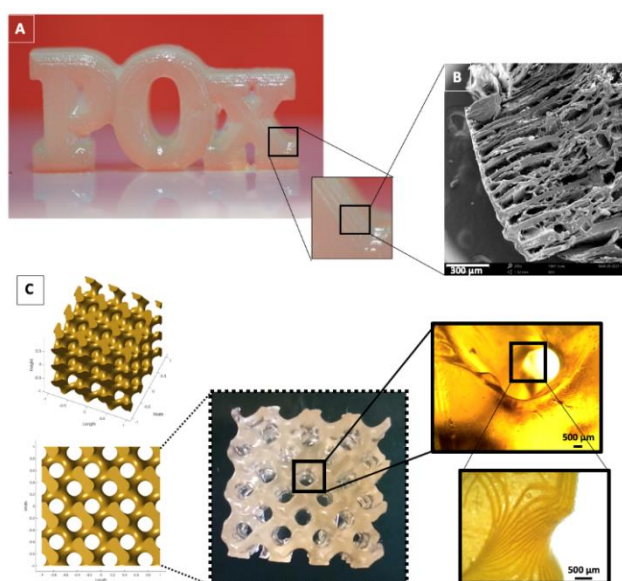


Figure III-16 - A/ Building of chemical abbreviation of polyoxazoline by SLA using MA_2POx_{120} . B/ SEM images of freeze-dried "POx" sample that revealed the layer-by-layer building by SLA. C/ From left to right, Gyroid-type geometry designed by CAD software, with the resulted building by SLA using MA_2POx_{120} , and optic microscopic visualization of the built structure.

5.4. Conclusion

To investigate sophisticated hydrogel 3D objects, well-defined poly(2-methyl-2-oxazoline)s were synthesized with controlled molecular weight and sharp dispersity with various number of photo-sensitive units per polymer chain. The versatility of POx chemistry was illustrated with dimethacrylated resin precursors by terminal chain functionalization as well as multimethacrylated ones after a supplementary step of partial hydrolysis of POx into POx-PEI. From these photoactive POx resins, single component hydrogels with tunable mechanical properties were successfully elaborated by SLA. This study feeds the lack of data in the literature about mechanical properties of hydrogels based on POx. Interestingly, Young's modulus of the magnitude of megapascal was measured which is quite remarkable for POx hydrogels. These properties under compression were modulated by the length of the macro-photocrosslinker. The SLA process demonstrates a promising potential for the elaboration of stiff and strong hydrogels which can find interest in the biomedical field of tissue engineering⁶¹. The fabrication of typical 3D objects (ie. triumphal arch) as well as highly hierarchical porous scaffolds with gyroid structures highlighted a high resolution of the 3D printing layer-by-layer, as confirmed by SEM. These promising results open perspectives for polyoxazoline chemistry in the challenging field of additive manufacturing of hydrogels.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge the CARTIGEN platform (IRMB, CHU, Montpellier, France) for scanning electron microscopy facilities access, especially Dr. Matthieu Simon and Dr. Lucas Jego for their assistances.

6. Supplementary Informations

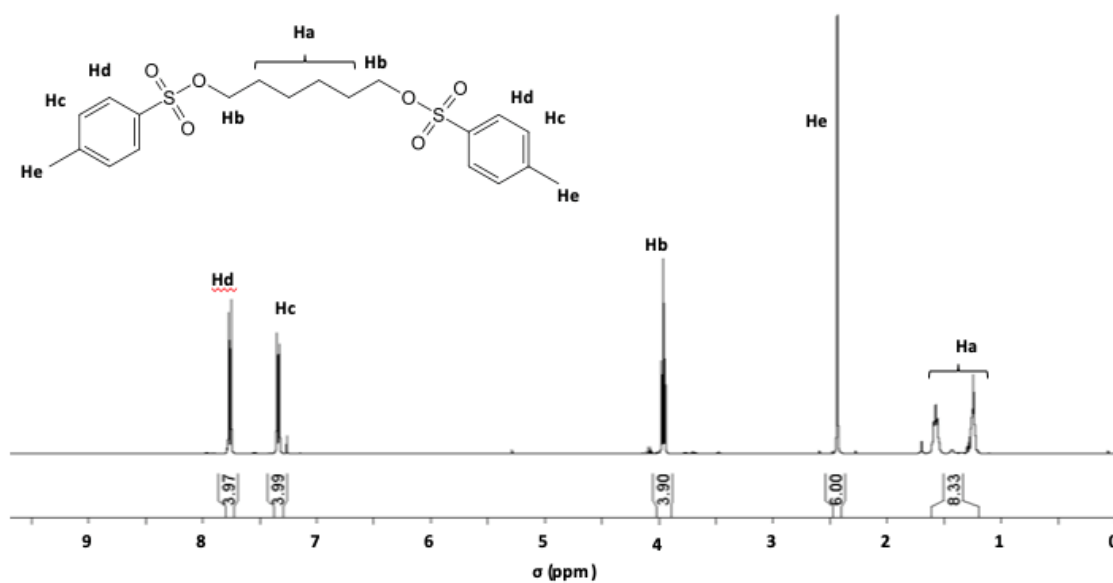


Figure III-SI-17 - ^1H NMR spectrum of HDOTs (CDCl_3)

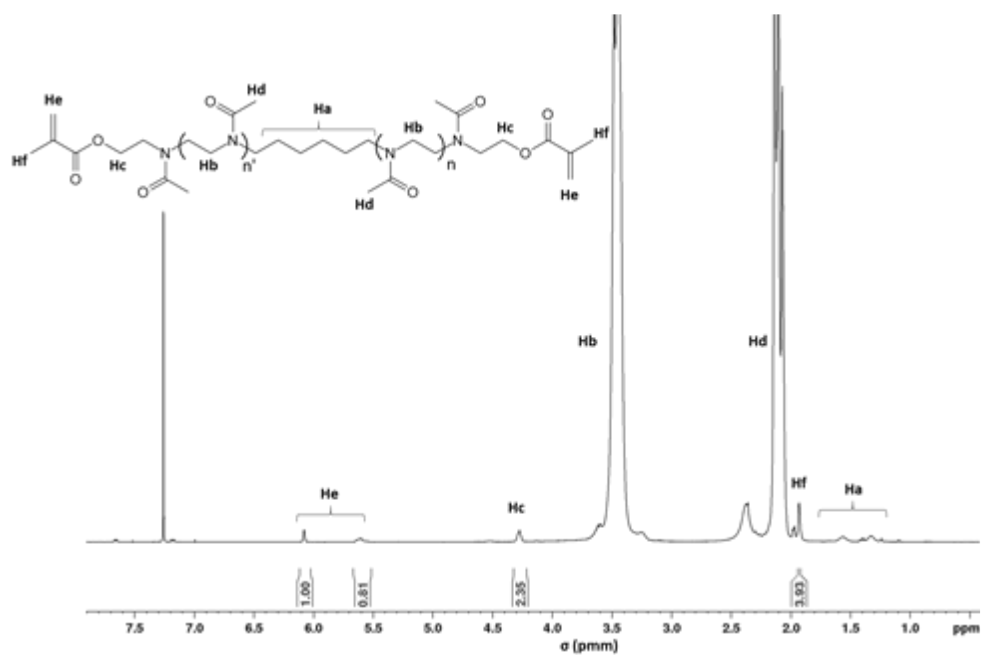


Figure III-SI-18 - ^1H NMR spectrum of bis-methacrylated poly(2-methyl-2-oxazoline) (M_2PO_x) (CDCl_3)

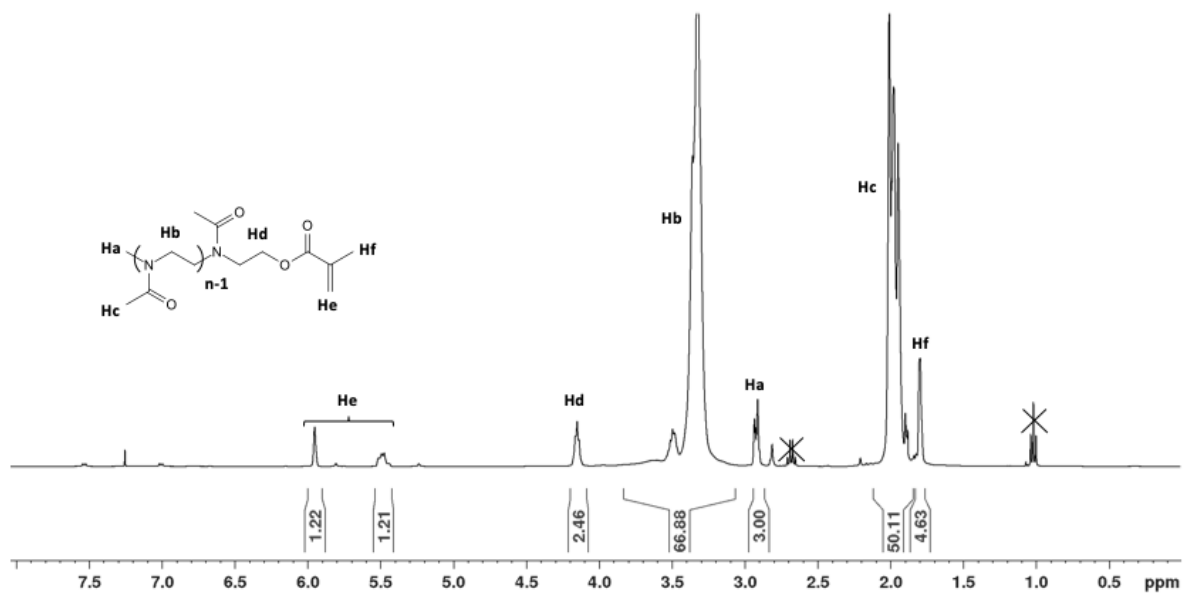


Figure III-SI-19 - ^1H NMR spectrum of MPO_x in CDCl_3

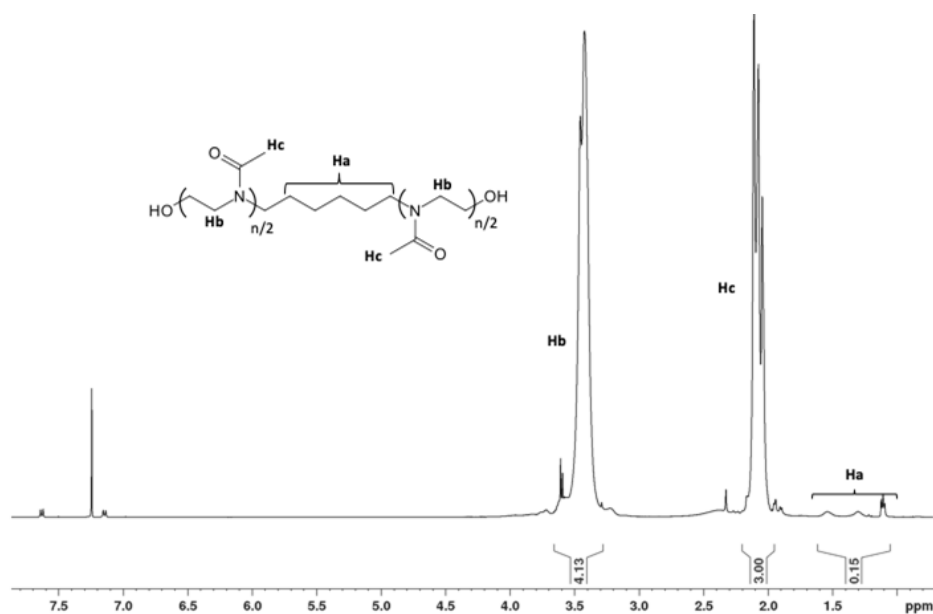


Figure III-SI-20 - ^1H NMR spectrum of poly(2-methyl-2-oxazoline) PO_x

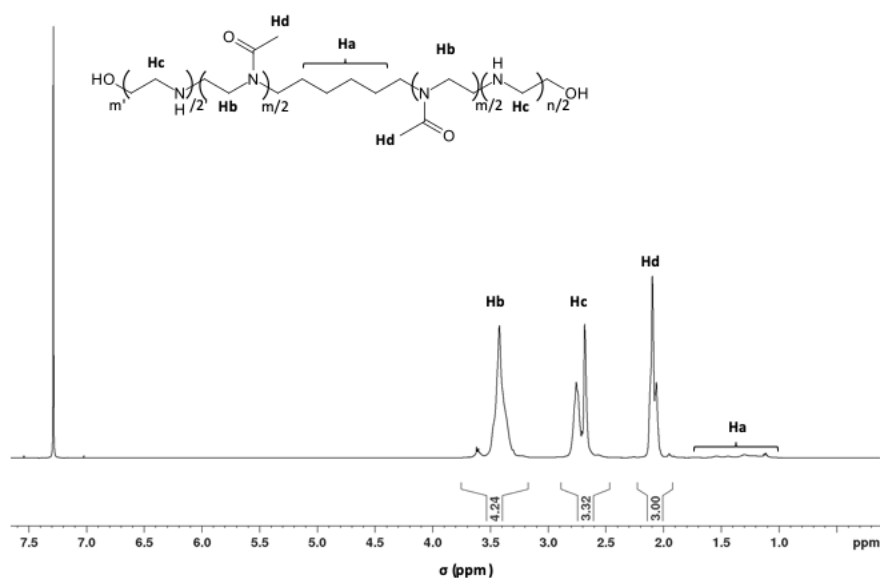


Figure III-SI-21 - ^1H NMR spectrum of $\text{POx}_m\text{-PEI}_p$ in CDCl_3

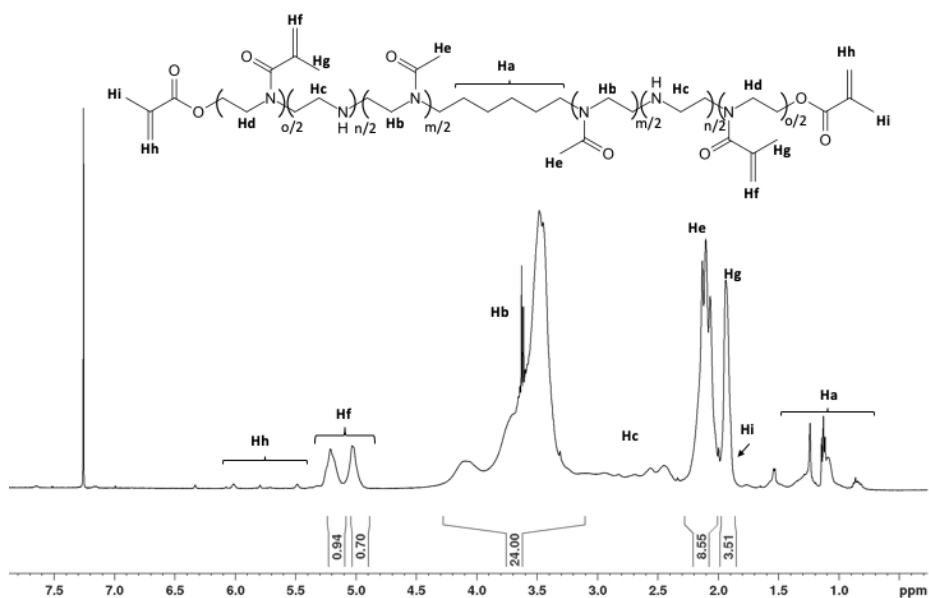


Figure III-SI-22 - ^1H NMR spectrum of $\text{MA}_o\text{POx}_m\text{-PEI}_p$ in CDCl_3

Table III-SI-3 - Molecular weight of POx precursors determined by SEC in DMAc using PMMA standards.

Name	M_n (g/mol)	\bar{D}
$\text{MA}_2\text{POx}_{10}$	4 200	1.2 ₉
$\text{MA}_2\text{POx}_{75}$	9 800	1.2 ₃
$\text{MA}_2\text{POx}_{120}$	20 000	1.2 ₆
$\text{MA}_{36}\text{POx}_{66}\text{-PEI}_4$	nd	nd

nd: Not determined.

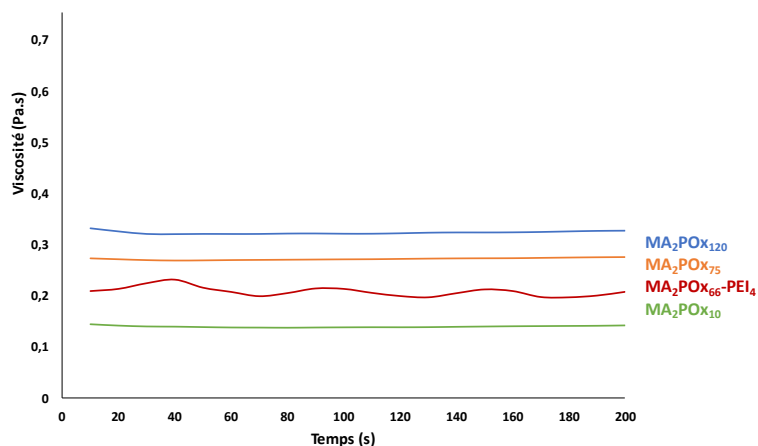


Figure III-SI-23 - Viscosity versus time for formulations of POx precursors.

Table III-SI-4 - Viscosity of the POx precursor solution for SLA.

POx precursor	wt/wt%	viscosity (Pa.s)
MA ₂ PO _{x10}	40	0.15
MA ₂ PO _{x75}	45	0.21
MA ₂ PO _{x120}	50	0.32
MA ₃₆ PO _{x66-PEI4}	60	0.27

Table III-SI-5 - Characteristics of hydrogels based on MA₂PO_{x10} / MAPO_{x10} blend.

Formulation	Q (%)	EWC (%)	E (MPa)	σ_{\max} (MPa)	ϵ_{\max} (%)
MA ₂ PO _{x10} + MAPO _{x10}	759	88	0.159	0.063	27.4

Table III-SI-6 - Behavior in water of hydrogels.

Name	Q (%)	EWC (%)
MA ₂ PO _{x10}	186	65
MA ₂ PO _{x75}	298	75
MA ₂ PO _{x120}	573	85
MA ₃₆ PO _{x66-PEI4}	655	87

7. Etude de la synthèse et de la formulation pour la stéréolithographie

7.1. Synthèse de la PMOx à partir de différents amorceurs

La stéréolithographie est une technologie qui nécessite une quantité de matière non négligeable lors du procédé de fabrication. Un bain de résine peut contenir 1L de matière. Dans cet objectif, la polymérisation doit être rapide, peu chère, la purification simple et la production en grandes quantités aisée. La synthèse de la PMOx a donc été optimisée au préalable. Dans un premier temps, trois amorceurs ont été étudiés pour la CROP, le **1,4-diiodobutane**, le **trans-1,4-dibromo-2-butène** et le **1,6-hexaneditosyle**. La réaction a été menée dans les mêmes conditions, à savoir dans de l'acétonitrile anhydre à 80 °C pendant 24 h en présence de la MOx et de l'amorceur suivie de 15 h à 40 °C en présence de KOH (5 M) pour la terminaison. La différence d'amorçage a été vérifiée par spectroscopie RMN ¹H et par chromatographie GPC. Le 1,4-diiodobutane a été rapidement éliminé puisqu'il est difficile de déterminer la taille des polymères finaux avec la superposition des protons de l'amorceur avec ceux de la PMOx. De plus, en GPC, ce type d'amorçage mène à des doubles populations. Le **trans-1,4-dibromo-2-butène** et le **1,6-hexaneditosyle** sont plus facilement identifiables en RMN ¹H après polymérisation et mènent à des dispersités voisines. Le 1,6-hexaneditosyle est un solide qui nécessite une étape de synthèse en amont à partir de l'hexanediol et le chlorure de 4-toluènesulfonyle. Ce dernier aura été préféré au **trans-1,4-dibromo-2-butène** (liquide) car sa purification est plus simple, son faible prix et sa performance d'amorçage légèrement supérieure. L'ensemble des résultats sont présentés en Figure III-24.

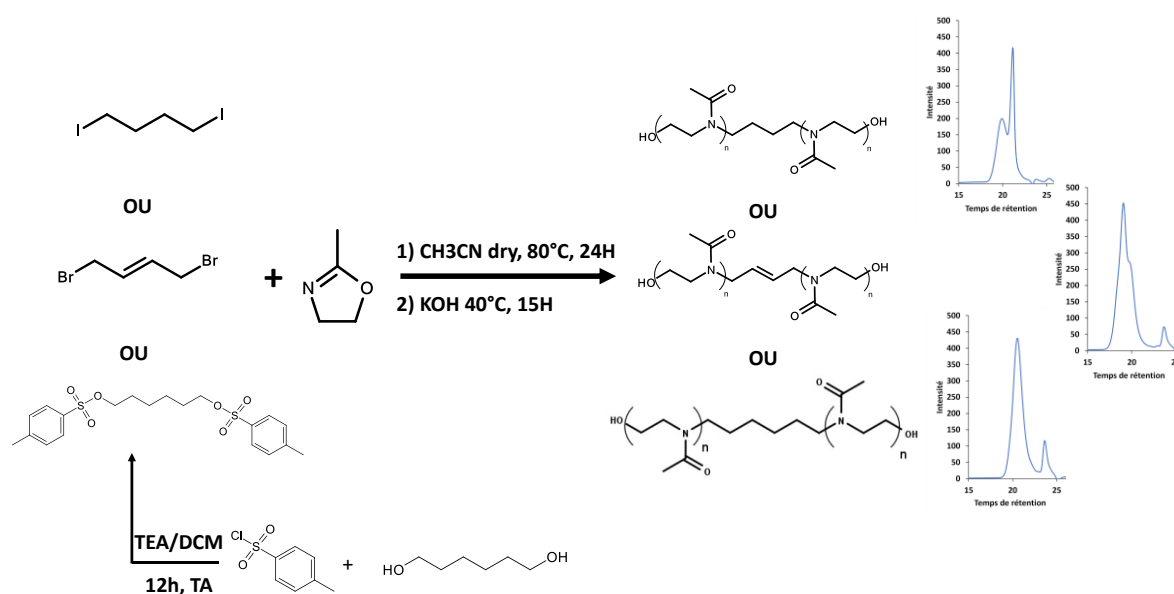


Figure III-24 – Les différents amorceurs de CROP de MOx avec leur résultat en chromatographie GPC

Par la suite, nous nous sommes intéressés à la fonctionnalisation des PMOx. Deux voies de méthacrylation des bouts de chaîne ont été étudiées comme décrit sur la Figure III-25. La **voie (A)** a été réalisée en deux étapes par terminaison des chaînes en croissance en présence de potasse. Les fonctions hydroxyle en extrémités de chaîne ont ensuite été méthacrylées avec l'anhydride méthacrylique sur 3 jours. La **voie (B)** a été effectuée en une étape par terminaison *in situ* de la CROP en présence d'acide méthacrylique qui mène directement à la fonctionnalisation voulue. La voie (B) a été sélectionnée pour cette étude car elle permet un gain de temps. Elle nécessite moins de dérivé méthacrylique et diminue la présence de sel inopportun et pour finir la fonctionnalisation s'est avérée être plus efficace lorsque les méthacrylates sont ajoutés directement pour stopper la réaction.

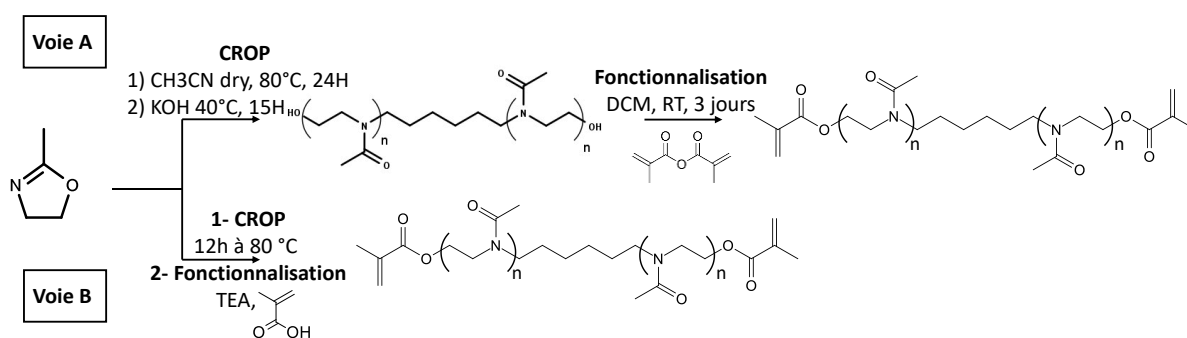


Figure III-25 – Méthacrylation de la PMOx en deux étapes (voie A) et en une étape (voie B)

7.2. Ajustement des paramètres de formulation

Le second point d'optimisation à porter sur la formulation de la résine sont les **quantités d'additifs** (photoamorceur et photoabsorbeur) ainsi que le taux de dilution de la PMOx. Ce dernier a nécessité une attention toute particulière. La PMOx étant hydrophile, l'eau a été utilisée comme solvant de formulation. Cependant, la PMOx est également un hydrogel. Cela signifie que la **quantité d'eau** présente dans la formulation a un impact sur l'objet final. La **masse molaire des PMOx** a également un impact sur la solubilité du polymère. Plus la masse molaire est élevée et plus la quantité d'eau nécessaire pour dissoudre le polymère est importante. Ceci sans oublier la nécessité d'obtenir une viscosité compatible avec la stéréolithographie. La Figure III-26 schématise les résultats. En résumé, si le **taux de dilution est trop faible** (cas de gauche), l'eau insérée n'est pas suffisante pour déployer les chaînes de polymères. Ceci mène à un réseau dense et à une rupture de l'objet construit après

gonflement. Ce phénomène est dû à la dislocation du réseau qui se brise sous les contraintes de l'absorption d'eau. A l'opposé, si le **taux de dilution est trop important** (cas de droite) le réseau est trop déplié à cause de la forte présence d'eau. Après réticulation, l'objet ne possède aucune tenue mécanique. Il nous a donc fallu trouver un compromis entre résistance mécanique et viscosité pour chaque polymère.

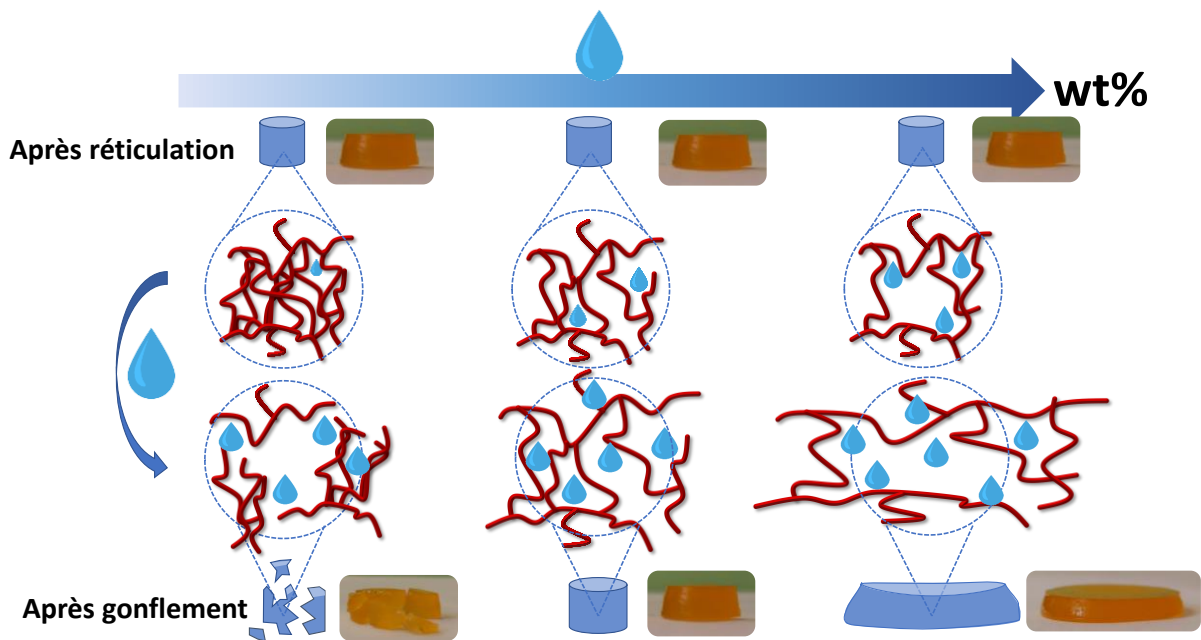


Figure III-26 - Impact de la dilution sur l'objet après gonflement

7.3. Ajustement des paramètres machine

Le dernier point de travail sur lequel nous nous sommes penchés a été le procédé de fabrication. Une recherche similaire de l'étude précédente a été réalisée sur les paramètres machines avec le **temps** et la **puissance d'irradiation** pour obtenir des objets complexes poreux de bonne résolution. Un travail a été effectué sur la tenue au plateau de construction des objets. En effet, la majorité des résines commerciales sont hydrophobes. Le plateau de construction possède un revêtement hydrophobe également afin d'assurer une bonne tenue des premières couches de construction. Dans ce travail, les matériaux utilisés sont hydrophiles. Dans un premier temps, l'**adhésion au plateau** n'a pas pu être obtenue à cause des comportements opposés de la résine et du plateau de construction. Pour outre passer cette limitation, la solution trouvée a été de faire en amont de la fabrication un sur-revêtement hydrophile. Pour cela, quelques gouttes de la résine sont déposées sur le plateau

puis lissées sur l'ensemble de la surface de manière homogène. Une réticulation de la surface a été réalisée en irradiant l'ensemble dans une boîte à UV pendant 10 min. Cette technique a permis de concevoir des objets hydrophiles avec une bonne adhésion.

8. Conclusion du chapitre

Au regard de la littérature, les hydrogels de **POx** possèdent un fort potentiel dans le domaine de la **santé**. Cependant, très **peu** d'études décrivent leur utilisation en **fabrication additive** et aucune en stéréolithographie. Dans ce chapitre, la remarquable capacité **d'absorption** d'eau des hydrogels de POx ainsi que leurs **propriétés mécaniques modulables** par la **chimie** ont été mises en évidence. Pour cela, des PMOx ont été **synthétisées** et fonctionnalisées par un groupement photosensible avec succès en **une étape**. Le choix d'un **amorçeur efficace** a permis de **contrôler** et de faire varier le degré de **polymérisation** des polymères. Le passage en **stéréolithographie** a été réalisé à la suite d'un travail sur la **formulation**. La **quantité d'eau** a dû être **ajustée** pour chaque formulation de polymère pour éviter toute fracture des objets. Ainsi, la chimie mais aussi la formulation ont eu un **impact** sur les propriétés **physiques et mécaniques** des hydrogels avec des taux de **gonflement** et de **déformation** de plus en plus importants quand la taille des POx augmente. A l'opposé, le module de **Young augmente** logiquement en **diminuant** la **masse molaire**. Les propriétés mécaniques obtenues, de l'ordre du MPa, dépassent celles des hydrogels rapportés dans la littérature qui sont de l'ordre du kPa. Une série d'objets complexes a été réalisée avec une bonne résolution des motifs par **stéréolithographie**.

9. Références

1. Dargaville, T. R., Park, J. R., Hoogenboom, R. Poly(2-oxazoline) Hydrogels: State-of-the-Art and Emerging Applications. *Macromol. Biosci.* **18**, 1–15 (2018).
2. Glassner, M., Vergaelen, M., Hoogenboom, R. Poly(2-oxazoline)s: A comprehensive overview of polymer structures and their physical properties. *Polym. Int.* **67**, 32–45 (2018).
3. De La Rosa, V. R. Poly(2-oxazoline)s as materials for biomedical applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **25**, 1211–1225 (2014).
4. Hoogenboom, R., Schlaad, H. Bioinspired Poly(2-oxazoline)s. *Polymers (Basel)*. **3**, 467–488 (2011).
5. Verbraeken, B., Monnery, B. D., Lava, K., Hoogenboom, R. The chemistry of poly(2-oxazoline)s. **88**, 451–469 (2017).
6. Aoi, K., Okada, M. Polymerization of oxazolines. *Prog. Polym. Sci.* **21**, 151–208 (1996).
7. Hartlieb, M., Kempe, K., Schubert, U. S. Covalently cross-linked poly(2-oxazoline) materials for biomedical applications-from hydrogels to self-assembled and templated structures. *J. Mater. Chem. B* **3**, 526–538 (2015).
8. Weber, C., Becer, R. C., Baumgaertel, A., Hoogenboom, R., Schubert, U. S. Preparation of methacrylate end-functionalized poly(2-ethyl-2-oxazoline) macromonomers. *Des. Monomers Polym.* **12**, 149–165 (2009).
9. Wloka, T., Czich, S., Kleinsteuber, M., Moek, E., Weber, C., Gottschaldt, M., Liefeth, K., Schubert, U. S. Microfabrication of 3D-hydrogels via two-photon polymerization of poly(2-ethyl-2-oxazoline) diacrylates. *Eur. Polym. J.* **122**, 109295 (2020).
10. Mees, M. A., Hoogenboom, R. Full and partial hydrolysis of poly(2-oxazoline)s and the subsequent post-polymerization modification of the resulting polyethylenimine (co)polymers. *Polym. Chem.* **9**, 4968–4978 (2018).
11. De La Rosa, V. R., Bauwens, E., Monnery, B. D., De Geest, B. G., Hoogenboom, R. Fast and accurate partial hydrolysis of poly(2-ethyl-2-oxazoline) into tailored linear polyethylenimine copolymers. *Polym. Chem.* **5**, 4957–4964 (2014).
12. Armstrong, J. K., Hempel, G., Kolling, S., Chan, L. S., Fisher, T., Meiselman, H. J., Garratty, G. Antibody against poly(ethylene glycol) adversely affects PEG-asparaginase therapy in acute lymphoblastic leukemia patients. *Cancer* **110**, 103–111 (2007).
13. Fisher, A. A. Immediate and delayed allergic contact reactions to polyethylene glycol. *Contact Dermatitis* **4**, 135–138 (1978).
14. Irizarry Rovira, A. R., Bennet, B. M., Bolon, B., Braendli-Baiocco, A., Chandra, S., Fleurance, R., Garman, R., Hutto, D., Lane, J., Romeike, A., Sargeant, A., Zimmerman, B. Scientific and Regulatory Policy Committee Points to Consider: Histopathologic Evaluation in Safety Assessment Studies for PEGylated Pharmaceutical Products. *Toxicol. Pathol.* **46**, 616–635 (2018).
15. Sedlacek, O., de la Rosa, V. R., Hoogenboom, R. Poly(2-oxazoline)-protein conjugates. *Polym. Conjug. From Pegylation Beyond.* **120**, 407–420 (2019).
16. Kelly, A. M., Wiesbrock, F. Strategies for the Synthesis of Poly (2- Oxazoline) -Based Hydrogels. *Macromol. Rapid Commun.* **33**, 1632–1647 (2012).
17. Bauer, M., Schroeder, S., Tauhardt, L., Kempe, K., Schubert, U. S., Fischer, D. In vitro hemocompatibility and cytotoxicity study of poly(2-methyl-2- oxazoline) for biomedical applications. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **51**, 1816–1821 (2013).
18. Bauer, M., Lautenschlaeger, C., Kempe, K., Tauhardt, L., Schubert, U. S., Fischer, D. Poly(2-ethyl-2-oxazoline) as Alternative for the Stealth Polymer Poly(ethylene glycol): Comparison of in vitro Cytotoxicity and Hemocompatibility. *Macromolecular Bioscience.* **12**, 986–998 (2012).
19. Viegas, T. X., Bentley, M. D., Harris, J. M., Fang, Z., Yoon, K., Dizman, B., Weimer, R., Mero, A., Pasut, G., Veronese, F. M. Polyoxazoline: Chemistry, properties, and applications in drug delivery. *Bioconjug. Chem.* **22**, 976–986 (2011).
20. Hoogenboom, R. Poly(2-oxazoline)s: A polymer class with numerous potential applications. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 7978–7994 (2009).
21. Ulbricht, J., Jordan, R., Luxenhofer, R. On the biodegradability of polyethylene glycol, polypeptoids and poly(2-oxazoline)s. *Biomaterials* **35**, 4848–4861 (2014).
22. Gaertner, F. C., Luxenhofer, R., Blechert, B., Jordan, R., Essler, M. Synthesis, biodistribution and excretion of radiolabeled poly(2-alkyl-2-oxazoline)s. *J. Control. Release* **119**, 291–300 (2007).
23. Lorson, T., Lübtow, M. M., Wegener, E., Haider, M. S., Borova, S., Nahm, D., Jordan, R., Sokolski-Papkov,

- M., Kabanov, A. V., Luxenhofer, R. Poly(2-oxazoline)s based biomaterials: A comprehensive and critical update. *Biomaterials* **178**, 204–280 (2018).
24. Chujo, Y., Sada, K., Matsumoto, K., Saegusa, T. Synthesis of an amphigel by the terpolymerization of 2-methyl-2-oxazoline, 2-alkyl-2-oxazoline, and bis-oxazoline. *Polym. Bull.* **21**, 353–356 (1989).
 25. Christova, D., Velichkova, R., Goethals, E. J. Bis-macromonomers of 2-alkyl-2-oxazolines - synthesis and polymerization. *Macromol. Rapid Commun.* **1073**, 1067–1073 (1997).
 26. Zoratto, N., Matricardi, P. *Semi-IPNs and IPN-based hydrogels*. *Polymeric Gels* (Elsevier Ltd), 91-124 (2018).
 27. In-Hwan Park, In-Su Han, Dong-Kuk Kim, T. S. A nonionic hydrogel from the telechelics by utilizing living polymerization of 2-oxazolines. *Die Angew. Makromol. Chemie* **190**, 165–176 (1991).
 28. Šrámková, P., Zahoranová, A., Kroneková, Z., Šišková, A., Kronek, J. Poly(2-oxazoline) hydrogels by photoinduced thiol-ene “click” reaction using different dithiol crosslinkers. *J. Polym. Res.* **5**, 82 (2017).
 29. Dargaville, T. R., Forster, R., Farrugia, B. L., Kempe, K., Voorhaar, L., Schubert, U. S., Hoogenboom, R. Poly (2-oxazoline) Hydrogel Monoliths via Thiol-ene Coupling. *Macromol. Rapid Commun.* **19**, 1695–1700 (2012).
 30. Dargaville, T. R., Lava, K., Verbraeken, B., Hoogenboom, R. Unexpected Switching of the Photogelation Chemistry When Cross-Linking Poly(2-oxazoline) Copolymers. *Macromolecules* **49**, 4774–4783 (2016).
 31. Korchia, L., Bouilhac, C., Aubert, A., Robin, J. J., Lapinte, V. Light-switchable nanoparticles based on amphiphilic diblock, triblock and heterograft polyoxazoline. *RSC Adv.* **7**, 42690–42698 (2017).
 32. Chujo, Y., Sada, K., Saegusa, T. Reversible Gelation of Polyoxazoline by Means of Diels-Alder Reaction. *Macromolecules* **23**, 2636–2641 (1990).
 33. Rathna, G. V. N. Gelatin hydrogels: Enhanced biocompatibility, drug release and cell viability. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19**, 2351–2358 (2008).
 34. Luef, K.P., Petit, C., Ottersböck, B., Oreski, G., Ehrenfeld, F., Grassl, B., Reynaud, S., Wiesbrock, F. UV-mediated thiol-ene click reactions for the synthesis of drug-loadable and degradable gels based on copoly(2-oxazoline)s. *Eur. Polym. J.* **88**, 701–712 (2017).
 35. Lück, S., Schubel, R., Rüb, J., Hahn, D., Mathieu, E., Zimmermann, H., Scharnweber, D., Werner, C., Pautot, S., Jordan, R. Tailored and biodegradable poly(2-oxazoline) microbeads as 3D matrices for stem cell culture in regenerative therapies. *Biomaterials* **79**, 1–14 (2016).
 36. Farrugia, B. L., Kempe, K., Schubert, U. S., Hoogenboom, R., Dargaville, T. R. Poly(2-oxazoline) hydrogels for controlled fibroblast attachment. *Biomacromolecules* **14**, 2724–2732 (2013).
 37. Czich, S., Wloka, T., Rothe, H., Rost, J., Penzold, F., Kleinstüber, M., Gottschaldt, M., Schubert, U.S., Liefelth, K. Two-Photon Polymerized Poly(2-Ethyl-2-Oxazoline) Hydrogel 3D Microstructures with Tunable Mechanical Properties for Tissue Engineering. *Molecules* **21**, 5066 (2020).
 38. Rettler, E. F. J., Kranenburg, J. M., Lambermont-Thijs, H. M. L., Hoogenboom, R., Schubert, U. S. Thermal, mechanical, and surface properties of poly(2-N-alkyl-2-oxazoline)s. *Macromol. Chem. Phys.* **211**, 2443–2448 (2010).
 39. Rettler, E. F. J., Lambermont-Thijs, H. M. L., Kranenburg, J. M., Hoogenboom, R., Unger, M. V., Siesler, H. W., Schubert, U. S. Water uptake of poly(2-N-alkyl-2-oxazoline)s: Influence of crystallinity and hydrogen-bonding on the mechanical properties. *J. Mater. Chem.* **21**, 17331–17337 (2011).
 40. Zahoranova, A., Kronekova, Z., Zahoran, M., Chorvat Jr., D., Janigova, I., Kronek, J. Poly(2-oxazoline) hydrogels crosslinked with aliphatic bis(2-oxazoline)s: Properties, cytotoxicity, and cell cultivation. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **54**, 1548–1559 (2016).
 41. Trachsel, L., Johnbosco, C., Lang, T., Benetti, E. M., Zenobi-Wong, M. Double-Network Hydrogels including Enzymatically Crosslinked Poly-(2-alkyl-2-oxazoline)s for 3D Bioprinting of Cartilage-Engineering Constructs. *Biomacromolecules* **20**, 4502–4511 (2019).
 42. Xu, X., Jerca, F. A., Van Hecke, K., Jerca, V. V., Hoogenboom, R. High compression strength single network hydrogels with pillar[5]arene junction points. *Mater. Horizons* **7**, 566–573 (2020).
 43. Trachsel, L., Zenobi-Wong, M., Benetti, E. M. The role of poly(2-alkyl-2-oxazoline)s in hydrogels and biofabrication. *Biomater. Sci.* **9**, 2874–2886 (2021).
 44. Lorson, T., Jaksch, S., Lübtow, M. M., Jüngst, T., Groll, J., Lühmann, T., Luxenhofer, R. A Thermogelling Supramolecular Hydrogel with Sponge-Like Morphology as a Cytocompatible Bioink. *Biomacromolecules* **18**, 2161–2171 (2017).
 45. Lübtow, M.M., Mrlik, M., Hahn, L., Altmann, A., Beudert, M., Lühmann, T., Luxenhofer, R. Temperature-Dependent Rheological and Viscoelastic Investigation of a Poly(2-methyl-2-oxazoline)-b-poly(2-iso-butyl-2-oxazoline)-b-poly(2-methyl-2-oxazoline)-Based Thermogelling Hydrogel. *J. Funct. Biomater.* **3**, 36

- (2019).
46. Hu, C., Haider, M. S., Hahn, L., Yang, M., Luxenhofer, R. Development of a 3D printable and highly stretchable ternary organic-inorganic nanocomposite hydrogel. *J. Mater. Chem. B* **9**, 4535–4545 (2021).
 47. Hu, C., Hahn, L., Yang, M., Altmann, A., Stahlhut, P., Groll J., Luxenhofer, R. Improving printability of a thermoresponsive hydrogel biomaterial ink by nanoclay addition. *J. Mater. Sci.* **56**, 691–705 (2021).
 48. Hahn, L., Maier, M., Stahlhut, P., Beudert, M., Flegler, V., Forster, S., Altmann, A., Töppke, F., Fischer, K., Seiffert, S., Böttcher, B., Lühmann, T., Luxenhofer, R. Inverse Thermogelation of Aqueous Triblock Copolymer Solutions into Macroporous Shear-Thinning 3D Printable Inks. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **12**, 12445–12456 (2020).
 49. Hahn, L., Karakaya, E., Zorn, T., Sochor, B., Maier, M., Stahlhut, P., Forster, S., Fischer, K., Seiffert, S., Pöppler, A. C., Detsch, R., Luxenhofer, R. An Inverse Thermogelling Bioink Based on an ABA-Type Poly(2-oxazoline) Amphiphile. *Biomacromolecules* **22**, 3017–3027 (2021).
 50. Kalaoglu-Altan, O. I., Li, Y., McMaster, R., Shaw, A., Hou, Z., Vergaelen, M., Hoogenboom, R., Dargaville, T. R., De Clerck, K. Crosslinking of electrospun and bioextruded partially hydrolyzed poly(2-ethyl-2-oxazoline) using glutaraldehyde vapour. *Eur. Polym. J.* **120**, 109218 (2019).
 51. Wałach, W., Oleszko-Torbus, N., Utrata-Wesołek, A., Bochenek, M., Kijeńska-Gawrońska, E., Górecka, Ż., Świążkowski, W., Dworak, A. Processing of (Co)poly(2-oxazoline)s by electrospinning and extrusion from melt and the postprocessing properties of the (co)polymers. *Polymers*. **2**, 295 (2020).
 52. Bronzeri, L. B., Gauche, C., Gudimard, L., Courtial, E. J., Marquette, C., Felisberti, M. I. Amphiphilic and segmented polyurethanes based on poly(ϵ -caprolactone)diol and poly(2-ethyl-2-oxazoline)diol: Synthesis, properties, and a preliminary performance study of the 3D printing. *Eur. Polym. J.* **151**, 110449 (2021).
 53. Peppas, N. A., Bures, P., Leobandung, W., Ichikawa, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **50**, 27–46 (2000).
 54. Slaughter, B. V., Khurshid, S. S., Fisher, O. Z., Khademhosseini, A., Peppas, N. A. Hydrogels in regenerative medicine. *Adv. Mater.* **21**, 3307–3329 (2009).
 55. Peng, H. T., Martineau, L., Shek, P. N. Hydrogel-elastomer composite biomaterials: 1. Preparation of interpenetrating polymer networks and in vitro characterization of swelling stability and mechanical properties. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **18**, 975–986 (2007).
 56. Van Vlierberghe, S., Dubruel, P., Schacht, E. Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules* **12**, 1387–1408 (2011).
 57. Peppas, N. A., Hilt, J. Z., Khademhosseini, A., Langer, R. Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology. *Adv. Mater.* **18**, 1345–1360 (2006).
 58. Klikovits, N., Sinaweil, L., Knaack, P., Koch, T., Stampfl, J., Gorsche, C., Liska, R. UV-Induced Cationic Ring-Opening Polymerization of 2-Oxazolines for Hot Lithography. *ACS Macro Lett.* **9**, 546–551 (2020).
 59. Drury, J. L., Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **24**, 4337–4351 (2003).
 60. Wallin, T. J., Pikul, J., Shepherd, R. F. 3D printing of soft robotic systems. *Nat. Rev. Mater.* **3**, 84–100 (2018).
 61. Chartrain, N. A., Williams, C. B., Whittington, A. R. A review on fabricating tissue scaffolds using vat photopolymerization. *Acta Biomater.* **74**, 90–111 (2018).
 62. Zhang, P., Sun, F., Liu, S., Jiang, S. Anti-PEG antibodies in the clinic: Current issues and beyond PEGylation. *J. Control. Release* **244**, 184–193 (2016).
 63. Rudmann, D. G., Alston, J. T., Hanson, J. C., Heidel, S. High Molecular Weight Polyethylene Glycol Cellular Distribution and PEG-associated Cytoplasmic Vacuolation Is Molecular Weight Dependent and Does Not Require Conjugation to Proteins. *Toxicologic Pathology*. **41**, 970-983 (2013).
 64. Viegas, T. X., Fang, Z., Yoon, K., Weimer, R., Dizman, B. *Poly(oxazolines). Engineering of Biomaterials for Drug Delivery Systems: Beyond Polyethylene Glycol* (Elsevier Ltd). 173-198 (2018).
 65. Simon, L., Marcotte, N., Devoisselle, J. M., Begu, S., Lapinte, V. Recent advances and prospects in nano drug delivery systems using lipopolyoxazolines. *Int. J. Pharm.* **585**, 119536 (2020).
 66. Knop, K., Hoogenboom, R., Fischer, D., Schubert, U. S. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: Pros and cons as well as potential alternatives. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **49**, 6288–6308 (2010).
 67. Barz, M., Luxenhofer, R., Zentel, R., Vicent, M. J. Overcoming the PEG-addiction: Well-defined alternatives to PEG, from structure-property relationships to better defined therapeutics. *Polym. Chem.* **2**, 1900–1918 (2011).
 68. Guillerm, B., Monge, S., Lapinte, V., Robin, J. J. How to modulate the chemical structure of polyoxazolines

- by appropriate functionalization. *Macromol. Rapid Commun.* **33**, 1600–1612 (2012).
69. Delaittre, G. Telechelic poly(2-oxazoline)s. *Eur. Polym. J.* **121**, 109281 (2019).
 70. Benkhaled, B. T., Montheil, T., Lapinte, V., Monge, S. Hydrosoluble phosphonic acid functionalized poly(2-ethyl-2-oxazoline) chelating polymers for the sorption of metallic cations. *J. Polym. Sci.* **58**, 2875–2886 (2020).
 71. Oudin, A., Chauvin, J., Gibot, L., Rols, M. P., Balor, S., Goudounèche, D., Payré, B., Lonetti, B., Vicendo, P., Mingotaud, A. F., Lapinte, V. Amphiphilic polymers based on polyoxazoline as relevant nanovectors for photodynamic therapy. *J. Mater. Chem. B* **7**, 4973–4982 (2019).
 72. Korchia, L., Bouilhac, C., Lapinte, V., Travelet, C., Borsali, R., Robin, J. J. Photodimerization as an alternative to photocrosslinking of nanoparticles: Proof of concept with amphiphilic linear polyoxazoline bearing coumarin unit. *Polym. Chem.* **6**, 6029–6039 (2015).
 73. Lübtow, M. M., Lorson, T., Finger, T., Gröber-Becker, F. K., Luxenhofer, R. Combining Ultra-High Drug-Loaded Micelles and Injectable Hydrogel Drug Depots for Prolonged Drug Release. *Macromol. Chem. Phys.* **221**, (2020).
 74. Means, A. K., Grunlan, M. A. Modern Strategies To Achieve Tissue-Mimetic, Mechanically Robust Hydrogels. *ACS Macro Lett.* **8**, 705-713 (2019).
 75. Blanquer, S. B. G., Werner, M., Hannula, M., Sharifi, S., Lajoine, G. P. R., Eglin, D., Hyttinen, J., Poot, A. A., Grijpma, D. W. Surface curvature in triply-periodic minimal surface architectures as a distinct design parameter in preparing advanced tissue engineering scaffolds. *Biofabrication* **9**, 25001 (2017).

Chapitre IV.

Hydrogels polymères thermosensibles en fabrication

4D

Chapitre IV. Hydrogels polymères thermosensibles en fabrication 4D

Introduction

Ce chapitre a pour ambition d'apporter une nouvelle dimension aux **hydrogels** de POx obtenus par **stéréolithographie** (fabrication 3D) par l'utilisation d'hydrogels POx-polyacrylamide **thermosensibles** (fabrication 4D). Ces résines à base de poly(*N*-isopropylacrylamide) (**PNIPAM**) ou de poly(2-isopropyl-2-oxazoline) (**PiPrOx**), possèdent des températures LCST voisines et susceptibles de générer après réticulation des hydrogels thermostimulables. Le comportement de ces hydrogels chimiques résulte de liaisons hydrogène et d'interactions accepteur-donneur entre des motifs acrylamide et 2-alkyl-2-oxazoline. L'objectif est ici de montrer des **différences de comportements mécaniques** ainsi que de **gonflement** à l'eau pour des résines de LCST voisines et imprimées par stéréolithographie. Une introduction bibliographique est faite sur les hydrogels thermosensibles et la **fabrication 4D** avant la présentation de notre travail.

1. Etat de l'art des polymères thermosensibles et leur utilisation en 4D

1.1. La thermosensibilité des polymères

Les **matériaux intelligents**, également qualifiés de stimulables, sont des matériaux répondants à des stimuli chimiques (pH, interactions ioniques...), physiques (température, lumière...), biologiques (interactions enzymatiques...) capables d'induire un changement de morphologie, ou encore de propriétés et ceci de manière réversible¹ (Figure IV-1).

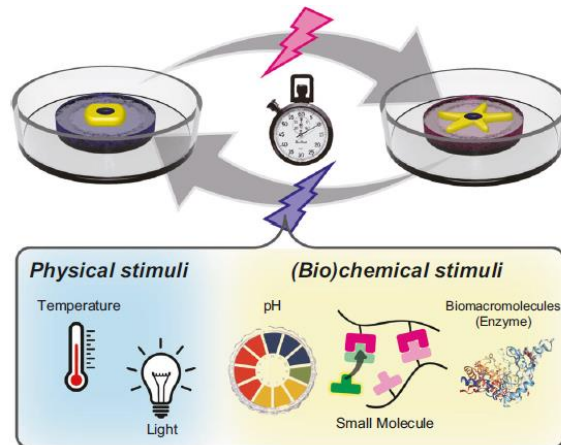


Figure IV-1 - Effet des stimuli externes sur la structure des hydrogels²

Dans le domaine des matériaux intelligents, les **hydrogels intelligents** ont suscité un grand intérêt du fait de leur capacité de déformation mécanique³ et ont permis de nombreuses applications en biochimie, en médecine, en robotique comme capteurs, matériaux auto-réparants ou encore pour de la délivrance de principes actifs⁴. L'étude de ces hydrogels connaît actuellement un essor considérable du fait de l'intérêt grandissant pour l'impression 4D, qui permet entre autres d'animer des objets en réponse à une stimulation³. Nous traiterons ici uniquement les hydrogels polymères thermosensibles conçus par stéréolithographie.

1.1.1. Généralités sur les phénomènes LCST et UCST

Les **polymères thermosensibles** sont des polymères dont la solubilité dans l'eau varie avec la température, provoquant un changement de conformation des chaînes polymères. Ce changement favorise soit les interactions polymère-solvant (polymère soluble), soit les interactions polymère-polymère (polymère insoluble). La température de transition est

appelée température de solubilité critique (T_c) ou température de trouble⁵. Dans le cas des polymères possédant une température de trouble, la valeur minimum est qualifiée de LCST (*Lower Critical Solution Temperature*) alors que celle maximum est qualifiée de UCST (*Upper Critical Solution Temperature*)⁶ (Figure IV-2). Les polymères à LCST sont des polymères insolubles à chaud et solubles à froid alors que les polymères à UCST ont des solubilités inversées. De plus, les températures LCST/UCST sont facilement ajustables en jouant sur la masse molaire du polymère, la nature des groupements terminaux ou des chaînes pendantes ainsi que l'ajout de co-monomères^{4,5}. Ici, le terme sol/gel n'est plus approprié mais plutôt contraction/expansion dans le cas des hydrogels réticulés⁷.

Dans le cas des **hydrogels thermosensibles à LCST**, le réseau est capable de s'expanser ou de se contracter dans l'eau en fonction de la température⁵. A froid, l'hydrogel est gonflé par l'hydratation des chaînes polymères constituant les mailles du réseau. En augmentant la température, l'entropie du système est telle que les interactions polymère-polymère se renforcent limitant ainsi celles polymère-eau amenant une expulsion de l'eau de l'hydrogel ayant pour conséquence une rétractation du réseau⁶.

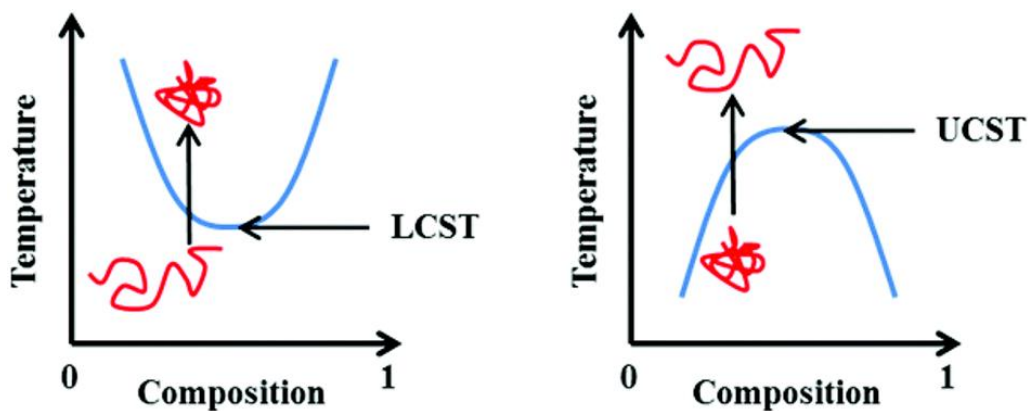


Figure IV-2 - Comportement UCST et LCST des polymères en fonction de la température

1.1.2. Les hydrogels thermosensibles à LCST

Les hydrogels à LCST sont beaucoup plus nombreux que ceux à UCST avec entre autres la famille des **acrylamides alkyl-substitués**⁸. Sa LCST varie de 10 à plus de 80 °C en fonction de l'encombrement de l'atome d'azote qui est monosubstitué ou disubstitué de façon cyclique ou acyclique⁹ (Figure IV-3). Des acrylamides ester-substitués ont également été synthétisés à partir d'acides aminés naturels^{8,10}.

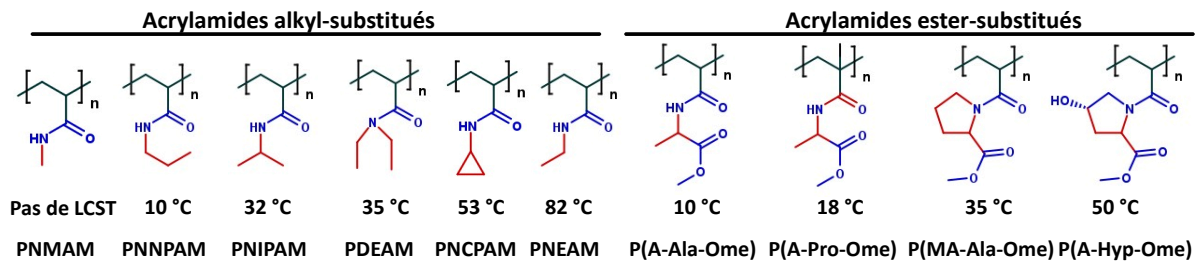


Figure IV-3 - Température LCST de poly(acrylamide)s *n*-substitués

Le **PNIPAM** est de loin le polymère à LCST de cette famille le plus utilisé avec une T_c de 32 °C proche de la température physiologique, attractive pour le domaine de la santé^{2,5,11,12}. Le PNIPAM doit être réticulé afin d'obtenir un hydrogel. L'ajout d'un réactif difonctionnel, appelé **agent réticulant**, permet la création de l'hydrogel. Les bisacrylamides sont souvent employés pour obtenir le **réseau tridimensionnel**¹³. Les hydrogels à base de PNIPAM ont fait l'objet de trois principales applications : (i) pour le relargage contrôlé de principes actifs^{7,14}, (ii) comme substrat de culture cellulaire, afin de générer facilement des feuillets cellulaires^{15,16}, ou encore (iii) comme hydrogel de comblement tissulaire à géométrie thermomodulable¹⁷. Il est possible de moduler la LCST de l'hydrogel en changeant le rapport monomère/agent réticulant. En revanche, en augmentant la quantité d'agent de réticulation, le réseau se densifie, augmente le module de Young et diminue l'absorption d'eau^{18,19}. Il est également possible de l'associer à divers comonomères⁵⁻⁷. Des copolymères ont ainsi été développés à base de méthacrylate de PEG ou d'acide acrylique ou encore de polymères biodégradables tels que les polyesters aliphatiques (ex : PCL)²⁰. Le PNIPAM a également été combiné à des polymères naturels comme la méthylcellulose, l'alginate ou l'acide hyaluronique¹². Cependant, malgré le remarquable intérêt pour le PNIPAM, une limitation importante est sa non-biodégradation et la toxicité du monomère^{5,8,12,18}.

Le **poly(éthylène glycol)** (PEG) est un réactif classique pour élaborer des hydrogels (chapitre 3). Il possède une LCST de l'ordre de 85 °C^{8,21}. Une façon de moduler cette valeur est de jouer sur la longueur de chaîne ou bien d'y incorporer le poly(propylène glycol) (PPG) en formant des copolymères triblocs appelés **poloxamères** connus sous le nom commercial de Pluronic^{®5,12}. La LCST de ces copolymères dépend grandement du rapport PPG/PEG⁶.

Le PNIPAM et le Pluronic F-127 (PEG-PPG-PEG) sont de loin les polymères thermosensibles les plus employés^{2,5,7,12}. Néanmoins, les polymères de la famille des **poly(2-R-2-oxazoline)s (POx)** sont une autre classe de polymères thermosensibles où la valeur de la LCST varie avec la nature du groupement R pendant^{22,23} (Figure IV-4).

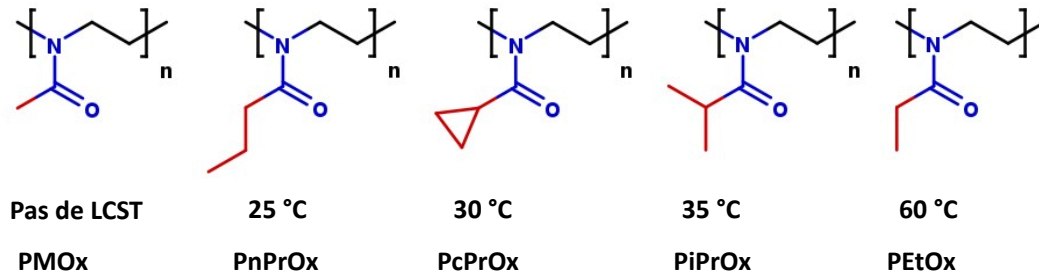


Figure IV-4 - LCST de POx possédant des groupements R alkyle variés

Hoogenboom *et al.* ont démontré que les POx ont une LCST qui diminue avec la longueur de chaîne²⁴. Par ailleurs, par le caractère vivant de la polymérisation, différents groupements fonctionnels peuvent être ajoutés en bouts de chaînes et ainsi faire varier la LCST²⁵. Néanmoins, les extrémités des chaînes influencent beaucoup moins la LCST que la nature de l'unité répétitive du polymère. Par exemple, l'ajout de fonctions acrylate hydrophobes sur une PEtOx diminue la LCST de 5 °C²⁵. Il est aussi possible de modifier la LCST des POx par copolymérisation de monomères oxazoline plus ou moins hydrophiles^{8,26}. L'étude présentée par la suite se centre sur la PiPrOx ayant une LCST d'environ 35 °C. La **PiPrOx** possède une structure chimique et une LCST analogue à celle du PNIPAM²⁷. Par contraste avec la PMOx et la PEtOx hydrosolubles qui ont beaucoup été étudiées pour l'élaboration d'hydrogels (chapitre 3), à notre connaissance, seulement deux articles réfèrent des hydrogels à base de PiPrOx. Uyama *et al.* en 1992 réalisa un hydrogel à base de PiPrOx et de PEG²⁸. Il mit en évidence la diminution de la Tc avec la diminution de PiPrOx. Il faudra attendre 2015 pour que Li *et al.* conçoive également un hydrogel à base de PiPrOx et de bisoxazoline comme agent de réticulation²⁹. L'équipe a démontré la différence de LCST entre le polymère en solution et l'hydrogel conçu à partir de ce même polymère.

Le poly(vinyl méthyl éther) et le poly(*N*-vinyl caprolactame) sont aussi deux polymères vinyliques à LCST^{6,8,11}. Cependant, le premier ne permet pas d'obtenir une gamme étendue de LCST et le second manque de stabilité avec le groupement ester. Les **phosphazènes** ont plus

récemment été étudiés mais leurs utilisations restent anecdotiques^{5,8,21}. Certains **polymères naturels** possèdent aussi des propriétés de gélification thermique comme le chitosan qui gélifie à 32 °C^{6,21}, l'élastine avec une température entre 25 et 80 °C en fonction du nombre de peptides³⁰, la méthylcellulose dans la plage de température de 60-80 °C, ou encore le xyloglucan à 27 °C et le dextran à 32 °C^{12,21,31}. L'inconvénient de ces polymères naturels est lié à une LCST beaucoup moins marquée que les polymères classiques à LCST. Pour pallier ce phénomène, ils sont souvent couplés à des polymères de synthèse¹².

1.2. La stéréolithographie 4D d'hydrogels chimiques thermosensibles

Comme précisé dans le chapitre 1, l'impression 4D nécessite l'utilisation de polymères stimulables. Nous avons focalisé notre étude sur les hydrogels à LCST réalisés à partir de polymères thermosensibles et par stéréolithographie. La chaleur est un stimulus largement étudié pour déclencher un changement de forme des hydrogels car il entraîne un changement rapide au niveau du matériau. Cette déformation provient du gonflement ou de l'expansion du réseau polymère avec la température³². Dans le cas de matériaux à mémoire de forme (température de transition vitreuse ou de fusion), la température génère une stimulation directe sur le matériau, ainsi l'objet change directement avec la température. Or, dans le cas des hydrogels à LCST, le changement de forme est dû au phénomène d'absorption d'eau et ne peut se faire qu'en milieu aqueux, avec une cinétique qui dépendra de la diffusion de l'eau dans le matériau. En d'autres termes, la température induit un changement de forme du matériau parce qu'il est dans un état gonflé. Cette double stimulation a un intérêt important car il permet de créer différents types de mouvements.

1.2.1. Principe de transformation sous stimulation

1.2.1.1. Le changement de morphologie par solvatation

La déformation des hydrogels par gonflement en stéréolithographie a été effectuée en premier lieu sur des formes simples. Ji *et al.* ont mis en avant l'impact des paramètres de fabrication sur le changement morphologique de l'hydrogel. Ceci est illustré en Figure IV-5 avec des résines de PEG diacrylées (PEGDA)³³. L'étude a montré la possibilité de **courber ou**

de tordre un objet par un gonflement contrôlé de l'hydrogel possédant des **rainures** de profondeur et/ou d'espacement modulables.

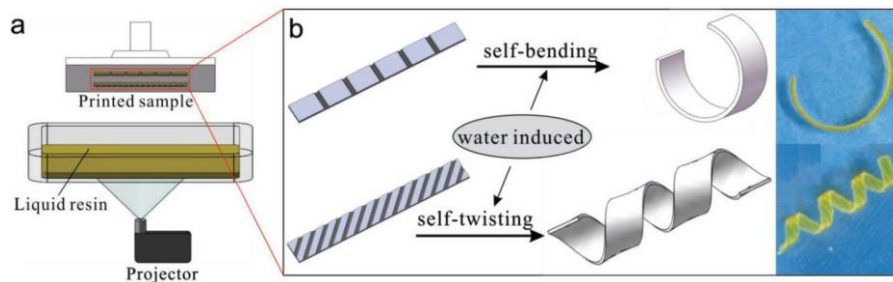


Figure IV-5 - Mécanismes de courbure (flexion ou torsion) lors du gonflement en fonction des rainures secondaires présentes sur l'objet en 3D³³

La déformation de l'objet dépend également du **temps d'irradiation UV**. En effet, le temps de réticulation induit différentes densités de réticulation et par conséquent une teneur en eau différente. Sur la Figure IV-6, les hydrogels de PEGDA ont montré une forte dépendance angulaire par rapport au temps d'irradiation. Plus le temps d'irradiation est long, plus le taux de réticulation est élevé. Ceci s'accompagne d'un taux de gonflement plus faible de même que la déformation.

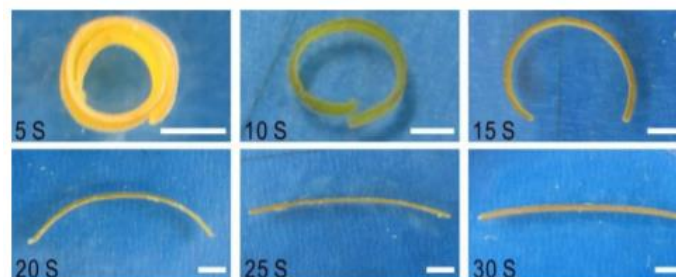


Figure IV-6 – Films hydrogels de PEG, immergés dans l'eau, imprimés avec différents temps d'irradiation³³

1.2.1.2. L'action de la température sur l'hydrogel

Ji *et al.* ont également démontré la possibilité de concevoir des **pièces fonctionnelles** telles que des pinces à partir de polymères à LCST³³. Pour cela, le PEGDA est mélangé avec un monomère thermosensible, le méthyl éther di(éthylène glycol) méthacrylate (MEO₂MA), conduisant à un hydrogel ayant une LCST de 32 °C. L'action de la pince a lieu en deux étapes (Figure IV-7). En dessous de la LCST, l'hydrogel gonfle, provoquant un écartement des

branches de la pince. L'augmentation de la température provoque une rétractation continue des branches qui piègent ainsi la balle. Sa libération se fait par refroidissement du dispositif. Le phénomène est réversible.

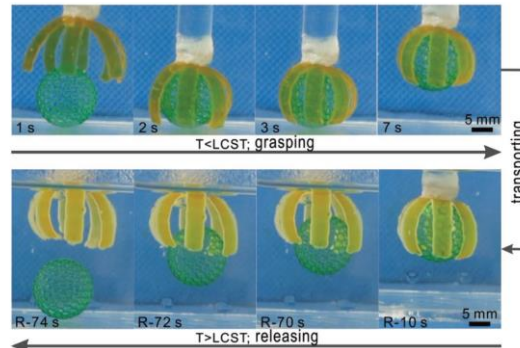


Figure IV-7 - Hydrogel thermosensible imprimé en forme de pince permettant de saisir et de libérer une balle en fonction de la température³³

1.2.2. Exemples d'applications d'hydrogel 4D de PNIPAM

Les propriétés thermosensibles du **PNIPAM** ont été utilisées pour fabriquer des objets tridimensionnels stimulables en stéréolithographie³⁴⁻³⁶. Comme illustré sur la Figure IV-8 avec une pièce d'échec, l'objet diminue de taille avec l'augmentation de la température illustrant la contraction du réseau par l'expulsion de l'eau.

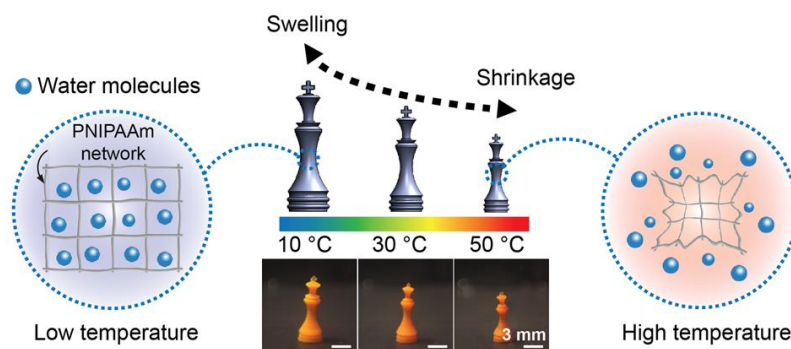


Figure IV-8 – Déformation en présence d'eau d'un hydrogel de PNIPAM élaborée en stéréolithographie³⁵

Sun *et al.* ont utilisé le **changement de transparence d'un hydrogel de PNIPAM** en fonction de la température³⁷. L'objet imprimé est capable d'être transparent en dessous de la LCST (20 °C) et opaque au-dessus de la LCST (40 °C).

Mishra *et al.* ont conçu une main robotique, présentée en Figure IV- A, capable de fonctionner en dehors de l'eau³⁶. Pour cela, des doigts poreux à base de PNIPAM (Figure IV- B partie jaune) et de polyacrylamide (PAM) (Figure IV- B partie rose) ont été fabriqués en stéréolithographie. Le passage de l'eau chaude dans les canaux des doigts fait contracter la partie PNIPAM ce qui permet d'attraper des objets (Figure IV- A1 et Figure IV- C). En parallèle, l'élévation de la température au-dessus de la T_g du PAM provoque la dilatation des pores permettant l'élimination de l'eau et le refroidissement des doigts accompagnée du relâchement de l'objet (Figure IV- A2 et Figure IV- B). Leur objectif à plus long terme est de mimer le comportement physiologique de la transpiration lors d'un effort pour diminuer la température corporelle. Avec leur étude, ils ont démontré que ce système de pores permet de refroidir nettement plus rapidement le dispositif et permet d'envisager une capacité de thermorégulation comme la transpiration.

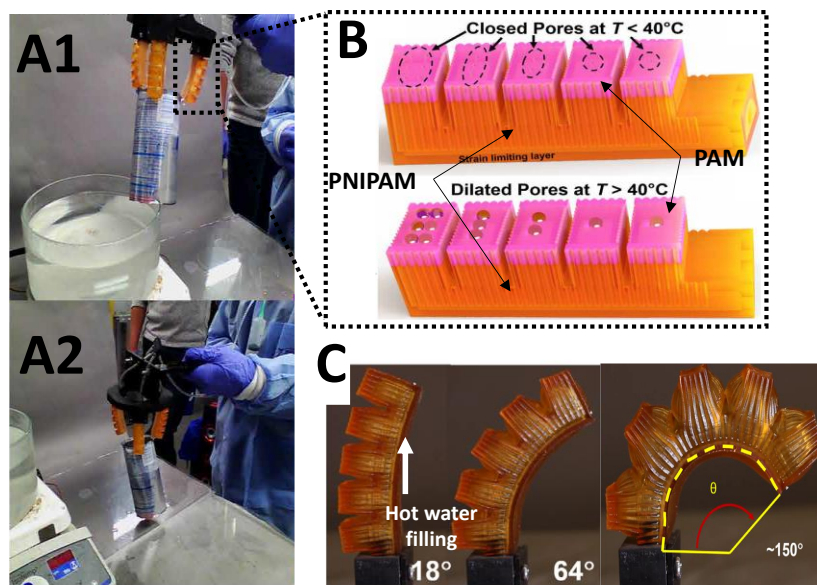


Figure IV-9 – Pinces artificielles en PNIPAM et PAM par auto-régulation par transpiration³⁶

1.2.3. Les autres polymères

D'autres polymères thermosensibles ont été utilisés pour élaborer des hydrogels thermosensibles en stéréolithographie. Dutta *et al.* ont utilisé le Pluronic F127 correspondant au (PEO)₉₉–(PPO)₆₅–(PEO)₉₉. Ils ont montré l'impact de la formulation sur la transformation de l'objet avec la température et le pH³⁸. Outre les polymères de synthèse, le chitosan a également été utilisé en fabrication 4D. Seo *et al.* ont formulé une résine à base de copolymère

PEG-chitosan permettant de réaliser une languette qui se plie et se déplie en fonction de la température grâce à la LCST du chitosan. Ils ont étudié l'impact de la température sur les propriétés mécaniques de l'objet. Il en ressort qu'en passant au-dessus de la LCST, le module de compression double tout comme la résistance et ceci sans réduire l'allongement. Cependant, l'hydrogel reste fragile avec des déformations de l'ordre de 40 %³⁹.

En conclusion, cette bibliographie a permis de définir la notion de polymères thermosensibles à LCST ainsi que leur nature chimique et de montrer leur intérêt pour élaborer des hydrogels intelligents. La différence de morphologie ou de taille des hydrogels de part et d'autre de la LCST a été discutée et expliquée par le phénomène de gonflement ou de contraction de réseau polymère entraînant la rétention ou l'expulsion de l'eau. Les principes de la fabrication 4D ont également été expliqués et présentés à travers des exemples. En conclusion et à la vue de la littérature, **les polymères de synthèse utilisés pour élaborer des hydrogels par stéréolithographie sont limités au PNIPAM et au PEG. Ceci justifie notre intérêt à étendre les hydrogels par stéréolithographie à d'autres types de polymères tels les polyoxazolines.**

2. Résultats – Hydrogels polymères thermosensibles en fabrication 4D

Les hydrogels chimiques étudiés sont constitués de motifs **polyoxazoline** (accepteur de liaisons hydrogène) et **polyacrylamide** (accepteur et donneur de liaisons hydrogène) (Figure IV-10). Ils sont composés de deux réactifs photosensibles : un agent réticulant de type diméthacrylate de POx et un monomère méthacrylate de type acrylamide sachant qu'un seul des réactifs est thermosensible à la fois. La **première résine** (PMOx-NIPAM) est constituée d'un **monomère thermosensible** NIPAM et d'un **agent réticulant** : poly(2-méthyl-2-oxazoline) diméthacrylé alors que la **deuxième résine** (PiPrOx-Acry) est constituée d'un **monomère** acrylamide (Acry) et d'un **agent réticulant thermosensible** : poly(2-isopropyl-2-oxazoline) diméthacrylé. Une motivation à l'utilisation de l'iPrOx au lieu du NIPAM est la forte toxicité du dernier. On note les différences et les similitudes entre deux formulations. Dans les deux cas, la thermosensibilité provient du groupement isopropyle. La différence est que la thermosensibilité est portée par le monomère dans le cas des formulations PMOx-NIPAM et

par l'agent réticulant dans le cas des formulations PiPrOx-Acry ce qui entraînera des conséquences sur les hydrogels.

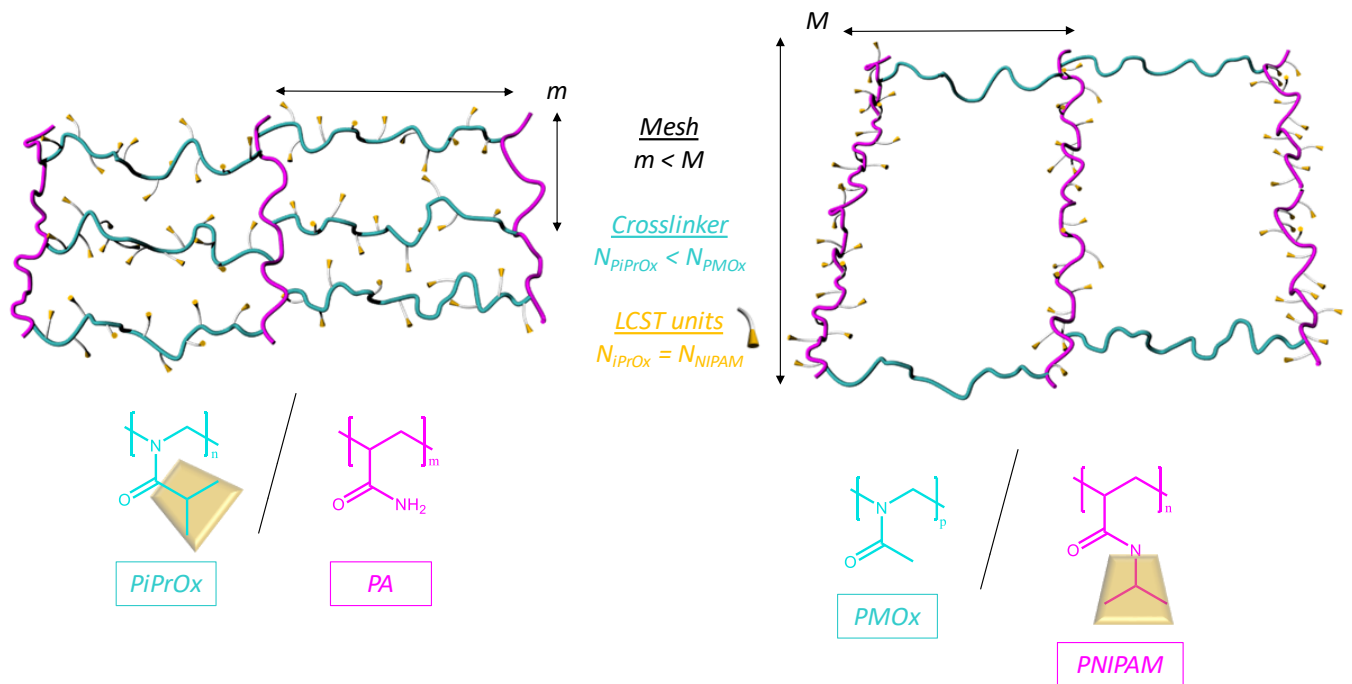


Figure IV-10 – Schématisation de la structure des hydrogels obtenus à partir des résines de PMOx-NIPAM et de PiPrOx-Acry

2.1. Caractérisation des précurseurs d'hydrogels

Ici les deux monomères acrylamides utilisés sont commerciaux alors que les deux réactifs à base de POx qui sont les agents réticulation ont dû être synthétisé selon le bilan de la Figure IV-11 A. Préalablement, un amorceur difonctionnel (HDOTs) a été synthétisé à partir du 1,6-hexanediol en Figure SI-IV-19. Celui-ci amorce la polymérisation par CROP des monomères 2-R-2-oxazoline sous conditions thermiques pour la MOx et micro-ondes pour l'iPrOx. La polymérisation est terminée *in situ* en présence d'acide méthacrylique qui permet de rendre les agents réticulants photosensibles. PiPrOx et PMOx ont été caractérisés par spectroscopie RMN ^1H (Figure IV-11). Les signaux communs à la PMOx et la PiPrOx correspondent aux protons CH_2 de la chaîne principale à 3,5 ppm et les protons éthyléniques des groupements méthacrylate à 5,5 et 6,0 ppm. Les signaux propres à chaque polymère sont les protons CH et CH_3 des groupements isopropyle des motifs PiPrOx à 2,6 et 1,0 ppm et les protons CH_3 de la PMOx à 2,0 ppm. Le détail des spectres de la PMOx et de la PiPrOx est donné en Figure SI-IV-20 et Figure SI-IV-21. A partir de ces spectres, les degrés de polymérisation moyen en nombre

(DP_n) ont pu être calculés en intégrant les protons CH_2 de la chaîne principale par rapport aux protons méthacrylate des extrémités de chaîne. Des DP_n d'environ 20 ont été obtenus pour le PiPrOx et PMOx. Les traces GPC ont permis de montrer que les oligomères sont bien définis avec une population unique de dispersité de 1,3. La RMN a validé les masses molaires de 1 700 $g \cdot mol^{-1}$ pour le PMOx et de 2 300 $g \cdot mol^{-1}$ pour la PiPrOx.

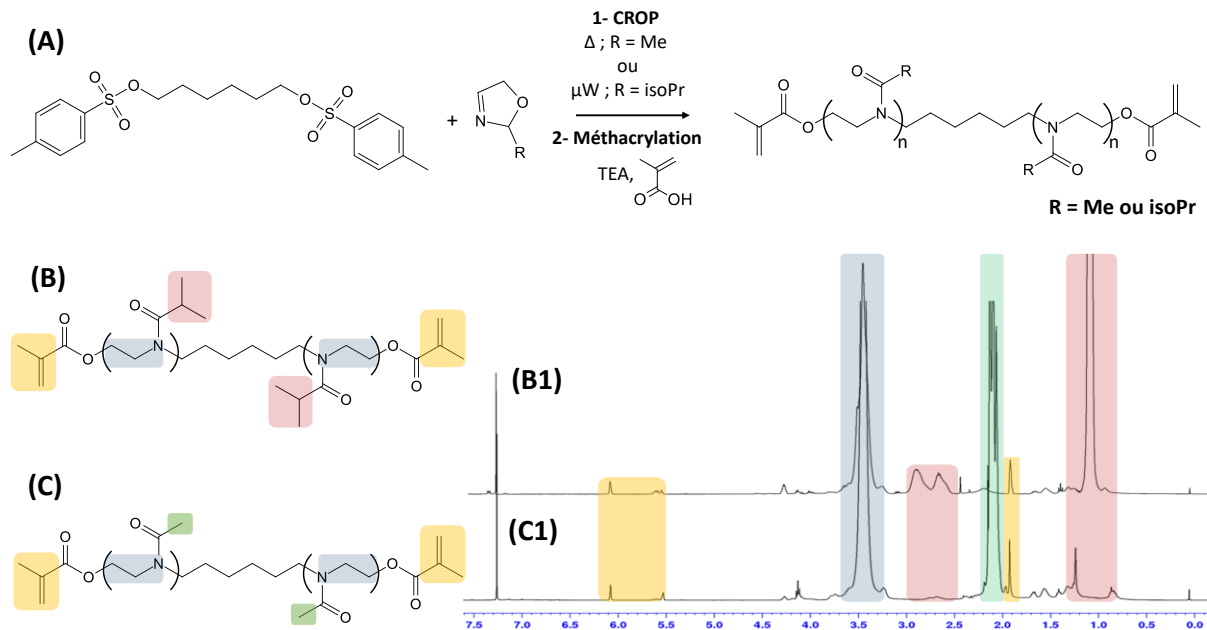


Figure IV-11 – (A) Voie de synthèse des agents réticulants à base de POx, (B) structure chimique de la PiPrOx et (C) PMOx. Superposition des spectres RMN 1H des deux réticulants PiPrOx (B1) et PMOx (C1) dans le $CDCl_3$

2.2. Formulation des résines thermosensibles

Quatre résines thermosensibles ont été développées pour la stéréolithographie par combinaison entre les agents réticulants PiPrOx et PMOx et les monomères acrylamide et NIPAM. Les différentes formulations sont similaires en termes de taille d'agent de réticulation (DP_{20}) et ont d'abord été comparées avec le **rapport molaire agent réticulant/monomère** = 1/100 (Tableau IV-1). Puis, dans le cas de PiPrOx₁-Acry₄, un rapport molaire agent réticulant/monomère = 1/4 a été testé au regard de la faible thermosensitivité de PiPrOx₁-Acry₁₀₀ où les motifs PiPrOx sont en trop faible nombre (ligne 3 Tableau IV-1).

Le dernier paramètre de la formulation est la **fraction en matière sèche (wt%)** correspondant à la fraction de réactifs par rapport à la quantité d'eau qu'il est possible de nommer également

facteur de dilution de la formulation. Celui-ci a été évalué dans le cas $\text{PMOx}_1\text{-NIPAM}_{100}$ avec deux fractions en matière sèche différentes : 33 et 50 wt% (lignes 1 et 2 Tableau IV-1). Ces taux de dilution ont été sélectionnés pour permettre une viscosité compatible avec le procédé de stéréolithographie. Des valeurs de l'ordre de $0,1 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$ ont été obtenues avec ces taux de dilution (Figure SI-IV-22). Toujours par rapport au processus de fabrication, les quantités en photoamorceur (Darocur) et photoabsorbeur (Orange G) ont été adaptées afin d'obtenir une bonne résolution dans un temps court de fabrication. Pour cela, des « courbes de travail » (*working curve*) ont été effectuées avec différentes concentrations. Cependant, comme expliqué précédemment, les paramètres de fabrication (temps d'irradiation et puissance) ont un impact sur la fabrication de l'objet. Un compromis entre résolution et temps a été obtenu avec des formulations à 3 wt% en Darocur 1173 et 0,2 wt% en Orange G par rapport au polymère. Ces quatre résines ont été utilisées en stéréolithographie pour fabriquer des hydrogels que nous avons caractérisés par la suite.

Tableau IV-1 - Description des résines photoréticulables

Hydrogels	PMOx ou PiPrOx* (mmol)	Monomère (mmol)	Ratio molaire (réticulant/monomère)	Wt%
$\text{PMOx}_1\text{-NIPAM}_{100}$	$8,85 \cdot 10^{-2}$	8,85	1:100	50
$\text{PMOx}_1\text{-NIPAM}_{100}$	$8,85 \cdot 10^{-2}$	8,85	1:100	33
$\text{PiPrOx}_1\text{-Acry}_{100}$	0,14	14	1:100	33
$\text{PiPrOx}_1\text{-Acry}_4$	0,44	1,77	1:4	33

- **PMOx** ($\text{DP}_n=20$, $M_{n \text{ RMN}}=1700 \text{ g/mol}$, $M_{w \text{ GPC}} = 5200 \text{ g/mol}$), **PiPrOx** ($\text{DP}_n=20$, $M_{n \text{ RMN}}=2260 \text{ g/mol}$, $M_{w \text{ GPC}} = 5500 \text{ g/mol}$).

2.3. Thermosensibilité des polymères à LCST et des hydrogels

Avant de nous intéresser au comportement thermosensible des hydrogels, la température LCST du PNIPAM et du PiPrOx de masses molaires comparables (2 300 g/mol) a été évaluée par spectroscopie UV (Figure IV-12). Des valeurs voisines de LCST ont été mesurées avec 31 °C pour le PNIPAM et 33 °C pour la PiPrOx (mesure en montée et descente de température). Ces valeurs sont en accord avec la littérature qui donne 32 et 35 °C, respectivement. Dans les deux cas, un trouble de la solution est visible (photos de la Figure IV-12). La comparaison de l'évolution de l'absorbance en fonction de la température en montée et descente révèle deux différences entre les deux polymères. La première différence est que le trouble de la solution de PNIPAM est rapide ($\Delta T = 5$ °C) alors que 20 °C sont nécessaires pour la solution de PiPrOx. Cela signifie que la cinétique de formation et de rupture des interactions hydrophobes entre les groupements isopropyle est plus lente dans le cas du PiPrOx. La seconde différence est que dans le cas du PiPrOx, une grande recouvrance des deux courbes existe alors qu'une différence de 3 °C est détectable pour le PNIPAM. Cette faible hystérésis pour le PiPrOx signifie que les interactions entre les groupements isopropyle se font de façon réversible et à la même vitesse. Ceci est confirmé par la superposition lors des premiers et seconds cycles.

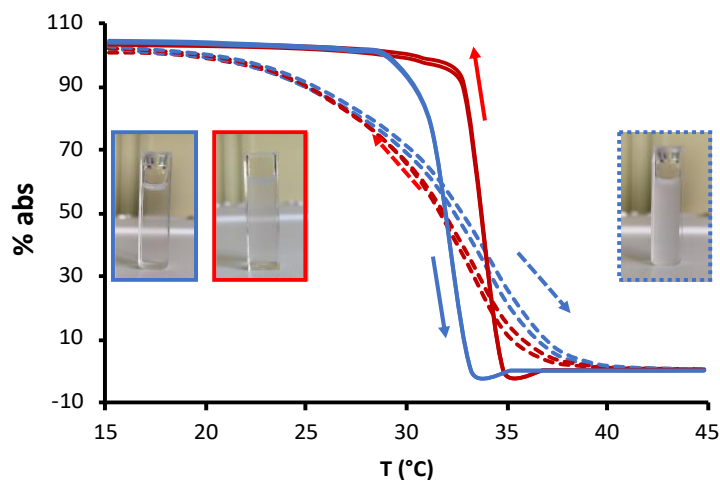


Figure IV-12 - Transmittance des solutions de PNIPAM (trait plein) et PiPrOx (trait pointillé) ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) en fonction de la température mesurée par spectroscopie UV. Deux cycles de chauffe (en bleu) refroidissement (en rouge) (rampe : 2 °C.min^{-1}).

Nous nous sommes ensuite intéressés au comportement en température des matériaux sous forme d'hydrogels après fabrication par stéréolithographie. Il est à noter que toutes les

mesures d'analyses (LCST, taux gonflement et compression) ont été faites sur des cylindres fabriqués par stéréolithographie. La température de trouble des hydrogels à base de PNIPAM ($\text{PMOx}_1\text{-NIPAM}_{100}$) et de PiPrOx ($\text{PiPrOx}_1\text{-Acry}_{100}$ et $\text{PiPrOx}_1\text{-Acry}_4$ **PiPrOx₁-Acry₁₀₀**) a été mesurée par analyse enthalpique différentielle (DSC) et non comme précédemment par spectroscopie UV en raison de l'opacité des hydrogels qui fausse les mesures de transmittance (Figure IV-13). Des pics endothermiques ont été détectés même si leur faible amplitude n'a pas permis de mesurer des enthalpies. Il faut noter que les valeurs de LCST des hydrogels, mesurées au maximum des pics, sont supérieures à celles des polymères du PNIPAM et de la PiPrOx en solution. L'hydrogel PMOx-NIPAM possède une LCST de 37 °C contre 32 °C et l'hydrogel PiPrOx-Acry 41 °C contre 35 °C. Ces différences qui sont du même ordre pour les deux polymères peuvent s'expliquer par une moins bonne diffusion des chaînes polymères une fois connectées dans un réseau qui ralentit la formation des interactions hydrophobes lors de la chauffe ou bien avec l'eau lors du refroidissement²⁹. De plus, l'ajout de fonctions hydrophiles avec la PMOx et l'acrylamide changent la balance des groupements hydrophile/hydrophobe. L'augmentation de l'hydrophilie stabilise les interactions avec l'eau et ainsi joue en défaveur de la LCST en la faisant augmenter.

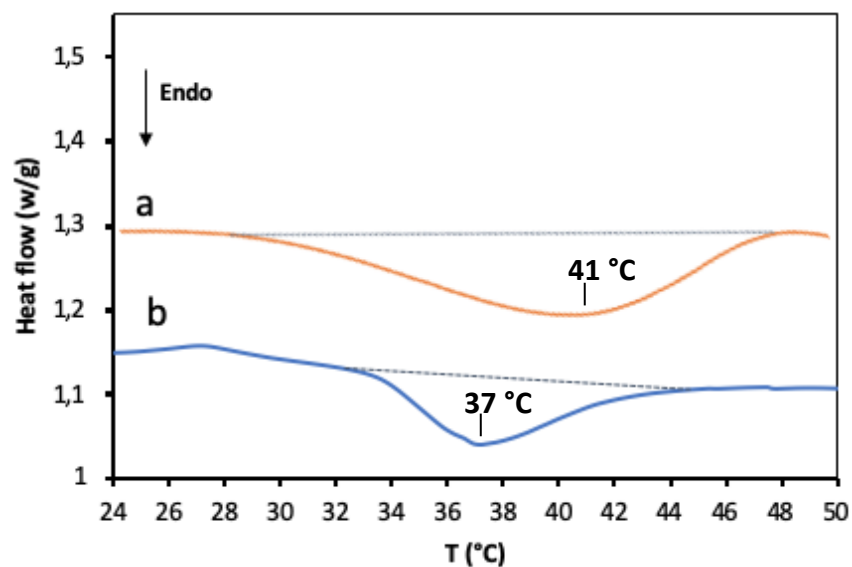


Figure IV-13 - Thermogrammes des hydrogels a) $\text{PiPrOx}_1\text{-Acry}_4$ et b) $\text{PMOx}_1\text{-NIPAM}_{100}$ évalués par DSC (rampe : $5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$).

2.4. Gonflement des hydrogels en fonction de la température

L'influence de la température a été évaluée sur les hydrogels par la mesure de la cinétique de leur gonflement à 25 °C et de dégonflement à 40 °C par méthode gravimétrique (Figure IV-14). Les mesures de prise de masse, *swelling degree* (SD), sont réalisées sur les hydrogels gonflés et à l'équilibre. A partir des mesures de SD, l'*equilibrium swelling degree* (ESD) est déduit. Il correspond à la valeur au plateau.

A 25 °C, les hydrogels PMOx₁-NIPAM₁₀₀(33 wt%) et PMOx₁-NIPAM₁₀₀ (50 wt%) ont une ESD de 820 % contre 360 % pour l'hydrogel PiPrOx₁-Acry₄ (33 wt%) alors que les cinétiques sont dans les deux cas de l'ordre de 48 h. À 40 °C, les deux natures d'hydrogels ont un ESD identique de l'ordre de 40 %. En revanche, l'hydrogel de NIPAM a une cinétique plus rapide pouvant s'expliquer par une plus grande affinité de l'eau que les unités iPrOx. Ces mesures correspondant à des prises de masse se vérifient également lors de mesures volumiques comme illustré sur la Figure IV-14 avec les photos de cylindres. Le volume observé est comparable pour les deux natures d'hydrogels après un passage à 40 °C. La comparaison des deux formulations de PiPrOx-Acry permet de montrer que dans le cas de PiPrOx₁-Acry₁₀₀ (33 wt%) le nombre de motifs thermosensibles iPrOx n'est pas suffisant pour permettre l'expression du caractère LCST de la PiPrOx (Figure IV-14D).

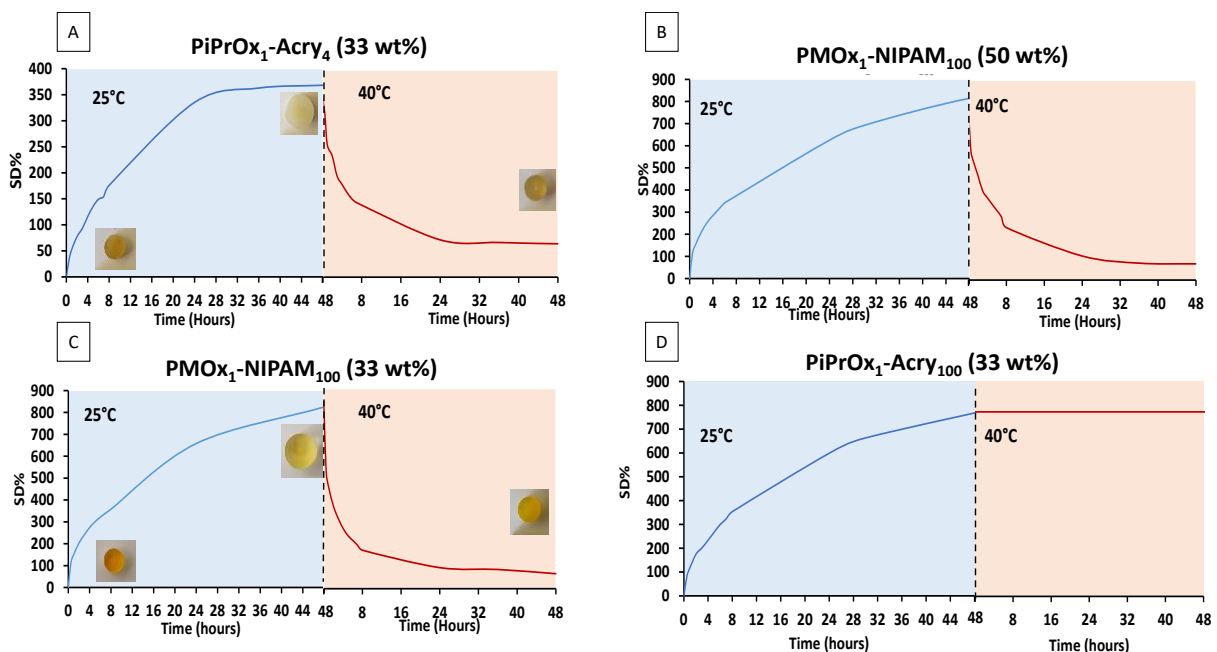


Figure IV-14 - Gonflement dans l'eau à 25 °C et dégonflement à 40 °C des hydrogels PMOx-NIPAM et PiPrOx-Acry.

Une étude du **mécanisme de diffusion de l'eau** dans les hydrogels a été réalisée à partir de la cinétique menée à 25 °C (Figure IV-14 en bleu). Ritger et Peppas⁴⁰ ont développé des équations semi-empiriques permettant de déduire les paramètres, n et le coefficient de diffusion, k. Ces grandeurs sont déduites de la courbe $\log(SDt/ESD)$ en fonction de $\log t$ (Figure IV-15) où n correspond au coefficient directeur de la droite et $\log k$ l'ordonnée à l'origine.

Selon l'étude de Korsmeyer⁴¹, les hydrogels de PMOx-PNIPAM ont un comportement Fickien ($n=0,43 < 0,45$) alors que ceux à base de PiPrOx-Acry ont un comportement non Fickien ($n=0,52$ et $0,6$) qui peut expliquer le plus faible gonflement de ces derniers au regard de la valeur de ESD. Ces résultats sont confortés par les valeurs du coefficient de diffusion qui est de l'ordre de $10,9$ pour les hydrogels PiPrOx-Acry contre $18,2$ - $18,6$ pour ceux PMOx-NIPAM. Comme attendue la meilleure diffusion de l'eau dans les hydrogels de PiPrOx-Acry correspond à l'hydrogel le plus gonflé qui est le PiPrOx₁-Acry₁₀₀ (33 wt%) avec un coefficient de diffusion de $13,5$ contre $10,9$ (Tableau IV-2).

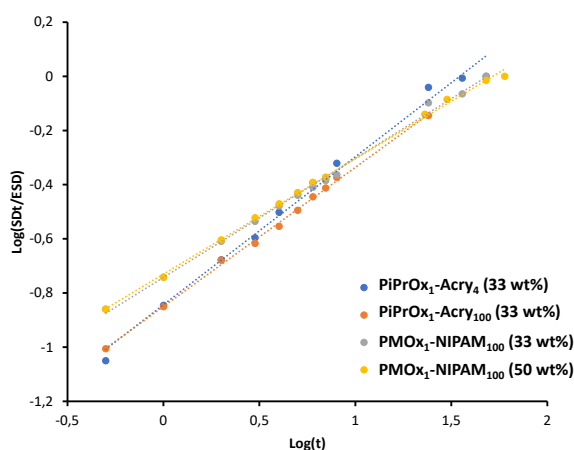


Figure IV-15 - Comportement de diffusion des hydrogels à 25 °C.

Tableau IV-2 - Paramètres à 25 °C de chaque polymère pour le calcul du coefficient de diffusion (k) de la Loi Fick/Ritger

	PiPrOx ₁ -Acry ₄ (33 wt%)	PiPrOx ₁ -Acry ₁₀₀ (33 wt%)	PMOx ₁ -NIPAM ₁₀₀ (33 wt%)	PMOx ₁ -NIPAM ₁₀₀ (50 wt%)
n	0,60	0,52	0,43	0,43
r ²	0,996	0,989	0,997	0,998
k.10 ⁻²	10,9	13,5	18,6	18,2

2.5. Comportement mécanique en compression des hydrogels

L'étude mécanique des hydrogels de PMOx-PNIPAM et PiPrOx-Acry a été réalisée en compression à 25 et 40 °C sur des cylindres réalisés par stéréolithographie à partir de laquelle ont été déduites les valeurs de module d'Young (E), la contrainte à la rupture (σ_{\max}) et l'allongement à la rupture (ε_{\max}) (Figure IV-16).

Pour tous les hydrogels, le module d'élasticité augmente quand ils passent la LCST ce qui est logique puisque la teneur en eau est plus faible et que les interactions hydrophobes se renforcent au détriment des interactions entre le polymère et l'eau. A 25 °C, il est de l'ordre de 120 et 60 kPa pour le PiPrOx₁-Acry₄(33 wt%) et le PMOx₁-NIPAM₁₀₀(33 wt%) respectivement, contre 250 et 110 kPa à 40 °C. De même, en passant la LCST, la contrainte à la rupture augmente pour les deux natures d'hydrogels. Il est à noter que la différence de contrainte à la rupture est plus importante à 40 °C pour les PMOx₁-NIPAM₁₀₀(33 wt%) (x 4,3) que pour PiPrOx₁-Acry₄(33 wt%) (x 3,2).

Par ailleurs, à même taux de dilution, 33 wt%, ε est constant en température pour les hydrogels PiPrOx₁-Acry₄(33 wt%) et PMOx₁-NIPAM₁₀₀(33 wt%) alors qu'à un taux de dilution plus important, 50 wt%, les deux types d'hydrogels ont des comportements très différents. L'hydrogel PMOx₁-NIPAM₁₀₀ 50 wt% a un allongement à la rupture beaucoup plus important au-dessus de la LCST, lié au renforcement du réseau par interactions hydrophobes. Les comportements issus des graphiques A, B et C étaient attendus. En revanche, pour le graphique D, même si l'augmentation du module et de la contrainte suit la même logique en fonction de la LCST, la déformation est supérieure de 20 % à 40 °C par rapport à 25°C. Ce comportement peut paraître contre intuitif car une densification du matériau obtenue au-dessus LCST aurait tendance à réduire ou ne pas influencer la déformation.

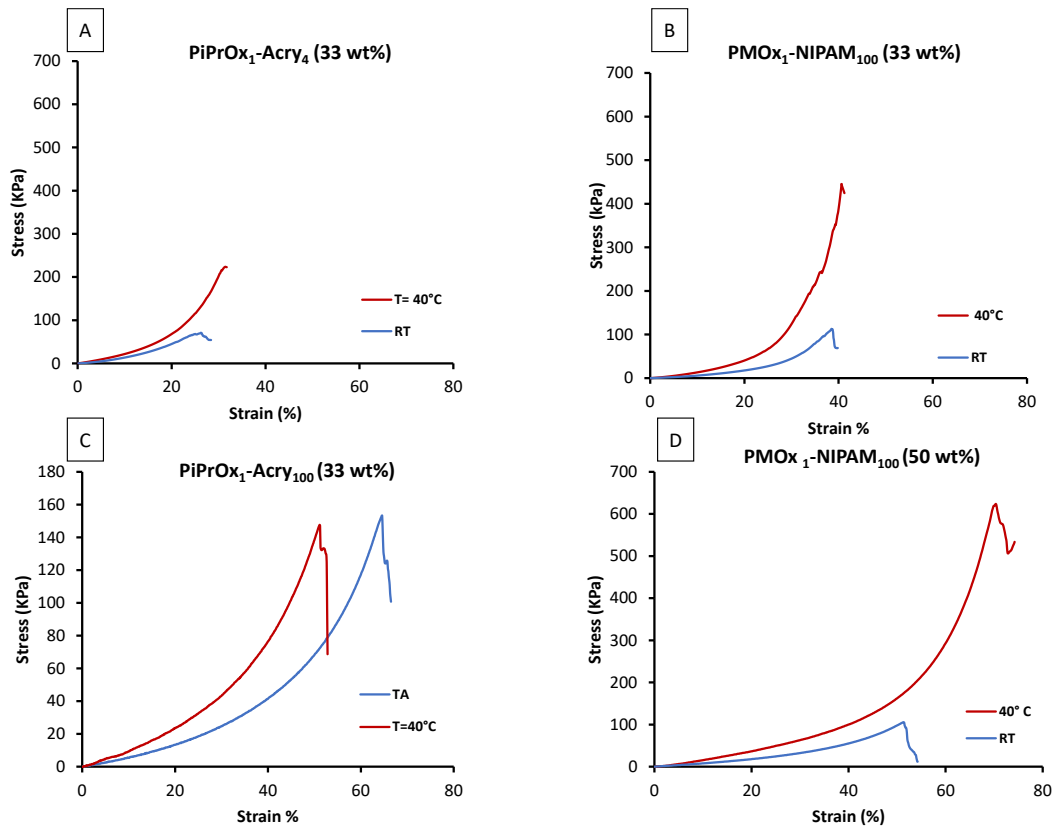


Figure IV-16 - Courbes de compression des hydrogels de PMOx-NIPAM et de PiPrOx-Acry à 25 et 40 °C.

2.6. Stéréolithographie des résines thermosensibles

Afin d'évaluer le potentiel de ces matériaux en impression 4D, nous avons fabriqué en stéréolithographie deux structures tridimensionnelles comme preuves de concept. Nous avons choisi de travailler successivement avec une résine PMOx₁-NIPAM₁₀₀(33 wt%) puis à base de PiPrOx₁-Acry₄(33 wt%).

La **première preuve de concept** est un actuateur de type « **piège à billes** » qui est une grille composée de 9 cages cubiques en PMOx₁-NIPAM₁₀₀(33 wt%) (Figure IV-17 A, B). Cette structure possède un volume cubique de 0,6 cm³, lorsque le système est placé en dessous de la LCST et 0,3 cm³ une fois placé au-dessus de la LCST. Ce phénomène de contraction volumique d'une structure tridimensionnelle permet d'illustrer cet effet sur le piégeage de billes de diamètre 3 mm (Figure IV-17 C). Ainsi, à 40 °C (T > LCST), les cages du dispositif sont plus petites que le diamètre des billes, ce qui les empêche de pénétrer dans les cages. En revanche, une fois la température redescendue à 20 °C (T < LCST), le dispositif se dilate ce qui laisse entrer progressivement les billes dans les cages. De retour à 40 °C, les billes peuvent

être piégées par rétractation volumique du dispositif qui provoque une réduction de la taille des cages qui devient inférieure au diamètre des billes.

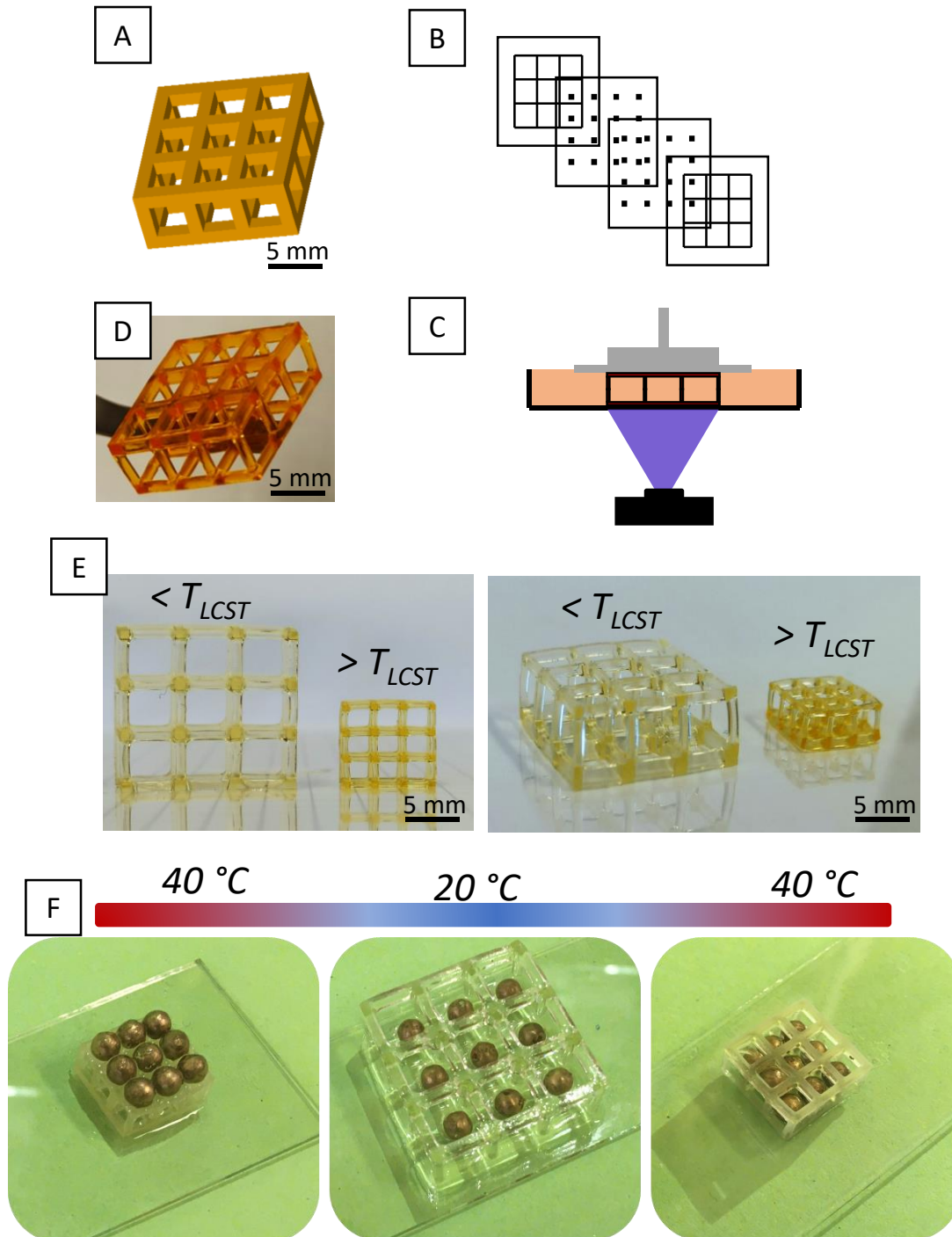


Figure IV-17 – (A) Fichier STL, (B) STL tranché sous forme d'images 2D, (C) Fabrication additive par DLP, (D) Objet 3D après impression, (E) Effet de la température sur les dimensions d'une cage en $PMOx_1-NIPAM_{100}$ (33 wt%) à 20 °C (gauche) et 40 °C (droite) et (F) Cage qui laisse entrer des billes métalliques à 20 °C, puis les piège à 40 °C.

Enfin, la **deuxième preuve de concept** est un dispositif médical utilisé en cardiologie. Il s'agit d'**endoprothèses (stents) coronaires** évitant des pontages aorto-coronaires plus invasifs. L'objectif est de développer des matériaux immunosuppresseifs et antiprolifératifs au lieu de travailler sur de l'enrobage de *stents*. Le défi est d'avoir des matériaux capables de se contracter lors de l'implantation de l'endoprothèse et de s'étirer une fois implantée. Cela est envisagé avec un polymère thermosensible PiPrOx₁-Acr₄(33 wt%).

Pour ce faire, un modèle STL a été conçu par un logiciel 3D (Rhinceros 3D) (Figure IV-18 A), qui représente un *stent* cylindrique poreux de diamètre 8 mm, avec un maillage régulier et spécifique. Comme dans l'exemple précédent, le même comportement est noté avec un gonflement maximum du dispositif au dessous de la LCT de l'hydrogel (20 °C), représenté sur le dispositif de gauche de la Figure IV-18 B. A l'inverse une élévation de la température au dessus de la LCST (40 °C) provoque une rétractation volumique du *stent* qui perd 45 % de son volume. Cette dernière preuve de concept peut laisser présumer un grand potentiel pour ces types de copolymères utilisés en impression 4D pour des applications de dispositifs biomédicaux.

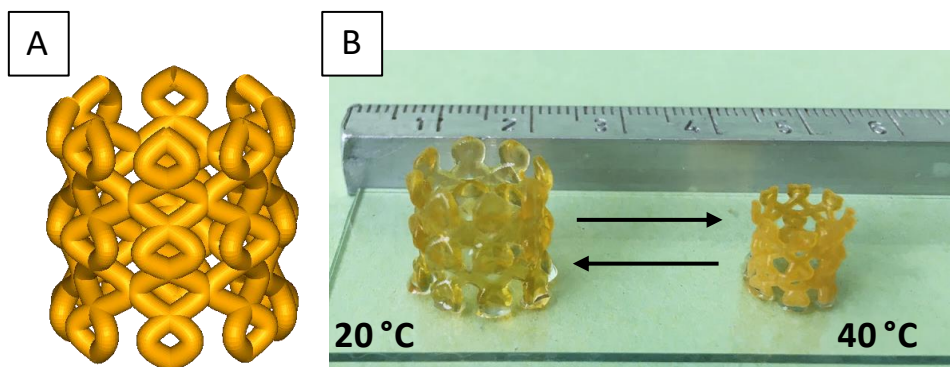


Figure IV-18 - Stents de PiPrOx₁-Acr₄(33 wt%) réalisés en stéréolithographie à 20 et 40 °C.

3. Informations complémentaires

3.1. Matériaux

2-Methyl-2-oxazoline (MOx, Sigma Aldrich, 99.0%), 2-isopropyl-2-oxazoline (iPrOx, Sigma Aldrich, 99.0%), 1,6-hexanediol (HD, Sigma Aldrich, 99.0%), acide méthacrylique (MAA, Alfa Aesar, 99.0%), triéthylamine (TEA, Sigma Aldrich, 98.0%), acétonitrile anhydre (Sigma Aldrich, 99.9%), chlorure de 4-toluènesulfonyle (TsCl, Sigma Aldrich, 99.0%), anhydride méthacrylique (Sigma Aldrich, 94%), orange G (Sigma Aldrich), *N*-isopropylacrylamide (NIPAM, Sigma Aldrich,

97.0%), acrylamide (Acry, Sigma Aldrich, 99.0%), éther diéthylique et éthylène glycol sont des produits commerciaux, utilisés sans purification supplémentaire.

3.2. Synthèse

- Synthèse du 1,6-hexaneditosylate (HDOTs)

Dans un ballon de 250 mL équipé d'un barreau d'agitation magnétique, le 1,6-hexanediol (HD) (10 g, 850 mmol, 1 éq.) et la TEA (57 mL, 4,25 mol, 5 éq.) ont été dissous dans 100 mL de chloroforme. La solution a été refroidie à 0 °C et le chlorure de 4-toluènesulfonyle (TsCl) (65 g, 3 400 mol, 4 éq.) a été ajouté portion par portion. Le mélange résultant a été agité pendant une nuit à 25 °C. Le mélange a été lavé à l'eau et 3 fois au dichlorométhane. La phase organique a été concentrée et stockée au réfrigérateur jusqu'à la cristallisation. Après recristallisation dans l'éthanol, un produit solide blanc a été isolé avec un rendement de 75 %.

HDOTs : RMN ¹H (CDCl₃), δ (ppm) : 7,7 (d, 4H, H₂), 7,3 (d, 4H, H₂), 3,9 (t, 4H, H₃), 2,5 (s, 6H, H₁), 1,6 (m, 4H, H₃) et 1,3 (m, 4H, H₃) (Figure SI-IV-19).

- Synthèse du bis-méthacrylé poly(2-méthyl-2-oxazoline) (PMOx₂₀)

Dans un ballon de 500 mL équipé d'un barreau d'agitation magnétique, le HDOT (1,1 g, 2,6 mmol) et la MOx (4,4 mL, 52 mmol) ont été dissous dans 30 mL d'acétonitrile anhydre. La solution a été vigoureusement agitée à 80 °C pendant 4 h. Le polymère résultant a ensuite été terminé par l'addition goutte-à-goutte de la TEA (1,4 mL, 10,4 mmol) et de l'acide méthacrylique (0,9 mL, 10,4 mmol). Le ballon a été maintenu à 40 °C pendant 15 h. Après refroidissement, le mélange réactionnel a été concentré puis précipité dans l'éther diéthylique et séché sous vide. Une poudre solide a été obtenue avec un rendement de 93%.

PMOx : RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 6,08 (1H, H₂), 5,61 (2H, H₂), 4,26 (2H, H₃) 3,20–3,66 (4H, H₄), 2,01-2,21 (3H, H₅), 1,91 (3H, H₁), 1,20-2,41 (8H, H₆). (Figure SI-IV-20).

- Synthèse du bis-méthacrylé poly(2-isopropyl-2-oxazoline) (PiPrOx₂₀)

Dans un vial de 20 mL équipé d'un barreau d'agitation magnétique, le HDOT (0.94 g, 2,2 mmol) et la MOx (5 g, 44 mmol) ont été dissous dans 10 mL d'acétonitrile anhydre. Le vial a été mis dans le réacteur micro-ondes pendant 17 min à 135 °C sous une puissance de 200 W. Le

polymère résultant a été transvasé dans un ballon de 100 mL. Ensuite, la polymérisation a été terminée par l'addition goutte-à-goutte de la TEA (0.8 mL, 11 mmol) et de l'acide méthacrylique (0,76 mL, 8,8 mmol). La solution a été maintenue à 40 °C pendant 15 h. Après refroidissement, le mélange réactionnel a été concentré puis précipité dans l'éther diéthylique et séché sous vide. Une poudre solide a été obtenue avec un rendement de 96%.

PiPrOx : RMN ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 6.08 (1H, H₂), 5.54 (2H, H₂), 4.22 (2H, H₃) 3.12–3.63 (4H, H₄), 2.55-2.89 (1H, H₅), 1.86 (3H, H₁), 0.96-1.12 (6H, H₆), 0.91-1.69 (8H, H₇) (Figure SI-IV-21).

3.3. Caractérisation

- Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres de RMN ^1H ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker Aspect de 400 MHz. Le CDCl_3 a été utilisé comme solvant deutéré. Les déplacements chimiques ont été donnés en parties par million (ppm). Pour la RMN ^1H , le résidu de CHCl_3 dans le CDCl_3 à 7,26 ppm a été considéré comme le pic de référence. La masse molaire des polymères a été déterminée à l'aide des équations suivantes :

$$DP_n(\text{POx}) = \frac{\int_{3.2}^{3.8} I}{\frac{8}{\int_{5.7}^{6.1} I}} \quad (1)$$

$$M_{n,\text{NMR}} = DP_n(\text{POxMA}) \times M_{\text{Ox}} + 2 * M_{\text{méthacrylate}} \quad (2)$$

où M_{Ox} et $M_{\text{méthacrylate}}$ sont les masses molaires respectivement de l'unité répétitive du monomère ($M_{\text{Ox}} = 85 \text{ g/mol}$ et $i\text{PrOx} = 113 \text{ g/mol}$) et de la chaîne terminale méthacrylate ($M_{\text{méthacrylate}} = 86 \text{ g/mol}$).

- Chromatographie phase gaz (GPC)

Les masses molaires moyennes en nombre et la dispersité des polymères ont été déterminées à l'aide d'un système de GPC (PL-GPC 50 Plus) équipé d'un passeur automatique d'échantillons (Varian modèle 410). L'appareil se compose d'un détecteur d'indice de réfraction, d'une précolonne PolarGel-M (7,5 x 50 mm) et de deux colonnes PolarGel-M (7,5 x 300 mm) thermostaté à 50 °C. La phase mobile est du *N,N*-diméthylacétamide (DMAc) (avec 0,1 % en

poids de LiCl) à un débit de 0,8 mL/min, calibrée avec des étalons de poly(méthylméthacrylate) (PMMA) allant de 550 à 2 000 000 g/mol (EasiVial-Agilent).

- UV-visible

Les analyses UV-visible ont été réalisées à l'aide d'un spectromètre UV-visible Perkin Elmer lambda 35 équipé d'un système Peltier PTP-1 + 1 dans un flacon en quartz (longueur = 1 cm). La température varie de 10 à 60 °C.

- Rhéologie

Les propriétés de viscosité ont été étudiées en effectuant des mesures de viscosité complexe sur les polymères dilués à 50 wt% dans l'éthylène glycol. Les propriétés viscoélastiques des solutions ont été mesurées à l'aide d'un rhéomètre (Physica Modular Compact MCR301, Anton Paar, Allemagne) à des fréquences allant de 0,1 à 10 Hz (0,6 à 62,8 rad·s⁻¹) à 25 °C. Des mesures de cisaillement oscillatoire ont été effectuées à l'aide d'un cône en acier de 40 mm, 2° de diamètre avec un espace de troncature de 55 µm pour mesurer la viscosité complexe (η^*) et déduire la viscosité à cisaillement nul (η_0) à 0,1 % de déformation.

- Propriétés mécaniques : compression

Les tests de compression des hydrogels ont été réalisés sur un appareil Instron 3366L5885. Des échantillons cylindriques de 10 × 5 mm ont été préparés par fabrication additive 3D et immergés dans l'eau pendant 2 jours avant le test. La compression a été réalisée à une vitesse de 5 mm·s⁻¹. La déformation de compression a été exprimée en pourcentage de la longueur initiale. Chaque point représente la moyenne ± standard déviation (n = 3).

- Taux de gel et taux de gonflement

L'efficacité de la photoréticulation a été calculée par la teneur en gel. Les échantillons ont d'abord été essuyés après fabrication puis pesés pour obtenir la masse initiale (m_i). Ensuite, les échantillons ont été immergés dans l'eau distillée pendant 48 h (l'eau a été renouvelée

cinq fois par jour). Après lavage, les polymères ont été séchés sous vide pour déterminer la masse sèche (m_s). La teneur en gel a été déterminée selon l'équation (3) :

$$\text{teneur en gel [\%]} = \frac{m_s}{m_i} * 100 \quad (3)$$

La cinétique d'absorption d'eau des hydrogels a été calculée à partir de la masse gonflée (m_g) et de la masse sèche (m_s). Les hydrogels ont été immergés dans l'eau distillée à température ambiante ou 40 °C. Les hydrogels ont été pesés toutes les heures de 1 à 8 h puis après 15, 24 et 48 h pour déterminer m_g . Les hydrogels ont été séchés sous vide pour déduire m_s . L'absorption d'eau à l'équilibre a été calculée avec les masses à 48 h. La cinétique d'absorption d'eau a été calculée comme suit :

$$\text{Water Content [\%]} = \frac{m_g - m_s}{m_s} * 100 \quad (4)$$

$$\text{Swelling Degree [\%]} = \frac{m_g - m_s}{m_g} * 100 \quad (5)$$

- Calorimètre à balayage (DSC)

Les analyses DSC ont été réalisées à l'aide d'un calorimètre Mettler Toledo (Mettler Toledo, France,) DSC1 calorimètre. Un étalonnage constant a été effectué avec des standards de biphenyle, d'indium, de bismuth, de zinc et du chlorure de césium. L'azote a été utilisé comme gaz de purge. Les propriétés thermiques ont été enregistrées entre 10 et 60 °C à une vitesse de chauffe de 5 °C/min.

- Fabrication additive

Pour préparer les formulations de résine pour la stéréolithographie, les polymères ont été mélangés avec de l'éthylène glycol (33 ou 50 wt%) comme diluant non réactif. Le Darocur 1173 (3 wt% par rapport au polymère) et de l'Orange G (0,2 wt% par rapport au polymère) ont été ajoutés comme photoamorceur et agent colorant respectivement.

Des structures poreuses cubiques tridimensionnelles avec des murs de 1 mm ont été conçues en utilisant le format STL de Rhinoceros 3D. Les structures 3D ont été construites à partir des résines susmentionnées par stéréolithographie à l'aide d'un appareil de traitement numérique de la lumière (DLP) (Asiga Max X27, Australie). Les objets 3D ont été construits par

photoréticulation de couches successives de résine d'une épaisseur de 100 μm . Chaque couche a été irradiée à une intensité de 20 mW/cm^2 pendant 30 s. Après la construction, les structures ont été lavées à l'eau distillée pendant 48 h.

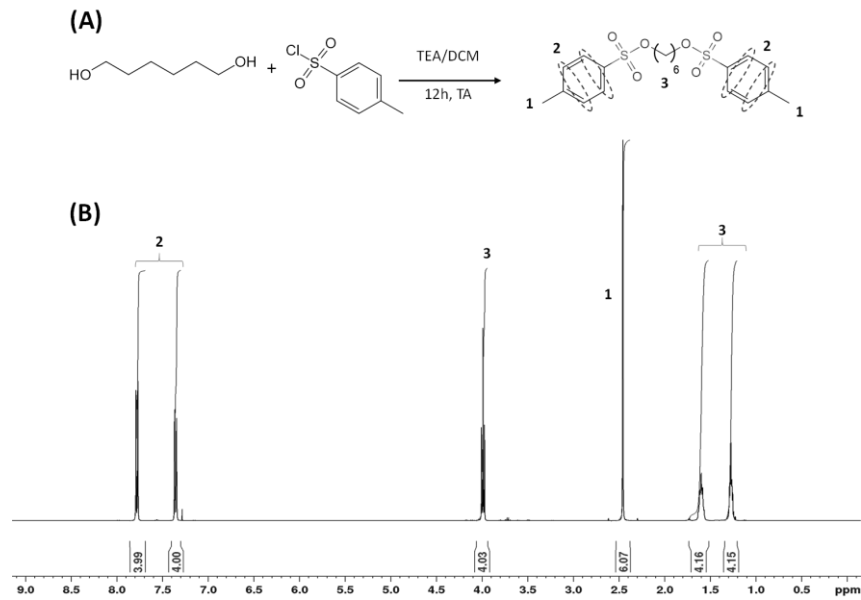


Figure SI-IV-19 – (A) voie de synthèse et (B) RMN ^1H (CDCl_3) de HDOTs

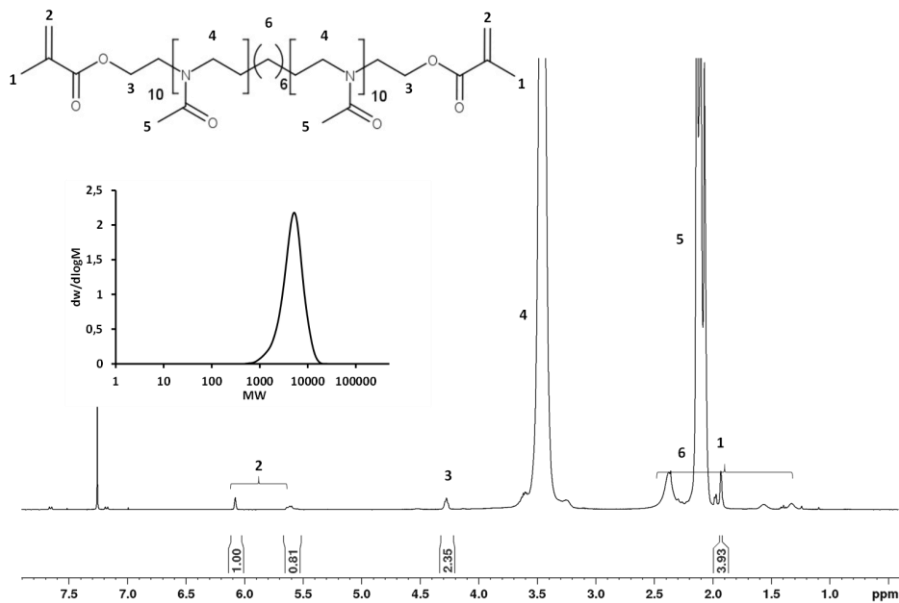


Figure SI-IV-20 - RMN ^1H (CDCl_3) et GPC (DMAc) de PMOx

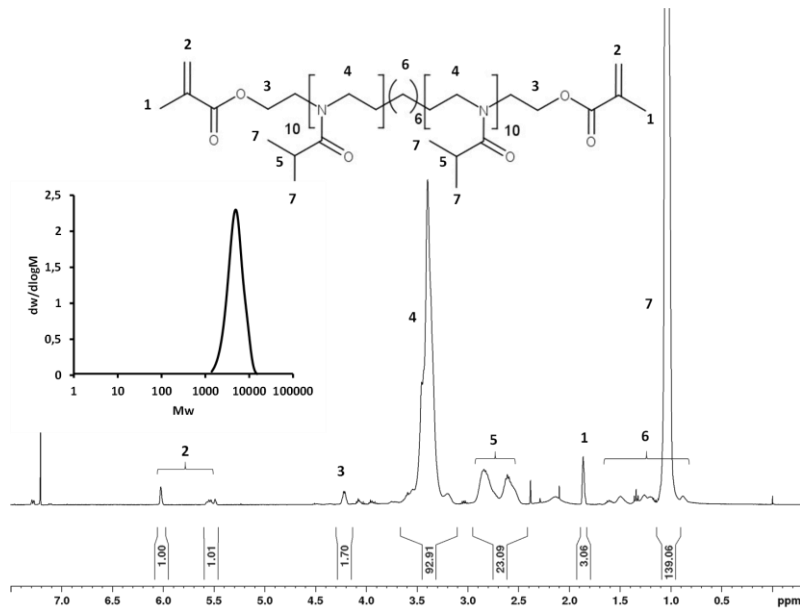


Figure SI-IV-21 - RMN ^1H (CDCl_3) et GPC (DMAc) de PiPrOx

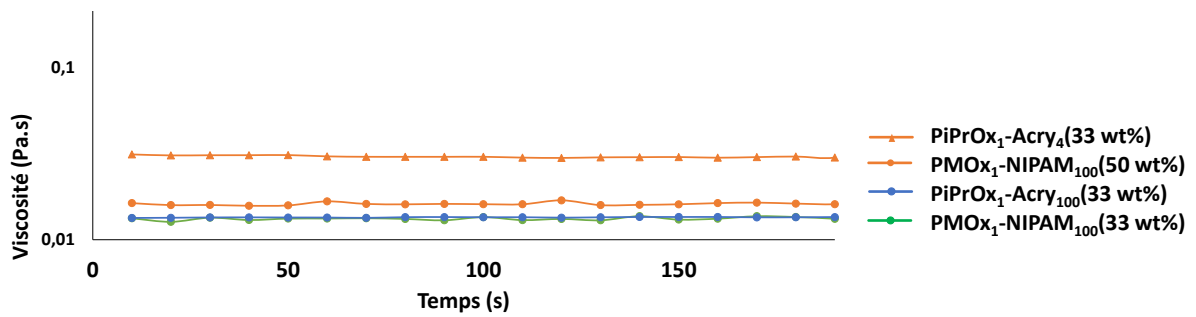


Figure SI-IV-22 - Viscosité des résines en fonction de la composition des résines

4. Conclusion du chapitre

Ce travail sur les **hydrogels thermosensibles** obtenus par **fabrication 4D** en **stéréolithographie** a permis de montrer que des polymères thermosensibles, PNIPAM ou PiPrOx, de **même** température **LCST** (32-35 °C) peuvent générer des hydrogels avec des **différences de comportements**. En effet, les hydrogels PMOx-PNIPAM et PiPrOx-Acry, alliant des réactifs acrylamide et oxazoline, sont également thermosensibles mais avec une **LCST plus élevée** de l'ordre de 37-41 °C. Ce phénomène est lié à une **diminution** de la **mobilité** des chaînes lors de la photoréticulation et une **augmentation** des groupements **hydrophiles**. Ces hydrogels se différencient aussi par leur comportement au **gonflement** et dégonflement en température qui est plus rapide dans le cas du PNIPAM avec un mécanisme de diffusion de l'eau **Fickien** pour **PMOx-PNIPAM** et **non Fickien** pour **PiPrOx-Acry**. Toutefois, il faut noter la faisabilité d'hydrogels à base de PiPrOx, ce qui a rarement été décrit jusqu'à maintenant. Dans les deux cas, l'effet de la **température** sur le comportement mécanique en **compression** est net avec un **module** d'élasticité et une **contrainte** à la rupture **supérieurs** au-dessus de la LCST et ceci de façon réversible. Enfin, la fabrication en **stéréolithographie** d'un **actuateur** de type piège à billes ainsi qu'une preuve de concept de dispositif médical avec un **stent**, ont permis de montrer quelques-unes des nombreuses possibilités offertes par les polymères thermosensibles en impression 4D pour modifier la taille et la géométrie d'objets aux environs de la LCST de l'hydrogel.

5. Références

1. Mano, J. F. Stimuli-responsive polymeric systems for biomedical applications. *Adv. Eng. Mater.* **10**, 515–527 (2008).
2. Tanaka, M., Nakahata, M., Linke, P., Kaufmann, S. Stimuli-responsive hydrogels as a model of the dynamic cellular microenvironment. *Polym. J.* **52**, 861–870 (2020).
3. Champeau, M., Heinze, D. A., Viana, T. N., Rodrigues de Souza, E., Chinellato, A. C., Titotto, S. 4D Printing of Hydrogels: A Review. *Adv. Funct. Mater.* **30**, 1–22 (2020).
4. Bratek-Skicki, A. Towards a new class of stimuli-responsive polymer-based materials – Recent advances and challenges. *Appl. Surf. Sci. Adv.* **4**, 100068 (2021).
5. Kasiński, A., Zielińska-Pisklak, M., Oledzka, E., Sobczak, M. Smart hydrogels – synthetic stimuli-responsive antitumor drug release systems. *Int. J. Nanomedicine* **15**, 4541–4572 (2020).
6. Koetting, M. C., Peters, J. T., Steichen, S. D., Peppas, N. A. Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications. *Mater. Sci. Eng. R Reports* **93**, 1–49 (2015).
7. Qiu, Y., Park, K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **53**, 321–339 (2001).
8. Roy, D., Brooks, W. L. A., Sumerlin, B. S. New directions in thermoresponsive polymers. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 7214–7243 (2013).
9. Chen, S., Wang, K., Zhang, W. A new thermoresponsive polymer of poly(N-Acryloylsarcosine methyl ester) with a tunable LCST. *Polym. Chem.* **8**, 3090–3101 (2017).
10. Chen, S., Zhang, Y., Wang, K., Zhou, H., Zhang, W. N-Ester-substituted polyacrylamides with a tunable lower critical solution temperature (LCST): The N-ester-substitute dependent thermoresponse. *Polym. Chem.* **7**, 3509–3519 (2016).
11. Zhang, Q., Zhang, Y., Wan, Y., Carvalho, W., Hu, L., Serpe, M. J. Stimuli-Responsive Polymers for Sensing and Reacting to Environmental Conditions. *Prog. Polym. Sci.* **116**, 101386 (2021).
12. Chatterjee, S., Hui, P. C. Stimuli-Responsive Hydrogels: An Interdisciplinary Overview. *Hydrogels - Smart Mater. Biomed. Appl.* 1-23 (2018).
13. Schild, H. G. Poly(N-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Prog. Polym. Sci.* **17**, 163–249 (1992).
14. Tang, L., Wang, L., Yang, X., Feng, Y., Li, Y., Feng, W. Poly(N-isopropylacrylamide)-based smart hydrogels: Design, properties and applications. *Prog. Mater. Sci.* **115**, 100702 (2021).
15. Sanzari, I., Buratti, E., Huang, R., Tusan, C. G., Dinelli, F., Evans, N. D., Prodromakis, T., Bertoldo, M. Poly(N-isopropylacrylamide) based thin microgel films for use in cell culture applications. *Sci. Rep.* **10**, 1–14 (2020).
16. Nagase, K., Yamato, M., Kanazawa, H., Okano, T. Poly(N-isopropylacrylamide)-based thermoresponsive surfaces provide new types of biomedical applications. *Biomaterials* **153**, 27–48 (2018).
17. Xu, X., Liu, Y., Fu, W., Yao, M., Ding, Z., Xuan, J., Li, D., Wang, S., Xia, Y., Cao, M. Poly(N-isopropylacrylamide)-Based Thermoresponsive Composite Hydrogels for Biomedical Applications. *Polym.* **12**, 580 (2020).
18. Haq, M. A., Su, Y., Wang, D. Mechanical properties of PNIPAM based hydrogels: A review. *Mater. Sci. Eng. C* **70**, 842–855 (2017).
19. Kurečić, M., Majda, S. S., Karin, S. K. Uv Polymerization of Poly (N-Isopropylacrylamide) Hydrogel. *Mater. Tehnol.* **46**, 87–91 (2012).
20. Gan, J., Guan, X., Zheng, J., Guo, H., Wu, K., Liang, L., Lu, M. Biodegradable, thermoresponsive PNIPAM-based hydrogel scaffolds for the sustained release of levofloxacin. *RSC Adv.* **6**, 32967–32978 (2016).
21. Klouda, L., Mikos, A. G. Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **68**, 34–45 (2008).
22. M.M. Bloksma, R.M. Paulus, H.P.C. van Kuringen, F. van der Woerd, H.M.L. Lambermont-Thijs, U.S. Schubert, R. H. Thermoresponsive poly (2-oxazine) s. *Rapid Commun.* **33**, 92–96 (2012).
23. Sedlacek, O., de la Rosa, V. R., Hoogenboom, R. Poly(2-oxazoline)-protein conjugates. *Polym. Conjug. From PEGylation Beyond.* **120**, 109246 (2019).
24. Hoogenboom, R., Thijs, H. M., Jochems, M. J., van Lankvelt, B. M., Fijten, M. W., Schubert, U. S. Tuning the LCST of poly(2-oxazoline)s by varying composition and molecular weight: Alternatives to poly(N-isopropylacrylamide)? *Chem. Commun.* **44**, 5758–5760 (2008).
25. Weber, C., Hoogenboom, R., Schubert, U. S. Temperature responsive bio-compatible polymers based on poly(ethylene oxide) and poly(2-oxazoline)s. *Prog. Polym. Sci.* **37**, 686–714 (2012).
26. Huber, S., Jordan, R. Modulation of the lower critical solution temperature of 2-Alkyl-2-oxazoline

- copolymers. *Colloid Polym. Sci.* **286**, 395–402 (2008).
27. Diab, C., Akiyama, Y., Kataoka, K., Winnik, F. M. Microcalorimetric Study of the Temperature-Induced Phase Separation in Aqueous Solutions of Poly(2-isopropyl-2-oxazolines). *Macromolecules* **37**, 2556–2562 (2004).
 28. Uyama, H., Kobayashi, S. A Novel Thermo-Sensitive Polymer. Poly(2- iso -propyl-2-oxazoline) . *Chemistry Letters*. **21**, 1643–1646 (1992).
 29. Li, T., Tang, H., Wu, P. Structural investigation of thermo-responsive poly(2-isopropyl-2-oxazoline) hydrogel across the volume phase transition. *Soft Matter* **11**, 1911–1918 (2015).
 30. Zhao, B., Li, N. K., Yingling, Y. G., Hall, C. K. LCST Behavior is Manifested in a Single Molecule: Elastin-Like polypeptide (VPGVG)_n. *Biomacromolecules* **17**, 111–118 (2016).
 31. Ward, M. A., Georgiou, T. K. Thermoresponsive polymers for biomedical applications. *Polymers*. **3**, 1215–1242 (2011).
 32. Dong, Y., Wang, S., Ke, Y., Ding, L., Zeng, X., Magdassi, S., Long, Y. 4D Printed Hydrogels: Fabrication, Materials, and Applications. *Adv. Mater. Technol.* **5**, 1–19 (2020).
 33. Ji, Z., Yan, C., Yu, B., Zhang, X., Cai, M., Jia, X., Wang, X., Zhou, F. 3D Printing of Hydrogel Architectures with Complex and Controllable Shape Deformation. *Adv. Mater. Technol.* **4**, 1–8 (2019).
 34. Odent, J., Vanderstappen, S., Toncheva, A., Pichon, E., Wallin, T. J., Wang, K., Shepherd, R. F., Dubois, P., Raquez, J. M. Hierarchical chemomechanical encoding of multi-responsive hydrogel actuators: Via 3D printing. *J. Mater. Chem. A* **7**, 15395–15403 (2019).
 35. Han, D., Lu, Z., Chester, S. A., Lee, H. Micro 3D Printing of a Temperature-Responsive Hydrogel Using Projection Micro-Stereolithography. *Sci. Rep.* **8**, 1–10 (2018).
 36. Mishra, A. K., Wallin, T. J., Pan, W., Xu, P., Wang, K., Giannelis, E. P., Mazzolai, B., Shepherd, R. F. Autonomic perspiration in 3D-printed hydrogel actuators. *Sci. Robot.* **5**, 1–10 (2020).
 37. Sun, X., Tyagi, P., Agate, S., McCord, M. G., Lucia, L. A., Pal, L. Highly tunable bioadhesion and optics of 3D printable PNIPAm/cellulose nanofibrils hydrogels. *Carbohydr. Polym.* **234**, 115898 (2020).
 38. Dutta, S., Cohn, D. Temperature and pH responsive 3D printed scaffolds. *J. Mater. Chem. B* **5**, 9514–9521 (2017).
 39. Seo, J. W., Shin, S. R., Park, Y. J., Bae, H. Hydrogel Production Platform with Dynamic Movement Using Photo-Crosslinkable/Temperature Reversible Chitosan Polymer and Stereolithography 4D Printing Technology. *Tissue Eng. Regen. Med.* **17**, 423–431 (2020).
 40. Ritger, P. L., Peppas, N. A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J. Control. Release* **5**, 37–42 (1987).
 41. Qiao, Z., Tran, L., Parks, J., Zhao, Y., Hai, N., Zhong, Y., Ji, H. F. Highly stretchable gelatin-polyacrylamide hydrogel for potential transdermal drug release. *Nano Sel.* **2**, 107–115 (2021).

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

La biomédecine est en constante évolution grâce entre autres à l'essor des techniques de fabrication additive. Parmi les différentes technologies, la stéréolithographie prend une place de choix avec sa haute résolution de fabrication, le contrôle des architectures 3D mais aussi grâce à sa capacité à générer des structures poreuses sophistiquées qui ne sont pas réalisables par les technologies conventionnelles. Cette haute technicité est employée pour concevoir des architectures sophistiquées, d'un intérêt essentiel notamment en ingénierie tissulaire. En effet, l'utilisation d'une matrice polymère présentant une structure poreuse contrôlée est une des priorités. Ces matrices polymères doivent posséder une biocompatibilité et une biodégradabilité contrôlées ainsi qu'une caractéristique de plus en plus recherchée : le biomimétisme. En effet, un support cellulaire ou *scaffold* biomimétique doit être capable de rétention d'eau, de se déformer à façon et de présenter une bonne affinité avec les tissus biologiques. Les matériaux de type hydrogel ont le remarquable avantage de répondre à ce cahier des charges.

Cette thèse a contribué à améliorer la compréhension des hydrogels synthétiques et d'étendre la gamme des hydrogels hybrides utilisables en stéréolithographie. Les polymères naturels ont l'avantage d'être biologiquement proches des tissus, expliquant l'utilisation majoritairement du collagène et surtout de son homologue, la gélatine, en ingénierie tissulaire. Cependant, sa faible résistance mécanique et sa faible solubilité à concentration élevée sont de sérieux inconvénients. Pour contrer ces limitations, des hydrogels hybrides à base de gélatine et de PTMC ont été élaborés dans le **chapitre 2**. Une étude poussée sur le greffage de PTMC sur la gélatine a permis de développer plusieurs polymères greffés hybrides avec des taux de PTMC variables. Ce contrôle de la polymérisation du TMC ainsi que la méthacrylation des extrémités de chaînes ont permis de diversifier les comportements des matériaux allant de l'hydrogel pour les faibles taux de greffage, à des élastomères pour des taux élevés en PTMC. L'allongement de la chaîne de PTMC s'est accompagné d'une diminution du module de Young, du taux de gonflement et d'une augmentation du temps de dégradation, le tout avec une excellente réponse cellulaire. Même si le greffage de PTMC a permis de contrer plusieurs difficultés, l'utilisation de polymères naturels multifonctionnels reste

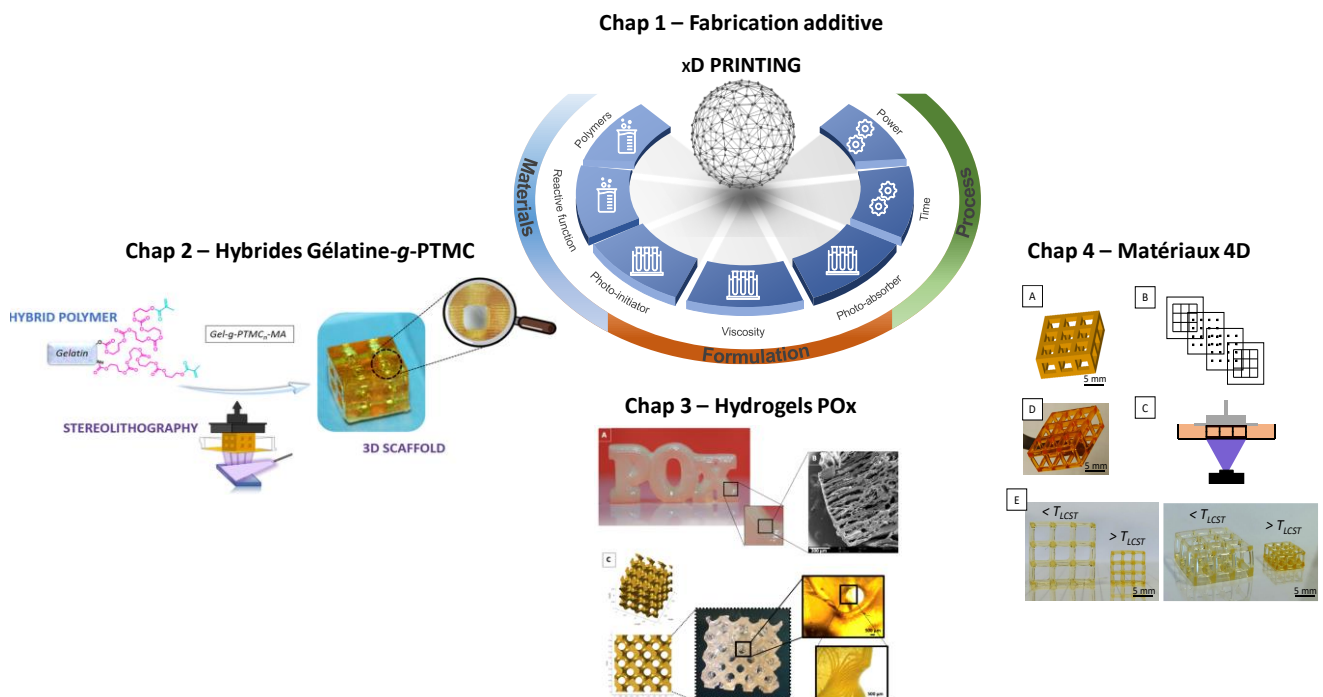
complexe. Pour pallier cet inconvénient, des hydrogels conçus à partir de polymères hydrosolubles de synthèse, plus faciles à designer, ont été élaborés dans le **chapitre 3**. La majeure partie des hydrogels de synthèse sont basés sur le PEG. Une alternative possible sont les polyoxazolines qui présentent des propriétés similaires avec de grandes possibilités de modification. L'élaboration de plusieurs architectures macromoléculaires à base de diméthacrylate de POx ainsi que la formulation des résines ont permis de moduler les propriétés physiques des hydrogels. Ainsi, les propriétés mécaniques peuvent évoluer du kPa au MPa uniquement par la variation de la taille du polymère et du degré de fonctionnalisation en méthacrylate. En outre, cette variabilité de propriétés n'a eu aucun impact préjudiciable sur le procédé de stéréolithographie puisque des structures sophistiquées 3D ainsi que des *scaffolds* ont pu être conçus avec une bonne résolution pour chacune de ces résines. Un autre type de POx a été étudié en jouant sur les ramifications des monomères oxazoline, des iPrOx, possédant une propriété spécifique de thermosensibilité. Cette caractéristique a permis de développer des polymères intelligents à base de POx apportant ainsi une nouvelle dimension à la fabrication additive par stéréolithographie pour aboutir à l'impression 4D. Dans le **chapitre 4**, nous avons pu mettre en perspective des hydrogels à base de iPrPOx avec des hydrogels de PNIPAM et ainsi étudier en parallèle leur propriétés thermostimulables. Ces d'hydrogels ont, par rapport à une température seuil proche de celle du corps, une capacité de gonflement par l'absorption d'eau et de contraction par libération l'eau. Cet effet de LCST s'est manifesté par différents comportements de contraction et expansion au gonflement en fonction de la formulation des hydrogels.

Plusieurs perspectives peuvent découler de ce travail de thèse. Tout d'abord, la maîtrise du greffage de PTMC sur la gélatine pourrait aisément être extrapolée à d'autres types de biomacromolécules afin de multiplier les possibilités de polymères hybrides. Ces matériaux générant des hydrogels ou des élastomères à façon, pourraient avoir un intérêt pour la régénération de tissus complexes et anisotropes comme le disque intervertébral, possédant un tissu central gélatineux et un tissu périphérique fibreux et élastomérique. De plus, la maîtrise de la fabrication par stéréolithographie d'objets à **porosité contrôlée** (taille, géométrie de motif) peut se généraliser à des porosités plus complexes comme celles à gradient et ainsi améliorer la diffusion des nutriments mais aussi créer une anisotropie qui

pourrait avoir un intérêt important pour l'ingénierie tissulaire du disque. Ceci explique pourquoi, nous poursuivons actuellement notre collaboration avec les partenaires impliqués dans cette thèse pour étudier les bénéfices de notre système dans la reconstruction du disque intervertébral cervical.

Une limite à l'utilisation des **hydrogels** est leur faible résistance mécanique qui a partiellement été solutionnée avec des hydrogels élaborés couche par couche en stéréolithographie. Le module ainsi obtenu, **de l'ordre du MPa**, permet une revalorisation mécanique des hydrogels et ainsi accroître leur champ d'application en ingénierie tissulaire.

Enfin, les premiers résultats obtenus en **impression 4D** ont montré l'intérêt des hydrogels thermosensibles de type POx pour élaborer des acteurs pour lesquels est recherché un changement réversible de morphologie sous stimulation. Ces derniers peuvent être employés en chirurgie mini-invasive qui nécessite le déploiement de dispositifs médicaux dans des espaces difficilement accessibles.



Techniques et méthodes expérimentales

Techniques et méthodes expérimentales

Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ^1H ont été enregistrés à l'aide d'un Bruker Advance DRX 400 (400 MHz) muni d'une sonde QNP et équipé d'un logiciel d'acquisition XWIN-NMR 2,1 à 20 °C. Les déplacements chimiques sont exprimés en parties par million (ppm) et référencés par rapport au pic du signal du solvant deutéré utilisé, le chloroforme deutéré (CDCl_3) à 7,26 ppm et l'eau deutérée (D_2O) à 4,79 ppm. Les spectres RMN ^{13}C ont été enregistrés avec le même appareil dans les mêmes solvants. Les déplacements chimiques sont référencés par rapport au pic du signal du CHCl_3 à 77 ppm.

Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)

Afin de déterminer les masses molaires des polymères et leur dispersité, des analyses par chromatographie d'exclusion stérique ont été effectuées sur un appareil PLGPC 50 Plus thermostaté à 50 °C et équipé d'un détecteur réfractomètre différentiel RI, d'une pré-colonne 8 μm PolarGel-M (7,5 \times 50 mm) et de deux colonnes 8 μm PolarGel-M columns (7,5 \times 300 mm) et d'un passeur automatique Varian model 410 autosampler. Le DMAc (0,1% LiBr) est utilisé comme éluant avec un débit de 0,8 mL/min. La calibration a été réalisée à partir d'un standard poly(méthacrylate de méthyle) (PMMA).

Spectroscopie FTIR

Les spectres FTIR (*Fourier Transform Infra Red*) ont été enregistrés avec un spectromètre Perkin-Elmer Spectrum 100 équipé d'une cellule ATR (Attenuated Total Reflectance) muni d'un cristal de ZnSe. La gamme de longueur d'onde étudiée est de 4 000 à 650 cm^{-1} .

Spectroscopie UV-visible

Le suivi de la réaction de photo-dimérisation et dé-dimérisation des coumarines a été suivie par analyses UV-visible, en utilisant un spectromètre Perkin-Elmer Lambda 35 UV/visible

équipé d'un système Peltier PTP1+1. Les mesures sont réalisées sur une gamme de longueur d'onde allant de 280 à 400 nm à l'aide d'une cuve en quartz de 10 mm.

Mesures mécaniques

Les mesures sur les hydrogels ont été effectuées à l'aide d'un appareil Instron 5533 équipé d'un capteur de force statique de 100 N et d'un plateau de compression cylindrique de 10 kN. Les résultats ont été interprétés sur un logiciel bleuHill3. La vitesse de compression ou traction des échantillons est de 5 mm/s avec une pré-charge de compression de 0,1 N. Trois échantillons ont été utilisés pour obtenir les données moyennes. Le module a été calculé à partir de la pente, dans la région linéaire, de la courbe contrainte-déformation correspondant à 5-10 % de déformation (selon la norme ISO-844 2014) en utilisant l'équation suivante : $E = \frac{\sigma}{\epsilon}$

E est le module de Young (Pa), σ la contrainte (Pa) qui est calculée selon l'équation $\sigma = F/S$, où F est la force (newton) et S la section (ou surface) de l'échantillon (mm^2). ϵ : le % de déformation est calculé selon l'équation $\epsilon = (l-l_0)/l_0$ où l correspond au déplacement du plateau (mm) et l_0 l'épaisseur de l'échantillon (mm).

Rhéomètre

Les mesures rhéologiques ont été effectuées sur un rhéomètre modulaire compact Anthon Paar MCR 302, équipé d'un cône de mesure sablée PP25/6. Les tests ont été effectués à 25 °C sous air avec une force appliquée sur l'échantillon de 1 N. Les propriétés rhéologiques ont été suivies en balayage (γ) de 0,01-10% et en fréquence angulaire (ω) de 0,01-100 $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$ à 10% de la déformation.

Annexes

Article

Synthesis of Poly(trimethylene Carbonate) from Amine Group Initiation: Role of Urethane Bonds in the Crystallinity

Thomas Brossier ^{1,2}, Gael Volpi ², Vincent Lapinte ¹ and Sebastien Blanquer ^{1,*} 

¹ ICGM, Univ. Montpellier, CNRS, ENSCM, 34296 Montpellier, France; thomas.brossier@3d-medlab.com (T.B.); vincent.lapinte@umontpellier.fr (V.L.)

² 3D Medlab, 13700 Marignane, France; gael.volpi@3d-medlab.com

* Correspondence: sebastien.blanquer@umontpellier.fr

Abstract: Semi-crystalline poly(trimethylene carbonate) (PTMC) can be efficiently prepared by ring-opening polymerization (ROP) initiated by amine using various catalysts. More promising results were reached with the one-step process of stannous octanoate unlike the two-step one-pot reaction using TBD and MSA catalysts. The ROP-amine of TMC consists in a simple isocyanate free process to produce polycarbonate-urethanes, compatible with the large availability of amines ranging from mono- to multifunctional until natural amino acids. ROP-amine of TMC leads to urethane bonds monitored by FTIR spectroscopy. The relationship between the nature of amines and the crystallinity of PTMC was discussed through X-ray diffraction and thermal studies by DSC and TGA. The impact of the crystallinity was also demonstrated on the mechanical properties of semi-crystalline PTMC in comparison to amorphous PTMC, synthesized by ROP initiated by alcohol. The semi-crystalline PTMC synthesized by ROP-amine opens many perspectives.

Keywords: poly(trimethylene carbonate) (PTMC); ring-opening polymerization; amine initiator; urethane



Citation: Brossier, T.; Volpi, G.; Lapinte, V.; Blanquer, S. Synthesis of Poly(trimethylene Carbonate) from Amine Group Initiation: Role of Urethane Bonds in the Crystallinity. *Polymers* **2021**, *13*, 280. <https://doi.org/10.3390/polym13020280>

Received: 21 December 2020

Accepted: 13 January 2021

Published: 16 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Biodegradable synthetic polymers have gained considerable interest in several basic and industrial domains. Among them, aliphatic polycarbonates such as poly(trimethylene carbonate) (PTMC) are remarkable polymers with soft and flexible properties, and present a typical biodegradation mechanism [1]. Indeed, it has been demonstrated that the mechanism of PTMC degradation follows a phenomenon of enzymatic surface erosion without autocatalysis behavior. Hence, the absence of core degradation allows conserving the mechanical properties all along the degradation process, which is a significant difference with their homologous biodegradable aliphatic polyesters [2]. That is why such biodegradability combined with the recognized biocompatibility of the PTMC have yielded especially to high potential in biomedical applications [3]. Hence, PTMC has been used for sustainable and better control drug delivery [4,5] as surface erosion is easier to control than bulk erosion. More particularly, PTMC has been found as material scaffold base in tissue engineering for soft tissue reconstruction, where maintaining the mechanical properties during the degradation phase is crucial [6,7]. Nevertheless, it is globally recognized that the mechanical properties of raw PTMC suffers from several limitations [3,8,9]. Even though the mechanical properties of PTMC evolve with the molar mass, globally, PTMC displays a low modulus combined with a low tensile strength which is often considered as insufficient for many applications. Moreover, PTMC shows low creep resistance which involves poor dimensional stability and is therefore a considerable limitation. Consequently, several chemical approaches have been proposed to conserve the flexibility and the specific biodegradation mechanism while offering mechanical resistance. First of all, chain cohesion reinforcement through PTMC crosslinking has showed positive influence especially in the creep resistance and ultimate stress [10]. Crosslinked PTMC has been obtained either by photo-activation [11] or by ring-opening polymerization of bis-cyclic monomers as

linkers [12]. A second approach to improve the mechanical strength was by generating crystalline phase within the amorphous coil of PTMC. Despite few discrepancies around the semi-crystalline properties of PTMC with low molar mass [13], the wide majority of the reported articles present the linear PTMC as a total amorphous polymer in the relaxed state and only semi-crystalline in the stretched state [8,14,15]. Hence, the contribution of crystalline phase within the PTMC material may improve the mechanical strength. In that sense, copolymerization of PTMC with semi-crystalline polymer such as biodegradable polyesters, especially polylactide and poly(ϵ -caprolactone), have been investigated in block or random copolymerization [9,16] and led to copolymers with the combined homopolymers properties. With the same idea, crystallization of PTMC phase has also been proposed by the formation of self-assembly through the presence of urethane bonds which are widely known to generate hydrogen bonds [17]. So far, poly(carbonate urethane)s have been exclusively studied by classical approach of polyaddition using diisocyanate and polycarbonate terminated diol. PTMC-based polyurethane showed considerable modification of the physical, thermal, and mechanical properties compared to raw PTMC [18,19]. More specifically, the alternation of soft and rigid phases, relayed by the formation of hydrogen bonds, provides excellent elastic properties with large elongation at break and high tensile strength [20,21]. Obviously, the molar mass of the precursor PTMC-terminated diol which represents the soft segments plays an important role in the evolution of the properties.

In this perspective, a more straightforward strategy to generate urethane bonds within the PTMC materials could be by ring opening polymerization (ROP) using aminated initiator, so-called ROP-amine. ROP-amine route has many advantages related to the other pathways of urethanization of PTMC chains. As illustrated in Figure 1, toxic isocyanate reactant is not required and the versatility of amines is much more extended than isocyanates. This variety concerns the functionality of amines (mono, di, tri, multi), the nature of amines (aliphatic, cycloaliphatic, aromatic . . .), the origin of amines (bio or petrosourced), and so on. Moreover, the strategy is shorter—only one step to reach to poly(carbonate urethane) instead of two steps for post-urethanization. No precaution of stoichiometry is mandatory as the case for polyaddition between diisocyanate and diol precursors. In the literature, ROP-amine has been already investigated for the polymerization of lactide and ϵ -caprolactone monomers [22–24]. ROP-amine for polyesters allows to generate amide groups and shows to modify the properties of the polyester compared to hydroxyl initiation [25]. However, to the best of our knowledge, ROP of TMC has been exclusively initiated with hydroxyl functions but amines have never been studied as initiator for TMC polymerization.

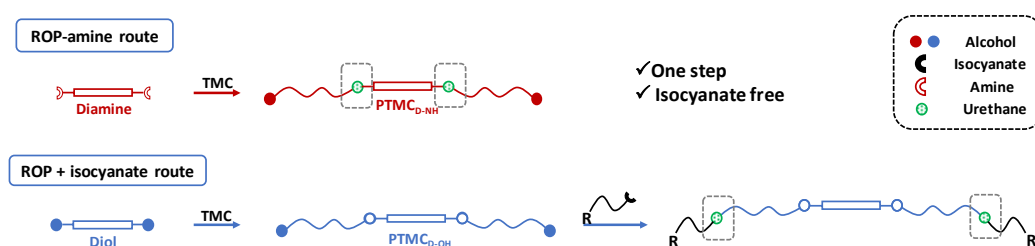


Figure 1. Comparative routes toward poly(trimethylene carbonate) (PTMC)-urethane by ring-opening polymerization (ROP)-amine route and polyaddition of isocyanate in PTMC terminal diols.

In this study we investigate the capacity of TMC to polymerize by using various amine initiators and describe the effect of the catalyst pathway to induce such ROP-amine. We particularly pay attention to the properties generated by the presence of the urethane bonds on the PTMC.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Trimethylene carbonate (TMC) comes from Foryou Medical (Huizhou, China). The initiators (1,6-hexanediol, (99%), propylamine, benzylamine, 1,6-hexanediamine, p-xylenediamine,

tris(2-aminoethyl)amine, bis(3-aminopropyl)amine, glycine methyl ester, L-phenylalanine methyl ester, the catalysts methanesulfonic acid (MSA), 1,5,7-triazabicyclo[4.4.0]dec-5-ene (TBD), tin(II) 2-ethylhexanoate ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$), were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France) and used as received. Anhydrous dichloromethane was retrieved from solvent purificator Inert PureSolv™ (Castelnau-le-Lez, France) and used as the polymerization solvent.

2.2. Methods

2.2.1. Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry (NMR)

^1H NMR and correlated spectroscopy (COSY) NMR spectra were recorded on a 400 MHz and 600 MHz Bruker Aspect Spectrometer. CDCl_3 was used as deuterated solvent. Chemical shifts were given in parts per million (ppm): for ^1H NMR the reference peak was residual CDCl_3 at 7.26 ppm. Degree of polymerization (DP_n) has been calculated with the following equation using protons H_a from the TMC unit (4.2 ppm/integrating for 4 protons), H_c from the initiator (3.1 ppm/integrating for 2x protons, with x the number of arms expected).

$$DP_n = \int \frac{H_a}{\frac{H_c}{2x}} \quad (1)$$

2.2.2. Size Exclusion Chromatograms (SEC)

SEC were recorded using a triple detection (GPC Varian 390-LC viscometer detector, Varian 390-LC refractive index detector and UV detector at 254 nm) from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). The analyses were performed in tetrahydrofuran (THF) at a flow rate of 1.0 mL/min at 30 °C. An Agilent PLgel 5 μm guard column and two columns 5 μm PLgel Mixed D were used. Data acquisition and calculations were performed using Cirrus Multi GPC/SEC software. Universal calibration was performed with PS standards from Agilent Technologies using the intrinsic viscosities given by the supplier.

2.2.3. Fourier Transform Infrared Spectra (FT-IR)

FT-IR analyses were recorded on a Perkin Elmer (Villebon-sur-Yvette, France) Spectrum 100 equipped with a ZnSe crystal using the ATR technique. The wave number ranges from 4000 to 650 cm^{-1} .

2.2.4. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

DSC analyses were carried out using a Mettler Toledo (Mettler Toledo, France,) DSC1 calorimeter. Constant calibration was performed with biphenyl, indium, bismuth, zinc, and cesium chloride standards. Nitrogen was used as the purge gas. Thermal properties were recorded between -50 and 120 °C at a heating rate of 5 °C $\cdot\text{min}^{-1}$. Thermal analyses have been initially performed on $\text{PTMC}_{\text{D-NH}}$ after 24 h, 2 weeks, 4 weeks, and 16 weeks (Table S1, from the supplementary materials). For the rest of the sample all the analyses have been done after 4 weeks at room temperature (20 °C).

2.2.5. Thermogravimetric Analysis (ATG)

The thermal stability was carried out using a NETZSCH TG 209F1 Libra analyzer (Selb, Germany). The experiments consisted in registering the weight loss of the sample under nitrogen flow (40 mL $\cdot\text{min}^{-1}$) in function of temperature ranging from 20 up to 600 °C with a heating rate of 10 °C $\cdot\text{min}^{-1}$.

2.2.6. Mechanical Measurements

Elongation at break and Young modulus of dumbbell were measured with an Instron3366L5885 tensile tester (Élancourt, France). Dumbbell were mounted between tensile grips with an initial grip spacing of 10 cm. The cross-head speed was 2 mm $\cdot\text{s}^{-1}$. The elongation at break was expressed as a percentage of the original length and the modulus

was obtained at 0.5% of deformation by stress/strain. Material film hardness was evaluated with a Shore A durometer (HBA 100-0) from Sauter (Basle, Suisse).

2.2.7. X-Ray Diffraction (XRD)

XRD measurements were performed using a Philips X'Pert PRO MPD apparatus (Amsterdam, The Netherlands) with a copper tube and nickel filter in the range $5 < 2\theta < 60^\circ$. The measurements were taken every 0.04 rad at room temperature. The XRD patterns were analyzed by PROFIT computer program. The program resolves a diffraction curve on diffraction peaks and amorphous halo which allows estimating the crystallinity degree.

2.3. Synthesis

2.3.1. Typical Procedure for Polymerization of TMC Initiated by ROP-amine with Sn(Oct)₂ (Same Protocol Has Been Performed with All the Amine Initiators)

Propylamine (1 equivalent), Sn(Oct)₂ (0.10 wt.%), and trimethylene carbonate (100 equivalent) were charged in a round bottom flask with a stir bar and dried by five successive N₂/vacuum cycles. The flask was heated to 130 °C using an oil bath. Polymerizations were carried out until the complete conversion of TMC determined by ¹H NMR. The polymer was dissolved in methylene chloride and collected by precipitation in methanol. The synthesis with 10 equivalent of TMC was also carried out for FT-IR analyses.

¹H NMR (δ in ppm, CDCl₃, 400 MHz): 4.7 (m, 1 H, NH), 4.2 (t, 40 or 400 H, CH₂), 3.8 (m, 2 H, CH₂), 3.2 (m, 2 H, CH₂), 2.0 (q, 20 or 200 H, CH₂), 1.5 (m, 2 H, CH₂), 0.9 (t, 3 H, CH₃).

2.3.2. Typical Procedure for Polymerization of TMC Initiated by ROP-Amine with TBD

Propylamine (1 equivalent) was added into a solution of TMC (100 equivalent) in CH₂Cl₂ (1.0 mol·L⁻¹). The mixture was stirred at 30 °C until the complete consumption of the amine. Then a solution of TBD (0.2 equivalent) in CH₂Cl₂ was added to the reaction mixture. After complete reaction, TBD was quenched with benzoic acid. The crude solution was precipitated in methanol.

¹H NMR (δ in ppm, CDCl₃, 400 MHz): 4.7 (m, 1 H, NH), 4.2 (t, 40 or 400 H, CH₂), 3.8 (m, 2 H, CH₂), 3.2 (m, 2 H, CH₂), 2.0 (q, 20 or 200 H, CH₂), 1.5 (m, 2 H, CH₂), 0.9 (t, 3 H, CH₃).

3. Results and Discussion

3.1. Synthesis of PTMC Homopolymer via ROP-Amine Route

In this study, the ring-opening polymerization of TMC initiated by amine groups is presented. The TMC ROP was typically driven by three different catalytic pathways widely used in ROP. To start, we studied the behavior and the efficiency of each catalytic pathway using the amine initiator (Figure 2). A typical degree of polymerization around 100 units has been targeted, and the conversion rate with the molar mass were measured by NMR spectroscopy and chromatography. Catalysis with methanesulfonic acid (MSA) was initially performed. After 24 h of reaction at room temperature, the ¹H NMR spectroscopy revealed a low conversion rate (around 50%), and the obtained residue did not precipitate in methanol which is usually the case for PTMC (Figure S1, from the supplementary materials). We therefore conclude that the cationic polymerization did not lead to an appropriate polymerization of TMC. Such behavior may be due to the protonation of the amine functions that reduces the nucleophilic character and impairs the ring-opening activation. Consequently, an opposite catalyst with basic properties may be more favorable for initiation of the polymerization. In that sense, we investigated the ROP-amine using the TBD as a nucleophilic catalyst. Interestingly, the polymerization does not show an expected worthy reactivity. In fact, in agreement with recent work obtained with PLA [25], direct anionic polymerization with TBD leads to uncontrolled polymerization of the TMC, with a huge dispersity of 2.8. In addition, we also noticed a significantly longer reactivity with ROP-amine route compared to ROP initiated with hydroxy groups, with respectively only 10% of conversion against 100% after 1 h of reaction [26] (Figure S2, from the supplementary materials). Nevertheless, as proposed by Alba et al. [25], the polymerization can be done

in two successive steps one-pot, with first the ring opening of one TMC unit in absence of catalyst, followed by classic ROP initiated by the generated hydroxy groups. By this pre-opening, the polymerization of TMC reached a complete conversion after 1 h with the TBD and 15 h with MSA (Figure S3, from the supplementary materials). However, as the polymerization has been performed in a two-step one-pot approach, this route cannot be considered as real ROP-amine to synthesize the PTMC.

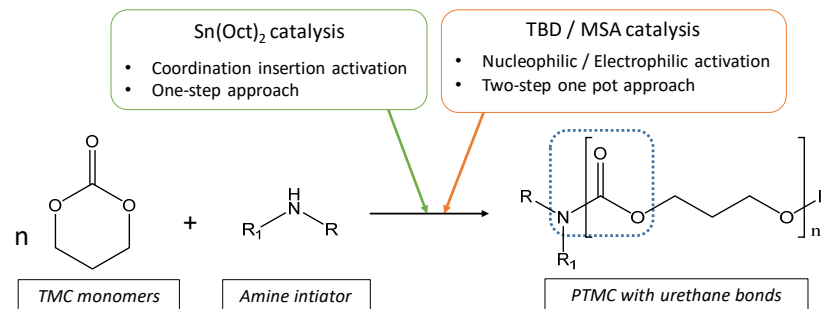


Figure 2. Overview on the catalysis pathways for the ROP-amine to synthesize the PTMC.

Finally, ROP-amine of TMC has been tested using stannous octanoate catalyst. The 1H NMR spectrum from Figure 3a shows the success of the ROP-amine with a conversion close to 100% after 24 h. The conversion rate is calculated by comparing the integrated areas of characteristic peaks of the protons from the monomers at 4.4 ppm with those from the growing polymer chains at 4.2 ppm (H_a). Nevertheless, it is crucial to prove that the generated polymer has been well initiated by 1,6-hexanediamine. For that, 2D COSY NMR (Figure 3b) spectroscopy allowed to correlate a new peak at 3.1 ppm (H_c) to the characteristic peak of the amino group at 4.7 ppm (H_f), and also correlated to the characteristic peak of the protons from the aliphatic 1,6-hexanediamine at 1.5 ppm (H_d) which can be assigned to the protons in alpha position of the resulting urethane. This peak has been used to calculate the average degree of polymerization in number of the PTMC which was close to the expected one (DP_{100}) (Table 1).

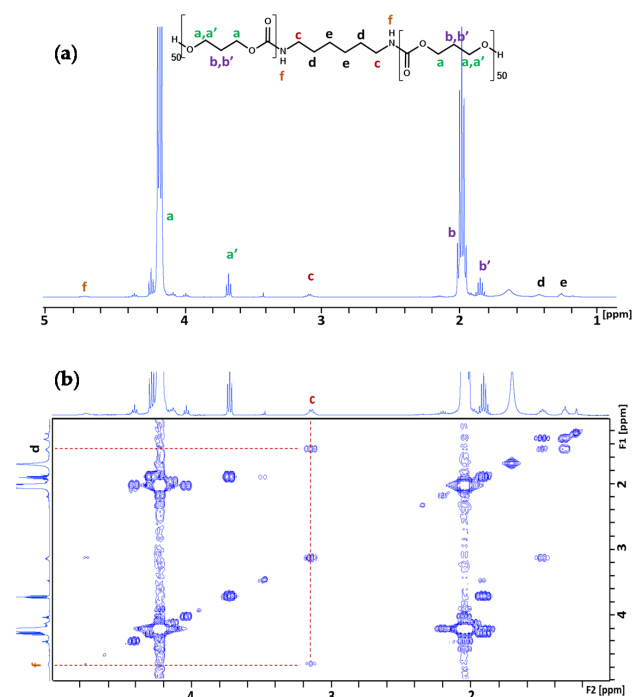
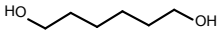
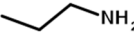
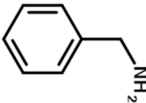
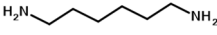
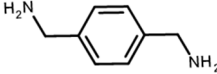
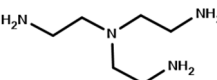
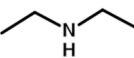
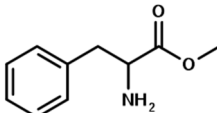
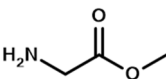


Figure 3. (a) 1H NMR and (b) 2D-COSY NMR of PTMC initiated by 1,6-hexanediamine with $Sn(Oct)_2$ ($CDCl_3$).

Table 1. Molar mass of PTMC_{OH} and various PTMC_{NH} for $DP_n = 100$.

Initiator Formula	Initiator Name	Abbreviation of PTMC	F^1	DP_n^{NMR}	DP_n^{SEC}	\bar{D}^3
	1,6-hexanediol	PTMC _D -OH	D ²	93	110	1.8
	propylamine	PTMC _M -NH	M ²	88	86	1.9
	benzylamine	PTMC _M -NH-Φ	M	88	86	1.9
	1,6-hexanediamine	PTMC _D -NH	D	102	86	1.9
	<i>p</i> -xylenediamine	PTMC _D -NH-Φ	D	108	98	1.7
	tris (2-aminoethyl)amine	PTMC _T -NH	T ²	98	83	3.4
	bis(3-aminopropyl)amine	PTMC _{M-S} -NH	M _S ²	94	108	1.6
	L-phenylalanine methyl ester	PTMC _M -AAP-NH	M	143	72	1.6
	glycine methyl ester	PTMC _M -AAG-NH	M	147	70	1.7

¹ Functionality; ² M: monofunctional; D: difunctional; T: trifunctional; Ms: substituted monofunctional; ³ Dispersity.

Once the formation of PTMC was demonstrated, the reactivity of TMC using 1,6-hexanediamine was compared to a traditional initiation with 1,6-hexanediol. Figure 4a represents the kinetic analysis (monomer conversion versus time) of ROP by both initiators using Sn(Oct)₂ catalyst. Interestingly, no differences have been noticed regarding the reactivity profile of each polymerization demonstrating a similar kinetic polymerization. For both initiations, the polymerization reached a plateau at 90% of conversion after 10 h of reaction. Moreover, in Figure 4b with both initiators, the PTMC samples were characterized by a similar monodisperse SEC trace with a close molar mass and dispersity (1.8 and 1.9 respectively) as already described for the synthesis of PLA and PCL [23].

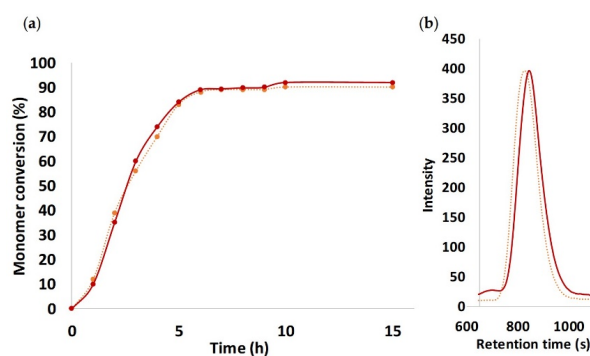


Figure 4. Comparison of (a) kinetic profile of PTMC initiated by 1,6-hexanediamine using Sn(Oct)₂ (line red) 1,6-hexanediol (dots orange), and (b) SEC traces of the resulting polymers.

The strategy of ROP-amine of TMC has been investigated through a series of aminated initiators (PTMC_{NH}) related to alcohol initiator (PTMC_{OH}) (Table 1). The study of aminated

initiators extends from monoamines (primary aliphatic (PTMC_{M-NH}), aromatic (PTMC_{M-NH-φ}), and secondary aliphatic (PTMC_{M-S-NH})) to diamines (primary aliphatic (PTMC_{D-NH}) and aromatic (PTMC_{D-NH-φ}), and multifunctional amines (PTMC_{T-NH}). The study was pursued with protected amino esters of glycine (PTMC_{M-AAG-NH}) and phenylalanine (PTMC_{M-AAP-NH}). Such study demonstrates the versatility of this approach to generate multiurethane functions along the PTMC chains.

From Table 1, it appears that the DP_n determined by NMR spectroscopy and chromatography are both consistent and similar with the theoretical targeted molar mass. The dispersities determined by SEC ranged from 1.6 to 1.9, except for PTMC_{T-NH} which is significantly higher around 3.4 and can be explained by its branched structure. As it can be expected, the mono and multifunctional aminated initiators induce a same efficiency of polymerization of the PTMC. Interestingly, secondary amine showed also efficient initiation of the polymerization, as it was also demonstrated for ROP-amine of lactide and lactone [27]. This is interesting for deeper investigation and comparison with primary amine, because secondary amine generates substituted urethane without hydrogen bonds. Following the study of Liu et al. on the polymerization of the PCL [28], we successfully synthesize the PTMC by ROP-amine using natural amino acid initiators. In order to reduce eventual by-reactions during the ROP-amine, the amino acids were protected into amino methylic esters. Such natural amino acid models are a huge potential to open a new possibility to use biosourced initiators for PTMC polymerization. The different molar masses with the theoretical ones can be explained by a partial activation of the initiator due to unfavored interactions or steric hindrance of the initiator provoking higher molar masses than theoretically expected.

3.2. Urethane Bond Formation Determined by Infra-Red Analyses

The urethane groups along the PTMC chains resulting from the initiation step of the ROP-amine of TMC was monitored by FTIR spectroscopy using various amine and diamine initiators in reference to PTMC_{D-OH} (Figure 5). The study was realized on short PTMC chains (DP_{10}) to magnify the urethane contribution related to carbonate ones. The characteristic carbonate signals of $\nu(C=O)$ and $\nu(C-O-C)$ around 1741 and 1222 cm^{-1} , respectively were detected for all polymers including PTMC_{D-OH}. The comparison between mono-, di-, and triamine initiators put in relieve the number of urethane groups along the PTMC chains with the increase of the amide II band intensity ($\delta(N-H) + \nu(C-N)$) at 1523 cm^{-1} . Interestingly, we clearly see the apparition of supplementary peak around 1700 cm^{-1} for PTMC_{D-NH} et PTMC_{T-NH} but totally absent for PTMC_{O-H}. As described in the literature this peak corresponds to the carbonyl involved in the H-bonds (named H-bonds $\nu(C=O)$ in the Figure 5) [29]. This can explain the increased trend in function of the number of urethane groups.

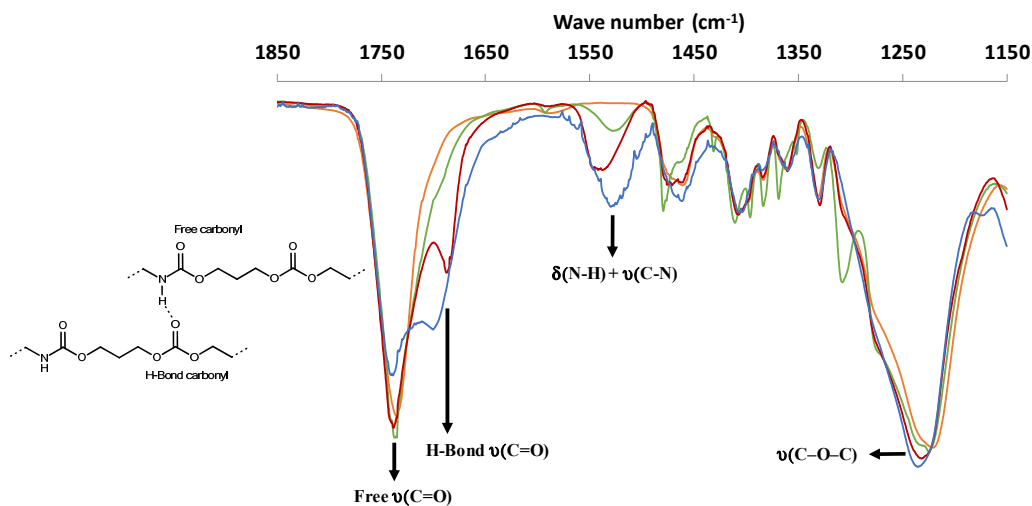


Figure 5. FTIR spectra of PTMC_{D-OH} (orange), PTMC_{M-NH} (green), PTMC_{D-NH} (red), and PTMC_{T-NH} (blue).

3.3. Thermal and Mechanical Properties of PTMC from ROP-Amine

A thermal study was realized by thermogravimetric analysis to evaluate the thermal stability of PTMC bearing urethane groups as illustrated in Table 2 and Figure 6a. PTMC_{OH} and PTMC_{NH} have the same thermal degradation profile without any weight loss before 250 °C and a sharp one-step weight loss around 280 °C. No notable difference was detected with the number of urethane groups per chain because of the low number of urethane groups related to the carbonate units. Consequently, the traditional characteristic urethane degradation in three stages was not observed [30]. Hence, this route of urethanization avoids the problematic release of HCN at 420–460 °C, inherent to the degradation of urethane groups, which gives a supplementary advantage.

Table 2. Thermal properties of various alcohol and amine initiated PTMC ($DP_n = 100$).

PTMC	T_g^1 (°C)	T_m^1 (°C)	ΔH_m^1 (J·g ⁻¹)	$T_{10\%}^2$ (°C)
PTMC _{D-OH}	−20.0	-	-	288
PTMC _{M-NH}	−30.0	-	-	276
PTMC _{D-NH}	−25.0	40.8	52.5	275
PTMC _{D-NH-Φ}	−24.6	39.2	49.4	276
PTMC _{T-NH}	−22.3	38.7	37.3	273

¹ values determined by DSC; ² values determined by TGA after 10% weight loss.

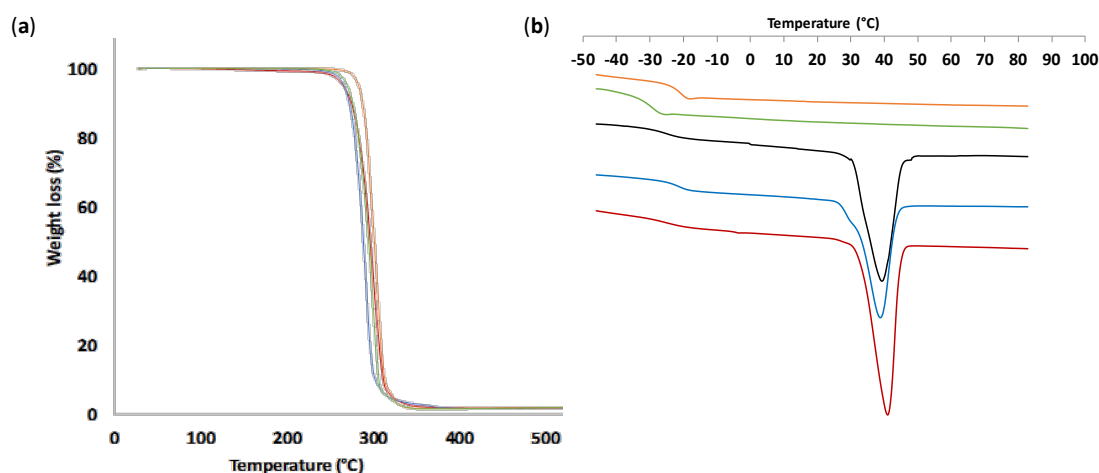


Figure 6. Thermal properties of PTMC_{D-OH} (orange); PTMC_{M-NH} (green); PTMC_{T-NH} (blue); PTMC_{D-NH} (red); PTMC_{D-NH-Φ} (black). (a) Thermal gravimetric analysis; (b) differential scanning calorimetry traces.

A thermal study of PTMC was also monitored by DSC to estimate the amorphous or semi-crystalline character of the polymers. Such study allows also to determine the potential influence in the crystalline organization generated by the presence of H-bonds as shown in FTIR (Figure 5). Indeed, poly(carbonate urethane) synthesized via the traditional urethanization with isocyanate led to semi-crystalline PTMC with evolved crystallinity in function of the hard segment content [18]. It appears that the crystallization kinetics was rather slow (Table S1) and no crystallization has been found for any samples after 24 h. In addition, thermal analysis after 4 and 16 weeks did not show significant differences, we therefore performed all the characterizations after 4 weeks. The DSC thermograms are presented in Figure 6b. All PTMC_{NH} have a low glass transition temperature around −20/−27 °C related to PTMC_{D-OH} (−20 °C in accordance to literature [8]) (Table 2). We noted the amorphous character of PTMC initiated by alcohol (PTMC_{D-OH}) while PTMC initiated by amine (excepted to PTMC_{M-NH}) were semi-crystalline with a melting temperature around 40 °C. A noteworthy melting phenomenon appears for the PTMC initiated by amine, excepted for PTMC_{M-NH}. The urethane groups in PTMC chains promote the or-

dered polymers. For instance, for linear PTMC, the crystallinity increased with the urethane groups per chain starting from amorphous character without urethane unit (PTMC_{D-OH}) or with one (PTMC_{M-NH}) to semi-crystalline character for two urethane groups and still more with four urethane obtained by classical urethanization approach using propylisocyanate as described in Supporting information (Figure S4 and Table S2, from the supplementary materials). In addition, we noted that PTMC_{D-NH-Φ} ($\Delta H_m = 49.4 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$) showed a similar crystallization with this from the PTMC_{D-NH} ($\Delta H_m = 52.5 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$). Therefore, this resemblance shows that the aromatic stacking did not influence or increase the crystallization behavior as it could have been expected. As illustrated with tri-arms star-shaped (PTMC_{T-NH}) using tris(2-aminoethyl)amine, the crystallinity of PTMC decreased with the number of arms regarding the enthalpy of PTMC_{D-NH} and PTMC_{T-NH} ($\Delta H_m = 52.5$ and $37.3 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively). Therefore, the branching of the PTMC structure yield to a different chain organization compared to the linear PTMC_{NH} which then disadvantages the crystallization.

The impact of urethane bonds on thermal properties was also assessed for higher molar mass using a PTMC with DP_n around 200 and 500. Surprisingly, as summarized in Table 3, a similar crystallinity was measured for all the DP_n with a melting temperature around 41 °C, and a similar melting enthalpy around 50 $\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$. Such semi-crystalline character for high molar mass of PTMC has never been reported before. Hence, we can hypothesize that the hydrogen bonds from the urethane groups organize the polymer chains and therefore favor the crystallization of the PTMC chains (Figure 7). It has to be noted that despite the low ratio of urethane groups, the crystallization occurs regardless the molar mass.

Table 3. Investigation of high molar mass PTMC.

PTMC	DP_{nth}	DP_{nNMR}^1	T_g^2 (°C)	T_m^2 (°C)	ΔH_m^2 ($\text{J}\cdot\text{g}^{-1}$)
PTMC _{D-NH}	100	102	−25.0	40.8	52.5
PTMC _{D-NH}	200	196	−27.8	41.9	51.7
PTMC _{D-NH}	500	460	−26.4	40.7	48.8

¹ NMR 600 MHz; ² values determined by DSC.

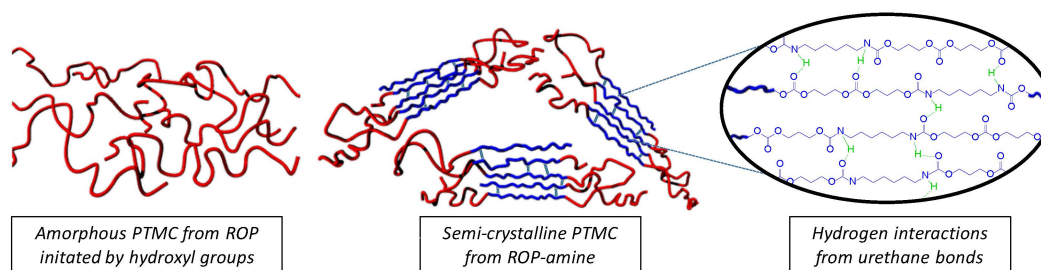


Figure 7. Illustration of amorphous and semi-crystalline organization of PTMC chains. Red worms represent the amorphous phase while blue worms illustrate the crystalline phase.

These results demonstrate the impact of urethane groups along the PTMC chains on the organization of the polymer chains and induce the crystallization phenomenon by hydrogen bonds. This trend shows the efficiency of this strategy of urethanization by ROP-amine instead of post-urethanization of PTMC_{OH}. Other consequences of the urethanes on PTMC were shown using mechanical tests. First, the molding samples of PTMC_{D-NH} contrasted with the amorphous PTMC_{D-OH} material, in the rubbery state at room temperature, too soft to be molded. This different behavior has been measured by hardness shore A with 15 ± 1.5 for PTMC_{D-OH} and 82 ± 1.2 for PTMC_{D-NH}. Young Modulus of PTMC_{D-NH} with DP_{100} was also determined by tensile test ($E = 36.2 \text{ MPa}$, $\sigma_{max} = 0.95 \text{ MPa}$) and comforted the significant stiff properties. In opposition, PTMC_{D-OH} using the same molar mass was not measurable because of the huge creep behavior which was not

the case for PTMC_{D-NH}. Nevertheless, due to the crystallinity, PTMC_{D-NH} remains quite fragile ($\epsilon_{\max} = 2\%$) and larger improvement could be obtained by cross-linking PTMC_{D-NH} to reinforce the mechanical properties as it is traditionally proposed in the literature for PTMC_{OH} [8,10].

3.4. X-Ray Diffraction Analyses

The crystallization character of ROP-amine PTMC was finally investigated by XRD analyses. The analyses were performed on the samples that showed the highest crystalline ratio in DSC, including PTMC_{D-NH- Φ} and PTMC_{D-NH} for DP_n at 100, 200, and 500 (Figure 8). For all the samples, four characteristic peaks of crystalline PTMC_{NH} are observed with the highest double peak 2θ around 21–22°, a sharper peak at 16°, and an additional small peak at 27°. Consequently, the presence of such sharp peaks in XRD proves the existence in the polymer samples of a relatively well-ordered phase which attests the occurrence of a crystalline phase. The X-ray diffraction profile of PTMC_{NH} closely resembled to the semi-crystalline poly(alkylene carbonate) with high number of CH₂ groups [31], or else the PTMC after crystallization upon stretching [8]. Indeed, XRD pattern of these poly(alkylene carbonate) specimen are characterized by strong reflections between 20 and 22.5° and by weaker reflections between 25 and 25.8°. In addition, diffraction peaks exhibited a similar location for all the measured samples, suggesting that the crystalline phase was similar for the samples and present a similar proportion of crystalline phase. However, it has to be noticed that the characteristic sharp peak that described the crystalline phase do not return to the base line which is typically due to the overlapping with the wide signal traditionally obtained with amorphous phases. This behavior is in agreement with the literature like in the case of the copolymer of PLLA-PTMC, which shows the apparition of crystalline peaks characteristic to PLLA crystallization which overlap the wide halo due to the amorphous phase of PTMC [32]. The degree of crystallinity was determined for all the tested PTMC_{NH} around 33%. The XRD results were consistent with the DSC data and can then give another proof that the assembled crystalline phase was generated by the formation of hydrogen bonds from the urethane groups.

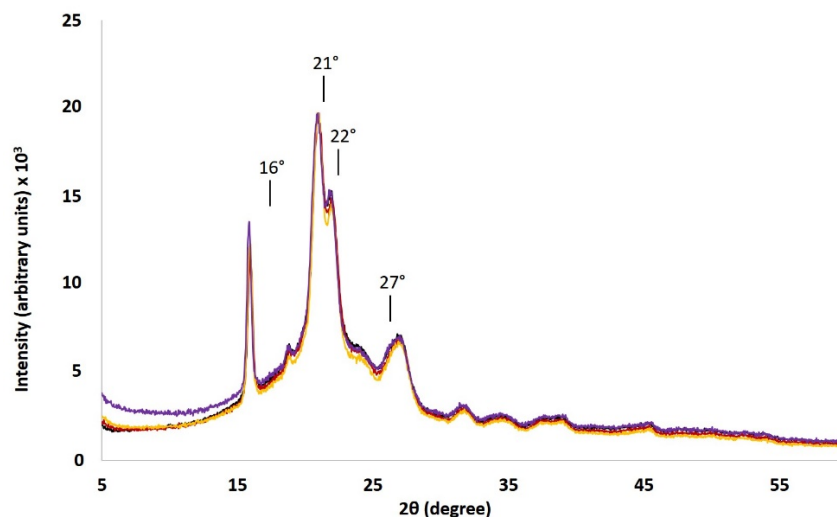


Figure 8. XRD patterns of the PTMC_{D-NH- Φ} (black) and PTMC_{D-NH} with DP_n at 100 (red), 200 (yellow) and 500 (purple).

3.5. Interest of Semi-Crystalline PTMC

To conclude, it can be noticed that the ROP-amine approach drastically modifies the properties of the raw PTMC traditionally obtained by the alcohol initiation. The capacity to melt the PTMC can lead to considerable benefit in the processability, especially where amorphous PTMC cannot be directly applied such as in extrusion process or additive manufacturing process like 3D-FDM [33]. Moreover, the urethane bonds for the primary

amine initiators have proved to generate hydrogen bonds and therefore may lead to the formation of self-assembled objects which can be promising for biomedical applications especially for the end-capped urethane obtained by amino acid initiators [25]. Furthermore, generated multiurethane bonds in the middle of the PTMC chain, using multifunctionalized amine initiators, can be used as precursors in polyaddition for the synthesis of new poly(carbonate urethane)s in order to maximize the number of urethane functions.

4. Conclusions

Herein, the first ROP-amine of trimethylene carbonate was successfully achieved and compared to ROP initiated by alcohol. The results of polymerization with $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ were better than those with TBD and MSA catalysts and similar to an alcohol initiation in terms of kinetic of polymerization and dispersity of molar mass. The efficiency of ROP-amine to produce poly(carbonate urethane)s was extended to a large platform of petro- and biobased amines. Many poly(carbonate urethane)s have semi-crystalline character even for high molar mass (DP_{500}), until now always described as amorphous, showing the importance of hydrogen bonds in crystallization process. This easy free-isocyanate route to semi-crystalline poly(carbonate urethane)s opens many perspectives to hybrid materials using amino acids or toward new industrial processes such as extrusion.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/2073-4360/13/2/280/s1>. Figure S1: ^1H NMR spectrum at 24 h in one step of PTMC with MSA (CDCl_3), Figure S2: ^1H NMR in one step of PTMC initiated by 1,6-hexanediamine with TBD (CDCl_3). Figure S3: ^1H NMR in one pot two steps of (a) propylamine, (b) crude after 6 h at 30 °C, and (c) PTMC after addition of TBD (CDCl_3). Figure S4: FT-IR spectra of PTMCD-NH and PTMCF-NH. Table S1: Thermal properties of PTMCD NH ($DP_n = 100$) after 24 h, 2 weeks, 4 weeks, and 16 weeks. Table S2: Thermal properties of PTMCF NH ($DP_n = 100$) after 2 weeks.

Author Contributions: Investigation and writing, T.B.; conceptualization, writing, and supervision, V.L., S.B.; funding acquisition, G.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the “Association Nationale Recherche Technologie” <http://www.anrt.asso.fr/fr>, and “3DMedlab” <http://www.3d-medlab.com/>.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data sharing not applicable.

Acknowledgments: Authors would like to thanks the “Balard Plateforme d’Analyses et de Caractérisation” (PAC Balard), especially Amine Geneste for technical support/assistance for the DSC measurements and Bernard Fraisse for the XRD analyses.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Vyner, M.C.; Li, A.; Amsden, B.G. The effect of poly(trimethylene carbonate) molecular weight on macrophage behavior and enzyme adsorption and conformation. *Biomaterials* **2014**, *35*, 9041–9048. [[CrossRef](#)]
2. Zhang, Z.; Zou, S.; Vancso, G.J.; Grijpma, A.D.W.; Feijen, J. Enzymatic Surface Erosion of Poly(trimethylene carbonate) Films Studied by Atomic Force Microscopy. *Biomacromolecules* **2005**, *6*, 3404–3409. [[CrossRef](#)]
3. Fukushima, K. Poly(trimethylene carbonate)-based polymers engineered for biodegradable functional biomaterials. *Biomater. Sci.* **2016**, *4*, 9–24. [[CrossRef](#)]
4. Zhang, Z.; Grijpma, D.W.; Feijen, J. Poly(trimethylene carbonate) and monomethoxy poly(ethylene glycol)-block-poly(trimethylene carbonate) nanoparticles for the controlled release of dexamethasone. *J. Control. Release* **2006**, *111*, 263–270. [[CrossRef](#)]
5. Zhao, H.; Wang, Y.L.; Peng, J.R.; Zhang, L.; Qu, Y.; Chu, B.Y.; Dong, M.L.; Tan, L.W.; Qiana, Z.Y. Biodegradable Self-Assembled Micelles Based on MPEG-PTMC Copolymers: An Ideal Drug Delivery System for Vincristine. *J. Biomed. Nanotechnol.* **2017**, *13*, 427–436. [[CrossRef](#)]

6. Blanquer, S.B.G.; Gebraad, A.W.H.; Miettinen, S.; Poot, A.A.; Grijpma, D.W.; Haimi, S.P. Differentiation of adipose stem cells seeded towards annulus fibrosus cells on a designed poly(trimethylene carbonate) scaffold prepared by stereolithography. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2016**, *11*, 2752–2762. [[CrossRef](#)]
7. Van Bochove, B.; Hannink, G.; Buma, P.; Grijpma, D.W. Preparation of Designed Poly(trimethylene carbonate) Meniscus Implants by Stereolithography: Challenges in Stereolithography. *Macromol. Biosci.* **2016**, *16*, 1853–1863. [[CrossRef](#)]
8. Pêgo, A.P.; Grijpma, D.W.; Feijen, J. Enhanced mechanical properties of 1,3-trimethylene carbonate polymers and networks. *Polymer* **2003**, *44*, 6495–6504. [[CrossRef](#)]
9. Castillo, R.V.; Fleury, G.; Navarro, C.; Couffin, A.; Bourissou, D.; Martin-Vaca, B. Impact of the architecture on the crystallization kinetics of poly(ϵ -caprolactone)/poly(trimethylene carbonate) block copolymers. *Eur. Polym. J.* **2017**, *95*, 711–727. [[CrossRef](#)]
10. Schüller-Ravoo, S.; Feijen, J.; Grijpma, D.W. Flexible, elastic and tear-resistant networks prepared by photo-crosslinking poly(trimethylene carbonate) macromers. *Acta Biomater.* **2012**, *8*, 3576–3585. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Bat, E.; Kothman, B.H.M.; Higuera, G.A.; van Blitterswijk, C.A.; Feijen, J.; Grijpma, D.W. Ultraviolet light crosslinking of poly(trimethylene carbonate) for elastomeric tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* **2010**, *31*, 8696–8705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Yang, L.; Li, J.; Li, M.; Gu, Z. The in Vitro and in Vivo Degradation of Cross-Linked Poly(trimethylene carbonate)-Based Networks. *Polymers* **2016**, *8*, 151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Zhu, K.J.; Hendren, R.W.; Jensen, K.; Pitt, C.G. Synthesis, properties, and biodegradation of poly(1,3-trimethylene carbonate). *Macromolecules* **1991**, *24*, 1736–1740. [[CrossRef](#)]
14. Takahashi, Y.; Kojima, R. Crystal structure of poly(trimethylene carbonate). *Macromolecules* **2003**, *36*, 5139–5143. [[CrossRef](#)]
15. Pêgo, A.P.; Poot, A.A.; Grijpma, D.W.; Feijen, J. Copolymers of trimethylene carbonate and ϵ -caprolactone for porous nerve guides: Synthesis and properties. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2001**, *12*, 35–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Zhang, Z.; Grijpma, D.W.; Feijen, J. Triblock Copolymers Based on 1,3-Trimethylene Carbonate and Lactide as Biodegradable Thermoplastic Elastomers. *Macromol. Chem. Phys.* **2004**, *205*, 867–875. [[CrossRef](#)]
17. Li, X.; Mignard, N.; Taha, M.; Prochazka, F.; Chen, J.; Zhang, S.; Becquart, F. Thermoreversible Supramolecular Networks from Poly(trimethylene Carbonate) Synthesized by Condensation with Triuret and Tetrauret. *Macromolecules* **2019**, *52*, 6585–6599. [[CrossRef](#)]
18. Kultys, A.; Rogulska, M.; Pikus, S.; Skrzypiec, K. The synthesis and characterization of new thermoplastic poly(carbonate-urethane) elastomers derived from HDI and aliphatic–aromatic chain extenders. *Eur. Polym. J.* **2009**, *45*, 2629–2643. [[CrossRef](#)]
19. Wang, F.; Li, Z.; Lannutti, J.L.; Wagner, W.R.; Guan, J. Synthesis, characterization and surface modification of low moduli poly(ether carbonate urethane)ureas for soft tissue engineering. *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 2901–2912. [[CrossRef](#)]
20. Zhu, R.; Wang, X.; Yang, J.; Wang, Y.; Zhang, Z.; Hou, Y.; Lin, F.; Li, Y. Influence of Hard Segments on the Thermal, Phase-Separated Morphology, Mechanical, and Biological Properties of Polycarbonate Urethanes. *Appl. Sci.* **2017**, *7*, 306. [[CrossRef](#)]
21. Ma, Z.; Hong, Y.; Nelson, D.M.; Pichamuthu, J.E.; Leeson, C.E.; Wagner, W.R. Biodegradable Polyurethane Ureas with Variable Polyester or Polycarbonate Soft Segments: Effects of Crystallinity, Molecular Weight, and Composition on Mechanical Properties. *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 3265–3274. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Bednarek, M.; Basko, M.; Biedroń, T.; Wojtczak, E.; Michalski, A. Polymerization of lactide initiated by primary amines and catalyzed by a protic acid. *Eur. Polym. J.* **2015**, *71*, 380–388. [[CrossRef](#)]
23. Kowalski, A.; Libiszowski, J.; Biela, T.; Cypryk, M.; Duda, A.; Penczek, S. Kinetics and Mechanism of Cyclic Esters Polymerization Initiated with Tin(II) Octoate. Polymerization of ϵ -Caprolactone and L,L-Lactide Co-initiated with Primary Amines. *Macromolecules* **2005**, *38*, 8170–8176. [[CrossRef](#)]
24. Clark, L.; Cushion, M.G.; Dyer, H.E.; Schwarz, A.D.; Duchateau, R.; Mountford, P. Dicationic and zwitterionic catalysts for the amine-initiated, immortal ring-opening polymerisation of *rac*-lactide: Facile synthesis of amine-terminated, highly heterotactic PLA. *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 273–275. [[CrossRef](#)]
25. Alba, A.; du Boullay, O.T.; Martin-Vaca, B.; Bourissou, D. Direct ring-opening of lactide with amines: Application to the organo-catalyzed preparation of amide end-capped PLA and to the removal of residual lactide from PLA samples. *Polym. Chem.* **2015**, *6*, 989–997. [[CrossRef](#)]
26. Toshikj, N.; Robin, J.-J.; Blanquer, S. A simple and general approach for the synthesis of biodegradable triblock copolymers by organocatalytic ROP from poly(lactide) macroinitiators. *Eur. Polym. J.* **2020**, *127*, 109599. [[CrossRef](#)]
27. Chen, S.; Liu, Y.; Li, Z.; Wang, X.; Dong, H.; Sun, H.; Yang, K.; Gebru, H.; Guo, K. H-bonding binary organocatalysis promoted amine-initiated ring-opening polymerizations of lactide from polysarcosine to diblock copolymers. *Eur. Polym. J.* **2017**, *97*, 389–396. [[CrossRef](#)]
28. Liu, J.Y.; Liu, L.J. Ring Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone Initiated by Natural Amino Acids. *Macromolecules* **2004**, *37*, 2674–2676. [[CrossRef](#)]
29. Mattia, J.; Painter, P. A Comparison of Hydrogen Bonding and Order in a Polyurethane and Poly(urethane–urea) and Their Blends with Poly(ethylene glycol). *Macromolecules* **2007**, *40*, 1546–1554. [[CrossRef](#)]
30. Chattopadhyay, D.K.; Webster, D.C. Thermal stability and flame retardancy of polyurethanes. *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34*, 1068–1133. [[CrossRef](#)]
31. Su, W.; Feng, J.; Wang, H.-F.; Zhang, X.-Z.; Zhuo, R.-X. Controllable preparation of poly(alkylene carbonate)s and observation on their structure-related odd-even effect. *Polymer* **2010**, *51*, 1010–1015. [[CrossRef](#)]

-
32. Ji, L.-J.; Lai, K.-L.; He, B.; Wang, G.; Song, L.-Q.; Wu, Y.; Gu, Z.-W. Study on poly(l-lactide-co-trimethylene carbonate): Synthesis and cell compatibility of electrospun film. *Biomed. Mater.* **2010**, *5*, 045009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 33. Geven, M.A.; Sprecher, C.; Guillaume, O.; Eglin, D.; Grijpma, D.W. Micro-porous composite scaffolds of photo-crosslinked poly(trimethylene carbonate) and nano-hydroxyapatite prepared by low-temperature extrusion-based additive manufacturing. *Polym. Adv. Technol.* **2016**, *28*, 1226–1232. [[CrossRef](#)]

Hydrogels multifonctionnels en stéréolithographie pour la reconstruction tissulaire

L'ingénierie tissulaire a connu un nouvel essor avec la fabrication additive en permettant la construction de structures sophistiquées et un contrôle de la porosité de matériaux inatteignables avec les procédés conventionnels. L'élaboration de matériaux hydrogels biofonctionnels par ces procédés de fabrication additive permet d'améliorer considérablement le comportement cellulaire. Cependant, le développement d'hydrogels en fabrication additive reste un grand défi. L'objectif de ces travaux de thèse a ainsi été de proposer de nouveaux hydrogels en stéréolithographie pour la conception de dispositifs médicaux. Afin d'élargir la gamme des hydrogels, plusieurs polymères ont été développés et adaptés au procédé de stéréolithographie avec (i) des hydrogels hybrides à base de gélatine et de poly(triméthylène carbonate), (ii) des hydrogels de synthèse de type polyoxazoline et (iii) des hydrogels thermostimulables pour l'impression 4D. La maîtrise de la polymérisation par ouverture de cycle des carbonates et des oxazolines et la fonctionnalisation de polymères naturels et de synthèse a permis de moduler les propriétés mécaniques des hydrogels allant du kPa (tissus mous) au MPa (cartilage). Plusieurs architectures complexes ont été conçues en stéréolithographie sur la base de ces différents (co)polymères. Ces objets 3D ont montré d'excellentes viabilités cellulaires dans le temps. L'ensemble de l'étude a montré des résultats très prometteurs pour l'utilisation de ces polymères en ingénierie tissulaire.

Stereolithography multifunctional hydrogels for tissue reconstruction

Additive manufacturing has given new horizons to tissue engineering, allowing the construction of sophisticated structures and controlled material porosity that was unattainable *via* conventional processes. The development of biofunctional hydrogels using these additive manufacturing processes has allowed for significant improvements in cellular behaviour. However, the elaboration of hydrogels by additive manufacturing remains truly challenging. Thus, the objective of this thesis was to propose new hydrogels by stereolithography for the design of medical devices. As to expand the range of hydrogels, several polymers were developed and adapted to stereolithography such as (i) hybrid hydrogels based on gelatin and poly(trimethylene carbonate), (ii) synthetic hydrogels of polyoxazoline and (iii) thermoresponsive hydrogels for 4D printing. The controlled ring-opening polymerization of carbonates and oxazolines combined with the functionalization of both natural and synthetic polymers, allowed for the modulation of these hydrogels' mechanical properties from kPa (soft tissues) to MPa (cartilage) scales. Based on these different (co)polymers, several complex architectures were constructed by stereolithography. These 3D objects demonstrated excellent cellular viability. This study shows highly promising results for the use of such polymers in tissue engineering.